



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas**

Transgénesis en pez cebra (*Danio rerio*) para el estudio de  
Betaglicano en el desarrollo

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Maestro en Ciencias

PRESENTA:

Alberto Ramos Morales

**TUTOR PRINCIPAL**

Dr. Fernando López Casillas  
Instituto de Fisiología Celular

**MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR**

Dra. Rosa Estela Navarro González, Instituto de Fisiología Celular  
Dr. Jesús Chimal Monroy, Instituto de Investigaciones Biomédicas

Ciudad de México. Marzo, 2018



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

“Continue, don’t only practice your art, but force your way into its secrets; it deserves that, for only art and science can raise men to the divinity.”

— Ludwig van Beethoven

Este trabajo se desarrolló en el Departamento de Biología Celular y del Desarrollo, en la División de Investigación Básica del Instituto de Fisiología Celular, bajo la tutoría del Dr. Fernando López Casillas. Durante la realización de este trabajo se contó con el apoyo económico de la beca CONACyT 741720, y de los proyectos PAPIIT-UNAM IN204916 y CONACYT 254046.

## *Dedicatoria*

A mi querida madre, Guadalupe del Carmen y a mi hermano Rafael que siempre me han apoyado y dado su amor a lo largo de mi vida. A mi tía Inés, por su cariño y la ayuda que nos ha brindado. A mi abuelita Juventina y el resto de toda mi querida familia, por su cariño y sostén en los momentos difíciles. A mis amigos con los que conviví en la maestría: Luis Ginez, Baldemar, Daniel Aguilar, Tetsuya y de forma especial a Karla Daniela con la cual compartí mucho.

# *Agradecimientos*

Al Dr. Fernando López Casillas por aceptarme en su laboratorio y permitirme trabajar en este proyecto de investigación.

A la Dra. Rosa Estela Navarro González y al Dr. Jesús Chimal Monroy miembros del Comité Tutoral, quienes contribuyeron con sus observaciones y críticas durante el desarrollo del trabajo aquí presentado.

Al Médico Cirujano Valentín Guadalupe Mendoza Rodríguez por su apoyo brindado como “Técnico Académico” del laboratorio. Por enseñarme a trabajar con la técnica de PCR y muchos otros procedimientos de biología molecular. También agradezco su valiosa amistad.

A la Biól. Lizbeth Rocio Ramírez Vidal estudiante de doctorado del laboratorio, por enseñarme a realizar las microinyecciones en los embriones del pez cebra y el manejo de los peces en el acuario.

Al Médico Veterinario y Zootecnista Gilberto Morales Villafaña

A la Dra. Laura Ongay, Guadalupe Códiz y Minerva Mora, Unidad de Biología Molecular, IFC-UNAM.

Al Dr. Fernando García Hernández, Unidad de Imagenología, IFC-UNAM

A la comunidad del IFC por brindar su apoyo en las unidades de servicio y por su enriquecedor ambiente académico.

A los miembros del Jurado de Tesis: Dra. Marina Macías, Dra. Hilda Lomelí, Dr. Enrique Pedernera, Dra. Diana Escalante y el Dr. Enrique Salas por sus valiosas observaciones y comentarios a la tesis.

Al “Programa de Apoyo a los Estudios del Posgrado” (PAEP) por el apoyo brindado para mi asistencia al VI Congreso de la Rama de Transducción de Señales de la Sociedad Mexicana de Bioquímica, llevada a cabo del 22 al 25 de octubre del 2017, Puerto Vallarta, Jalisco.

A los profesores del posgrado en Ciencias Bioquímicas, por la excelencia académica de sus clases.

Al Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas, por su excelente apoyo y orientación en todos los aspectos de la maestría, de forma especial a Leticia García y Julio Palacios, por el apoyo brindado en los trámites de ingreso y titulación en el posgrado.

# ÍNDICE

<b>Abstract</b> .....	1
<b>Resumen</b> .....	2
<b>Abreviaturas</b> .....	3
Introducción .....	4
<b>La Transgénesis como una herramienta para estudios de genética reversa</b> .....	4
<b>Transgénesis en pez cebra como modelo de estudio en genética reversa</b> .....	5
<b>El sistema Tol2 induce eficiente transgénesis en pez cebra</b> .....	6
<b>El sistema de subclonación múltiple Gateway</b> .....	8
<b>El sistema Tol2 Kit</b> .....	12
ANTECEDENTES.....	13
Hipótesis.....	20
Objetivos.....	20
Justificación.....	21
Metodología .....	21
<b>Construcción de los vectores de entrada “middle” Tol2 con los cDNAs de BG</b> ..21	
<b>Construcción de los vectores de expresión Tol2</b> .....	22
<b>Transcripción <i>in vitro</i> para obtención del mRNA de la transposasa</b> .....	22
<b>Microinyección del vector Tol2 y del mRNA de la transposasa en embriones de pez cebra</b> .....	22
<b>Observaciones con microscopía confocal de fluorescencia</b> .....	23
<b>Genotipificación de la transgénesis en la población de peces candidatos fundadores transgénicos y en su descendencia</b> .....	23
<b>Extracción de DNA genómico de la aleta caudal de peces adultos</b> .....	23
<b>Extracción de DNA genómico de embriones</b> .....	23
Resultados .....	24
<b>Construcción y purificación de los vectores TOL2 para la transgénesis de Betaglicano (BG) silvestre de rata y de sus mutantes (DT-BG y GAG-BG)</b> .....	24
<b>Estructura de los vectores TOL2 para la transgénesis de Betaglicano silvestre de rata o de sus mutantes (DT-BG, GAG-BG)</b> .....	25
<b>Inducción de transgénesis por el método de microinyección y selección de embriones microinyectados mediante fluorescencia</b> .....	27
<b>Microinyección y selección de embriones microinyectados mediante fluorescencia</b> .....	28
<b>Resumen de los peces microinyectados y seleccionados que llegaron a la etapa adulta (generación F0)</b> .....	29
<b>Fluorescencia observada en la primera generación (F1) de peces transgénicos</b> ..30	
<b>Fluorescencia observada en los embriones transgénicos (F1)</b> .....	31

<b>Análisis de la transgénesis de las diferentes versiones de Betaglicano en la generación F0 .....</b>	<b>32</b>
<b>Genotipificación y búsqueda de los peces fundadores transgénicos.....</b>	<b>34</b>
<b>Resumen de los peces fundadores transgénicos identificados por PCR.....</b>	<b>35</b>
Discusión.....	36
<b>Construcción y análisis de los vectores TOL2 para la transgénesis de Betaglicano (BG) silvestre de rata y de sus mutantes (DT-BG y GAG-BG).....</b>	<b>36</b>
<b>Selección por fluorescencia de los embriones microinyectados con los vectores Tol2.....</b>	<b>37</b>
<b>Observación de la fluorescencia en la descendencia de los peces adultos seleccionados post-microinyección.....</b>	<b>37</b>
<b>Genotipificación y hallazgo de fundadores transgénicos para la versión de BG silvestre (WT-BG) y BG mutante sin dominio citoplásmico (DT-BG).....</b>	<b>40</b>
<b>Posibles cambios metodológicos que podrían mejorar el diseño experimental del proyecto .....</b>	<b>40</b>
Conclusión .....	42
Perspectivas .....	42
Referencias.....	43

## Abstract

### Transgenesis in zebrafish (*Danio rerio*) for the study of Betaglycan in development

Betaglycan (BG) is a plasma membrane proteoglycan co-receptor of TGF- $\beta$  family ligands. BG is a protein with a transmembrane pass, its extracellular domain is modified with glycosaminoglycans (GAGs). Several TGF- $\beta$  family ligands bind to the core protein of BG while bFGF binds the glycosaminoglycan chains of BG. The BG possesses a small cytoplasmic domain which contains a motif for binding to PDZ-domain proteins. Two proteins have been identified that bind to the cytoplasmic domain of BG:  $\beta$ -arrestin and GIPC (protein GAIP-interacting protein C-terminus). A functional model for BG has recently been postulated by (Villarreal et al., 2016) that proposes that its TGF- $\beta$  presentation function is due mainly to ligand concentration effects, that facilitate the ligand binding to the TGF- $\beta$  receptor II.

BG knock-out in mouse has a lethal embryonic phenotype, with hepatic, cardiac, hematopoiesis and coronary vascularization alterations (Stenvers et al., 2003). Morpholino mediated BG knock-down in zebrafish showed also embryonic lethality and alterations in the vascular development and structure of the somites (Kamaid et al., 2015). The molecular mechanism by which BG is involved in such developmental processes is still unknown. However, interaction of cell growth factors with the Betaglycan's GAGs or the interaction of proteins with the Betaglycan's cytoplasmic domain could explain how BG participates in altered developmental processes.

We have generated transgenic fish that overexpress the wild type BG of rat, and its mutant lacking cytoplasmic region. Also we tried to generate transgenic fish lacking GAG chains. To achieve transgenic fish, we used the Tol2 kit system, based on the Tol2 transposable element (Kawakami, 2007; Kwan et al., 2007).

The transgenic fishes generated could be a biological tool to elucidate the role played by BG in zebrafish development.

**Keywords:** Betaglycan, Transgenesis, Zebrafish, Tol2 kit system, Tol2 transposable element

## Resumen

### **Transgénesis en pez cebra (*Danio rerio*) para el estudio de Betaglicano en el desarrollo**

El Betaglicano (BG) es un proteoglicano de membrana plasmática con función de co-receptor de los ligandos de la familia TGF- $\beta$ . BG es una proteína con un dominio transmembranal, y su dominio extracelular es modificado con glucosaminoglucanos (GAGs). Varios ligandos de la familia TGF- $\beta$  se unen al núcleo proteico del BG, mientras que el bFGF se une a las cadenas de glucosaminoglucanos de BG. El BG posee un pequeño dominio citoplásmico que contiene un motivo para la unión a proteínas con dominio PDZ. Se han identificado dos proteínas que se unen al dominio citoplásmico de BG:  $\beta$ -arrestina y GIPC (proteína que interactúa con la proteína C-terminal). Un modelo funcional para el BG ha sido postulado recientemente por Villarreal et al., 2016, quienes proponen que su función de presentación de TGF- $\beta$  se debe a efectos de concentración de ligando que facilitan la unión del ligando al receptor II de TGF- $\beta$ .

El knock-out de BG en el ratón tiene un fenotipo embrionario letal, con alteraciones hepáticas, cardíacas, en la hematopoyesis y en la vascularización coronaria (Stenvers et al., 2003). El knock-down de BG en pez cebra mediado por morfolino, también mostró letalidad embrionaria y alteraciones en el desarrollo vascular y en la estructura de las somitas (Kamaid et al., 2015). El mecanismo molecular por el cual el BG está implicado en tales procesos del desarrollo es todavía desconocido. Sin embargo, la interacción de factores de crecimiento celular con las cadenas GAGs de BG o la interacción de proteínas con el dominio citoplásmico del BG, quizás explique cómo el BG participa en estos procesos del desarrollo alterados.

Nosotros hemos generado peces transgénicos que sobreexpresan a la proteína BG silvestre de rata, y su mutante que carece de la región citoplásmica. También se trató de generar peces transgénicos para la mutante que carece de cadenas GAG. Para generar los peces transgénicos, se utilizó el sistema Tol2 kit, un sistema basado en el elemento transponible Tol2 (Kawakami, 2007; Kwan et al., 2007).

Los peces transgénicos generados podrían ser una herramienta biológica para elucidar el papel que tiene BG en el desarrollo del pez cebra.

**Palabras Clave:** Betaglicano, Transgénesis, Pez cebra, Sistema Tol2 kit, Elemento genético transponible Tol2

## Abreviaturas

• <b>AttB</b>	<b>Attachment B</b>
• <b>AttL</b>	<b>Attachment L</b>
• <b>BG</b>	<b>Betaglicano</b>
• <b>BMP</b>	<b>Bone morphogenetic protein</b>
• <b>CRISPR</b>	<b>Clustered regularly interspaced short palindromic repeats</b>
• <b>DT-BG</b>	<b>Betaglicano sin dominio citoplásmico</b>
• <b>EGFP</b>	<b>Enhanced green fluorescent protein</b>
• <b>FGF</b>	<b>Fibroblast growth factor</b>
• <b>GAG</b>	<b>Glucosaminoglucanos</b>
• <b>GAG-BG</b>	<b>Betaglicano sin sitios de unión a GAG</b>
• <b>GAIP</b>	<b>G Alpha Interacting Protein</b>
• <b>GIPC</b>	<b>GAIP interacting protein, C terminus</b>
• <b>hCMV</b>	<b>Human cytomegalovirus</b>
• <b>hpf</b>	<b>Horas post-fertilización</b>
• <b>IHF</b>	<b>The integration host factor</b>
• <b>nlsEGFP</b>	<b>EGFP with nuclear localization sequence</b>
• <b>Pb</b>	<b>Pares de bases</b>
• <b>IRES</b>	<b>Internal ribosome entry site</b>
• <b>PBS</b>	<b>Phosphate buffered saline</b>
• <b>PCR</b>	<b>Polymerase chain reaction</b>
• <b>PDZ</b>	<b>Dominio estructural proteico común de las proteínas: PSD95, Dlg1 y zo-1</b>
• <b>PFA</b>	<b>Paraformaldehído</b>
• <b>sCMV</b>	<b>Simian cytomegalovirus</b>
• <b>SP6</b>	<b>Promotor de Enterobacteria phage Sp6</b>
• <b>TALLEN</b>	<b>Transcription activator-like effector Nuclease</b>
• <b>TGF-β</b>	<b>Transforming growth factor beta</b>
• <b>TIRs</b>	<b>Terminal inverted repeats</b>
• <b>UTR</b>	<b>Untranslated region</b>
• <b>WT-BG</b>	<b>Betaglicano silvestre</b>
• <b>ZFN</b>	<b>Zinc-finger nuclease</b>

## Introducción

### La Transgénesis como una herramienta para estudios de genética reversa

Transgénesis es el diseño de un genotipo por la introducción estable de DNA exógeno al genoma de un organismo (Griffiths AJF, 1999; Dale and Schantz, 2002). Para que el organismo con el transgen se considere transgénico, la inserción debe darse en sus células germinales, de forma que sus descendientes hereden el transgen y lo expresen en forma estable.

Existen varios métodos para inducir la transgénesis; principalmente consisten en la microinyección de la construcción portadora del transgen en el cigoto o en el uso de vectores retrovirales que infectan a un embrión en etapas muy tempranas del desarrollo, de forma que la construcción se inserta en el genoma de las células embrionarias que darán origen a las células germinales y el organismo posteriormente heredará el transgen (Griffiths AJF, 1999; Dale and Schantz, 2002). La inyección de plásmido tiene grandes ventajas porque ofrece mayor tasa de éxito y evita introducir DNA retroviral al organismo, el cual podría modificar el fenotipo por la reactivación retroviral en etapas posteriores en el desarrollo del organismo.

La transgénesis de organismos con desarrollo interno como el de mamíferos, se puede realizar por microinyección de la construcción (plásmido) en el pronúcleo de un ovocito o por la inyección de células embrionarias transfectadas con la construcción, a otro embrión que se encuentra en etapa de blástula. Este último procedimiento genera organismos “quiméricos” de los cuales algunos pueden portar el transgen en su línea germinal (Dale and Schantz, 2002).

La transgénesis es una herramienta muy útil para los estudios de genética reversa. El abordaje genético que parte de un gen conocido, pero del cual se desconoce su función (del genotipo al fenotipo) (Huang et al., 2012; Clark, 2015). Anterior a la metodología de la transgénesis, los primeros estudios de genética se basaban en la búsqueda del gen o genes asociados con un fenotipo ya descrito (genética directa). Este último abordaje genético se basaba en la inducción de mutaciones con rayos gama o con *N-etil-N-nitrosourea (ENU)*, para obtener un fenotipo particular y después buscar el gen asociado con este fenotipo. Fue así, que a mediados de los 90's se logró una gran colección de mutantes con sus respectivos fenotipos, principalmente de organismos que comenzaban a ser modelos para el estudio genético en el desarrollo y de enfermedades humanas. Para localizar el gen o genes asociados al fenotipo, se realizaban mapeos genéticos y experimentos de clonación posicional. Sin embargo, esto conllevaba mucho tiempo y era un problema describir el origen genético del fenotipo cuando el fenotipo observado se

originaba por la acción de más de un gen mutado o por la redundancia funcional entre genes (Huang et al., 2012; Clark, 2015).

La secuenciación de los genomas de organismos modelos como: *Saccharomyces cerevisiae*, *Mus musculus*, *Rattus*, *Danio rerio* (pez cebra), *Drosophila melanogaster* y *C. elegans*, junto con la sofisticación de los métodos de clonación, facilitaron el surgimiento de otros métodos de análisis genéticos como la transgénesis, dando comienzo a la genética reversa (Clark, 2015).

### **Transgénesis en pez cebra como modelo de estudio en genética reversa**

El pez cebra o *Danio (Brachydanio) rerio*, es un pez nativo de la India que mide 2-3 cm de largo. Fue descrito por primera vez en 1822 por Francis Hamilton e introducido a Europa como un pez para mascota a principios de 1900. Su alta tasa reproductiva, su transparencia embriónica y la facilidad y bajo costo de su sustento, atrajeron el interés científico de este pez como un modelo para estudios genéticos y de biología del desarrollo en la década de 1930. Jane Marion Oppenheimer y George Streisinger formalizaron al pez cebra como un modelo en genética y biología del desarrollo, publicaron importantes trabajos con este pez como: la descripción del organizador dorsal, el iniciador del plan corporal de vertebrados y otros estudios genéticos con una gran colección de mutantes (Clark, 2015). Posteriormente cuando comenzó la ingeniería genética por inyección de DNA, el pez cebra demostró ser un excelente organismo para dichos propósitos y por tanto un modelo muy útil para estudios de genética reversa (Clark, 2015).

Las nuevas tecnologías basadas en retrovirus y transposones, también mostraron buenos resultados en pez cebra para generar mutaciones y realizar estudios de “genética directa”. Debido al potencial del pez cebra como modelo genético, a principios del 2000 se inició la secuenciación del genoma de este pez y debido a los estudios que validaban cierta equivalencia genética-fenotipo del pez cebra con el humano, se comenzó hacer estudios de enfermedades o alteraciones genéticas humanas utilizando este pez como modelo. Un ejemplo de esto fue la asociación del fenotipo humano de piel clara (una variante del albinismo) común en el norte y este de Europa, con la identificación de la mutación del gen *SLC24A5* en el pez cebra que origina el fenotipo “Golden” en el pez (Lieschke and Currie, 2007; Clark, 2015).

Un abordaje experimental muy útil en estudios de genética reversa es el knock-down genético. Este abordaje se puede realizar en pez cebra mediante morfolinós, los cuales son oligómeros de alrededor de 25 bases nucleotídicas unidas por un anillo morfolino en lugar del azúcar ribosa. Los morfolinós tienen alta afinidad por el RNA y debido a su estructura molecular no pueden ser degradados por RNAsas o DNAsas, pueden permanecer en la célula incluso después de la división celular (Bill et al., 2009). Existen

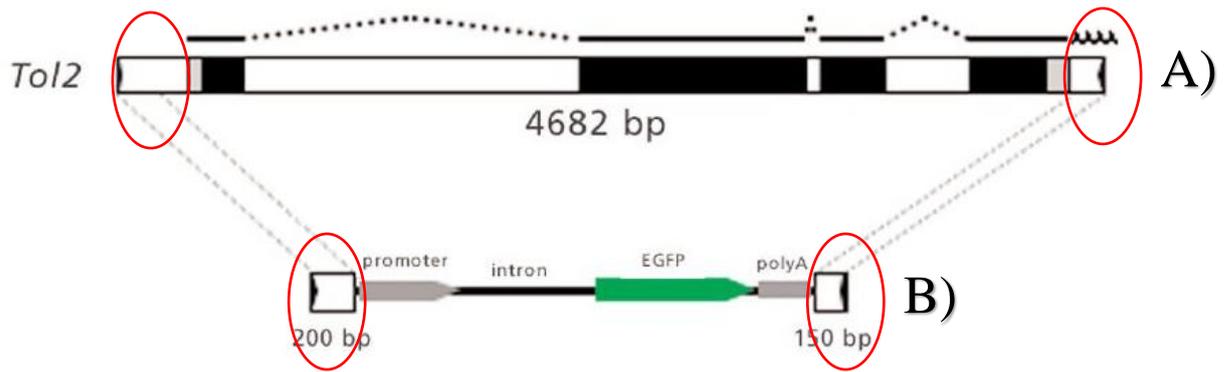
dos mecanismos para el knock-down génico mediado por morfolinós en uno de ellos se inhibe la traducción al ser secuencias complementarias a la región 5' UTR del mRNA, bloqueando la detección del sitio de inicio de la traducción. El otro mecanismo es porque el morfolino bloquea el splicing, al unirse establemente con el mRNA e inhibe el procesamiento correcto del mRNA dando origen a versiones truncadas no funcionales de la proteína (Egger and Larson, 2001; Bill et al., 2009).

Existen dos formas para administrar los morfolinós, una es por microinyección y la otra por electroporación. En el pez cebra, la administración de morfolinós para generar el knock-down génico ha sido funcionalmente demostrado (Draper et al., 2001), la administración de los morfolinós puede llevarse a cabo en el vitelo de los embriones de célula única (cigoto) (Yuan and Sun, 2009).

La microinyección en cigotos de pez cebra es el método más eficiente en este organismo para inducir transgénesis y knock-out génico. La microinyección en cigoto ha permitido el uso de transposones para generar knock-out y transgénesis en el pez cebra, como lo son el sistema Tol1, el sistema Tol2, los elementos Ac/Ds. Recientemente han surgido nuevas tecnologías para estos propósitos, como la ingeniería de endonucleasas con dominio "dedo de zinc" (endonucleasas ZFN), las nucleasas efectoras de activadores de transcripción (TALEN) y el sistema CRISPR-Cas (Foley et al., 2009; Bedell et al., 2012; Huang et al., 2012; Hwang et al., 2013).

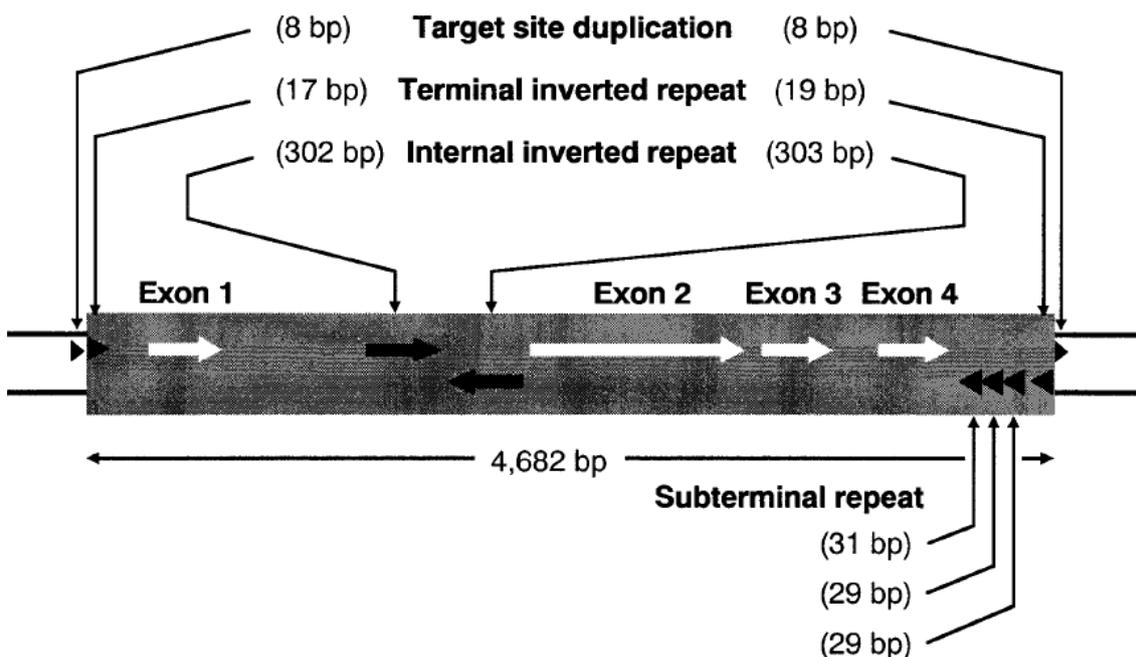
### **El sistema Tol2 induce eficiente transgénesis en pez cebra**

El elemento Tol2 es un transposon activo autónomo identificado en el genoma del pez medaka (*Oryzias latipes*). Tiene una secuencia de 4.7 kilobases y es similar al de la familia de transposones hAT (por los grupos *hobo*, *Ac* y *Tam3*); los cuales están presentes en los genomas de vertebrados, pero en forma inactiva. El elemento Tol2 posee 4 exones que codifican una proteína transposasa de 649 aminoácidos. Ésta transposasa codificada por el elemento Tol2 cataliza la transposición de todo el elemento Tol2 en un genoma huésped, mediante el reconocimiento de los extremos del elemento Tol2 y por la interacción aleatoria con una secuencia del DNA huésped (Kawakami et al., 2000). La secuencia mínima del elemento Tol2 necesaria para que ocurra la transposición, son estos dos extremos de reconocimiento del elemento; un extremo de 200 pb y otro de 150 pb, *ver figura 1*. Una secuencia de DNA de hasta 11 kb flanqueada por estos dos extremos del elemento Tol2, puede también transponerse con alta eficiencia hacia un DNA genómico huésped por la acción de esta transposasa del elemento Tol2 (Kawakami, 2007).



**Figura 1. El elemento Tol2.** En A), se observa el elemento Tol2 que mide 4682 pb; las cajas negras representan a los exones que codifican a la proteína transposasa, las cajas blancas representan a los intrones. La región marcada con puntas de flechas negras, es una región de repetidos invertidos terminales de 12 pb (TIRs). Los extremos del elemento son marcados con los círculos rojos, uno tiene una secuencia de 200 pb y el otro de 150 pb. Estas secuencias permiten el reconocimiento del elemento Tol2 por la transposasa, para que ésta medie la transposición del elemento Tol2. En B), se observa una construcción de DNA (promotor + gen) flanqueada por estos dos extremos del elemento Tol2. Esto permitirá que la construcción flanqueada sea reconocida por la transposasa y ésta lleve a cabo la inserción de la construcción en un genoma huésped, *imagen modificada de (Kawakami, 2007).*

Los extremos del elemento Tol2 se caracterizan por poseer repetidos invertidos imperfectos de 17 pb y 19 pb en ambos extremos (derecho e izquierdo), y tres repetidos más de alrededor de 30 pb localizados en uno de los extremos del elemento Tol2. El elemento también posee dos repetidos invertidos internos de aproximadamente 300 pb, *ver figura 2.*



**Figura 2. Estructura del elemento Tol2.** El elemento posee en uno de los extremos terminales (derecho), tres repetidos invertidos de  $\approx 30$  pb, continuo a este se encuentra un repetido invertido de 19 pb. En el extremo izquierdo también existe un repetido similar de 17 pb (observar la cabezas de flechas negras). En cada transposición el elemento Tol2 gana un repetido de 8 pb en cada extremo. Tol2 también posee dos repetidos internos de  $\approx 300$  pb (observar flechas negras internas). En la figura se observan los 4 exones del elemento Tol2 que codifican a la transposasa (flechas blancas internas). *Figura tomada de (Koga and Hori, 2001).*

Cuando la transposasa reconoce este conjunto de repetidos invertidos que conforman los extremos Tol2 (el extremo izquierdo de 200 pb y el extremo derecho de 150 pb); la transposasa induce un corte de doble cadena en cada límite del extremo Tol2 y posteriormente por interactuar con un DNA genómico huésped, permite la inserción del elemento Tol2 en el DNA huésped, *ver figura 1*. El mecanismo de transposición de este elemento Tol2 puede describirse como de corte y pegado. El proceso genera el incremento de 8 pb al final de cada extremo Tol2, *ver figura 2* (Koga and Hori, 2001).

Gracias a la clonación de la transposasa que codifica este elemento Tol2, y a la observación por Kawakami y colaboradores; de que cualquier secuencia de DNA flanqueada con los extremos del elemento Tol2 podía ser insertada a un genoma blanco, surgió el sistema Tol2 como una herramienta de ingeniería genética para la generación de transgénicos estables.

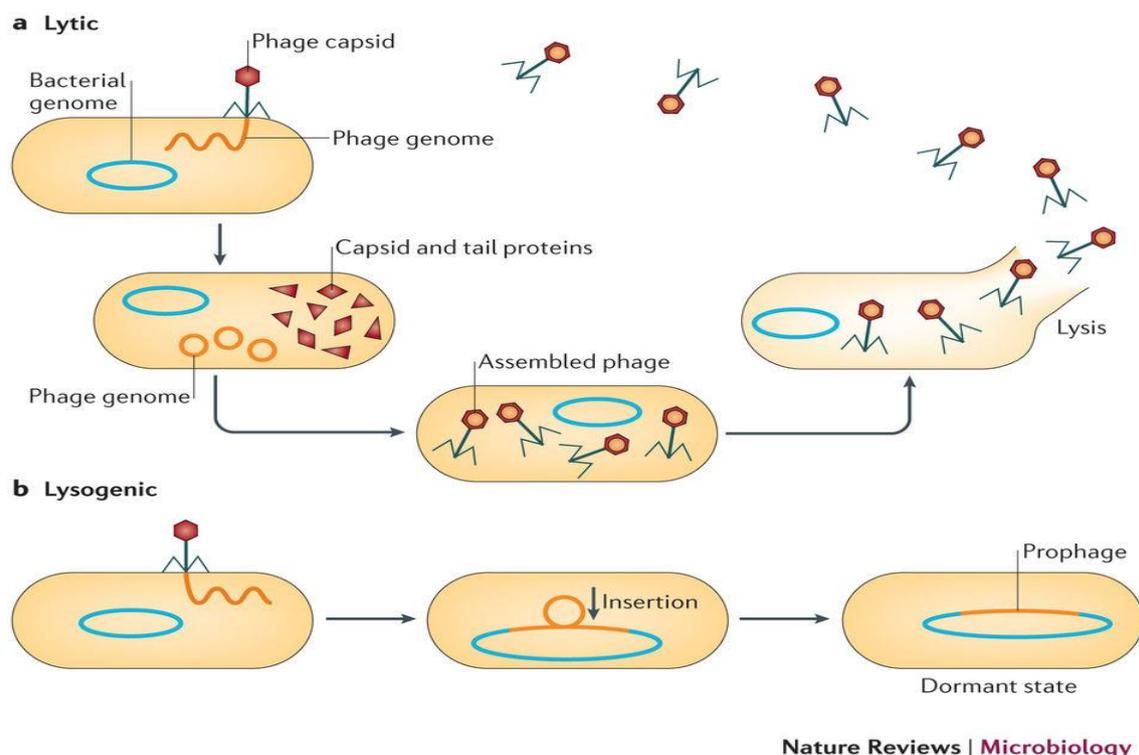
El sistema Tol2 permite generar transgénesis en rana, pez cebra, pollo, ratón y humano. En el pez cebra, el sistema Tol2 induce transgénesis en línea germinal entre el (50-70) % de los peces microinyectados, usando vectores Tol2 y el mRNA de la transposasa para que medie la inserción de un transgen a un genoma huésped. La microinyección de un vector de expresión sin los extremos Tol2, genera transgénesis en línea germinal sólo en 5% de los peces microinyectados (Kawakami, 2007). Para utilizar el sistema Tol2 en el pez cebra, debe realizarse microinyecciones en los cigotos de los peces, microinyectando el vector de expresión Tol2 con la construcción de interés más el mRNA de la transposasa Tol2 (Kawakami and Shima, 1999; Kawakami, 2007).

Gracias al elemento Tol2 es posible insertar DNA, flanqueado por los extremos del elemento Tol2, en un DNA genómico blanco. La generación de complejas construcciones de DNA flanqueadas con los extremos Tol2 son construidas usando el sistema de subclonación Gateway.

### **El sistema de subclonación múltiple Gateway**

El sistema Gateway está basado en el sistema de recombinación del bacteriófago lambda ( $\lambda$ ). Este sistema de recombinación permite la integración del genoma del virus en el

genoma de la bacteria huésped, este proceso es parte del ciclo lisogénico del virus (Hartley et al., 2000), *ver figura 3*. La integración del genoma viral en el genoma bacteriano depende de una secuencia de recombinación de 232 pb que posee el virus  $\lambda$  y de una secuencia presente en *E. Coli* de 21 pb. Ambas secuencias comparten una secuencia núcleo idéntica de 7 pb. Esta secuencia núcleo en el virus  $\lambda$  está flanqueada por una secuencia a la derecha de 143 pb y por otra a la izquierda de 82 pb, las cuales son llamadas secuencias “P”. La secuencia completa del virus  $\lambda$  (secuencia núcleo más las dos secuencias laterales) es denominada “attP” por (Phage). La secuencia núcleo de *E. Coli* está flanqueada por dos brazos de 7 pb cada uno, las cuales son denominadas “secuencias B”, la secuencia completa que incluye al núcleo y las dos secuencias laterales se denomina “attB” por (Bacterial) (Katzen, 2007).



**Figura 3. Ciclo lítico-lisogénico del bacteriofago  $\lambda$ .**

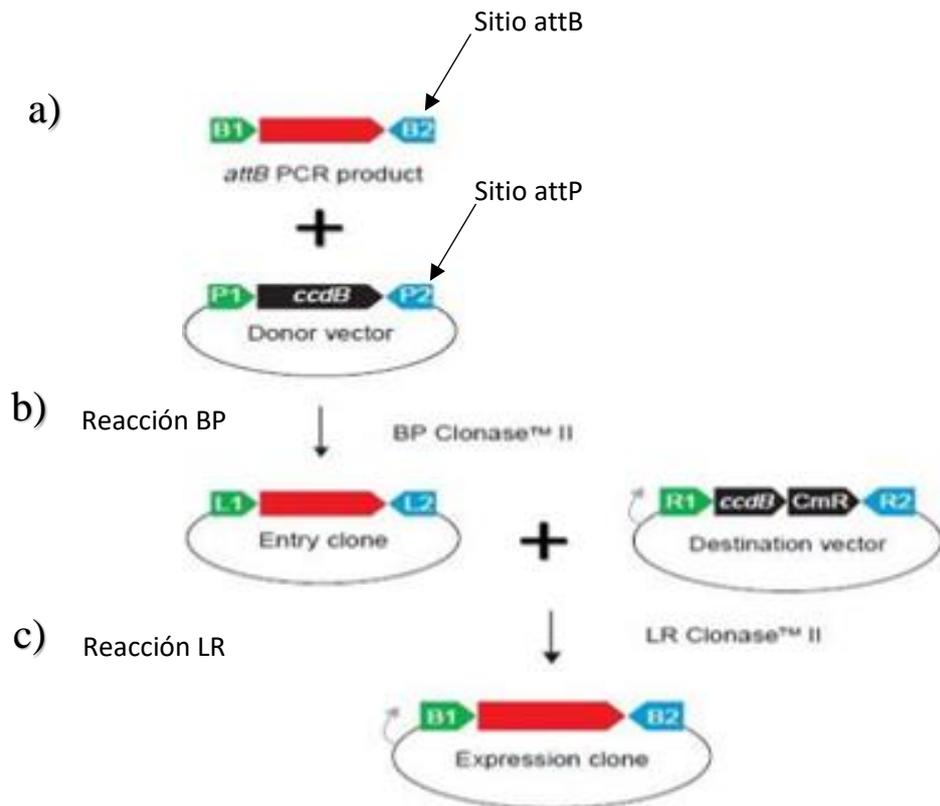
En a), se representa la fase lítica del bacteriofago lambda, el genoma del fago entra al interior de la bacteria huésped para mediar la replicación de los componentes de los viriones que posteriormente lisarán la célula para ser liberados. En b), se representa la fase lisogénica en la cual el genoma del fago se inserta en el genoma de la bacteria huésped, para dar origen al estado de profago. En la inserción participan las proteínas; el factor de integración al hospedero (IHF) e integrasa, las cuales usan los sitios de recombinación del fago (sitios attP) y de la bacteria huésped (attB) para mediar la inserción del genoma viral en el genoma bacteriano, los genes para la fase lítica son reprimidos. Bajo ciertas condiciones de estrés celular entre ellas daño al DNA, se puede dar la reactivación de la fase lítica en el profago que promueven la expresión de las proteínas de la fase lítica, como la excisionasa que permite liberar el profago del genoma huésped, *modificado de (Feiner et al., 2015)*.

El virus  $\lambda$  codifica 3 proteínas que procesan la recombinación; la integrasa, el factor de integración al hospedero (IHF) y la excisionasa. Cuando el virus  $\lambda$  entra a su fase lisogénica; la integrasa y la proteína IHF se unen a la secuencia attP del virus y al interactuar con la secuencia attB en el genoma de la bacteria, producen la integración del genoma viral en el genoma bacteriano. La recombinación de attB con attP mediado por la integrasa y la proteína IHF es denominada reacción BP. La recombinación genera sitios “att híbridos” denominados “attL” y “attR” (Hartley et al., 2000; Katzen, 2007).

Cuando se activa la fase lítica del virus  $\lambda$ , se expresa la proteína excisionasa que procesa la exclusión del genoma del virus  $\lambda$ , desde el genoma bacteriano. En la reacción de recombinación de los sitios attL con attR participan la integrasa, IHF y la excisionasa, la reacción es denominada LR. En la reacción LR, los sitios att se reestablecen a sitios attB y attP (Katzen, 2007).

El sistema Gateway mediante las reacciones BP y LR, y gracias a la alta especificidad de los diferentes sitios de recombinación; permite la transferencia rápida de construcciones a vectores “de entrada” (entry vectors). Posteriormente, estos vectores de entrada permiten la transferencia de las construcciones a una gama amplia de vectores destino como puede ser un vector de expresión Tol2, *ver figura 4*. El sistema Gateway además permite construir vectores con más de un inserto en un orden específico, hasta 4 insertos diferentes en un solo vector destino, en tan sólo un evento de reacción. Este sistema además, evita problemas como la pérdida del marco de lectura, común en la subclonación génica por los múltiples eventos de subclonación (Katzen, 2007). Gracias a que cada evento de recombinación entre los diferentes sitios “att” es mediado por las mismas enzimas (Integrasa, IHF y excisionasa), se evita la necesidad de utilizar una gran cantidad de enzimas de restricción para las múltiples subclonaciones.

La gran capacidad del sistema Gateway para ensamblar ordenadamente varios fragmentos de DNA (provenientes de entry clones) en un vector destino, ha sido explotada para crear el sistema Tol2 kit.



**Figura 4. El Sistema Gateway.**

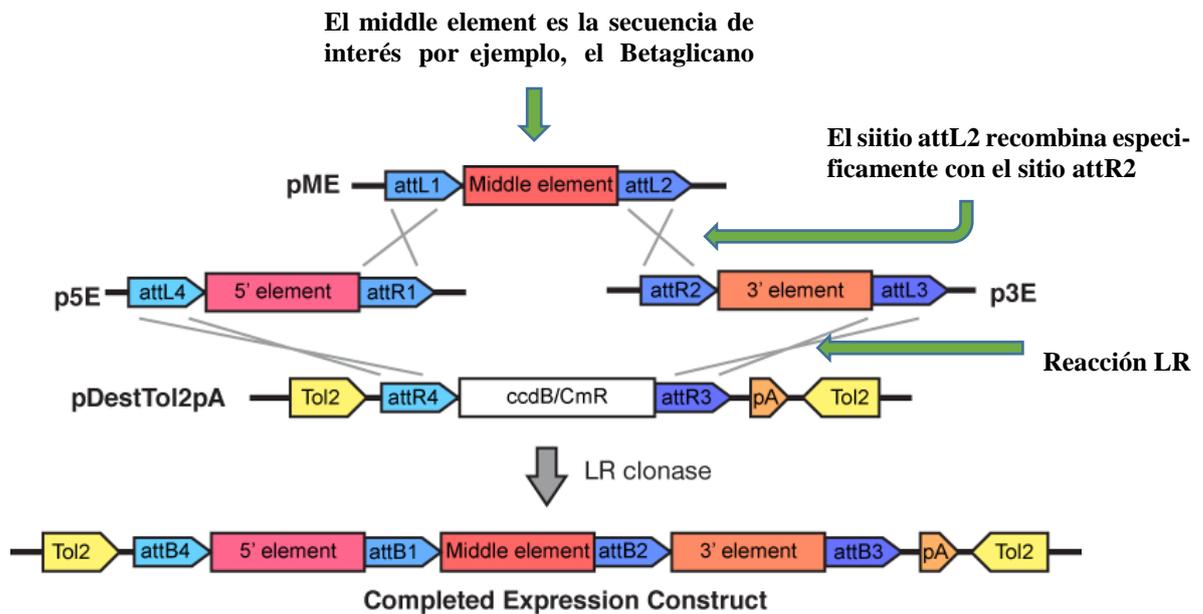
Para poder utilizar el sistema de subclonación Gateway es necesario primero flanquear la secuencia de interés con dos sitios *attB*, los cuales pueden ser agregados por PCR. En **a)**, se observa una secuencia de DNA (flecha roja) flanqueada por dos sitios *attB* diferentes, *attB1* y *attB2*. Se observa también a un vector donante (donor vector) el cual contiene dos sitios *attP* compatibles para recombinarse con los sitios *attB1* y *attB2*. La secuencia *ccdB* (flecha negra) codifica un gen letal para permitir la selección negativa de la subclonación en el vector donante. En **b)**, se observa la subclonación de la secuencia de interés hacia el vector donante mediante la reacción de recombinación BP, en esta reacción se usa la mezcla de enzimas denominada BP clonasa II, mezcla que incluye a la enzima integrasa y a la enzima IHF. Después de la reacción de recombinación BP, se genera un vector de entrada (entry clone) que contiene la secuencia subclonada flanqueada por dos sitios *attL*, sitios que se generaron por la hibridación de los sitios *attB* con los sitios *attP* durante la reacción BP. En **c)**, se describe la reacción de recombinación llamada LR, que es realizada por la mezcla de enzimas LR clonasa II (mezcla de las enzimas Integrasa, IHF y excisionasa). En esta reacción el vector de entrada es combinado con un vector destino (Destination vector), el cual puede ser un vector de expresión que contiene dos sitios *attR*, para generar la subclonación de la secuencia de interés (flecha roja) en un vector de expresión. El nuevo vector de expresión contendrá ahora dos sitios *attB* que se restituyeron por la combinación de los sitios *attL* y *attR* en la reacción LR. Estas sucesivas reacciones de recombinación del sistema Gateway permite generar múltiples subclonaciones utilizando las mismas mezclas de enzimas, con la ventaja de obtener subclonaciones exitosas gracias al uso de diferentes sitios *att* que dan especificidad durante las recombinaciones, *Modificado de (Katzen, 2007)*.

## **El sistema Tol2 Kit**

El sistema Tol2 kit es una colección de vectores de entrada generados para usarse con la tecnología de multiclونación Gateway (clonación por recombinación específica). Este sistema Tol2 kit permite el ensamble de construcciones complejas en un vector de expresión destino que posee los sitios de recombinación del elemento Tol2, generando una construcción capaz de insertarse en un DNA genómico blanco. Para ello se necesita también la actividad de la proteína transposasa codificada por el elemento Tol2 (Kawakami, 2007; Kwan et al., 2007).

Este sistema fue generado por los laboratorios de Kawakami y Chi-Bin Chien. En la colección de vectores del sistema Tol2 kit, hay vectores que poseen elementos reguladores de la transcripción como los promotores hsp70, el promotor para beta-actina, el promotor de CMV y el de la histona 2A-X. También hay vectores de entrada con proteínas fluorescentes reporteras como GFP y mCherry. Vectores que poseen la señal de polyA, la secuencia para la fusión del epítipo de myc y de proteínas fluorescentes con la secuencia de reconocimiento a ribosoma tipo IRES (para la generación de construcciones bi-cistrónicas) (Kwan et al., 2007). Todos estos vectores de entrada se hicieron con la finalidad de que pudieran ser combinados para generar una gran diversidad de vectores de expresión con los extremos Tol2.

La generación de un vector Tol2 con el Tol2 kit, se basa en el ensamble de 3 vectores de entrada en un solo vector destino que posee las secuencias extremo para la transposición del elemento Tol2, *ver figura 5*. Estos vectores de expresión Tol2 se caracterizan por contener una estructura de tres elementos; un componente 5' que contiene un elemento regulador de la transcripción como un promotor transcripcional, un componente intermedio "middle element" que codifica la secuencia de interés a insertar en el genoma de un organismo (ej. transgen) y al final un componente 3' que puede contener una secuencia codificante de la poly-A o de un IRES fusionado con una proteína fluorescente reportera para generar mRNAs bicistrónicas. Estos tres elementos del vector están flanqueados por dos sitios de recombinación del elemento Tol2, uno a cada extremo; permitiendo que la construcción pueda ser insertada en el genoma de la célula huésped por un mecanismo de transposición (Chien, 2016).



**Figura 5. Construcción de un vector de expresión Tol2 para generar transgénesis.** El vector de expresión Tol2 se construye por el ensamble de 3 vectores de entrada; un vector de entrada origina la región 5', al poseer una secuencia reguladora (5'element), el segundo vector inserta la secuencia del gen de interés por ejemplo, el gen de Betaglicano, y el tercer vector de entrada genera la región 3' de la construcción (3'element), este último vector puede insertar un marcador un gen reportero, como una proteína fluorescente. Para la subclonación, de los 3 vectores de entrada en un solo vector destino, los 3 vectores de entrada son añadidos junto con el vector destino portador de los extremos Tol2 (pDestTOL2pA) a una mezcla de reacción donde se añade también la mezcla de enzimas denominada (LR clonasa II) que contiene las enzimas: Integrasa, IHF y excisionasa. Estas enzimas catalizan la recombinación de los 4 vectores y al final de la reacción se genera un vector de expresión Tol2 con la construcción de interés con los 3 elementos elementos deseados. La secuencia *ccdB* codifica para una toxina contra la DNA Gyrase que es letal en *E. coli*, el intercambio de la secuencia *ccdB* por el middle element constituye un método de selección positiva, *modificado de (Kwan et al., 2007).*

## ANTECEDENTES

### Betaglicano y la superfamilia de TGF- $\beta$

La superfamilia del factor de crecimiento transformante beta (TGF- $\beta$ ) la constituyen los factores de crecimiento transformante beta (TGF- $\beta$  1, 2 y 3), la Activina, la subfamilia Nodal, las proteínas morfogénicas de hueso (BMPs), el factor de crecimiento y diferenciación (GDF) y la sustancia inhibitoria Müleriana (MIS) (Shi and Massague, 2003; Weiss and Attisano, 2013).

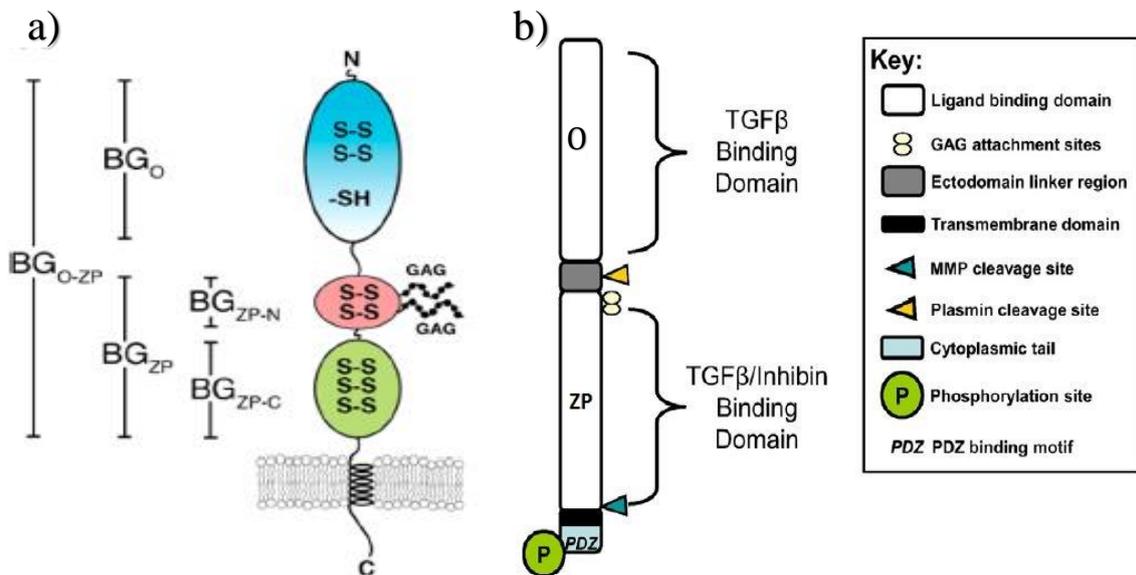
La vía de señalización celular del factor de crecimiento transformante beta (TGF- $\beta$ ) y de varios otros integrantes de la superfamilia, regulan diversos procesos celulares como la proliferación, muerte y diferenciación celular y la migración celular, así como varios procesos embriogénicos (Wu and Hill, 2009). Existen dos receptores canónicos para los ligandos TGF- $\beta$ : el receptor tipo I (TGF $\beta$ RI) y el receptor tipo II (TGF $\beta$ R2) a los cuales se suman otros dos que suelen ser considerados como co-receptores; el Betaglicano o también llamado receptor tipo III de TGF- $\beta$  (TGF $\beta$ RIII) y la Endogлина (Shi and Massague, 2003).

El Betaglicano (BG) es un proteoglicano con localización en la membrana plasmática. Se une con alta afinidad a ligandos de TGF- $\beta$ , principalmente a TGF- $\beta$ 2. La unión del BG con el ligando favorece la unión de TGF- $\beta$  al receptor II de TGF- $\beta$  y se ha visto que es imprescindible para la eficiente activación de la señalización inducida por la isoforma TGF- $\beta$ 2. Dicha interacción del ligando con el Betaglicano induce la formación de un complejo ternario con el receptor II de TGF- $\beta$ , induciendo a su vez, el reclutamiento del receptor tipo I de TGF- $\beta$ . El TGF- $\beta$ R2 fosforila en múltiples residuos de serina y treonina a TGF- $\beta$ RI, induciendo la activación de éste receptor y favoreciendo la unión de este receptor con Smad2, que lleva a la activación de la señalización mediada por Smads (Shi and Massague, 2003).

El Betaglicano tiene una secuencia de 853 aminoácidos, posee una región extracelular con sitios de unión a glucosaminoglucanos (GAGs), una región transmembranal y una pequeña región citoplásmica (Lopezcasillas et al., 1991). La región extracelular de Betaglicano está constituida por dos dominios, el dominio O (orphan domain) y el dominio ZP (por la similitud con el de proteínas de la zona pelúcida) (Villarreal et al., 2016). Ambos dominios extracelulares del Betaglicano tienen unión a ligandos de la superfamilia de TGF- $\beta$ : TGF- $\beta$  1/2/3, BMP 2/4/7 y GDF-5 (Lopez-Casillas et al., 1994; Pepin et al., 1994; Kirkbride et al., 2008; Lin et al., 2011) . Sin embargo, el dominio ZP además puede unir inhibina (Lewis et al., 2000; Esparza-Lopez et al., 2001; Wiater et al., 2006). El dominio O y el ZP están unidos por una secuencia de aproximadamente 50 aminoácidos (región linker), que es blanco de enzimas proteolíticas (Mendoza et al., 2009).

Existe una forma soluble de Betaglicano que contiene solo la región extracelular con los dominios ZP y O. Esta forma soluble se genera por “shedding” mediado por proteasas (Velasco-Loyden et al., 2004). Esta versión soluble posee una función contraria al Betaglicano completo, ya que funciona como un antagonista de TGF- $\beta$  (Lopez-Casillas et al., 1994).

Los dos sitios de unión a glucosaminoglicanos en el Betaglicano de rata están localizados en las serinas (535 y 546) del dominio ZP y los principales tipos de GAGs que se unen son heparán sulfato y condroitin sulfato (Lopez-Casillas et al., 1994). Estos GAGs no son necesarios para la unión de TGF- $\beta$  a Betaglicano. Sin embargo, puede unirse a otros factores de crecimiento como el factor de crecimiento de fibroblastos básico (Andres et al., 1992).



**Figura 6. Estructura del Betaglicano.** En a), Se aprecia un diagrama esquemático de los dominios estructurales del Betaglicano. El dominio Orphan en el extremo N-terminal y la región citoplásmica en el extremo carboxilo terminal. Las cadenas de glucosaminoglicanos (GAG) en el subdominio ZP-N y la localización de los puentes disulfuro (S-S), así como de las cisteínas libres (-SH), tomado de (Villarreal et al., 2016). En b), se observa un esquema representativo de los dominios de Betaglicano para la interacción con ligandos de la superfamilia de TGF- $\beta$  (subdominios O y ZP), la corta región citoplásmica que tiene un motivo para la unión de proteínas con dominio PDZ, los sitios de corte proteolítico en la región linker y el corte que origina la versión soluble de Betaglicano), modificado de (Bilandzic and Stenvers, 2012; Dale and Schantz, 2002)

En la corta región citosólica del Betaglicano, en los tres últimos residuos de aminoácidos hay un motivo para unión con proteínas que poseen el dominio PDZ, Ver figura 6. Hasta ahora se han identificado pocas proteínas que interactúen con la región citoplásmica del Betaglicano algunas de éstas son; la proteína  $\beta$ -arrestin2 y la proteína GIPC, ésta última interactúa con BG a través de su dominio PDZ (J. Biol. Chem. 276:39608, 2001). La proteína  $\beta$ -arrestin2 induce la internalización del complejo Betaglicano-TGF- $\beta$ RII, que inhibe la señalización de TGF- $\beta$ , este proceso puede constituir un mecanismo de regulación de la vía de TGF- $\beta$  (Chen et al., 2003).

La compleja estructura proteica del Betaglicano (BG) junto con su gran número de ligandos, hace difícil discernir la función del Betaglicano *in vivo*. Además, al igual que el resto de receptores de la superfamilia de TGF- $\beta$ , las posibles funciones del BG pueden ser dependientes del tipo celular y del contexto celular.

El Betaglicano es el co-receptor de la superfamilia de TGF- $\beta$  más abundante en la superficie celular en muchos tipos celulares (Massague, 1990), algunos tipos celulares donde se ha caracterizado la expresión y una función del BG son las células granulosas, las células de Sertoli y las de Leydig. También en la glándula pituitaria y en la glándula suprarrenal se ha caracterizado que se expresa BG. La función del Betaglicano en estos tejidos y tipos celulares está vinculada con su unión a inhibina la cual regula la secreción de la hormona folículo estimulante (hormona necesaria para la foliculogénesis y la esteroidogénesis), así como en la diferenciación de las células granulosas. El grupo de Vale demostró claramente que el BG es el receptor funcional de la inhibina y es indispensable para los efectos anti-activina por parte de la inhibina (Wiater et al., 2009). Se ha observado que las células cancerosas disminuyen o pierden la expresión del BG a nivel de mRNA o de proteína, y que este hecho favorece la progresión tumoral al potenciarse el crecimiento del tumor y la migración de las células cancerosas, revisado en (Bilandzic and Stenvers, 2012).

Otra función del BG observada es la de constituir una forma de regulación de la señalización de TGF- $\beta$ , ya que la internalización del BG en la célula se da en forma de complejo con los receptores I y II de TGF- $\beta$ . La regulación del Betaglicano en la membrana celular puede ser mediada por la internalización dependiente de clatrina y/o de caveolina (Finger et al., 2008; McLean and Di Guglielmo, 2010).

Las funciones asociadas al BG se pensaban que todas derivaban de su capacidad de unión a los diferentes ligandos de la superfamilia de TGF- $\beta$  y se creía que el BG era sólo un receptor accesorio. Sin embargo, esta perspectiva cambio cuando se generaron los primeros animales knock-out para BG. Se observó que la abolición del Betaglicano por knock-out génico en ratón fue letal en etapas tempranas del desarrollo y se encontró un fenotipo con proliferación celular anómala en corazón, con apoptosis anómala en hígado y con aberraciones en la vascularización de los vasos coronarios (Stenvers et al., 2003; Compton et al., 2007). En el laboratorio también se investigó que función podría tener el BG en el desarrollo utilizando al pez cebra como modelo. Se observó que la abolición del BG en pez cebra mediante la administración de morfolino también es letal en etapas tempranas del desarrollo y que se genera una aberrante vascularización del plexo caudal venoso y de los vasos intersegmentales. Se observó también, que la co-administración del mRNA del Betaglicano de rata, indujo un rescate fenotípico normal en los embriones tratados con morfolino (Kamaid et al., 2015).

Otras observaciones que se hicieron en el morfante del Betaglicano del pez cebra, fue que hay una posible participación no celular autónomo del BG en el desarrollo del plexo caudal venoso y de los vasos intersegmentales que dan origen al sistema arterial, es decir que es el tejido circundante a los vasos sanguíneos y no las células endoteliales, quien expresa el BG y permite la función del BG en la vascularización y la angiogénesis (Kamaid et al., 2015). El Betaglicano puede participar en el desarrollo vascular independientemente de la función que tiene la Endogлина en el desarrollo vascular, proteína que sí es expresada en el endotelio (Li et al., 1999; Arthur et al., 2000; Bautch, 2017). Interesantemente, en el morfante para BG también se encontró que el BG tiene un papel relevante en el desarrollo de las somitas y del tejido muscular, pues la deficiencia del BG generó una morfología anormal de somitas y la desorganización de la actina en las miofibras (Kamaid et al., 2015).

En el laboratorio se clonó el Betaglicano del pez cebra, y se determinó que el BG del pez cebra contiene 63% de similitud y un 46% de identidad de aminoácidos con el Betaglicano de otros vertebrados. Se caracterizó que la región citoplásmica del BG del pez cebra posee una identidad de aminoácidos del 76-83% con otros vertebrados (Kamaid et al., 2015), *ver figura 7*. Se halló también que el Betaglicano del pez cebra contiene sólo un sitio de unión a cadenas GAGs; la serina 522 que correspondería a la serina 535 en rata. El único tipo de cadena GAG que porta el Betaglicano del pez cebra por tanto, es el heparán sulfato, (Kamaid et al., 2015). ¿Podría ser que la pérdida de este GAG de BG sea la clave para explicar porque la pérdida del BG genera aberrante vascularización en pez cebra y de los vasos coronarios en ratón?. Se sabe que proteínas cruciales en la angiogénesis como el factor de crecimiento endotelial vascular VEGF, interactúan con cadenas GAGs de heparán sulfato.

Recientemente se ha caracterizado el papel que tienen las cadenas GAGs en el desarrollo, principalmente de las GAGs de heparán sulfato. Estos glucosaminoglucanos definen gran parte de la función de los proteoglicanos. Se sabe que los proteoglicanos con heparán sulfato están involucrados en la generación y regulación de los centros organizadores de los patrones corporales en el desarrollo, por ejemplo, del patrón izquierdo/derecho (Poulain and Yost, 2015). Estos proteoglicanos con GAGs permiten la generación de los gradientes de concentración de una amplia gama de morfógenos (Poulain and Yost, 2015). El principal mecanismo funcional de estos proteoglicanos de heparán sulfato es que potencian las señalizaciones celulares ya sea por favorecer la presentación de los ligandos con los receptores, por activar la señalización de forma directa (en el caso de proteoglicanos con actividad de cinasa), incrementan la concentración del ligando hacia el receptor, regulan el tráfico de los receptores al interior celular (tráfico endocítico), son

vehículos para la secreción de los ligandos durante la exocitosis y finalmente crean reservorios de los ligandos en la matriz extracelular (Poulain and Yost, 2015).

zebra fish	MWLTAHIHPSAILLTLLSSLASAGPLSRSPCELLPVGVGHPVQAMLSFTALSGCASRGTTSHQPQVHIIINLRKGSQAQA	80
chicken	M--SSSCVTPVP-A MILCF D VPRSE V S NSS H LLE V GL Q VL R-NPDR L	76
pig	M-- L CVVALF-A IS C T EPGVQ A S NAS Q LME V MGR Q VL R-AAD P	76
human	M-- S YVIAIF-A MSFC T EPGAL E S SAS Q LME V GL Q VL --ALR P	75
rat	MAV S HMVPMVV MSAC T EPSTR E S INAS Q LME V GL R VL R-STD P	79
mouse	MAV S HMVVFV-V MSAC T EPSTR E S ISAS Q LME V GL R IL R-STD L	78
zebra fish	REKTAEVAHLRPIQSLHVHQKPLVFFILNSPQIPILWKVRETEKLAGVQKRIPIHVVEGSEVHFEVGNFSSCEVKVETLPHQ	160
chicken	DHHER T T S V I L L LV LK R P IR V F SS I W K L A TEKNP ER	156
pig	GQRQS T N S V I H V L LV HLK R V S L L S V SS L A TEERNP	156
human	GQLQR T N S V I H SV L H LV HLK R T S L L S V Q SSA LTA TEERNP	155
rat	GQROR T N A V T H I L LV HLK R A P L L S V Q PS LTA TEERNP QR	159
mouse	GQPQR T N A V T H V L LV H K R A P L L S V Q SS LTA TEERSP QR	158
zebra fish	NEHLLNWAHHRYTAVTSFSLRMAHDIVIKVGEDPVFSSTCKIDNKFLSLNYLASYIEFPQSTGCVLSGPDHRQEVHIE	240
chicken	Q QKE G T KISR N Q PP N EKN G LQ KR E LM MLVQ R	236
pig	RKE G T KI RN Q PP S GKN E LQ K E V RPO K	236
human	RKE G T KI RN Q PPK N GKN E LQ KA E M SQPQNE	235
rat	R QKE G T KI RN Q PP N GKN E LQ KA E PSQP K	239
mouse	H QKE G T KI RN Q PP N GKN E LQ KA E ASQP K	238
zebra fish	LQAPNSS--SAFQVDVVDLRPLDGDILPHRDVVLKCKEKS NVWVIAKHKVMGKLEIMTSDTVLSSEDERLQMVSQKTV	318
chicken	IT NPY I IK SQFGAK E N I K S D Q VI NSIGFGKE S TM S	316
pig	I NPY I I I SRK PE VKMLI I K SPD K N KVLAPNSIGFGRES S IMT S	316
human	IT NPY ITI I SQE LEVVKMLI I K SPD K S K IAPNSIGFGKES S TMT SI	315
rat	IT S NPY I I I AQR PEVVKML I K SPD K N KVIAPNSIGFGKES S TMT L	319
mouse	IS NPY T I I I ARE PEVVKML I K SPD K N KVIAPDSIGFGKES S T T L	318
zebra fish	KQKLPAGSQALIQWAEENGFPNVTSYTNTFPVANHFMLRLREQVSDVGIMDEGMLPFPFSILRNINPLPKPS----ARDAPP	394
chicken	IPDI SSHES K Y HKYS KA R H Q EHTEEMNDREEDHSLP ELTE LHGAKN AL	386
pig	RDDI STQEK LR LD YS VA R H ENNEEMRDEEVHTIP ELQ LDPGA VLDHPSPGEG AR	396
human	RDDI STQEN VK LD YS I MA IV H ENNEEMRDEEVHTIP ELR LDPGA ALQNPPIRGGEGQ	395
rat	RDDI STQEN ME LD YR MA E H ENNEEMRDEEVHTIP ELR LDPDHP ALDNPLFPFGES	399
mouse	RNDY STQEN MK LD YS IA R H ENNEEMRDEEVHTIP ELR LGPDH ALDSPPFQGE-I	397
zebra fish	RNGFPFPFLEMDO-----DQSF-----PLMP-HEDSVFLAGGPEEHOGSADVGFNVQCEKNMNVVSIKETLQAN	460
chicken	-D LT -HINRGGHETGGGI SRDSVDT INHDFEH LSKHKE V A ALSIK DDKV T AV DS S	464
pig	HG L PYIPRRQRDGGKDR L RPK DPV S -IQLFPQRE Q A R ALS R DSE L AV DSP S	472
human	NG L PDISRRVNEEGEDGL RPK DPVI S -IQLFPQRE V V IALS K DNE I AV DSP S	471
rat	NG L PDIPRRGWKE GEDRI RPK QPIV S -VQLLPDHR E V GV IALS K DHE AVD DSP TN	474
mouse	NG PDIPRRGWKE GEDRI RPK EPII R -VQLLPDHR E V GVNIALS K DNE AVD DSP TN	472
zebra fish	GFGKPNITLQDSQCKATSNATHYILETPLSGCQTSKIPSHSPVVLVYINAVISQSEQKDGSGWPFVDEDEMFGEVLLPG	540
chicken	YTRTELS L HS RM G F SLPNK G RTS-YILDKI YFN-S QL SPAB SFDD--D S DNGF	540
pig	YPLGEL L PT KT G F S D G RHRR A DG Y N-S QAPPSG S DGY L S DNGF	551
human	YSGMDV L PT KM G FV S N G RPRR ALDG Y N-S QVPALG S DGY L S DNGF	550
rat	YSGMEL L PS KM G FV S N G RHRR T DG Y N-S VQAPSPG S DGY L S DNGF	553
mouse	YSGMEL L PS KM G FV S N G RPRR A DG Y N-S VQAPSPG S DGY L S DNGF	551
zebra fish	DALPELTERILPVNGHATILFNCTYRKNQDSPFDDTAGSDDFLVDSTANVTENMELYNHFPQFNPSQPFITVTENRPVF	620
chicken	D---- GDVTFSNWP-E A LHQPEKDF NPAMFWP--PEPHIT KTELPLAP GLPS A G IY	613
pig	VD---- GDVALSRPELVV SL PAR---HPSRAG---DPP R S D TIDLPLAFA GVPS A GH Y	619
human	MD---- GDASLFRPEIVV SLQQVR---NPSSFQ----EQPHG I TDLFLVP GVPS P GH Y	618
rat	GD---- GETAPLSRAGVVV SL QLR---NPSGFQ----GQLDG A TDLFLVP GVPS A EH Y	621
mouse	TD---- GETAPLSRAGVVV SL QLR---SPSGFQ----DQLDG A TDLFLVP GVPS A EH Y	619
zebra fish	VEIAATEADPNLGMFIQTCFISPDSPAVQSEYVVIENICPKDDSVVYYP-QRGDFPIPHAQMDKKRFSPTYRSKFNVS L	699
chicken	VSV IS A V F DRM D TI E KF STEKLN A K VFKPI I	693
pig	VSV QE A Y DRM D TI E KF DPK VH Q BT VFKPV T	699
human	VSV EQE A Y DRM H TI E KF SPK VH Q D VFKPV T	698
rat	VSV QD A L Y DRM D TI E KF SSK VH EV LFK V T	701
mouse	VSV QD A Y DRM D TI E KF SSK VH EV VFK V T	699
zebra fish	LFLHCMSLCSRRNDKENNLAECLMPLDEACTSLSIESILLIMNTKILTTPKIVVIS----DDMPVIVKVPWDESPPRQ	774
chicken	LT TNIDKDTQR PK VP NVDM AM H K F L ITH EGKPEDSSLPKSNVRQ S--	767
pig	Q LT TK EKEPQK PK V DASM NAM Q K F LA IHHEVQFK--GPST ESNPI	774
human	Q LT TKMEKHPQK PK VP DASI NAM Q K F LA HHEAESKEKGPMS E NPI	775
rat	LT -KGSQK PR VT D DATM WTM Q K F LA VL QVDYKENVPST DSSPIP PPO	779
mouse	LT -KGSQK PK VT D DATM WTM Q K F LA VL QVDYKENVPMN ESSPVP P-Q	776
zebra fish	IIYVLDTEFVVGIAFAAFVIGALLTGALWPIYBHTGGTAAGCOVPSCPPVSENSSAAHSIGSTOSTPCSSSSNA	848
chicken	VF G L RA GRR TS A AT	841
pig	FHG L M Y DS GR P TS A L AT	848
human	FHG L M Y E GR TS A T	849
rat	FHG L M Y E RR TS A T	853
mouse	FHG L M Y E RR TS A T	850

**Figura 7. Alineamiento de la secuencia de aminoácidos del BG de pez cebra con el BG de otros vertebrados.** Se muestra la secuencia polipeptídica del BG de pez cebra alineada con la secuencia polipeptídica de pollo, puerco, humano, rata y ratón. Los aminoácidos que coinciden ser idénticos en pez cebra y los demás organismos son denotados con un asterisco y la no escritura de los aminoácidos (únicamente se escriben en la secuencia del pez cebra). Los aminoácidos que coinciden ser similares en pez cebra y los demás organismos se denotan con un punto. La línea café indica la secuencia del dominio O (Orphan) y la línea negra indica la secuencia del dominio ZP. La serina indicada con la flecha verde, es el sitio de unión del BG con GAG de heparán sulfato. La flecha azul denota la serina que es el sitio de unión del BG con GAG de condroitin sulfato, notar que el BG de pez cebra carece de este sitio, debido a que en lugar de la serina existe una prolina. La línea amarilla indica la secuencia de aminoácidos de la región transmembranal del BG. La línea roja indica la secuencia de aminoácidos de la región citoplásmica del BG, notar que tanto la región transmembranal como la citoplásmica del BG de pez cebra, poseen una gran identidad de secuencia con las secuencias polipeptídicas del BG de otros vertebrados. Los dominios O y ZP del BG de pez cebra también posee gran similitud e identidad con las secuencias del BG de otros vertebrados. *Modificado de (Kamaid et al., 2015).*

Se sabe que los proteoglicanos con heparán sulfato además de participar en el desarrollo del sistema vascular, también participan en el desarrollo del sistema nervioso (principalmente en la diferenciación celular, la sinaptogénesis y la axonogénesis) (Poulain, 2015). La evidencia de la participación de los proteoglicanos de heparán sulfato en los anteriores procesos del desarrollo se ha recaudado a partir, de mutantes de las diferentes enzimas que generan y modifican a los glucosaminoglucanos y por la caracterización de que diversos morfógenos se unen a los glucosaminoglucanos, por ejemplo, el FGF8 y el FGF2, (Poulain and Yost, 2015).

En etapas tempranas del desarrollo, varios ligandos de la superfamilia de TGF- $\beta$ ; como Nodal y BMP son los principales morfógenos de los centros organizadores corporales (dorsal/ventral, antero/posterior y patrón corporal izquierdo/derecha). El Betaglicano se une a varias isoformas de los BMPs entre ellas BMP4, el cual tiene una función inhibitoria de Nodal. BG además interacciona con otros morfógenos esenciales como las TGF- $\beta$ s (que regulan la transición epitelio-mesénquima, importante en el desarrollo) e inhibina. Es importante remarcar que la unión del Betaglicano con estos morfógenos es independiente de sus GAGs. Sin embargo, como se mencionó existe la posibilidad de que muchos otros morfógenos o factores de crecimiento estén interaccionando con BG a través de sus GAGs.

Debido a que el BG no posee actividad catalítica como podría ser de cinasa, por mucho tiempo se descartado que el BG regule una vía de señalización celular directamente. Sin embargo, como se mencionó anteriormente, el BG en su región citoplásmica posee un motivo para interaccionar con proteínas que poseen el dominio PDZ. Este motivo podría

permitir que el BG funcione como una proteína de andamiaje que participe en vías de señalización celular. Todo esto remarca la necesidad de dilucidar que interacciones moleculares no caracterizadas están ocurriendo con BG a través de sus GAGs o de su región citoplásmica y si estas interacciones, modulan vías de señalización no canónicas para el BG que expliquen el papel que el Betaglicano tiene en el desarrollo. Para ello se podrían hacer estudios *in vivo* que sigan el efecto de la abolición del BG a lo largo del desarrollo, pero tomando en cuenta los elementos que hay en cada región de la estructura del Betaglicano.

## **Hipótesis**

La metodología TOL2 permitirá generar peces transgénicos que expresarán constitutivamente al Betaglicano (BG) silvestre de rata y de BG mutante en *Danio rerio*.

## **Objetivos**

1. Obtener los vectores del sistema TOL2 para la transgénesis del Betaglicano silvestre y de versiones mutantes del BG de rata.
2. Microinyectar estos vectores en embriones de peces *Danio rerio* para inducir la transgénesis estable de cada versión del BG de rata.
3. Seleccionar por fluorescencia los embriones que tengan mayor expresión del vector microinyectado y crecerlos hasta la etapa adulta.
4. Tipificar los peces adultos provenientes de la selección de embriones microinyectados seleccionados, para encontrar los peces fundadores transgénicos de cada versión del BG de rata.

## Justificación

La letalidad y las alteraciones en el desarrollo observadas en ratón y en pez cebra cuando se indujo el knock out y el knock down génico del BG, rompió con la idea del BG como un receptor accesorio con funciones ya conocidas. Se creó el cuestionamiento de ¿Cómo el BG regula o participa en los procesos del desarrollo que se vieron afectados en su knock out y en su knock down génico?. Para responder a este cuestionamiento, se puede emplear el abordaje experimental de rescates fenotípicos. Para realizar este abordaje experimental se puede emplear el mRNA del BG. Sin embargo, la administración de mRNA sólo nos permitiría hacer rescates fenotípicos en etapas tempranas del desarrollo, ya que la funcionalidad del rescate se va perdiendo con la degradación y segregación del mRNA. Por tanto, un método que podría evitar esta limitación de la administración del mRNA para los rescates sería el uso de transgénicos. Los ensayos de rescate fenotípico en el knock out de BG podrían ser más eficientes y menos limitantes si empleamos el uso de transgénicos que expresen constitutivamente al BG. Estos transgénicos podrían ser en pez cebra para aprovechar las enormes ventajas que da este animal modelo para el estudio de los procesos del desarrollo. También dado que ya se tiene bien conocida la secuencia del BG de rata y que se sabe que el mRNA del BG de rata rescata eficientemente la ausencia del BG endógeno del pez cebra (Kamaid et al., 2015), se podría emplear el BG de rata para generar los transgénicos de pez cebra.

Para analizar si las cadenas GAGs o la región citoplásmica del BG están involucrados en las alteraciones fenotípicas observadas por la eliminación del BG, podría ser útil generar peces transgénicos de diferentes versiones de BG, una que carezca de GAGs y otra que carezca de su región citoplásmica. Estos peces transgénicos constituirán una herramienta biológica eficiente para el abordaje experimental de rescate fenotípico.

## Metodología

### **Construcción de los vectores de entrada “middle” Tol2 con los cDNAs de BG**

Los cDNAs de la secuencia completa de Betaglicano de rata, de la versión de Betaglicano sin los sitios de unión a GAGs y el del Betaglicano carente de la región intracelular fueron construidos previamente en el laboratorio a partir del plásmido pBG7s, que contiene el cDNA de Betaglicano silvestre de rata) e incluyen un epítipo de c-myc en el extremo amino de la proteína madura (Lopez-Casillas et al., 1994)). El vector donde se subclonaron las diferentes versiones de Betaglicano fue el vector pE3-CR8GW TOPO (invitrogen) que contiene los sitios de recombinación “L” del sistema Gateway®. Este vector fue modificado, se reemplazó la secuencia que va de 671 pb a 784 pb por una

secuencia nueva que contiene un polylinker que va de 671 pb a 755 pb. Este vector CR8 TOPO modificado con la región polylinker, permitió la inserción en este vector de las diferentes versiones del Betaglicano (WT-BG, DT-BG y GAG-BG) por restricción enzimática con HindIII y EcoRI. Al final con la inserción de los diferentes cDNAs del Betaglicano en el vector CR8 TOPO con la región polylinker se crearon los tres middle entry vectors que se usó para la construcción final del vector de expresión con el Tol2 kit.

### **Construcción de los vectores de expresión Tol2**

En la Construcción de los vectores de expresión Tol2, se utilizó el vector p5E-CMV/SP6 para generar la región 5' del vector de expresión (esta región contiene el promotor de citomegalovirus de simio sCMV), seguido de esta región se insertó el cDNA de cada versión de Betaglicano contenida en un middle entry vector CR8 TOPO. Para crear la región 3' del vector de expresión se usó el vector p3E-IRES-nlsEGFPpA (el cual permite la inserción en el vector de expresión de una secuencia IRES fusionada con la secuencia codificante de la EGFP polyAdenilada, esta EGFP contiene una secuencia señal de localización nuclear). El diseño de esta construcción permite la co-expresión del Betaglicano y la proteína EGFP con localización nuclear, pero una traducción independiente. La construcción final del vector de expresión Tol2, se generó por la recombinación de cada uno de los middle entry vectors con las versiones de Betaglicano con un vector p5E-CMV/SP6 y un vector p3E-IRES-nlsEGFPpA mediante la reacción LR del sistema Gateway, siguiendo el protocolo descrito por el laboratorio de Chien, disponible en (Chien, 2016) y el MultiSite Gateway® Pro manual, invitrogen número de publicación MAN0000570.

### **Transcripción *in vitro* para obtención del mRNA de la transposasa**

Se realizó transcripción *in vitro* del vector pCS2FA-transposase del Tol2 kit, que contiene la secuencia codificante para el mRNA de la transposasa. Para la transcripción se utilizó The AmpliCap™ SP6 High Yield Message Maker Kit de Cellscript® No. de Catálogo C-AC0706. Se siguió el protocolo del producto y el mRNA obtenido se resuspendió en agua libre de nucleasas.

### **Microinyección del vector Tol2 y del mRNA de la transposasa en embriones de pez cebra**

Mediante microinyección, utilizando el microinyector Femtojet 5247; se administró el vector de expresión Tol2 con la versión de Betaglicano wild type junto con el mRNA de la transposasa. Las microinyecciones se realizaron en cigotos de pez cebra. En cada microinyección se administró un volumen de 1nl que contenía, el mRNA de la transposasa al [10ng/μl], rojo fenol al 1%, buffer Danieau 1x y el vector de expresión Tol2 al [10ng/μl] de una de las tres versiones de Betaglicano (la silvestre, la que carece de la región intracelular y la que carece de sitios de unión a GAGs). Las microinyecciones

de cada versión de BG se realizó en paralelo con la microinyección control (para ello se utilizó la misma población de cigotos colectados en cada microinyección). La microinyección del vector control consistió en vector TOL2 sin inserto de BG. Todas las microinyecciones se realizaron con las mismas concentraciones de vector y de mRNA de transposasa.

### **Observaciones con microscopía confocal de fluorescencia**

Para la observación de embriones completos, los embriones fueron previamente fijados con PFA al 5% por 90 min a temperatura ambiente. Posteriormente se realizaron 4 lavados con PBS-Tween (0.1%), después se permeabilizaron con acetona fría por 8 min. Luego se retiró la acetona y se realizaron 4 lavados de 5 min con PBS-Tween (0.1%) al final se realizó una tinción con DAPI por 15 min a temperatura ambiente, haciendo 2 lavados para retirar el exceso de DAPI con PBS-Tween (0.1%).

### **Genotipificación de la transgénesis en la población de peces candidatos fundadores transgénicos y en su descendencia**

Se diseñó un par de oligos específicos para amplificar un fragmento de 498 pb del dominio O de Betaglicano de rata. La secuencia de los oligos son: FW 5'AGAGCTTCACCGTTCTGTCTG3', RV 5'GCAAGGTAATTGAGTGAGAGGA3'. Las reacciones de PCR se realizaron en un volumen total de 20 µl, con la Taq DNA polymerase #M0267X NEB®, utilizando el buffer 10X de esta polimerasa. En las reacciones se añadió 1 µl de DNA genómico de la aleta caudal de peces adultos o de una mezcla de 25 embriones, para la tipificación de la transgénesis en células somáticas o de embriones transgénicos respectivamente.

### **Extracción de DNA genómico de la aleta caudal de peces adultos**

Un trozo de la aleta caudal por pez se extrajo de los peces adultos candidatos a ser fundadores transgénicos, mediante un corte con bisturí. Los peces fueron previamente anestesiados con tricafna al 1X preparado según un protocolo de la base de datos de ZFIN. El trozo de aleta fue sumergida en 50 µl de buffer de lisis con 200 mg/ml de proteinasa K, posteriormente se dejó incubando a 56 °C en agitación por 4 h. Después de la incubación a 56 °C se incubó la muestra a 95 °C por 5 min para inactivar la reacción enzimática. Luego se realizó una breve centrifugación y se recuperó el sobrenadante. 1 µl de este DNA genómico se utilizó directamente en la PCR.

### **Extracción de DNA genómico de embriones**

Un grupo de 25 embriones por tubo de 24-48 h fueron destinados para extraer el DNA genómico siguiendo un protocolo descrito por (Hoshijima et al., 2016). El tubo con los 25 embriones se le añadió 200 µl de NaOH a 50mM y se dejó incubando a 95 °C por 35 min, posteriormente los tubos se enfriaban a 4 °C por 3 min y se les añadía 20 µl de TRIS

HCl 1M pH 8. 1  $\mu$ l de este DNA genómico se utilizó directamente en la PCR para tipificar a los embriones transgénicos.

## Resultados

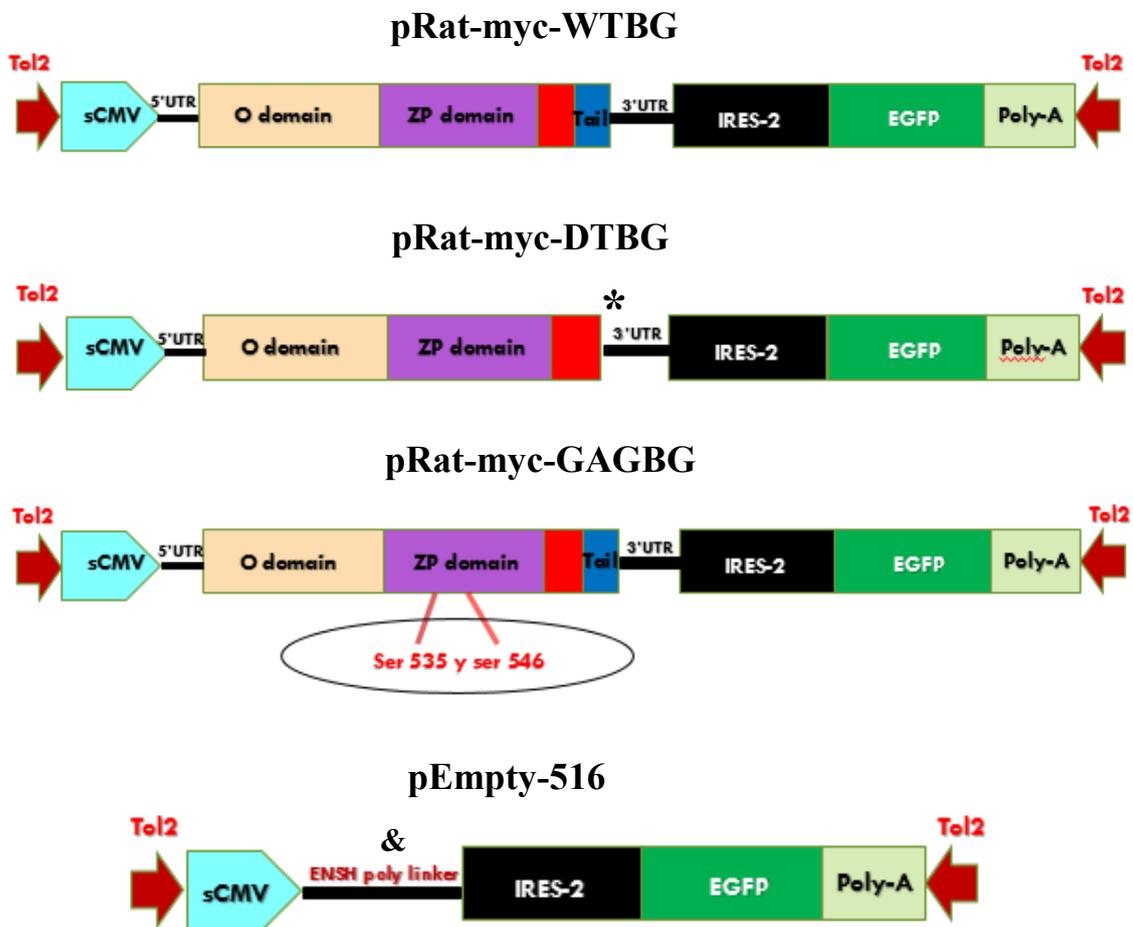
### **Construcción y purificación de los vectores TOL2 para la transgénesis de Betaglicano (BG) silvestre de rata y de sus mutantes (DT-BG y GAG-BG)**

Para poder utilizar el sistema TOL2 descrito por (Kawakami, 2007; Kwan et al., 2007) e inducir transgénesis en pez cebra, se construyeron los vectores de expresión TOL2 que contienen la secuencia del Betaglicano silvestre de rata (WT-BG) o de dos mutantes de este Betaglicano; una que carece de la región citoplásmica (DT-BG) y otra que carece de sitios de unión a glucosaminoglucanos (GAG-BG). Para lo anterior, se partió de vectores realizados previamente en el laboratorio que contenían el Betaglicano silvestre de rata o sus mutantes (Lopez-Casillas et al., 1994; Lopezcasillas et al., 1991).

La estructura de estos tres vectores de expresión TOL2 posee un promotor de citomegalovirus de simio (sCMV) que regula la expresión del Betaglicano y de la proteína verde fluorescente (EGFP) que se encuentra río abajo de la versión de Betaglicano, transcribiéndose un mRNA de tipo bi-cistrónico. La proteína EGFP posee una secuencia señal de localización nuclear y su traducción es regulada por una secuencia para el reconocimiento a ribosoma IRES (Internal Ribosome Entry Site). De forma que, la transcripción del transgene produce un mRNA bi-cistrónico, que traduce tanto al Betaglicano como a la proteína EGFP. Un cuarto vector fue construido, el cual carece de la secuencia codificante para Betaglicano, pero posee tanto el mismo promotor como la proteína EGFP; este vector constituye el control de la transgénesis, *ver figura 7*.

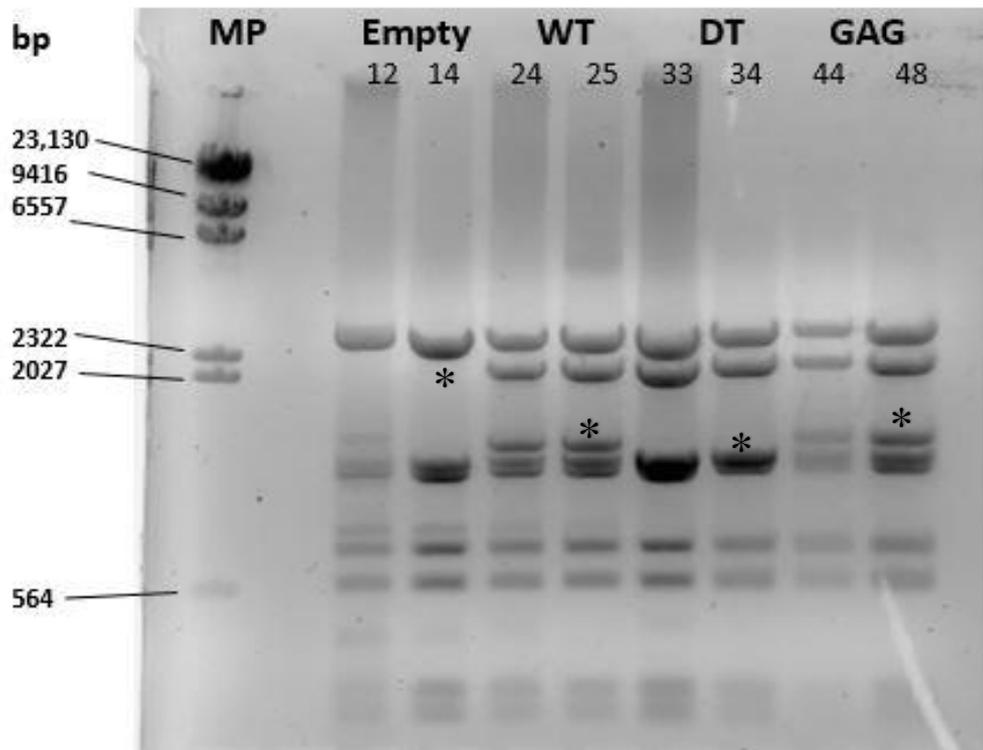
Los cuatro vectores TOL2 están flanqueados en los extremos por las secuencias Tol2 para permitir que la transposasa reconozca éstas secuencias e inserte la construcción flanqueada en el genoma del embrión, *ver figura 7*.

**Estructura de los vectores TOL2 para la transgénesis de Betaglicano silvestre de rata o de sus mutantes (DT-BG, GAG-BG)**



**Figura 7. Estructura de los vectores de expresión TOL2 para la transgénesis de BG en embriones de pez cebra.** Los tres vectores que contienen una versión de Betaglicano, poseen el promotor sCMV, posteriormente está la secuencia que codifica la versión de BG con su 5' UTR y su 3' UTR. En el vector control (pEmpty-516) en lugar de la secuencia para BG, se encuentra la región de muticlonación pre existente (mostrado como &). El vector pRat-myc-DTBG, codifica una versión de BG que carece de la cola citoplásmica (mostrado con \*). El vector pRat-myc-GAGBG posee un intercambio de bases que codifican alanina en lugar de los aminoácidos Ser 535 y Ser 546, eliminando los dos sitios de glicosilación del BG (mostrado en el ovalo). Notar que los cuatro vectores están flanqueados a los extremos por las secuencias Tol2, que permite el reconocimiento del vector por la transposasa, la cual realizará la inserción de la construcción flanqueada al genoma de la célula.

## Purificación y análisis de los vectores Tol2 previo a la microinyección



**Figura 8. Purificación y análisis enzimático de la correcta estructura de los vectores Tol2.** Después de la construcción de los vectores Tol2, se realizaron midipreps para recuperar cada uno de los diferentes vectores de expresión con BG. En la purificación se usó el kit PureYield™ Plasmid Midiprep System, Promega®, siguiendo el protocolo del kit. Los plásmidos purificados fueron analizados con tres endonucleasas; HindIII + PstI + PvuII. El patrón observado correspondió con el patrón correcto de los vectores predicho en el simulador de geles de SnapGene software. Observar en las bandas inferiores a los asteriscos, que el patrón de bandeado del vector con Betaglicano sin GAGs (GAG) es idéntico al de BG silvestre (WT), de acuerdo a que ambos vectores poseen BG que sólo se diferencia en dos codones cambiados de serinas a alaninas (sitios de glicación de BG), notar que el patrón de bandeado del BG carente de la cola citoplásmica (DT) es diferente al silvestre y al de GAG. El vector vacío o control (Empty vector) claramente tiene un patrón de bandeado diferente al resto de vectores que si poseen BG.

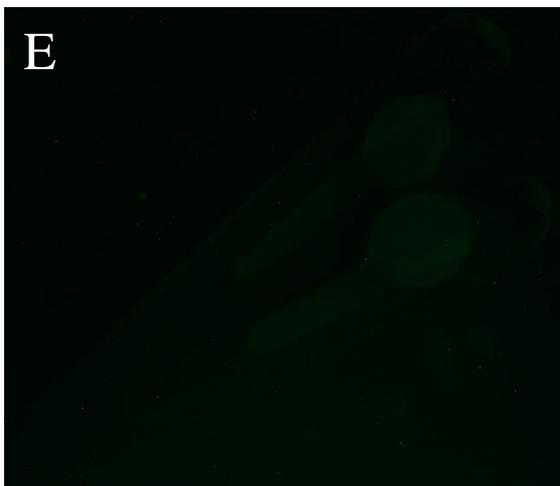
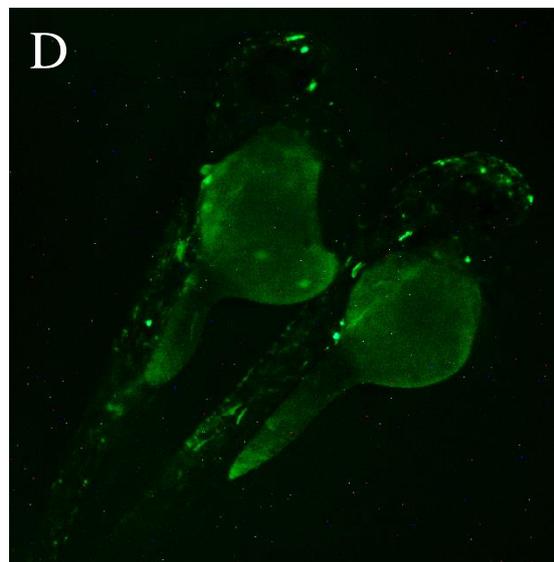
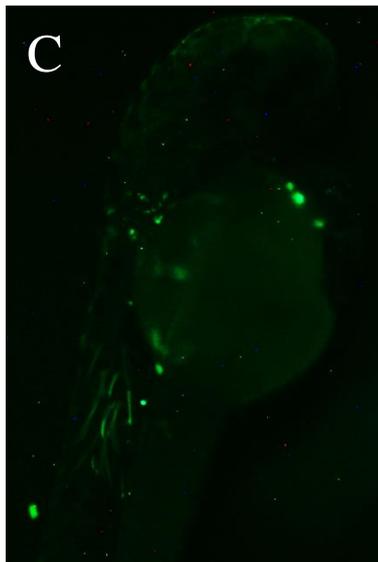
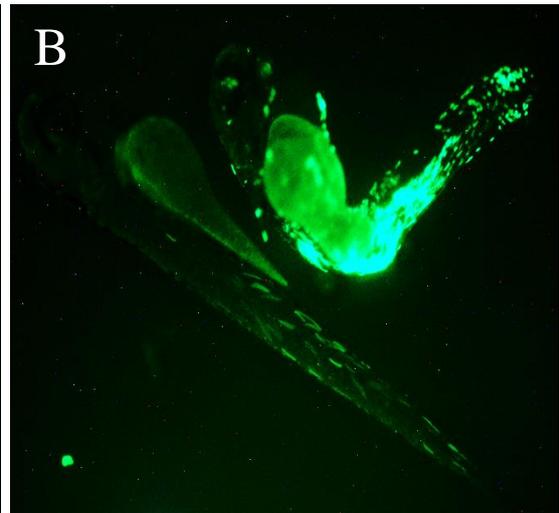
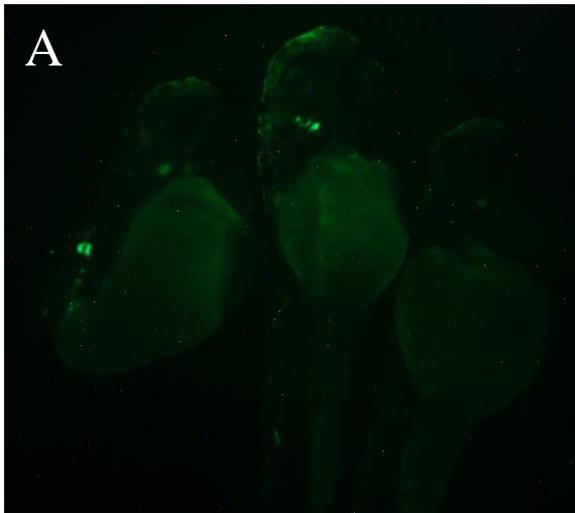
## **Inducción de transgénesis por el método de microinyección y selección de embriones microinyectados mediante fluorescencia**

Para la inducción de transgénesis con el sistema Tol2, es necesario que después de construir los vectores de expresión TOL2; se realice la microinyección de cada vector junto con el mRNA de la transposasa Tol2 en el cigoto de un embrión de pez (Kawakami, 2004; Kwan et al., 2007). Para encontrar la cantidad óptima de plásmido y mRNA de transposasa a microinyectar, inicialmente se hicieron pruebas de estandarización; microinyectando 50pg, 25pg y 15pg de DNA (plásmido no linearizado) con 25pg de mRNA de transposasa en embriones silvestres en la etapa de cigoto. Posteriormente, se hicieron observaciones de la mortalidad, morfología y niveles de fluorescencia a las 24h, 48h y 72h. Se encontró que en las tres concentraciones había alta mortalidad de los embriones, quizá debido a un efecto de la alta cantidad de plásmido microinyectado que correlaciona con lo mencionado por Chi-Bin Chien en (Kwan et al., 2007). Posterior a las pruebas de estandarización, se decidió microinyectar 10pg de plásmido con 10pg de mRNA de transposasa, concentraciones que permitieron mayor sobrevivencia de los embriones microinyectados.

Se realizó una serie de microinyecciones de aproximadamente 70 embriones por microinyección, en cada cigoto se administró 10pg/nl de vector y 10pg/nl de mRNA de transposasa.

Después de cada serie de microinyección a las 48 horas post-fertilización (hpf), los embriones eran observados con microscopía estereoscópica de epifluorescencia para identificar los embriones con mayor fluorescencia y sin deformaciones, y seleccionarlos para su crecimiento hasta la etapa adulta. El patrón de fluorescencia que se observó, tuvo un patrón en mosaico, que correlaciona con el patrón de expresión génica tipo mosaico descrito para la microinyección con un vector de expresión en etapa cigótica (Clark et al., 2011; Hartmann and Englert, 2012), *ver figura 9, imágenes A,B,C y D*. Este método de selección por presencia de fluorescencia fue utilizada gracias a que todos los vectores Tol2 microinyectados poseen la proteína verde fluorescente EGFP como gen reportero, *ver figura 9*.

**Microinyección y selección de embriones microinyectados mediante fluorescencia**



**Figura 9. Microinyección de los vectores Tol2 con Betaglicano o de vector control, y selección de los embriones con fluorescencia.** En A, se observa la fluorescencia en mosaico de tres embriones de 48 hpf microinyectados con el vector pRat-myc-WTBG, visto con microscopía de epifluorescencia. En B, se observa la fluorescencia de dos embriones microinyectados con el vector pRat-myc-DTBG. En C, se observa a un embrión microinyectado con el vector pRat-myc-GAGBG. En D, se observa a dos embriones microinyectados con el vector pEmpty-516 (vector control sin Betaglicano). En E, se observa a dos embriones silvestres no microinyectados observados con microscopía de epifluorescencia. En F, se observa a los dos embriones de la imagen E, vistos con luz blanca.

**Resumen de los peces microinyectados y seleccionados que llegaron a la etapa adulta (generación F0)**

Construcción de BG microinyectada	Total de peces seleccionados que llegaron a la etapa adulta
pRat-myc-WTBG	32
pRat-myc-DTBG	40
pRat-myc-GAGBG	5
pEmpty-516 (vector control sin BG)	48

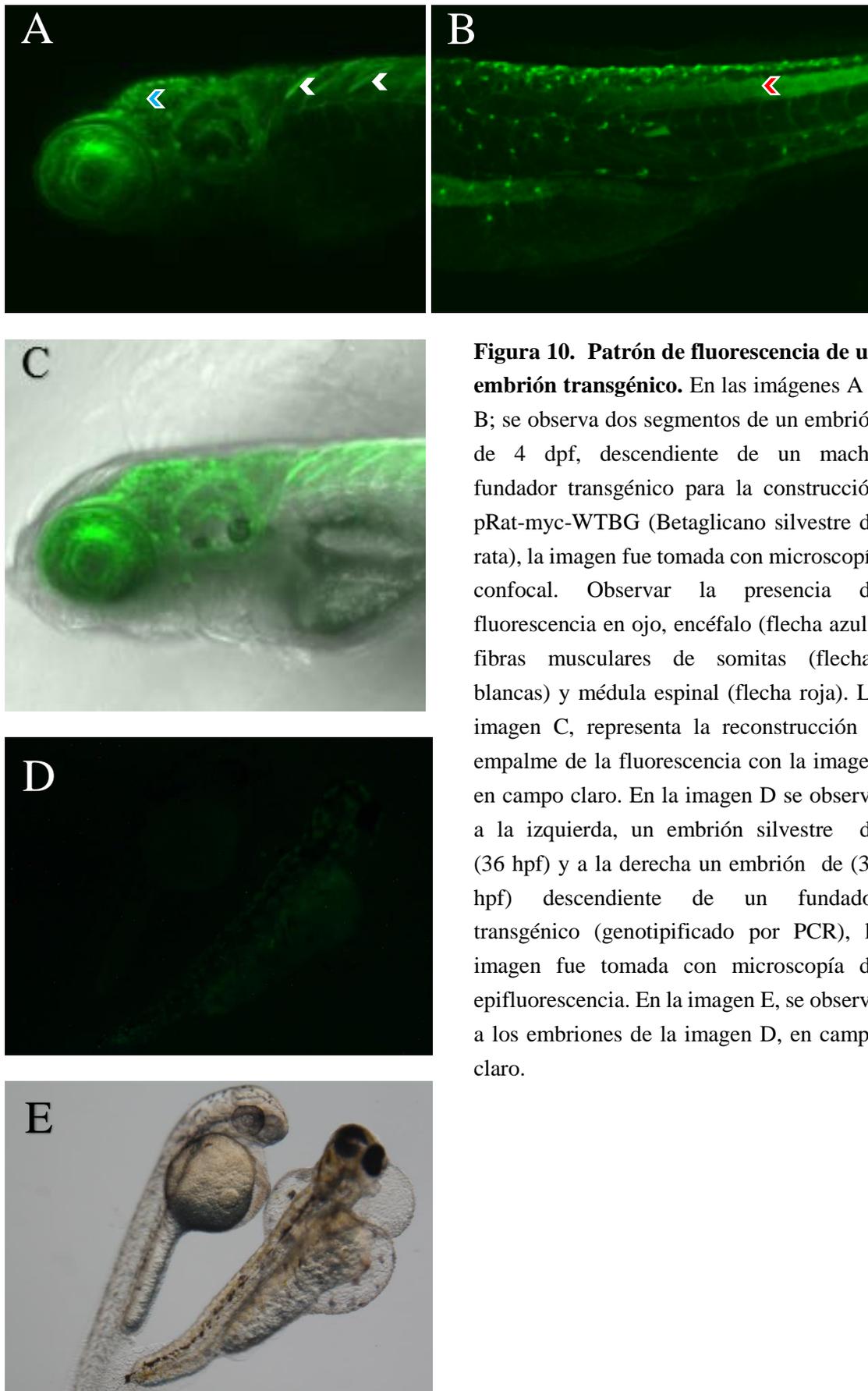
**Tabla 1. Total de peces microinyectos seleccionados que llegaron a la etapa adulta.** Después de  $\approx 5$  meses de crecimiento, una fracción de los embriones microinyectados seleccionados por fluorescencia llegó a la etapa adulta. La tabla indica el número de peces obtenidos para cada construcción que se microinyectó. A partir de estas cuatro poblaciones de peces, se realizó la búsqueda de peces fundadores transgénicos para cada una de las tres versiones de Betaglicano.

## **Fluorescencia observada en la primera generación (F1) de peces transgénicos**

Como parte de la metodología usada para encontrar a los peces fundadores transgénicos (peces adultos que heredan el transgen a su descendencia), se realizó observaciones a diferentes tiempos de los embriones descendientes de la cruce de un pez adulto (posible fundador transgénico, ver tabla 1) con un pez silvestre. La fluorescencia por la proteína verde fluorescente EGFP en la descendencia transgénica sólo se pudo observar a partir de los 4 días post fertilización, *ver figura 10*. Los embriones que resultaban no transgénicos tenían un nivel bajo de fluorescencia debido a autofluorescencia en este tiempo.

Para eliminar la autofluorescencia de los embriones silvestres observada con microscopía de epifluorecencia, se decidió utilizar microscopía confocal de fluorescencia; esto eliminó en gran medida la autofluorescencia y permitió ver el patrón de fluorescencia en los embriones provenientes de la cruce de un pez fundador transgénico con un pez silvestre, *ver figura 10*.

## Fluorescencia observada en los embriones transgénicos (F1)



**Figura 10. Patrón de fluorescencia de un embrión transgénico.** En las imágenes A y B; se observa dos segmentos de un embrión de 4 dpf, descendiente de un macho fundador transgénico para la construcción pRat-myc-WTBG (Betaglicano silvestre de rata), la imagen fue tomada con microscopía confocal. Observar la presencia de fluorescencia en ojo, encéfalo (flecha azul), fibras musculares de somitas (flechas blancas) y médula espinal (flecha roja). La imagen C, representa la reconstrucción y empalme de la fluorescencia con la imagen en campo claro. En la imagen D se observa a la izquierda, un embrión silvestre de (36 hpf) y a la derecha un embrión de (36 hpf) descendiente de un fundador transgénico (genotipificado por PCR), la imagen fue tomada con microscopía de epifluorescencia. En la imagen E, se observa a los embriones de la imagen D, en campo claro.

## **Análisis de la transgénesis de las diferentes versiones de Betaglicano en la generación F0**

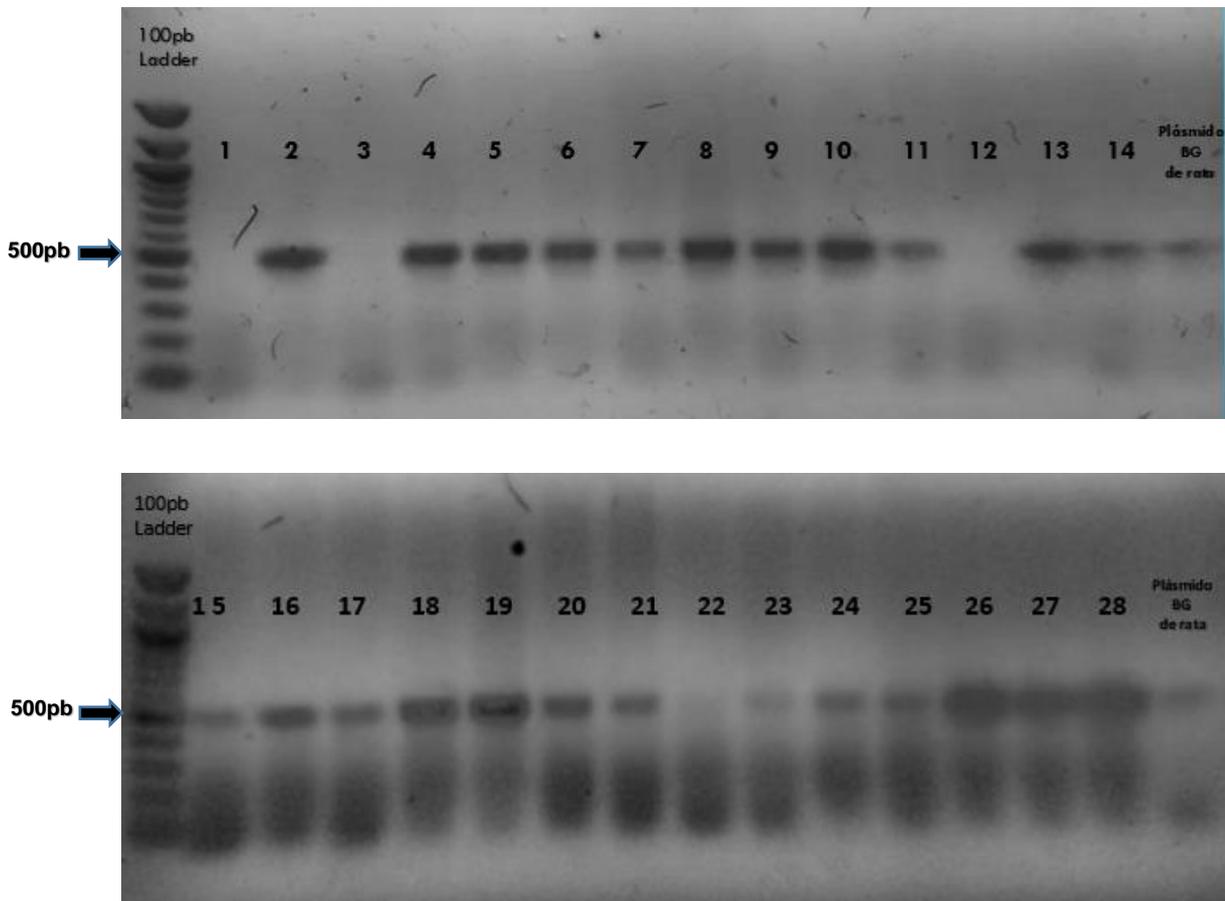
Después de seleccionar a los embriones microinyectados por fluorescencia, se procedió a criarlos para lograr que la mayor parte de estos peces llegaran a la etapa adulta. Los cuidados se realizaron siguiendo los protocolos establecidos en el laboratorio y en el manual de cuidado publicado en la base de datos The Zebrafish information Network, 2016. De esta forma se logró establecer poblaciones de peces adultos seleccionados de la versión de Betaglicano silvestre (WT-BG), del Betaglicano mutante sin el dominio citoplásmico (DT-BG) y de los microinyectados con el vector control (Empty-516). Sin embargo, sólo se pudieron crecer pocos peces de la versión del Betaglicano mutante sin sitios de unión a glucosaminoglucanos (BG-GAG), *ver tabla 1*.

A partir de las poblaciones de peces adultos seleccionados post-microinyección, se procedió a analizar la presencia del transgene de las versiones de BG en la aleta caudal de estos peces mediante PCR (Polymerase Chain Reaction). Los oligos se diseñaron de forma que amplificara un fragmento de 498pb del dominio Orphan (dominio O), presente en las tres versiones de Betaglicano (WT-BG, DT-BG y GAG-BG). También se corroboró que estos oligos fueran específicos para amplificar Betaglicano de rata y no amplificaran alguna región inespecífica del Betaglicano endógeno del pez.

Se extrajo DNA de la aleta caudal de los peces adultos seleccionados de todas las versiones de BG o generación F0. Las PCRs nos demostraron que la mayoría ( $\approx 70\%$ ) de la población de peces adultos seleccionados, poseía la inserción de la construcción microinyectada en el genoma de las células somáticas de la aleta caudal. Lo anterior indicó que el sistema TOL2 utilizado y las microinyecciones fueron correctos y que había altas probabilidades de que los peces con la transgénesis en células de la aleta caudal, tuvieran la transgénesis en células germinales y heredarán el transgen a su descendencia, *ver figura 11*.

Las tipificaciones por PCR permitió conocer que  $\approx 54\%$  de la población de peces adultos seleccionados para el BG silvestre (WT-BG) tenía el transgen en células somáticas, mientras que para la versión de BG mutante carente del dominio citoplásmico (DT-BG);  $\approx 77\%$  de los peces tenían el transgen en células somáticas. Para el BG mutante sin sitios de glicosilación (BG-GAG), 4 de los 5 peces adultos que se obtuvieron eran positivos al transgen en células somáticas. Las observaciones reflejaron una alta tasa de eficiencia en la transgénesis somática de las versiones de Betaglicano, el cuál es consistente con la alta eficiencia reportado para el sistema Tol2 ( $\approx 50\%$ ) (Kawakami, 2004; Kwan et al., 2007).

## Transgénesis eficiente en células somáticas de los peces adultos de la generación F0



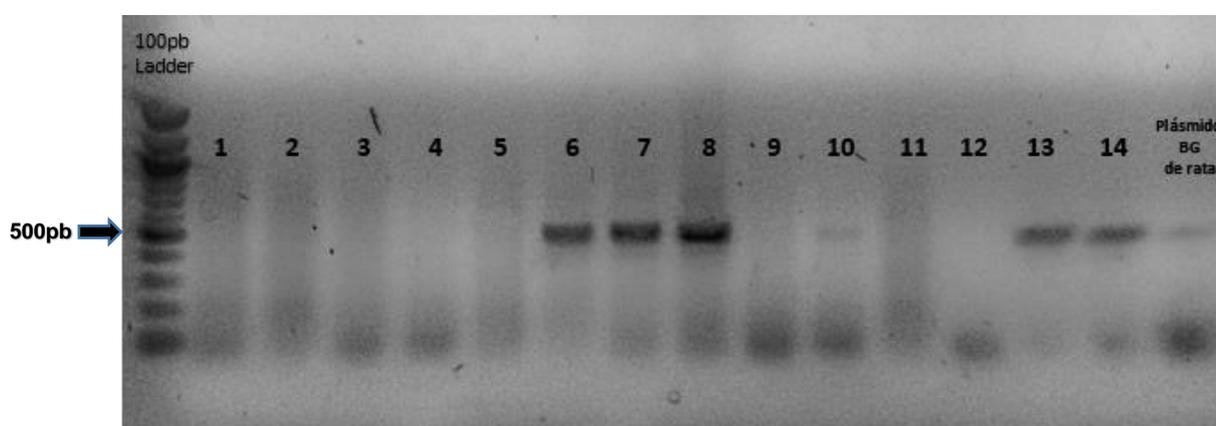
**Figura 11. Transgénesis eficiente en células somáticas de los peces adultos generación F0.** En los geles superior e inferior, se observa una muestra representativa del análisis de la transgénesis en las tres poblaciones de peces con las tres versiones de BG microinyectado (WT-BG, GAG-BG y DT-BG). En cada carril se observa la ausencia o presencia de una banda de  $\approx 500$  pb (mostrado con una flecha) que pertenece a la amplificación de un fragmento de DNA del dominio Orphan de BG de rata; indicando que los peces de donde se obtuvo el DNA genómico para la amplificación, poseen la inserción de la construcción microinyectada en sus células somáticas. Cada carril pertenece al DNA genómico de la aleta caudal de un pez diferente. Los carriles 1-10 son muestras de peces adultos microinyectados con la versión silvestre de BG (WT-BG), (los carriles 1,2, 4, 5, 7 y 10 son peces machos, los carriles 3,6, 8 y 9 son hembras). Los carriles 11-14 son muestras de peces adultos microinyectados con la versión mutante de BG sin sitios de unión a GAGs (BG-GAG), (los 4 carriles son muestras de peces machos). Los carriles 15-28 son muestras de peces adultos microinyectados con la versión mutante de BG sin el dominio citoplásmico (DT-BG), (los carriles 15, 16, 20, 22, 24, 25 y 27 son peces machos, los carriles 17, 18, 19, 21, 23 y 26 son hembras). Ambos geles poseen un

control positivo de amplificación (Plásmido BG de rata), donde se utilizó para la reacción DNA plasmídico purificado que contiene Betaglicano de rata. Notar que la banda del control positivo corrobora que las bandas de amplificación del DNA genómico de los peces es específica de Betaglicano de rata.

### Genotipificación y búsqueda de los peces fundadores transgénicos

Una vez que la población de peces seleccionados adultos alcanzó la madurez reproductiva, se procedió a realizar el tamizaje para encontrar a los peces fundadores transgénicos para las diferentes versiones de Betaglicano. Para el tamizaje se usó la técnica de PCR con DNA genómico de embriones, descendientes de la cruce de un pez silvestre con cada uno de los peces adultos seleccionados que dieron positivo al transgen en la aleta caudal.

Para cada reacción de PCR se utilizó el DNA genómico de 25 embriones de 48h post fertilización. El tamizaje permitió encontrar peces fundadores transgénicos de la versión de Betaglicano silvestre (WT-BG) y de la versión de Betaglicano mutante que carece de la región citoplásmica (DT-BG), *ver figura 12*.



**Figura 12. Detección por PCR de peces fundadores transgénicos.** En cada carril se observa el análisis de una muestra de DNA genómico de un grupo de 25 embriones descendientes de la cruce de un pez silvestre con un pez positivo en la aleta caudal al transgen Betaglicano de rata. Los carriles 1 y 2 pertenecen a DNA genómico de embriones descendientes de un pez positivo en aleta caudal a la versión de BG sin dominio citoplásmico (DT-BG). Los carriles 3-5 pertenecen a embriones de otro pez positivo en la aleta caudal para el transgen (DT-BG). Los carriles 6 y 7 pertenecen a DNA genómico de embriones descendientes de un tercer pez positivo a la versión de BG sin dominio citoplásmico (DT-BG) en la aleta caudal, observar la presencia de una banda de  $\approx 500$  pb; indicando que los embriones son transgénicos para la versión de BG carente del

dominio citoplásmico (DT-BG). El carril 8 pertenece a DNA genómico de embriones descendientes de un cuarto pez positivo a la versión de BG sin dominio citoplásmico (DT-BG) en la aleta caudal, notar también la presencia de la banda de  $\approx 500$  pb. Los carriles 9 y 10 pertenecen a embriones de un pez positivo en la aleta caudal para el transgen de BG silvestre (WT-BG). Los carriles 11 y 12 pertenecen a DNA genómico de embriones descendientes de un quinto pez positivo a la versión de BG sin dominio citoplásmico (DT-BG) en la aleta caudal. Los carriles 13 y 14 pertenecen a embriones de un pez positivo en la aleta caudal para el transgen de BG silvestre (WT-BG), observar la presencia de la banda de  $\approx 500$  pb, indicando que los embriones son transgénicos para la versión de BG silvestre de rata. Plásmido BG de rata, es la muestra control positivo, ya que posee DNA plasmídico purificado de BG de rata, observar la presencia de la banda de  $\approx 500$  pb.

### **Resumen de los peces fundadores transgénicos identificados por PCR**

El tamizaje por PCR realizado permitió encontrar a varios peces fundadores transgénicos de la versión de Betaglicano silvestre (WT-BG) y de Betaglicano mutante que carece del dominio citoplásmico (DT-BG), *ver tabla 2*.

<b>Construcción de BG microinyectado</b>	<b>Total de peces fundadores transgénicos obtenidos</b>
<b>pRat-myc-WTBG</b>	<b>5 peces</b>
<b>pRat-myc-DTBG</b>	<b>4 peces</b>
<b>pRat-myc-GAGBG</b>	<b>cero</b>

**Tabla 2. Identificación de una población de peces fundadores transgénicos de BG silvestre (WT-BG) y de BG carente del dominio citoplásmico (DT-BG).** En la tabla se puede observar el total de peces fundadores transgénicos identificados por PCR según la construcción con la cual se microinyectó. La descendencia de cada uno de estos peces fundadores transgénicos permitirá establecer una línea transgénica estable de Betaglicano de rata silvestre (WT-BG) y de Betaglicano mutante sin el dominio citoplásmico (DT-BG).

## Discusión

La razón principal en este proyecto de generar peces transgénicos de las tres versiones de BG fue conseguir una herramienta biológica para realizar rescates fenotípicos en experimentos de disminución del BG en diferentes etapas del desarrollo, inducido ya sea por knock-down o por knock-out. Por tanto, es necesario que los peces transgénicos expresen de forma constitutiva y ubicua el BG transgénico. Sin embargo, se observó que la fluorescencia de los peces fundadores transgénicos y de su descendencia, poseen nulo o muy bajos niveles de fluorescencia en las primeras 48 hpf. Este bajo nivel de fluorescencia en los primeros días del desarrollo de los embriones, podría indicar una baja expresión del transgen controlado por el promotor sCMV que poseen las construcciones. La expresión del transgen BG podría no ser constitutiva y ubicua como se esperaba. Por otro lado, hemos encontrado literatura que habla sobre un patrón de expresión tejido específico y temporal no constitutivo, de los transgenes controlados por este promotor de sCMV en pez cebra (Suhr et al., 2009; Mella-Alvarado et al., 2013).

Esto abre la posibilidad de que la principal característica de los peces transgénicos generados en este proyecto con el propósito de realizar ensayos de rescate fenotípico, podría no ser la adecuada. Ante este panorama, aún es necesario analizar el patrón de expresión del transgen en la primera generación de peces transgénicos (generación F1), para corroborar fehacientemente que no hay expresión constitutiva y ubicua del transgen BG regulado por el promotor sCMV. Cabe resaltar que los niveles de fluorescencia por un gen reportero, puede no ser un indicador preciso de la actividad de un promotor, ya que la fluorescencia es afectada multifactorialmente como se mencionará en los párrafos posteriores. El análisis de la expresión del transgen no debe ser únicamente a nivel de mRNA, sino también a nivel de proteína. Si finalmente la expresión del transgen de interés, no es constitutivo y ubicuo se tendrá que replantear la generación de nuevos peces transgénicos.

### **Construcción y análisis de los vectores TOL2 para la transgénesis de Betaglicano (BG) silvestre de rata y de sus mutantes (DT-BG y GAG-BG).**

La construcción de los vectores de expresión Tol2 para las tres versiones de Betaglicano: BG silvestre (WT-BG), BG sin el dominio intracelular (DT-BG) y el BG sin sitios de unión a glucosaminoglucanos (BG-GAG) fue correcta, como lo reveló el análisis por digestión enzimática. Demostrando, la versatilidad y eficiencia tanto del sistema Tol2 kit como del sistema de recombinación Gateway®. La estructura final de cada uno de los tres vectores de expresión Tol2 quedó de la siguiente manera: cada vector posee el CMV/SP6 cassette como el elemento de regulación de la transcripción, elegido dentro del grupo de plásmidos que componen el Tol2 kit por ser un promotor constitutivo.

Posteriormente, se encuentra la secuencia codificante para una de las versiones de BG con su 5' UTR y su 3' UTR, a continuación hay un elemento IRES que regula la traducción de la EGFP codificada como un segundo cistron en el mRNA. En la estructura de los vectores de expresión Tol2 se incluyó un promotor constitutivo (sCMV) y una secuencia IRES antes del gen de la EGFP para que se permitiera la expresión constitutiva y ubicua (mencionado en (Kwan et al., 2007) tanto del Betaglicano como de la proteína EGFP, pero con una traducción independiente de estas proteínas. Este diseño en los vectores permitiría la selección de los peces microinyectados y posteriormente de los transgénicos mediante fluorescencia, y se evitaría las posibles alteraciones de estructura/función que conllevaría la fusión del Betaglicano con la proteína reportera.

### **Selección por fluorescencia de los embriones microinyectados con los vectores Tol2**

Las observaciones de la fluorescencia en los embriones microinyectados, nos permitió conocer que a las 48h post-fertilización se podía apreciar mayor fluorescencia en los embriones que mantenían un desarrollo normal, permitiendo descartar a los embriones sin fluorescencia o con deformación en la selección de los embriones microinyectados, que serían criados hasta la etapa adulta. La presencia de fluorescencia en diferentes regiones corporales de los embriones microinyectados con los diferentes vectores de expresión Tol2 nos permitió conocer en esta etapa, que los vectores y las microinyecciones estaban funcionando correctamente. Sin embargo, en esta etapa aún no se tenía certeza si la transgénesis había ocurrido de forma exitosa en los embriones seleccionados.

### **Observación de la fluorescencia en la descendencia de los peces adultos seleccionados post-microinyección**

Parte del tamizaje que se empleó para encontrar a los peces fundadores transgénicos, fue la presencia de fluorescencia en los embriones provenientes de la cruce de los posibles fundadores transgénicos con peces silvestres. Las observaciones de la fluorescencia se hicieron a 24 hpf, 48 hpf, 72 hpf y hasta el sexto día post-fertilización usando un microscopio estereoscópico de epifluorescencia. El mayor nivel de fluorescencia se observó entre las 48 hpf y el sexto día. Sin embargo, no se logró observar intensidades de fluorescencia adecuados para discernir entre embriones transgénicos y no transgénicos; debido a que había bajos niveles de fluorescencia en los primeros 3 días post-fertilización, y por la presencia de autofluorescencia originada por la fluorescencia intrínseca de las células; la cual emite en longitudes de onda muy similares a las proteínas verdes fluorescentes (GFPs) (Tsien, 1998). Por esta razón, para disminuir el ruido de fondo se hicieron observaciones de la fluorescencia con microscopía confocal. Con lo cual se pudo constatar que sí había fluorescencia en las larvas de algunos peces, posibles

fundadores transgénicos, *ver figura 10*. Progenitores que posteriormente dieron positivo al análisis por PCR como auténticos fundadores transgénicos.

Debido a que el tamizaje de los posibles fundadores transgénicos por microscopía confocal, resultaba poco práctica para el análisis de las poblaciones de las tres versiones de Betaglicano. Se decidió usar como método de selección a la reacción en cadena de la polimerasa PCR. Este método nos permitió eficientemente encontrar a peces fundadores transgénicos, de las versiones de BG silvestre (WT-BG) y del BG mutante sin dominio citoplásmico (DT-BG), *ver figura 12 y tabla 2*.

El nivel bajo de fluorescencia observado en la descendencia de los peces fundadores transgénicos; quizá pueda ser explicado por un nivel bajo de expresión génica, determinado por el tipo de promotor que regula la expresión tanto de las versiones del Betaglicano como del gen reportero (EGFP) en un mRNA bi-cistrónico. El promotor sCMV (simian Citomegalovirus) que se utilizó, fue catalogado por el laboratorio de Chi-Bin Chien (creador del sistema Tol2 kit) como un promotor fuerte ubicuo (Kwan et al., 2007). Sin embargo, esta catalogación fue basada en lo reportado por (Rupp et al., 1994; Turner and Weintraub, 1994), quienes clonaron el promotor de sCMV y lo utilizaron para promover la expresión de un gen fusionado con una proteína verde fluorescente en *Xenopus*. En estos experimentos ha de tenerse en cuenta que los vectores con este promotor fueron microinyectados en embriones y el análisis de la expresión regulada por el promotor sCMV, fue hecha en éstos mismos embriones microinyectados y no en un modelo transgénico.

Tanto el promotor sCMV como el de humano (hCMV), se han utilizado para promover alta expresión en células de mamífero y en otros eucariontes, catalogándose como promotores fuertes en modelos *in vitro*. Esto constituyó una de las principales razones de elección del promotor sCMV, para regular la transcripción de las construcciones de los vectores utilizados en este proyecto. Sin embargo, tiempo después cuando las construcciones ya estaban hechas encontramos reportes de que el promotor sCMV no induce una expresión alta y ubicua en transgénicos de pez cebra (*Danio rerio*) y en ratón. Se ha visto que el promotor de sCMV y el promotor de hCMV promueven un patrón de expresión tejido específico y dinámico, conforme avanza el desarrollo de los organismos transgénicos modelo generados también con el sistema Tol2 kit (Suhr et al., 2009; Mella-Alvarado et al., 2013).

El promotor sCMV en pez cebra es muy activo para la inducción de expresión génica transitoria en embriones microinyectados. Sin embargo, Suhr y colaboradores observaron que en los embriones microinyectados con vectores Tol2 para inducir transgénesis estable de la proteína EGFP, hay gran variación en los niveles de fluorescencia entre las

(24-72) hpf. Posteriormente se caracterizó en la primera y segunda generación de peces transgénicos, que el promotor sCMV promueve expresión génica en: telencéfalo, cerebelo, médula espinal, retina, bulbo olfatorio y línea lateral en los primeros 2 y 7 días post-fertilización. En músculo esquelético hubo un intenso nivel de expresión y de fluorescencia hasta los 2-3 meses post-fertilización (Suhr et al., 2009). El patrón de expresión del promotor de sCMV en transgénicos de pez cebra, fue muy similar al patrón de expresión descrito para el promotor de hCMV también en transgénicos de pez cebra generados con el sistema Tol2 kit (Mella-Alvarado et al., 2013).

Otros factores que podrían explicar los niveles bajos de fluorescencia observados en los embriones de los peces fundadores transgénicos o generación F1 (caracterizados por PCR) son: el número de copias del transgen, la traducción de la proteína EGFP regulada por la secuencia Internal ribosome entry site (IRES), y finalmente la eficiencia en la maduración de la proteína EGFP. Debe de tenerse en cuenta que la transgénesis inducida con el sistema Tol2 al ser dependiente de un mecanismo de recombinación por una transposasa, el número de inserciones del transgen y su localización en el genoma de la célula son inespecíficas (Kawakami, 2007), por tanto, el número de copias entre diferentes líneas transgénicas puede variar. Por otro lado, la eficiencia en la traducción de las proteínas verdes fluorescentes entre ellas de la EGFP, se ha visto que es dependiente de la secuencia de reconocimiento al ribosoma y el uso de codón. Por ejemplo, en modelos de mamífero la secuencia Kozak es la secuencia más eficiente para la traducción de proteínas GFPs (Tsien, 1998), mientras que hay reportes contradictorios en cuanto a la eficiencia en la traducción por los IRES (Internal ribosomal entry sites). Predomina el supuesto de que la traducción mediado por IRES es más baja para el segundo cistron en un mRNA bi-cistronico que el no-dependiente de IRES (Hennecke et al., 2001; Mizuguchi et al., 2000; Sadikoglou et al., 2014) . La fluorescencia de las GFPs también depende del tiempo y condiciones ambientales del sistema; ya que las diferentes GFPs poseen tasas de maduración (plegamiento correcto de la proteína para la conformación del fluorocromo) diferentes. Se ha caracterizado que a temperaturas  $\approx 30^{\circ}\text{C}$  o mayores, la maduración del fluorocromo disminuye considerablemente. La competición de la fluorescencia con el ruido de fondo como puede ser la autofluorescencia también afecta la señal real de fluorescencia por las GFPs y finalmente la compartimentalización celular de las proteínas GFPs pueden ayudar a mejorar las observaciones de fluorescencia. Un grado alto de difusión, como puede ser la localización citoplásmica o en membrana citoplásmica, optimizan grandemente la fluorescencia en observaciones macroscópicas de tejidos u organismos completos que expresan las GFPs (Tsien, 1998).

## **Genotipificación y hallazgo de fundadores transgénicos para la versión de BG silvestre (WT-BG) y BG mutante sin dominio citoplásmico (DT-BG)**

La población de peces posibles fundadores transgénicos que fueron positivos para el transgen de Betaglicano de rata en la aleta caudal, fueron cruzados con peces silvestres Tübingen AB. Los embriones de cada cruce fueron sometidos al análisis por PCR para ver si habían heredado el transgen de uno de sus progenitores; de esta forma se pudo encontrar a 5 peces fundadores transgénicos para la versión de BG silvestre y 4 peces de la versión mutante del BG carente de la región citoplásmica, *ver tabla 2*. Estos hallazgos nos permitieron obtener dos poblaciones de fundadores transgénicos, a partir de las cuales se pueden establecer líneas transgénicas de peces cebras con el transgen del Betaglicano silvestre de rata y del Betaglicano de rata sin la región citoplásmica. Las observaciones generales sobre los embriones transgénicos, nos permite decir que gran parte de la población presenta la viabilidad suficiente para llegar a la etapa adulta.

## **Posibles cambios metodológicos que podrían mejorar el diseño experimental del proyecto**

Ante la problemática de una posible expresión baja del transgen, por una actividad baja del promotor sCMV empleado en las construcciones para la transgénesis de las diferentes versiones del BG, es necesario un nuevo diseño de los vectores de expresión Tol2 para incluir un nuevo promotor constitutivo y de expresión ubicua ya caracterizado en pez cebra, como el promotor de  $\beta$ -actina (Kwan et al., 2007). Para evitar los problemas de autofluorescencia típico de las proteínas verdes fluorescentes, se podría usar como proteína reportera a mCherry, ya que es conocido que las proteínas que emiten fluorescencia a longitudes onda cercanas al rojo, su señal es menos afectada por la autofluorescencia de la materia biológica (Tsien, 1998). Sin embargo, ante la carencia de un vector 3' con un IREs-mCherry en la colección Tol2kit para generar una construcción para expresión de un mRNA bi-cistrónico con proteínas rojas, sería de mucha utilidad usar EGFP como gen reportero, pero que tenga localización citoplásmica o en membrana celular (Kwan et al., 2007). Estos sencillos cambios en la construcción de los vectores, podrían resolver la problemática observada y favorecer el objetivo de estudio planteado en esta tesis.

Otro abordaje experimental para la generación de transgénesis en el pez cebra podría ser de gran utilidad si elimina los problemas que conlleva el uso de un sistema de transposición; como la inserción inespecífica del transgen en el genoma del pez. Recientemente las aplicaciones del sistema tipo II de *Streptococcus pyogenes* CRISPR/Cas9, ha demostrado ser altamente eficiente para la generación de un transgénico por knock-in en el pez cebra (Hwang et al., 2013; Kimura et al., 2014). El sistema CRISPR/Cas9 tiene un porcentaje de éxito arriba del 25% en la generación de

fundadores transgénicos (Kimura et al., 2014), casi igual de eficiente que el sistema Tol2. Nuevas ventajas que el sistema CRISPR/Cas9 para knock-in aportaría a nuestro modelo experimental serían: tener una transgénesis locus específico de una sola copia y poder usar el propio promotor del transgen. Éstas ventajas mencionadas anteriormente han sido caracterizadas por dos grupos de investigación, quienes demostraron la posibilidad de realizar knock-in en el pez cebra para la generación de un transgénico mediante el sistema de reparación de DNA independiente de homología inducida por el sistema CRISPR/Cas9 (Auer et al., 2014; Kimura et al., 2014). La metodología descrita por Auer y Kimura resulta tan flexible y eficiente que para hacer uso de ella sólo se necesita diseñar un sgRNA para la digestión del sitio específico del genoma blanco, otro sgRNA para la digestión del vector, el vector que porta el transgen a insertar y el mRNA de Cas9; todos estos elementos se microinyectan en etapa de célula única en embriones de pez cebra. Posteriormente esta metodología fue mejorado por Hisano y colaboradores, donde por implementación de pequeñas secuencias homólogas a la secuencia genómica blanco que flanquean el transgen en el vector; se puede lograr una inserción específica del transgen evitando las posibles inserciones con pérdida del marco de lectura del transgen. Por tanto, ya existe una metodología que podría ayudarnos a obtener peces transgénicos que podrían usar el promotor endógeno del transgen, con una inserción específica y sin problemas de corrimiento de marco de lectura (Hisano et al., 2015).

La metodología de CRISPR/Cas9 también podría ser utilizada para generar peces mutantes del BG, la mutante del BG que carece de la región citoplásmica y de la mutante del BG que carece de glucosaminoglucanos. Este nuevo enfoque, permitiría hacer un estudio de la participación del BG en el desarrollo mediante rescates fenotípicos con el mRNA del BG silvestre, sin la forzosa necesidad de generar la transgénesis.

## Conclusión

Utilizando la metodología Tol2 kit para inducir transgénesis en pez cebra, se obtuvieron peces fundadores transgénicos para la versión de Betaglicano silvestre de rata (BG-WT) y de Betaglicano que carece de la región citoplásmica (BG-DT). A partir de estos fundadores transgénicos, se pueden establecer líneas transgénicas de estas dos versiones de Betaglicano de rata.

Debido a que se ha reportado en la literatura que el promotor que controla nuestras versiones de BG transgénicos, el promotor sCMV; no posee actividad constitutiva en transgénicos de pez cebra (Suhr et al., 2009; Mella-Alvarado et al., 2013), es necesario que se caracterice el patrón de expresión del Betaglicano de rata en nuestros transgénicos para comprobarlo.

## Perspectivas

- Seleccionar la descendencia de los peces fundadores transgénicos, para establecer líneas transgénicas de las dos versiones del Betaglicano (silvestre y mutante carente de la región citoplásmica).
- Caracterizar el patrón de expresión de las versiones del BG en los embriones transgénicos mediante inmunofluorescencia y RT-PCR cuantitativo.
- Establecer una línea homocigótica transgénica de las versiones de BG (BG-DT y BG-WT) para analizar si existe un fenotipo asociado con estas versiones transgénicas del Betaglicano en pez cebra.
- Realizar ensayos de disminución del Betaglicano endógeno en los peces transgénicos (BG-DT), por knock-down o knock-out (cruzando los peces transgénicos con peces knock-out); para analizar *in vivo* la función de la región citoplásmica del BG durante el desarrollo del pez cebra.
- Generar nuevos peces transgénicos usando un nuevo diseño y metodología experimental, por ejemplo, CRISPR/Cas9, para el caso de que los transgénicos no expresen de forma constitutiva y ubicua el BG y para resolver al mismo tiempo algunos inconvenientes que posee un transgénico originado por un sistema basado en un elemento transgénico transponible, como la transgénesis locus no específica.

## Referencias

- Andres, J.L., DeFalcis, D., Noda, M., and Massague, J. (1992). Binding of two growth factor families to separate domains of the proteoglycan betaglycan. *The Journal of biological chemistry* 267, 5927-5930.
- Arthur, H.M., Ure, J., Smith, A.J., Renforth, G., Wilson, D.I., Torsney, E., Charlton, R., Parums, D.V., Jowett, T., Marchuk, D.A., *et al.* (2000). Endoglin, an ancillary TGFbeta receptor, is required for extraembryonic angiogenesis and plays a key role in heart development. *Developmental biology* 217, 42-53.
- Auer, T.O., Duroure, K., De Cian, A., Concordet, J.P., and Del Bene, F. (2014). Highly efficient CRISPR/Cas9-mediated knock-in in zebrafish by homology-independent DNA repair. *Genome Res* 24, 142-153.
- Bautch, V.L. (2017). Endoglin moves and shapes endothelial cells. *Nature cell biology* 19, 593-595.
- Bedell, V.M., Wang, Y., Campbell, J.M., Poshusta, T.L., Starker, C.G., Krug, R.G., 2nd, Tan, W., Penheiter, S.G., Ma, A.C., Leung, A.Y., *et al.* (2012). In vivo genome editing using a high-efficiency TALEN system. *Nature* 491, 114-118.
- Bilandzic, M., and Stenvers, K.L. (2012). Reprint of: Betaglycan: a multifunctional accessory. *Molecular and cellular endocrinology* 359, 13-22.
- 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, 69-77.
- Clark, K.J., Urban, M.D., Skuster, K.J., and Ekker, S.C. (2011). Transgenic Zebrafish Using Transposable Elements. *Method Cell Biol* 104, 137-149.
- Clark, K.J.E., S. C. (2015). How Zebrafish Genetics Informs Human Biology. *Nature Education*
- Compton, L.A., Potash, D.A., Brown, C.B., and Barnett, J.V. (2007). Coronary vessel development is dependent on the type III transforming growth factor beta receptor. *Circulation research* 101, 784-791.
- Chen, W., Kirkbride, K.C., How, T., Nelson, C.D., Mo, J., Frederick, J.P., Wang, X.F., Lefkowitz, R.J., and Blobel, G.C. (2003). Beta-arrestin 2 mediates endocytosis of type III TGF-beta receptor and down-regulation of its signaling. *Science* 301, 1394-1397.
- Chien, C.-B. (2016). Tol2 kit (Utah, USA.: [http://tol2kit.genetics.utah.edu/index.php/Main\\_Page](http://tol2kit.genetics.utah.edu/index.php/Main_Page)).
- Dale, J., and Schantz, M.v. (2002). From genes to genomes : concepts and applications of DNA technology (Chichester, West Sussex, England ; New York: Wiley).
- Draper, B.W., Morcos, P.A., and Kimmel, C.B. (2001). Inhibition of zebrafish fgf8 pre-mRNA splicing with morpholino oligos: a quantifiable method for gene knockdown. *Genesis* 30, 154-156.
- Ekker, S.C., and Larson, J.D. (2001). Morphant technology in model developmental systems. *Genesis* 30, 89-93.
- Esparza-Lopez, J., Montiel, J.L., Vilchis-Landeros, M.M., Okadome, T., Miyazono, K., and Lopez-Casillas, F. (2001). Ligand binding and functional properties of betaglycan, a co-receptor of the transforming growth factor-beta superfamily. Specialized binding regions for transforming growth factor-beta and inhibin A. *The Journal of biological chemistry* 276, 14588-14596.
- Feiner, R., Argov, T., Rabinovich, L., Sigal, N., Borovok, I., and Herskovits, A.A. (2015). A new perspective on lysogeny: prophages as active regulatory switches of bacteria. *Nature reviews Microbiology* 13, 641-650.
- Finger, E.C., Lee, N.Y., You, H.J., and Blobel, G.C. (2008). Endocytosis of the type III transforming growth factor-beta (TGF-beta) receptor through the clathrin-independent/lipid raft pathway regulates TGF-beta signaling and receptor down-regulation. *The Journal of biological chemistry* 283, 34808-34818.
- Foley, J.E., Maeder, M.L., Pearlberg, J., Joung, J.K., Peterson, R.T., and Yeh, J.R. (2009). Targeted mutagenesis in zebrafish using customized zinc-finger nucleases. *Nature protocols* 4, 1855-1867.

- Griffiths AJF, G.W., Miller JH, et al. (1999). *Modern Genetic Analysis* (New York: W. H. Freeman).
- Hartley, J.L., Temple, G.F., and Brasch, M.A. (2000). DNA cloning using in vitro site-specific recombination. *Genome Res* 10, 1788-1795.
- Hartmann, N., and Englert, C. (2012). A microinjection protocol for the generation of transgenic killifish (Species: *Nothobranchius furzeri*). *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* 241, 1133-1141.
- Hennecke, M., Kwissa, M., Metzger, K., Oumard, A., Kroger, A., Schirmbeck, R., Reimann, J., and Hauser, H. (2001). Composition and arrangement of genes define the strength of IRES-driven translation in bicistronic mRNAs. *Nucleic acids research* 29, 3327-3334.
- Hisano, Y., Sakuma, T., Nakade, S., Ohga, R., Ota, S., Okamoto, H., Yamamoto, T., and Kawahara, A. (2015). Precise in-frame integration of exogenous DNA mediated by CRISPR/Cas9 system in zebrafish. *Scientific reports* 5, 8841.
- Hoshijima, K., Jurynek, M.J., and Grunwald, D.J. (2016). Precise Editing of the Zebrafish Genome Made Simple and Efficient. *Developmental cell* 36, 654-667.
- Huang, P., Zhu, Z., Lin, S., and Zhang, B. (2012). Reverse genetic approaches in zebrafish. *Journal of genetics and genomics = Yi chuan xue bao* 39, 421-433.
- Hwang, W.Y., Fu, Y., Reyon, D., Maeder, M.L., Tsai, S.Q., Sander, J.D., Peterson, R.T., Yeh, J.R., and Joung, J.K. (2013). Efficient genome editing in zebrafish using a CRISPR-Cas system. *Nature biotechnology* 31, 227-229.
- Kamaid, A., Molina-Villa, T., Mendoza, V., Pujades, C., Maldonado, E., Ispizua Belmonte, J.C., and Lopez-Casillas, F. (2015). Betaglycan knock-down causes embryonic angiogenesis defects in zebrafish. *Genesis*.
- Katzen, F. (2007). Gateway((R)) recombinational cloning: a biological operating system. *Expert opinion on drug discovery* 2, 571-589.
- Kawakami, K. (2004). Transgenesis and gene trap methods in zebrafish by using the Tol2 transposable element. *Methods in cell biology* 77, 201-222.
- Kawakami, K. (2007). Tol2: a versatile gene transfer vector in vertebrates. *Genome biology* 8 *Suppl 1*, S7.
- Kawakami, K., and Shima, A. (1999). Identification of the Tol2 transposase of the medaka fish *Oryzias latipes* that catalyzes excision of a nonautonomous Tol2 element in zebrafish *Danio rerio*. *Gene* 240, 239-244.
- Kawakami, K., Shima, A., and Kawakami, N. (2000). Identification of a functional transposase of the Tol2 element, an Ac-like element from the Japanese medaka fish, and its transposition in the zebrafish germ lineage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 11403-11408.
- Kimura, Y., Hisano, Y., Kawahara, A., and Higashijima, S. (2014). Efficient generation of knock-in transgenic zebrafish carrying reporter/driver genes by CRISPR/Cas9-mediated genome engineering. *Scientific reports* 4, 6545.
- Kirkbride, K.C., Townsend, T.A., Bruinsma, M.W., Barnett, J.V., and Blobe, G.C. (2008). Bone morphogenetic proteins signal through the transforming growth factor-beta type III receptor. *The Journal of biological chemistry* 283, 7628-7637.
- Koga, A., and Hori, H. (2001). The Tol2 transposable element of the medaka fish: an active DNA-based element naturally occurring in a vertebrate genome. *Genes & genetic systems* 76, 1-8.
- Kwan, K.M., Fujimoto, E., Grabher, C., Mangum, B.D., Hardy, M.E., Campbell, D.S., Parant, J.M., Yost, H.J., Kanki, J.P., and Chien, C.B. (2007). The Tol2kit: a multisite gateway-based construction kit for Tol2 transposon transgenesis constructs. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* 236, 3088-3099.
- Lewis, K.A., Gray, P.C., Blount, A.L., MacConell, L.A., Wiater, E., Bilezikjian, L.M., and Vale, W. (2000). Betaglycan binds inhibin and can mediate functional antagonism of activin signalling. *Nature* 404, 411-414.

- Li, D.Y., Sorensen, L.K., Brooke, B.S., Urness, L.D., Davis, E.C., Taylor, D.G., Boak, B.B., and Wendel, D.P. (1999). Defective angiogenesis in mice lacking endoglin. *Science* 284, 1534-1537.
- Lieschke, G.J., and Currie, P.D. (2007). Animal models of human disease: zebrafish swim into view. *Nature reviews Genetics* 8, 353-367.
- Lin, S.J., Hu, Y., Zhu, J., Woodruff, T.K., and Jardeetzky, T.S. (2011). Structure of betaglycan zona pellucida (ZP)-C domain provides insights into ZP-mediated protein polymerization and TGF-beta binding. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108, 5232-5236.
- Lopez-Casillas, F., Payne, H.M., Andres, J.L., and Massague, J. (1994). Betaglycan can act as a dual modulator of TGF-beta access to signaling receptors: mapping of ligand binding and GAG attachment sites. *The Journal of cell biology* 124, 557-568.
- Lopezcasillas, F., Cheifetz, S., Doody, J., Andres, J.L., Lane, W.S., and Massague, J. (1991). Structure and Expression of the Membrane Proteoglycan Betaglycan, a Component of the Tgf-Beta Receptor System. *Cell* 67, 785-795.
- Massague, J. (1990). The transforming growth factor-beta family. *Annual review of cell biology* 6, 597-641.
- McLean, S., and Di Guglielmo, G.M. (2010). TGF beta (transforming growth factor beta) receptor type III directs clathrin-mediated endocytosis of TGF beta receptor types I and II. *The Biochemical journal* 429, 137-145.
- Mella-Alvarado, V., Gautier, A., Le Gac, F., and Lareyre, J.J. (2013). Tissue and cell-specific transcriptional activity of the human cytomegalovirus immediate early gene promoter (UL123) in zebrafish. *Gene expression patterns : GEP* 13, 91-103.
- Mendoza, V., Vilchis-Landeros, M.M., Mendoza-Hernandez, G., Huang, T., Villarreal, M.M., Hinck, A.P., Lopez-Casillas, F., and Montiel, J.L. (2009). Betaglycan has two independent domains required for high affinity TGF-beta binding: proteolytic cleavage separates the domains and inactivates the neutralizing activity of the soluble receptor. *Biochemistry* 48, 11755-11765.
- Mizuguchi, H., Xu, Z., Ishii-Watabe, A., Uchida, E., and Hayakawa, T. (2000). IRES-dependent second gene expression is significantly lower than cap-dependent first gene expression in a bicistronic vector. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 1, 376-382.
- Pepin, M.C., Beauchemin, M., Plamondon, J., and O'Connor-McCourt, M.D. (1994). Mapping of the ligand binding domain of the transforming growth factor beta receptor type III by deletion mutagenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91, 6997-7001.
- Poulain, F.E. (2015). Analyzing the role of heparan sulfate proteoglycans in axon guidance in vivo in zebrafish. *Methods in molecular biology* 1229, 469-482.
- Poulain, F.E., and Yost, H.J. (2015). Heparan sulfate proteoglycans: a sugar code for vertebrate development? *Development* 142, 3456-3467.
- Rupp, R.A., Snider, L., and Weintraub, H. (1994). Xenopus embryos regulate the nuclear localization of XMyoD. *Genes & development* 8, 1311-1323.
- Sadikoglou, E., Daoutsali, E., Petridou, E., Grigoriou, M., and Skavdis, G. (2014). Comparative analysis of internal ribosomal entry sites as molecular tools for bicistronic expression. *Journal of biotechnology* 181, 31-34.
- Shi, Y., and Massague, J. (2003). Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell* 113, 685-700.
- Stenvers, K.L., Tursky, M.L., Harder, K.W., Kountouri, N., Amatayakul-Chantler, S., Grail, D., Small, C., Weinberg, R.A., Sizeland, A.M., and Zhu, H.J. (2003). Heart and liver defects and reduced transforming growth factor beta2 sensitivity in transforming growth factor beta type III receptor-deficient embryos. *Molecular and cellular biology* 23, 4371-4385.
- Suhr, S.T., Ramachandran, R., Fuller, C.L., Veldman, M.B., Byrd, C.A., and Goldman, D. (2009). Highly-restricted, cell-specific expression of the simian CMV-IE promoter in

- transgenic zebrafish with age and after heat shock. *Gene expression patterns : GEP* 9, 54-64.
- Tsien, R.Y. (1998). The green fluorescent protein. *Annual review of biochemistry* 67, 509-544.
- Turner, D.L., and Weintraub, H. (1994). Expression of achaete-scute homolog 3 in *Xenopus* embryos converts ectodermal cells to a neural fate. *Genes & development* 8, 1434-1447.
- Velasco-Loyden, G., Arribas, J., and Lopez-Casillas, F. (2004). The shedding of betaglycan is regulated by pervanadate and mediated by membrane type matrix metalloprotease-1. *The Journal of biological chemistry* 279, 7721-7733.
- Villarreal, M.M., Kim, S.K., Barron, L., Kodali, R., Baardsnes, J., Hinck, C.S., Krzysiak, T.C., Henen, M.A., Pakhomova, O., Mendoza, V., *et al.* (2016). Binding Properties of the Transforming Growth Factor-beta Coreceptor Betaglycan: Proposed Mechanism for Potentiation of Receptor Complex Assembly and Signaling. *Biochemistry* 55, 6880-6896.
- Weiss, A., and Attisano, L. (2013). The TGFbeta superfamily signaling pathway. *Wiley interdisciplinary reviews Developmental biology* 2, 47-63.
- Wiater, E., Harrison, C.A., Lewis, K.A., Gray, P.C., and Vale, W.W. (2006). Identification of distinct inhibin and transforming growth factor beta-binding sites on betaglycan: functional separation of betaglycan co-receptor actions. *The Journal of biological chemistry* 281, 17011-17022.
- Wiater, E., Lewis, K.A., Donaldson, C., Vaughan, J., Bilezikjian, L., and Vale, W. (2009). Endogenous betaglycan is essential for high-potency inhibin antagonism in gonadotropes. *Molecular endocrinology* 23, 1033-1042.
- Wu, M.Y., and Hill, C.S. (2009). Tgf-beta superfamily signaling in embryonic development and homeostasis. *Developmental cell* 16, 329-343.
- Yuan, S., and Sun, Z. (2009). Microinjection of mRNA and morpholino antisense oligonucleotides in zebrafish embryos. *Journal of visualized experiments : JoVE*.