



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

**Caracterización de la función de BAF57, una subunidad del complejo SWI/SNF, durante el desarrollo embrionario de pez cebra (*Danio rerio*).**

TESIS  
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:  
M. en C. JORGE LUIS CASTILLO ROBLES

DIRECTOR DE TESIS  
DRA. HILDA LOMELÍ BUYOLI, IBT UNAM

COMITÉ TUTOR  
DRA. ROSA NAVARRO GONZÁLEZ, IFC UNAM

DR. MARIO ZURITA ORTEGA, IBT UNAM

CUERNAVACA MORELOS. ENERO DE 2019



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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

## ÍNDICE

<b>RESUMEN</b> .....	4
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	5
Diferenciación celular: de una célula a un organismo complejo.....	5
Mecanismos epigenéticos.....	6
Complejos remodeladores de la cromatina dependientes de ATP.....	7
El complejo remodelador de cromatina SWI/SNF o BAF.....	7
<b>ANTECEDENTES</b> .....	13
La subunidad BAF57.....	13
Los dominios de BAF57.....	14
Baf155 y Baf170 protegen a BAF57 de la degradación.....	15
La expresión de isoformas de BAF57.....	16
BAF57 media la represión del gen CD4 durante la especificación de las células T.....	17
Mutaciones en el gen <i>BAF57</i> de humanos.....	17
<b>El pez cebra como modelo de estudio</b> .....	20
El desarrollo embrionario del pez cebra.....	21
Desarrollo del corazón en pez cebra.....	22
<b>El papel del complejo BAF durante el desarrollo del corazón</b> .....	26
<b>JUSTIFICACIÓN</b> .....	27
<b>HIPÓTESIS</b> .....	28
<b>OBJETIVOS</b> .....	29
Objetivo general.....	29
Objetivos particulares.....	29
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	30
Mantenimiento de las cepas de pez cebra.....	30
Mutaciones mediadas por CRISPR-Cas9.....	30
Genotipificación.....	30
Síntesis del ARNm de BAF57 y experimentos de rescate.....	31
Histología.....	31
Hibridaciones <i>in situ</i> .....	31
Microscopía.....	32
Inmunofluorescencia.....	33
Análisis de PCR en tiempo real.....	33

Western blot.....	34
Inmunoprecipitación de cromatina (ChIP).....	34
Co-inmunoprecipitación. ....	35
Identificación de proteínas por espectrometría de masas en tándem (LC–MS/MS).....	35
<b>RESULTADOS</b> .....	37
Expresión del de <i>baf57</i> es ubicua durante el desarrollo del pez cebra.....	37
<i>baf57</i> de pez cebra presenta formas de <i>splicing</i> alternativo específicas de cerebro.....	38
Generando la pérdida de función de Baf57 en pez cebra.....	39
Las mutaciones generadas en Baf57 causan severos defectos a los 4dpf.....	41
Las mutaciones conducen a un abatimiento total de la proteína BAF57.....	43
El ARNm de Baf57 es capaz de rescatar el fenotipo.....	44
La estructura del corazón en las larvas <i>baf57</i> <sup>-/-</sup> presenta alteraciones importantes.....	45
Los corazones en los mutantes no logran el proceso de torsión o looping.....	46
La falta de BAF57 no afecta la formación del mesodermo, endodermo ni del miocardio durante las etapas tempranas del desarrollo .....	49
La falta de BAF57 conduce a defectos durante el desarrollo del endocardio.....	50
La formación del canal atrioventricular se ve severamente afectada en los mutantes de <i>baf57</i> <sup>-/-</sup> .....	53
La pérdida de BAF57 provoca una sobreexpresión de varios factores transcripciones cardiacos.....	54
La subunidad BAF57 es necesaria para que el complejo BAF se una a regiones regulatorias de <i>gata5</i> .....	56
BAF57 es esencial para mantener la estabilidad del complejo BAF.....	58
<b>DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES</b> .....	60
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	67



## RESUMEN

El complejo remodelador de cromatina SWI/SNF también conocido como BAF en mamíferos está formado por al menos 12 subunidades codificadas por 28 genes, lo que permite una gran variedad de ensamblajes. BAF57 es una subunidad que se puede encontrar solo en animales y está presente en todas las posibles combinaciones de los complejos BAF. Se ha reportado que BAF57 tiene un papel importante en varios procesos generales, como la transcripción y la diferenciación celular, también se ha involucrado en procesos específicos de desarrollo, en la biogénesis del cáncer y tiene un papel importante en las enfermedades de discapacidad intelectual.

En este trabajo, eliminamos el gen *baf57* en el pez cebra mediante el sistema CRISPR-Cas9. Encontramos que durante los primeros 2 días post fertilización (dpf) el desarrollo de los embriones parece transcurrir sin problemas, sin embargo, a los 3 dpf observamos entre otros defectos, una reducción en la talla, una curvatura en el eje corporal, malformaciones en diferentes órganos, incluyendo la vesícula ótica, la vejiga natatoria y el corazón, además desarrollan un edema pericárdico y mueren a los 6 dpf. Nosotros nos enfocamos primeramente en estudiar los defectos cardíacos y encontramos alteraciones durante el desarrollo del endocardio en estadios tempranos, y que posteriormente observamos que el tubo cardíaco no logra hacer el *looping* necesario para el correcto funcionamiento del corazón. Aunado a esto observamos un importante incremento en la expresión de factores transcripcionales que incluyen a *nkx2.5*, *nppa* y *gata5*, los cuales son algunos de los principales orquestadores que dirigen el desarrollo del corazón. Adicionalmente mostramos que, en un contexto silvestre, BAF57 se une a regiones regulatorias en *cis* del gen *gata5* reprimiendo su expresión en estadios tardíos. Además, los estudios de co-inmunoprecipitación y proteómica, indicaron alteraciones en la composición del complejo BAF de las larvas mutantes, lo que sugiere que BAF57 es importante para el correcto ensamblaje del complejo BAF y la expresión correcta de ciertos genes durante el desarrollo del corazón.

## INTRODUCCIÓN

### **Diferenciación celular: de una célula a un organismo complejo.**

Durante el desarrollo embrionario es necesario que ocurra una especificación en un subgrupo de células para dar lugar a células progenitoras de un determinado tejido u órgano que de esta manera iniciará su diferenciación gradual hacia un destino celular en particular. Al mismo tiempo que ocurre la diferenciación, otros procesos moleculares y celulares tienen lugar, como la señalización, la migración y la organización celular en el espacio tridimensional. Para dar origen a estos subgrupos de células cada vez más especializadas y finalmente a un órgano maduro y funcional es necesaria una regulación espacio-temporal de la expresión genética muy precisa.

Justamente, una de las preguntas más fascinantes en la biología ha sido, cómo a partir de una célula única -el óvulo fertilizado o cigoto-, puede desarrollarse un organismo completo con cientos de tipos celulares. La generación de esta gran variedad de tipos celulares, sorprendentemente ocurre a partir de una célula con un genoma compuesto con ADN del padre y de la madre. Entonces, si cada célula del cuerpo contiene la misma información genética, ¿cómo es posible que un mismo genoma dé instrucciones que produzcan tipos celulares tan variables? Sumado a esto, las células diferenciadas no están distribuidas aleatoriamente, sino perfectamente organizadas formando tejidos y órganos con un determinado tamaño y forma, a lo cual llamamos morfogénesis. Las preguntas fundamentales que surgen son: ¿cuáles son los mecanismos que dirigen el crecimiento, la forma y el tamaño de cada tejido, órgano u organismo en particular? y ¿cuál es la relación entre la información genética y la complejidad que resulta de estos procesos del desarrollo? (Gilbert 2006). Para tratar de responder estas preguntas, la biología del desarrollo engloba el estudio de todos estos procesos, desde la fertilización, la diferenciación celular, morfogénesis y el crecimiento, integrando distintas disciplinas como la fisiología, la biología celular, la genética y la epigenética. La regulación de la transcripción genética es un determinante clave durante la diferenciación celular, y desempeña un papel muy importante en el desarrollo embrionario y enfermedades humanas.

## **Mecanismos epigenéticos.**

El material genético de las células eucariotas está empaquetado en el núcleo dentro de la cromatina. La subunidad básica de la cromatina es el nucleosoma, una estructura proteica altamente estable, compuesta de un octámero de histonas formado por dos moléculas de cada una de las histonas H2A, H2B, H3 y H4. Este octámero está rodeado por aproximadamente 1.8 vueltas de ADN de doble cadena, lo que equivale a 147 pares de bases (pb). (Kornberg 1974). La cromatina se puede encontrar en distintos grados de compactación. La más laxa es la fibra de 11 nanómetros (nm), que consta de nucleosomas separados por una zona de ADN de longitud variable, entre 10 y 50 pb, asemejando un collar de cuentas (*beads-on-a-string*). El siguiente nivel de mayor compactación es la fibra de 30 nm o solenoide, compuesto de grupos de 6 nucleosomas empaquetados en forma de hélice, donde una variante de histona, H1 o histona-linker ayuda a formar esta estructura (Berger 2007). La tendencia natural es hacia la formación de una estructura altamente compacta de cromatina gracias a la fuerte interacción entre la carga negativa del ADN y las histonas, las cuales son extremadamente básicas, lo que favorece la estabilidad de los nucleosomas y permite bloquear físicamente el acceso a regiones del genoma. Sin embargo, el grado de compactación de la cromatina es dinámico y variable, siendo la heterocromatina la más compacta y por lo tanto la forma inactiva, mientras la eucromatina menos compacta y por lo tanto la forma activa (Zheng and Hayes 2003).

Hasta el momento, se han identificado diversos mecanismos epigenéticos que determinan la dinámica entre la formación de eucromatina hacia heterocromatina y viceversa, y que por lo tanto son fundamentales en la regulación de la expresión genética (Mohtat and Susztak 2010). Dentro de los principales mecanismos se incluyen: la metilación del ADN, las modificaciones covalentes post-traduccionales de las histonas, el silenciamiento génico mediado por ARNs no codificantes y los complejos de remodelación de cromatina dependientes de ATP, (Goldberg, Allis et al. 2007, Bell and Spector 2011). Estos complejos son capaces de reordenar el estado de la cromatina (eucromatina/heterocromatina) a pesar de la tendencia natural de los cromosomas hacia un mayor grado de compactación del ADN. La remodelación de cromatina es un factor

determinante para regular el acceso de factores proteicos a regiones específicas de ADN, el cual es necesario para iniciar procesos moleculares como la transcripción, la replicación y la reparación. En conclusión, se requiere una combinación extremadamente coordinada de varios mecanismos reguladores del estado de la cromatina, junto con un reclutamiento de factores transcripcionales, para establecer los patrones correctos de expresión genética durante el desarrollo.

### **Complejos remodeladores de la cromatina dependientes de ATP.**

Los complejos remodeladores de cromatina (CRC) dependientes de ATP (adenosina trifosfato) son complejos multiproteicos que se encuentran muy conservados en eucariotas. El análisis de factores que median la organización de los nucleosomas durante el ensamblaje de la cromatina condujo a la identificación de varios de estos complejos, los cuales se agrupan en cuatro familias: SWI/SNF, ISWI, CHD (NuRD/Mi2) e INO80. (Flaus, Martin et al. 2006, Clapier and Cairns 2009). Las características comunes de estos CRC es su gran tamaño, pero principalmente que presentan una subunidad catalítica que contiene un dominio de ATPasa/helicasa, aunque obviamente también presentan diferencias en cuanto a su abundancia y actividad. Los CRC normalmente se asocian a otros co-reguladores que dirigen su reclutamiento hacia secuencias específicas del genoma para mantener o reorganizar las interacciones entre el ADN y los nucleosomas (Hargreaves and Crabtree 2011, Narlikar, Sundaramoorthy et al. 2013).

### **El complejo remodelador de cromatina SWI/SNF o BAF**

El primer remodelador de cromatina dependiente de ATP que se describió fue el complejo SWI/SNF (switch/sucrose nonfermenting) de levadura, implicándolo en un principio, en la regulación del gen que codifica para la endonucleasa necesaria para el intercambio del tipo sexual (Stern, Jensen et al. 1984), y del gen encargado de fermentar sacarosa (Neigeborn and Carlson 1984). Posteriormente, se descubrió que este complejo regula la transcripción de un gran número de genes (Hirschhorn, Brown et al. 1992).

El complejo SWI/SNF es reclutado a la cromatina en donde desplaza o reposiciona a los nucleosomas, liberando secuencias de DNA que se encuentran inaccesibles a diferentes factores de transcripción (Fig. 1A), lo que se asocia primordialmente a la activación transcripcional (Peterson and Herskowitz 1992, Roberts and Orkin 2004, Yaniv 2014). Como ya se mencionó, gracias principalmente a la hidrólisis de ATP mediada por su subunidad catalítica el complejo SWI/SNF puede llevar a cabo la remodelación de la cromatina a través de varios mecanismos: puede desplazar el octámero de histonas con respecto a la secuencia del DNA (Fig. 1B), expulsar totalmente un nucleosoma (Fig. 1C), desenrollar el DNA sobre la superficie del nucleosoma (Fig. 1D) o inducir un cambio en la composición de histonas del octámero (Fig. 1E). Por otro lado, otros trabajos han contribuido a entender que el complejo SWI/SNF también funciona en el proceso inverso, es decir, que el complejo SWI/SNF puede actuar reposicionando a los nucleosomas de tal manera que secuencias blanco para un determinado factor transcripcional, queden ocultas y por lo tanto interviniendo en la represión transcripcional (Sudarsanam, Iyer et al. 2000, Cairns 2007, Hargreaves and Crabtree 2011).

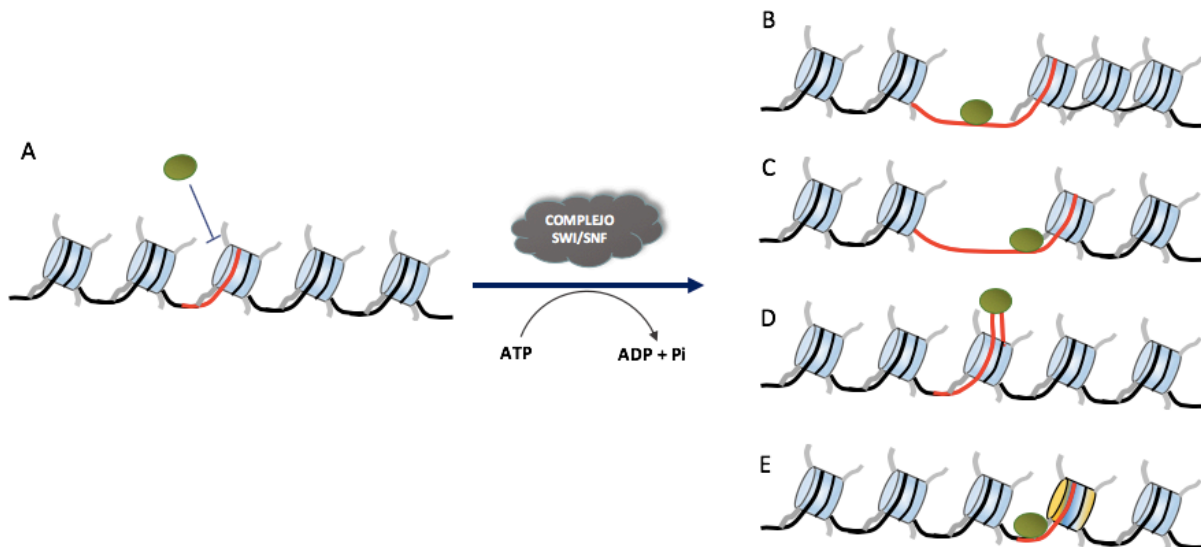


Figura 1. (modificada de (Kasten, Clapier et al. 2011)). Las diferentes formas de remodelación de cromatina mediadas por SWI/SNF. Las proteínas de unión a ADN (círculo verde) no pueden unirse a su sitio blanco, si este se encuentra inaccesible (línea roja en A), el complejo remodelador de cromatina SWI/SNF afecta el posicionamiento o la densidad de los nucleosomas regulando el acceso de los factores de unión al ADN a sus sitios blanco mediante diferentes mecanismos (B-D).

Diversos estudios han contribuido a identificar subunidades homólogas a las del complejo SWI/SNF de levadura en diferentes especies (Fig. 2A), por ejemplo, Brahma (BRM) el homólogo en *Drosophila* de la sub-unidad catalítica Swi2/Snf2 (Fig. 2B), que tiene la actividad de helicasa y ATPasa dependiente de ADN se describió como una proteína del grupo trithorax que activa la transcripción (Kennison 1995). En vertebrados existen dos genes que codifican para subunidades catalíticas conservadas, Brahma (*Brm*) y el gen relacionado a Brahma 1 (*Brg1*) (fig. 3C). A este complejo también se le conoce en *Drosophila* como BAP por el acrónimo de “Brahma Associated Proteins” (fig. 3B), mientras que en vertebrados se le llama BAF, por el acrónimo de “BRG1/*brm* Associated Factors” (Ring, Vameghi-Meyers et al. 1998) (fig 3C). Ya que aquí nos referiremos principalmente al complejo en vertebrados, en adelante usaremos la designación “complejo BAF”.

Aunque un solo complejo BAF contiene de 12 a 15 subunidades proteicas, solo cuatro proteínas forman el “core” o núcleo del complejo: la subunidad catalítica BRG o BRM más BAF47, BAF155 y BAF170, y estos son los componentes mínimos necesarios para remodelar cromatina *in vitro*, a un nivel comparable con el complejo completo (Phelan, Sif et al. 1999). Por otra parte, a las proteínas restantes se les conoce como subunidades accesorias, y se ha propuesto que tienen funciones específicas *in vivo* interaccionando con otras proteínas o factores transcripcionales para dirigir el reclutamiento del complejo a sus sitios blanco (Mohrmann and Verrijzer 2005). Interesantemente algunas de las subunidades del complejo BAF pueden ser codificadas por más de un gen homólogo, y claramente con el transcurso de la evolución y la aparición de la multicelularidad se ha ido incrementando la complejidad de estos ensamblajes (Fig. 2), hasta el punto de que en vertebrados, alrededor de 28 genes codifican para subunidades del complejo BAF y aunado a esto, algunas subunidades presentan variantes de *splicing* alternativo (Wu, Lessard et al. 2009, Kadoch and Crabtree 2015).

Teniendo en cuenta que sólo una de las isoformas homólogas se integra al complejo, es posible producir una gran variedad de combinatorias de complejos BAF con patrones de expresión específicos y funciones altamente especializadas (fig. 2 B,C).

Además, recientemente mediante análisis de bioinformática y proteómica se han identificado nuevas subunidades accesorias en complejos BAF de mamífero (cuadro 1) que no existen en el complejo SWI/SNF de levadura (Kadoch, Hargreaves et al. 2013). Esto muestra que la composición de la subunidades ensambladas en los complejos BAF podría ser mucho más compleja de lo que se pensaba anteriormente, cuando ya incluso se había estimado computacionalmente que en mamíferos era posible formar hasta 288 diferentes versiones de complejos BAF (Wu, Lessard et al. 2009)

Tradicionalmente, en vertebrados a los complejos BAF se les ha agrupado en dos principales combinatorias, una llamada simplemente BAF y que se caracteriza por contener las subunidades ARID1A/BAF250A o ARID1B/BAF250B y puede utilizar como su subunidad catalítica tanto a BRG1 como a BRM, mientras que a la otra combinatoria se le ha nombrado pBAF, y se caracteriza por contener la subunidad BAF180/PBRM (polybromo), ARID2/BAF200 y solamente utiliza a BRG1 como su subunidad catalítica (Fig 2 C.) y (Cuadro 1).

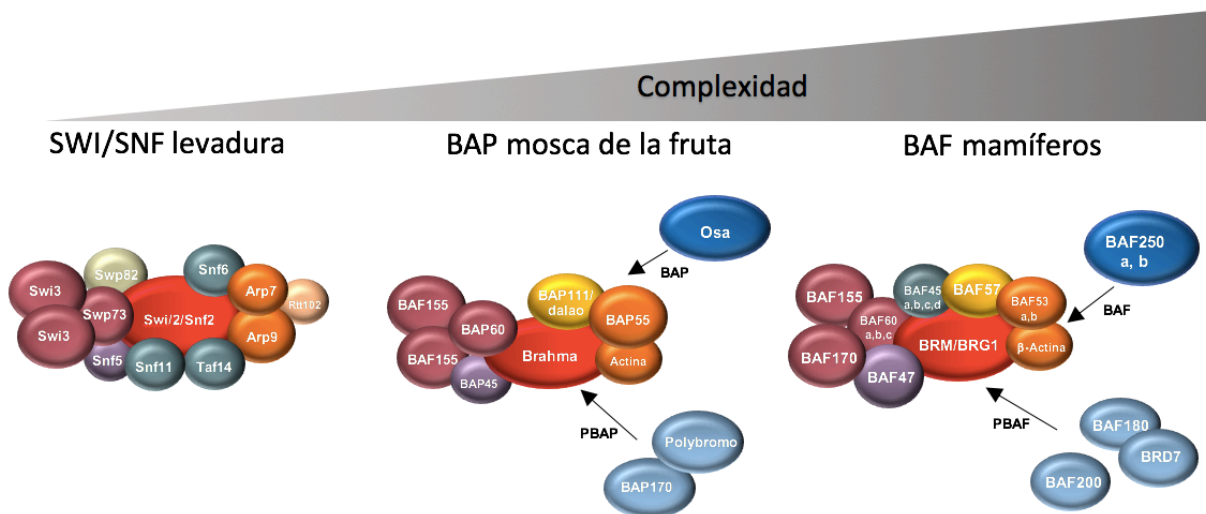


Figura 2. modificada de (Kasten, Clapier et al. 2011). Composición y funciones de los complejos de la familia SWI/SNF | BAF. Estos complejos están conservados en eucariotas, contienen una subunidad catalítica con función de ATPasa y subunidades accesorias conservadas. Los colores de las subunidades representan homología (ortólogos o parálogos).

El papel de las subunidades accesorias ha sido tema de estudio de muchos grupos. Algunas subunidades tienen un patrón de expresión restringido a un tipo celular o a un momento específico en el desarrollo. Aislado y caracterizando estos complejos se han descrito una gran variedad de combinaciones. (Kim, Huh et al. 2001, Olave, Wang et al. 2002, Eroglu, Wang et al. 2006), Un ejemplo es el complejo BAF de células troncales embrionarias (esBAF) donde están presentes Brg1 y BAF155 pero no sus homólogos Brm y BAF170 respectivamente (Ho, Ronan et al. 2009) (Fig. 2 C.) y (Tabla 1). Por otra parte, BAF60c es una subunidad que se ha encontrado enriquecida en el corazón y forma parte a lo que se considera un complejo específico de corazón llamado cBAF (Lou, Deshwar et al. 2011), la función de este complejo se discutirá con detalle más adelante.

		Complejo BAF	Complejo pBAF	Complejo esBAF	Complejo npBAF	Complejo nBAF
<b>Subunidades del "core"</b>	Subunidad catalítica	BRG1/	BRG1	BRG1	BRG1	BRG1/
		BRM			BRM	BRM
	BAF47	BAF47	BAF47	BAF47	BAF47	
	BAF155	BAF155	BAF155	BAF155	BAF155	
	BAF170	BAF170		BAF170	BAF170	
<b>Subunidades Accesorias</b>		ARID1A/ 1B		ARID1A	ARID1A/ 1B	ARID1A/ 1B
			ARID2	ARID2	ARID2	ARID2
			BAF180	BAF180	BAF180	BAF180
		<b>BAF57</b>	<b>BAF57</b>	<b>BAF57</b>	<b>BAF57</b>	<b>BAF57</b>
		BAF60a/b/c	BAF60a/b/c	BAF60a	BAF60a	BAF60a/c
		BAF45a/b/c	BAF45a/b/c	BAF45a	BAF45a	BAF45b/c
	BAF53a/b	BAF53a/b	BAF53a	BAF53a	BAF53b	
Subunidades identificadas posteriormente		SS18		SS18	SS18	
		BRD7	BRD7	BRD7	BRD7	BRD7
		BRD9		BRD9	BRD9	BRD9
		BCL7a/b/c		BCL7a/b/c	BCL7a/b/c	BCL7a/b/c
		BCL11a/b		BCL11a/b	BCL11a/b	BCL11a/b

Cuadro 1. Diferentes combinaciones de las subunidades pueden formar diversos complejos BAF. Las subunidades catalíticas se encuentran en anaranjado, estas en conjunto con las subunidades en verde forman el "core" del complejo, las subunidades accesorias se encuentran en gris.

A lo largo de las últimas tres décadas se ha demostrado ampliamente que el complejo BAF tiene una función importante en varios procesos generales, tales como la transcripción, y la diferenciación celular, también se le ha involucrado en diversos



procesos específicos durante el desarrollo embrionario, en la biogénesis del cáncer como un supresor de tumores y en enfermedades de discapacidad intelectual (Park, Park et al. 2006, Wilson and Roberts 2011). Como es de esperarse, se ha observado que la pérdida de las subunidades que pertenecen al “core” causan defectos más severos, pleiotropía o incluso muerte, mientras que mutaciones en las subunidades accesorias causa defectos más específicos en algún tipo celular, tejido u órgano. La tabla 2 resumen solo algunos ejemplos de la caracterización de fenotipos descritos por la pérdida o desregulación de diferentes subunidades.

Subunidad	Fenotipo
BRG1	En ratón nulo es letal durante la preimplantación (Bultman, Gebuhr et al. 2005) regula la activación de la transcripción cigótica e interviene en la diferenciación de neuronas (Seo, Richardson et al. 2005), adipocitos (Pedersen, Kowenz-Leutz et al. 2001), miocitos (de la Serna, Carlson et al. 2001). En heterocigosis presenta exencefalia y susceptibilidad a tumorigenesis (Bultman, Gebuhr et al. 2000).
BRM	Viable y fértil, solo se observa aumento en la talla y peso del ratón nulo (Reyes, Barra et al. 1998), promueve la diferenciación tejido específica, su expresión aumenta durante el proceso (Flowers, Nagl et al. 2009).
BAF47	El ratón nulo es letal durante la gastrulación, en heterocigosis desarrolla sarcomas en tejido neural y en tejidos blandos (Klochender-Yeivin, Fiette et al. 2000, Roberts, Galusha et al. 2000).
BAF155/ BAF170	El ratón heterocigoto presenta exencefalia y defectos en el cierre del tubo neural (Kim, Huh et al. 2001).
ARID1A/ BAF250A ARID1B/ BAF250B	ARID1A es letal durante la gastrulación, en células troncales embrionarias es necesaria para mantener la pluripotencialidad (Gao, Tate et al. 2008). ARID1B es necesaria para el mantenimiento de la pluripotencialidad y la regulación global de genes (Yan, Wang et al. 2014).
BAF180	Tiene un importante papel en el desarrollo del corazón (Wang, Zhai et al. 2004)
<b>BAF57</b>	Ver texto (se detalla en antecedentes)
BAF60a/c	BAF60c en pez cebra establece la asimetría del corazón, su expresión ectópica junto con Gata5 promueve el destino hacia progenitores cardiacos (Lou, Deshwar et al. 2011)
BAF45a/b/c	BAF45a es necesario para la proliferación y mantenimiento de células progenitoras neuronales. BAF45b y BAF45c se expresan en neuronas ya diferenciadas (Lessard, Wu et al. 2007).
BAF53a/b	BAF53a esta involucrada en el mantenimiento de las células progenitoras neuronales (Lessard, Wu et al. 2007) BAF53b se expresa en neuronas diferenciadas y es necesaria para el crecimiento dendrítico (Wu, Lessard et al. 2007).

Tabla 2. Caracterización de las subunidades del complejo BAF durante la embriogénesis de ratón.

## ANTECEDENTES

### La subunidad BAF57

BAF57 también conocida como SMARCE1 (por su acrónimo en inglés: **SWI/SNF-Related, Matrix-associated, Actin-dependent Regulator of Chromatin subfamily E, member 1**) es una subunidad que es codificada por un solo gene y por lo tanto está siempre presente en los complejos BAF, independientemente de la combinatoria de las otras subunidades (cuadro 1). Por ello, algunos autores la consideran como una subunidad del “core”, pero estrictamente no lo es, ya que no es necesaria para remodelar cromatina *in vitro*. Este hallazgo junto con el hecho de que solo está presente en animales, y no en organismos menos complejos como levaduras o plantas (Fig. 3), sugiere que esta subunidad apareció en paralelo con un mayor grado de complejidad en la estructura de la cromatina.

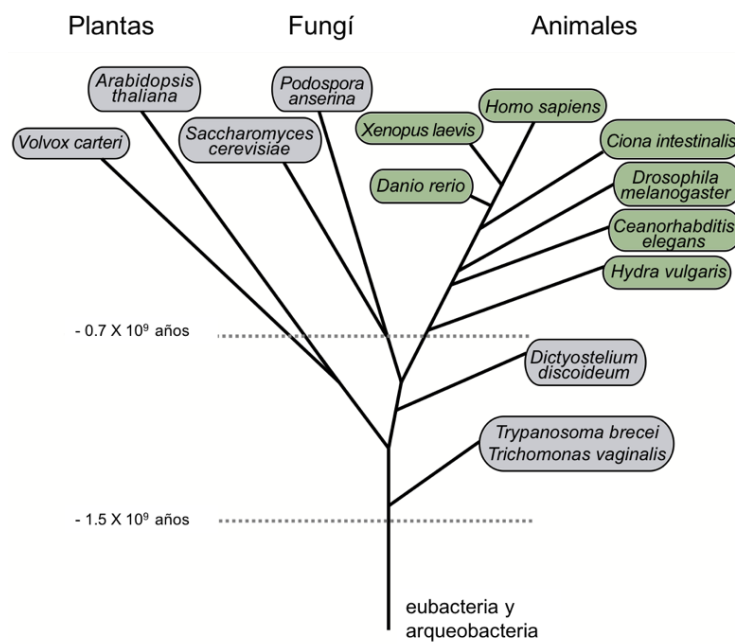


Figura 3. (Modificada de (Lomeli and Castillo-Robles 2016). Árbol filogenético de organismos modelo. Las especies en verde son aquellas en las cuales BAF57 está presente. Se consideraron homólogos de BAF57 a las proteínas con más del 50% de cobertura total y más del 35% de identidad en un PBLAST contra BAF57 de humano. Las especies en gris indican los organismos en los cuales no se encontró ninguna proteína que cumpliera estos criterios.

Ya que los complejos BAF tienen un papel esencial en diferentes procesos biológicos, existen un gran número de estudios donde se han descrito los defectos que causa la ausencia o la desregulación de alguna subunidad en particular, para el caso de BAF57 se ha estudiado su participación en diferentes procesos específicos. En la siguiente sección trataré de describir brevemente la estructura de BAF57, su bioquímica y los principales ejemplos de interacciones y mecanismos mediante los cuales ejerce su función.

### **Los dominios de BAF57**

Se han descrito homólogos de BAF57 en una diversidad de organismos modelo animales (Fig. 3). Estas proteínas homologas presentan un alto grado de identidad en su secuencia de aminoácidos. En general, las proteínas BAF57 presentan un dominio rico en prolinas, un dominio HMG (*high mobility group*), y un dominio coiled/coil (Fig. 4).

El dominio HMG se describió como un dominio de unión al surco menor del ADN de una manera inespecífica. El dominio HMG de BAF57 tiene una fuerte actividad de unión al ADN y en particular al ADN con estructura 4WJ (*four way junction*). Esta estructura se forma durante la recombinación y reparación del ADN y se sabe que imita los puntos de entrada y salida de los nucleosomas. La capacidad de BAF57 de unirse a esta estructura sugiere que podría tener un papel directo en la modificación de la arquitectura de la cromatina, además se han probado mutaciones puntuales o deleciones del dominio HMG y se ha observado que la proteína mutada pierde afinidad hacia el ADN. El dominio *coiled coil* de BAF57 es similar al que presenta la Kinesina (dominio KLCC), un cierre de leucinas importante para la dimerización, por lo cual se ha propuesto que tiene una función similar (Wang, Chi et al. 1998). Del lado N-terminal BAF57 tiene un dominio rico en prolinas, importante para la interacción proteína-proteína, y por lo tanto para el ensamblaje en el complejo BAF, mientras que del lado C-terminal se encuentra una región rica en residuos ácidos importante para su estabilidad.

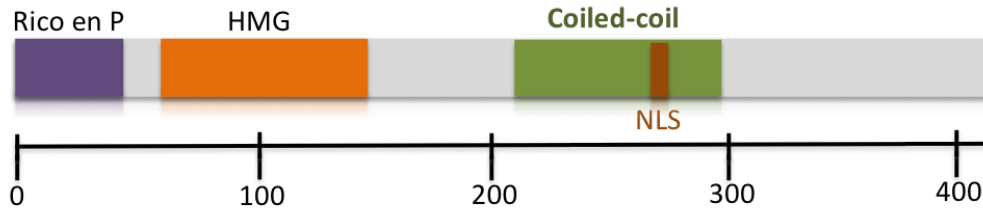


Figura 4. Esquema general de la proteína BAF57 resaltando los dominios conservados. En morado el rico en prolinas, en naranja el dominio *high mobility group* (HMG), en verde el dominio *coiled-coil* y en café una secuencia de localización nuclear. La barra inferior corresponde al número de aminoácidos.

### Las subunidades BAF155 y BAF170 protegen a BAF57 de degradación.

Se ha demostrado que los niveles de la proteína BAF57 en la célula están cuidadosamente regulados. Esto se observó al transfectar cultivos celulares con formas exógenas de BAF57, lo que resultó en una reducción de los niveles de BAF57 endógena. La explicación para esta observación es que los componentes del complejo BAF mantienen una relación estequiométrica, por lo tanto si existe una subunidad en exceso, esta se degrada, de tal modo que todas las proteínas BAF57 se encuentran ensambladas en los complejos BAF (Chen and Archer 2005).

El mismo grupo describió posteriormente el mecanismo de degradación de BAF57. El dímero formado por BAF170 y BAF155 estabiliza a BAF57, bloqueando la ubiquitinación mediada por TRIP12, una ligasa de ubiquitina E3, de manera que cuando BAF57 está ensamblada en el complejo, las lisinas importantes del dominio *coiled-coil* quedan inaccesibles a la ubiquitinación, mientras que cuando existe un exceso de BAF57 libre, estas lisinas quedan expuestas para ser ubiquitinadas lo que induce la degradación vía proteosoma. Este mecanismo previene que se encuentren subunidades del complejo BAF libres, ya que un exceso podría interferir con el reclutamiento del complejo BAF y provocar una desregulación de sus genes blanco (Keppler and Archer 2010).

## La expresión de isoformas de BAF57

Aunque la mayoría de las subunidades del complejo BAF están codificadas por más de un gen homólogo, la subunidad BAF57 está codificada solamente por un gen en todos los organismos donde se ha estudiado. No obstante, BAF57 puede contribuir al polimorfismo de los complejos BAF, ya que *baf57* en humano, ratón y rata, tienen al menos tres isoformas producidas por *splicing* alternativo con una parte del N-terminal deletada lo que causa la pérdida del dominio rico en prolina (N-BAF57), y una isoforma que pierde una región del C-terminal (C-BAF57). Las proteínas N-BAF57 de ratón se expresan específicamente en neuronas y se asocian en complejos BAF, sustituyendo a la proteína de longitud completa, lo que sugiere que los complejos BAF que contienen estas variantes desempeñan funciones específicas. Es interesante que en ratones, la expresión de los transcritos cortos de *Baf57* alcanza su punto máximo cuando las células progenitoras neurales en el cerebro en desarrollo han dejado de proliferar y han comenzado a diferenciarse en neuronas (Kazantseva, Sepp et al. 2009).

Se ha sugerido que las isoformas de BAF57 podrían tener un papel importante en la interacción del complejo BAF con un complejo represor llamado REST (*Repressor Element 1-Silencing Transcription factor*) también conocido como NRSF (*Neural Repressor Silencer Factor*). REST se une a un elemento represor de 23 pares de bases en los genes neuronales para reprimir su expresión en células no neuronales (Kazantseva, Sepp et al. 2009). El complejo REST contiene represores transcripcionales como HDAC1/2, Sin3A y Co-REST (Schoenherr and Anderson 1995).

La evidencia muestra que BAF57 es la subunidad del complejo BAF que interacciona con componentes del complejo REST, concretamente la parte amino de BAF57 interacciona con Sin3A *in vitro* (Sif, Saurin et al. 2001, Pal, Yun et al. 2003) mientras que co-REST se une a la parte carboxilo terminal de BAF57 en ensayos de doble híbrido (Battaglioli, Andres et al. 2002), por lo tanto, se puede especular que en células no neuronales la proteína completa de BAF57 tiene un papel en reclutar al complejo BAF hacia el elemento represor donde se encuentra el complejo REST y ayudar a reprimir genes neuronales (Watanabe, Mizutani et al. 2006). Por otro lado, las

isoformas de BAF57 que pierden la parte amino, pueden tener una función clave en permitir la transcripción de los mismos genes en células neurales, ya que no serían capaces de interactuar con Sin3A. Esta hipótesis se refuerza por la observación de que al transfectar estas isoformas en células no neuronales se observa la expresión de un grupo de genes neuronales (Watanabe, Mizutani et al. 2006).

### **BAF57 media la represión del gen CD4 durante la especificación de las células T.**

Se ha inactivado la expresión de BAF57 en un ratón transgénico durante el desarrollo del linaje de las células T. Esto se logró mediante la expresión de la dominante negativa de BAF57 (BAF57DN) bajo la regulación del promotor Lck específico de timo. Esta mutante carece de todo el extremo amino terminal y pierde su capacidad de unión al ADN. Este trabajo reforzó el mecanismo descrito anteriormente de la regulación estequiométrica de BAF57, ya que los resultados confirmaron que la expresión de BAF57DN suprimía la expresión de BAF57 endógena y que las subunidades mutadas se ensamblaron en complejos BAF (Chi, Wan et al. 2002). El análisis fenotípico de los ratones transgénicos reveló que BAF57 está involucrado en el desarrollo y la maduración de las células T. En ratones, transgénicos BAF57DN adultos, las células T mostraron una expresión de los co-receptores de superficie CD4 y CD8 alterada. Específicamente se encontró una expresión prematura de CD4, indicando una desrepresión temprana de su gen, implicando a BAF57 en el silenciamiento de CD4. Estudios posteriores demostraron que BAF57 se une directamente a una secuencia llamada “silenciador” del gen CD4, y está específicamente involucrada en la remodelación de cromatina de esta región para silenciar el gen CD4 en etapas específicas durante el desarrollo del linaje de los linfocitos T (Wan, Zhang et al. 2009).

### **Mutaciones en el gen *BAF57* de humanos.**

La disminución o pérdida total de función de *BAF57* en humanos se asocia principalmente con dos enfermedades severas: la formación de meningiomas y el síndrome de Coffin-Siris.

Los meningiomas son tumores derivados de la membrana aracnoidea, la cual es una de las tres membranas que rodean el sistema nervioso central (SNC). El 90% de los meningiomas ocurren en las meninges craneales, mientras que el 10% restante ocurre en las meninges espinales. Se sabe que la mayoría de las familias afectadas con meningiomas tienen mutaciones en la línea germinal del locus NF2 (Ruttledge, Sarrazin et al. 1994). Sin embargo, un subgrupo de pacientes con meningiomas espinales no presentan mutaciones en NF2. Entre los meningiomas no asociados con NF2, los principales genes implicados son los que codifican para las subunidades BAF47 y BAF57.

El primer reporte que identificó mutaciones en BAF57 como causa de meningiomas se publicó en 2013 (Smith, O'Sullivan et al. 2013). Posteriormente, se identificaron diferentes mutaciones en más de 20 pacientes con meningiomas familiares. Al menos 10 de estas mutaciones se confirmaron en la línea germinal. (Smith, Wallace et al. 2014) Una característica constante de los meningiomas asociados con BAF57 es la clara histología celular, que los define como agresivos y con una tendencia a recurrir. Todas las mutaciones BAF57 encontradas en los meningiomas son de pérdida de función (Fig. 5) y en muchos casos, el ADN tumoral mostró una pérdida de heterocigosidad (LOH) del alelo silvestre, lo que sugiere que BAF57 tiene un papel como un supresor de tumores en este tipo de meningiomas (Evans, Van Hoff et al. 2015, Gerkes, Fock et al. 2016).

El síndrome de Coffin-Siris es un raro trastorno de malformaciones congénitas caracterizado por un severo retraso mental, una apariencia facial tosca, retraso en el desarrollo, escoliosis, así como microcefalia y alteraciones en diferentes órganos internos (Fleck, Pandya et al. 2001, Schrier, Bodurtha et al. 2012). Los pacientes tienen discapacidad para articular palabras, deterioro del crecimiento prenatal y dificultad en la alimentación después del nacimiento. Los rasgos faciales incluyen pelo escaso, las cejas gruesas y el labio inferior grueso, malformaciones en los dedos de las manos y de los pies, la visión está deteriorada, tienen anomalías estructurales del sistema nervioso central, anomalías cardíacas que incluyen defectos del tabique ventricular o el tabique auricular y con frecuencia tienen convulsiones, pérdida de la audición e infecciones. (Tsurusaki, Okamoto et al. 2012, Kosho, Okamoto et al. 2013).

Cuarenta y dos años después de que el síndrome fuera descrito por Coffin y Siris, se publicaron trabajos demostrando que es causado por mutaciones en el complejo remodelador de cromatina BAF (Santen, Aten et al. 2012, Santen, Kriek et al. 2012, Tsurusaki, Okamoto et al. 2012). Hasta el momento se han descrito mutaciones en heterocigosis de siete genes (*Brm*, *Brg1*, *Baf47*, *Baf200*, *Baf250a*, *Baf250b* y *Baf57*) en la línea germinal de pacientes afectados con este síndrome (Bogershausen and Wollnik 2018). También se sabe que las mutaciones son exclusivas, es decir, que si el paciente tiene una mutación en alguno de estos genes, los otros genes del complejo BAF son normales (Miyake, Tsurusaki et al. 2014)

Específicamente, para BAF57 se han identificado cuatro mutaciones heterocigotas en el dominio HMG de pacientes con Coffin-Siris, que en ningún caso producen una proteína trunca, sino que son sustituciones de aminoácidos que no modifican el marco de lectura abierto (Fig. 5), y que se ha propuesto que tienen un efecto de ganancia de función o de dominante negativo (Tsurusaki, Okamoto et al. 2012, Wieczorek, Bogershausen et al. 2013, Tsurusaki, Okamoto et al. 2014).

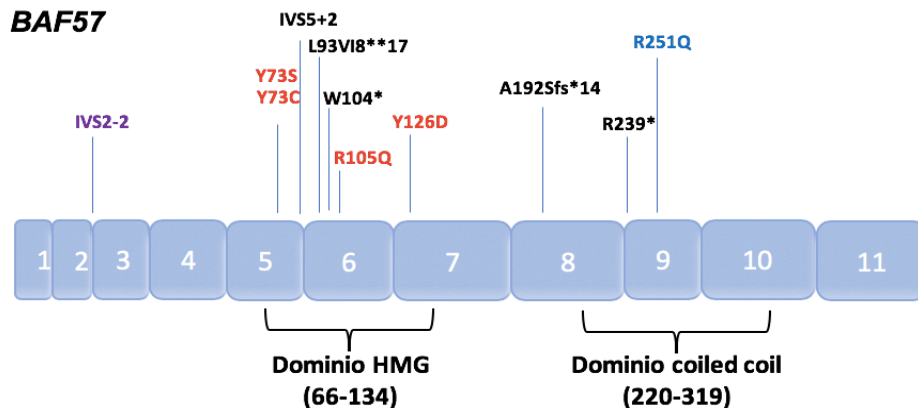


Figura 5. Modificada de (Yano, Fujimoto et al. 2018) Mutaciones específicas en *Baf57* desarrollan fenotipos diferentes. Todas las mutaciones relacionadas con el síndrome de Coffin-Siris (mutaciones en rojo) caen dentro del dominio HMG y todas son sustitución de aminoácidos. Mientras que las mutaciones relacionadas a meningiomas (mutaciones en negro) se distribuyen a todo el gen y siempre producen un corrimiento del marco de lectura abierto y por consecuencia un codón de paro prematuro. Otras mutaciones también se han asociado a diferentes enfermedades de discapacidad intelectual como autismo (mutación en morado) y el síndrome oculoauriculofrontonasal (mutación en azul).



## El pez cebra como modelo de estudio

En este trabajo se utilizó al pez cebra como modelo de estudio. Por ello se mencionan a continuación la importancia y ventajas de este organismo para el estudio del desarrollo embrionario de vertebrados. Entre sus ventajas principales se encuentran: al ser un vertebrado presenta alta similitud con el humano. Su embriogénesis ocurre externamente de tal forma que se puede observar todo el desarrollo embrionario y permite la obtención de imágenes *in vivo*. Existe gran accesibilidad a material biológico por la cantidad de embriones que una sola pareja puede producir cada semana (100 a 300 embriones). La transparencia del embrión permite diversos análisis como la localización de proteínas "*in vivo*" por medio de fusiones con proteínas fluorescentes y el marcaje y transplante de grupos de células para determinar su destino tisular.

Particularmente en este estudio centramos nuestro análisis en el del desarrollo del corazón. En este contexto, el pez cebra ofrece ventajas adicionales. Por ejemplo, a pesar de que el corazón de pez cebra consiste en un atrio y un ventrículo, que no están septados como en el humano, los comportamientos morfogenéticos requeridos para el desarrollo del corazón en humanos y pez cebra son sorprendentemente similares, un ejemplo de esto es que muchos de los genes involucrados en el desarrollo del corazón, como *Gata5*, *Nkx2.5*, *Tbx20* y *Hand2* se conservan (Bruneau 2008) y sirven como marcadores de tipos celulares específicos en el corazón (Tabla 2). Otras ventajas que hacen al pez cebra ideal para estudios cardiovasculares incluyen la difusión pasiva de oxígeno, lo que le permite sobrevivir durante varios días a pesar de los defectos cardiovasculares (Stainier 2001). Por lo tanto, los mutantes en pez cebra con una función cardiovascular comprometida pueden estudiarse por más tiempo que lo que es posible en los mamíferos donde los defectos cardíacos normalmente causan letalidad temprana. De hecho, muchos mutantes cardiovasculares de pez cebra han proporcionado información importante sobre los procesos celulares y moleculares de la formación del corazón en humanos (Stainier, Fouquet et al. 1996). Además, recientemente con el desarrollo de las metodologías para manipular el genoma, como el sistema CRISPR-Cas9, se ha facilitado mutar secuencias específicas en el genoma y generar cepas estables que porten la mutación de interés para generar herramientas

y modelos de enfermedades en el pez cebra. Estos aspectos hacen que el pez cebra sea un excelente modelo para mejorar nuestra comprensión de los mecanismos moleculares que dirigen el desarrollo de los vertebrados.

### **El desarrollo embrionario del pez cebra.**

En el pez cebra la activación del ovocito ocurre solo por el contacto con el agua, lo cual completa la meiosis, que hasta ese momento permanece detenida en la segunda metafase. Este proceso de activación dispara la reacción cortical la cual involucra cambios en el calcio intracelular y desencadena una serie de eventos que resultan en cambios estructurales en la membrana que entre otras cosas previene la poli-espermia. El espermatozoide entra al citoplasma del ovocito solo por una región conocida como micrópilo que se encuentra en una envoltura del ovocito llamada corion (Leung, Webb et al. 1998). El embrión de pez cebra presenta una segmentación meroblástica discoidal (Fig. 6 A-F), es decir, una vez fertilizado el embrión, este presenta una polaridad determinada por el sitio donde entró el espermatozoide y que corresponderá al polo animal, en el cual ocurren las divisiones celulares, mientras que en el polo vegetal se encuentran los componentes esenciales que nutren al embrión durante su desarrollo (Houston and King 2000).

En el pez cebra como en muchos animales, ambos gametos contribuyen de igual manera al contenido cromosómico, sin embargo, solo el gameto materno hereda el citoplasma al nuevo organismo, este citoplasma contiene ARNs mensajeros esenciales para el desarrollo temprano del embrión. En pez cebra los ARNs mensajeros maternos le permiten llevar a cabo 10 ciclos de división celular antes de que se inicie la transcripción cigótica, lo cual ocurre cuando ya se han formado 1024 células, durante un estadio llamado transición de la blástula media (Fig. 6F) (Kane 1999). Los primeros ciclos celulares duran 15 minutos, luego se vuelven más lentos y asincrónicos llegando a durar el ciclo 16 aproximadamente 4 horas, después ocurre la epibolia, donde las células avanzan y cubren el vitelo (Fig. 6H-J), al final de esta etapa se distinguen los ejes embrionarios. La gastrulación comienza desde el estadio de escudo en el que se determina la región dorsal y se forma el epiblasto y el hipoblasto (Fig. 6I), se desarrolla

la placa neural y se forman las somitas (Fig. 6K). Un poco después se desarrollan los rudimentos de los órganos primarios y se comienza a desarrollar el cerebro, el corazón y los ojos. Posteriormente, después de las 24 horas se forma el sistema circulatorio y el corazón comienza a latir. Finalmente, entre las 48 y 72 horas ocurre la eclosión y presenta un desarrollo completo de los órganos rudimentarios (Kimmel, Ballard et al. 1995).

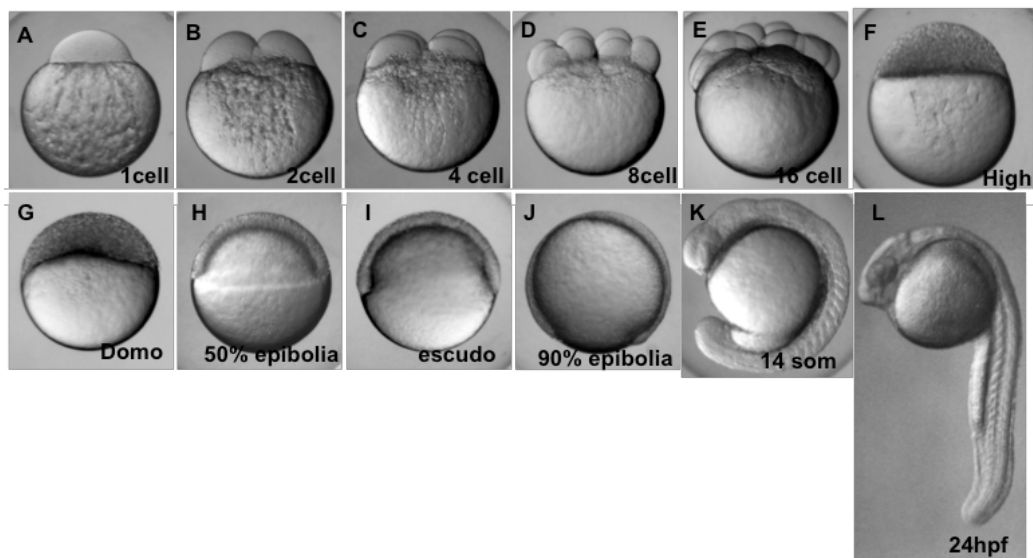


Figura 6. Desarrollo embrionario de pez cebra. En las imágenes se muestran los estadios desde una célula y hasta las 24 hpf en vista lateral (Fotos tomadas por Jorge Castillo)

### Desarrollo del corazón en pez cebra

En el año 2000 se determinó en pez cebra (Reifers, Adams et al. 2000), pollo (Barron, Gao et al. 2000) y *Xenopus* (Shi, Katsev et al. 2000) que los cardiomiocitos comienzan a identificarse en la placa anterior del mesodermo lateral (ALPM por sus siglas en inglés) y más tarde estas poblaciones celulares bilaterales se fusionan en la línea media para formar el tubo cardiaco y finalmente un corazón totalmente funcional. Tanto en la especificación temprana como durante los distintos niveles de diferenciación hacia un destino cardiaco, existen una serie de señalizaciones tanto inductoras como inhibitorias. A continuación, se explicarán con más detalle estos procesos durante el desarrollo del corazón de pez cebra.

El primer paso en el desarrollo cardíaco es la especificación de las células precursoras cardíacas (CPCs) que se originan a las 5 hpf en la zona marginal lateral de la blástula, donde ya es posible distinguir a los precursores del atrio y del ventrículo. Incluso en estas etapas tempranas los dos grupos ya se encuentran segregados encontrando a los progenitores del ventrículo en una posición más marginal (Figura 7A), (Keegan, Meyer et al. 2004). También los blastómeros que darán lugar a las células del endocardio se ubican en el margen lateral, pero sin ninguna organización específica. Durante estas etapas tempranas las CPCs bilaterales inician programas de diferenciación donde intervienen varias vías de señalización, incluidas las del ácido retinoico (RA), Wnt, la vía de Hedgehog (Hh), el factor de crecimiento de fibroblastos (Fgf), proteína morfogénica ósea (Bmp) y la vía de Nodal (Staudt and Stainier 2012).

Más adelante, de las 6 a 9 somitas estos grupos de células progenitoras se encuentran dentro de la mitad posterior del ALPM donde expresan los factores de transcripción *hand2* y *gata5*. En estas etapas ambos progenitores expresan también el factor transcripcional *nkx2.5* y el gen *myl7/cmlc2*, los cuales se usan ampliamente como marcadores de células progenitoras de cardiomiocitos en general (Tu and Chi 2012). Los progenitores del ventrículo conservan su posición hacia a la región media y pueden distinguirse por su expresión de la cadena pesada de miosina ventricular (*vmhc*), mientras que los progenitores del atrio expresan exclusivamente la cadena pesada de miosina auricular (*amhc*). Después de la gastrulación en el estadio de 12 somitas, las células precursoras se ubican en la posición correcta dentro del ALPM, y a medida que estas poblaciones migran hacia la línea media embrionaria continúan diferenciándose, los precursores del ventrículo siempre mantienen su posición más hacia la línea media del embrión con respecto a las células progenitoras del atrio, (Fig. 7B) (Yelon, Horne et al. 1999).

Las poblaciones bilaterales de CPCs llegan a la línea media a las 15 somitas (16.5 hpf) y comienzan a fusionarse primero posteriormente y luego anteriormente. A las 18 somitas (18 hpf) se completa la fusión formando un cono cardíaco poco profundo con los precursores ventriculares en su ápice dorsal (Figura 7C) (Stainier, Lee et al. 1993). Durante la formación del cono cardíaco los precursores del endocardio se

encuentran recubriendo el lumen, y las células del miocardio se unen y migran asimétricamente para formar el tubo cardíaco lineal (Figura 7D), hasta este momento todos los componentes provienen de una primera ola de diferenciación llamada primer campo cardíaco (FHF, por sus siglas en inglés), las células cardíacas adicionales se reclutan en una segunda ola de diferenciación tardía llamada segundo campo cardíaco (SHF, por sus siglas en inglés) este proceso extiende el tubo cardíaco de su polo arterial al ventricular (Hu, Sedmera et al. 2000). A partir de aproximadamente 28 hpf, el tubo cardíaco se comienza a doblar en un proceso conocido como *looping*, a las 30 hpf se ha formado una ligera torcedura en el centro del tubo lineal, esta torcedura se hace más pronunciada y el tubo toma cada vez más la forma de "S" a medida que avanza el desarrollo (Fig. 7E). El *looping* coloca el ventrículo hacia la derecha y la parte anterior del atrio, después las cámaras del corazón se expanden por un inflado cardíaco (Fig. 7F). Durante este proceso, las curvaturas de la cámara pueden distinguirse por la expresión del Precursor A del péptido natriurético auricular (nppa), que está restringido regionalmente al miocardio de la curvatura externa de ambas cámaras, pero ausente de la curvatura donde habrá de formarse el canal atrio-ventricular (AVC por sus siglas en inglés) (Auman, Coleman et al. 2007). El AVC es crucial para mantener el flujo de sangre unidireccional en el corazón. El primer signo de diferenciación del AVC se produce a 37 hpf, cuando hay una constricción entre las cámaras del atrio y del ventrículo, la expresión de Bmp4 y Versican, que previamente se encontraba en todo el tubo cardíaco, ahora se restringe al miocardio del AVC en formación (Beis, Bartman et al. 2005). De manera similar, notch1b que a las 36 hpf se expresa en todo el endocardio ventricular a las 45 hpf se restringe al endocardio del AVC. A las 48 hpf se ha formado un engrosamiento notable del endocardio en la zona del AVC llamado anillo endocárdico, en esta etapa el AVC evita en cierta medida que el flujo sanguíneo se regrese y conforme avanza el desarrollo se vuelve cada vez más eficiente, bloqueando completamente el regreso del flujo a las 76 hpf (Scherz, Huisken et al. 2008).

Aunque desde las 48 hpf, ya se han formado los componentes principales del corazón, este aún es inmaduro y carece de células auxiliares y estructuras adicionales que son importantes para su función. Por ejemplo, el tracto de salida del flujo sanguíneo del pez cebra se compone de el bulbo arterioso, el cual está compuesto por una capa

gruesa de células musculares lisas (Figura 7H) y sirve como una pseudocámara para regular el flujo a través de la aorta, que suministra sangre directamente a las branquias para la oxigenación. Finalmente, el epicardio se desarrolla a partir de una población de células extra-cardíacas, y es una fuente importante de señales para el miocardio, aproximadamente a las 72 hpf, se expande y comienza a extenderse sobre la superficie de todo el corazón (Figura 7G). En el pez cebra, la maduración del corazón continúa a través de la etapa juvenil. Durante las etapas larvarias y juveniles tempranas, el ventrículo se remodela de una forma muy piramidal a una morfología más rectangular y el corazón gira de manera que el ventrículo se coloca ventralmente con respecto al atrio (Figura 7 G) (Staudt and Stainier 2012)

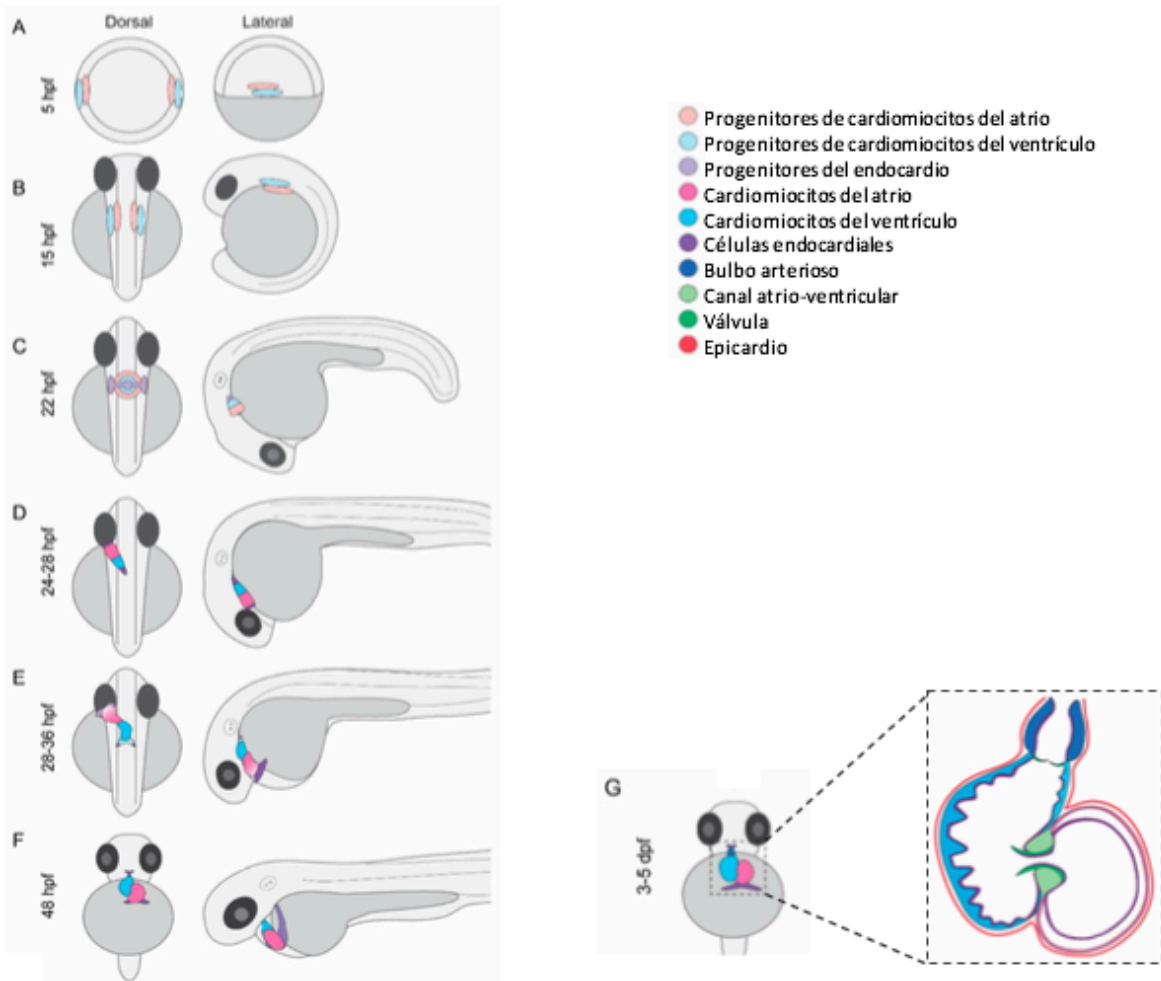


Figura 7. Esquema del desarrollo del corazón de pez cebra modificado de (Brown, Chi et al. 2004).

## El papel del complejo BAF durante el desarrollo del corazón

Se ha observado que algunas de las subunidades del complejo BAF son importantes para un adecuado desarrollo del corazón y para la correcta señalización y expresión de diferentes factores cardiogénicos. En ratones, las mutaciones en diferentes subunidades del complejo BAF conducen a defectos en el desarrollo del corazón y son letales durante la embriogénesis. Entre los genes mutados que produjeron anomalías cardíacas *in vivo* se encuentran Brg1, Baf60c y Baf180.

La función BRG1 también se ha estudiado en embriones de pez cebra. En ambos organismos se observó que los niveles relativos de los factores transcripcionales y de los complejos BAF son importantes para la expresión cardiogénica adecuada (Takeuchi, Lou et al. 2011). Eliminar a Brg1, siendo esta la subunidad catalítica, representa una pérdida dramática de la función del complejo BAF, y por lo tanto proporciona información sobre la función global de remodelación de la cromatina dependiente del complejo BAF, incluido el desarrollo cardiovascular. Por otro lado, BAF60c es una subunidad enriquecida en el corazón que se ensambla de manera mutuamente exclusiva para formar parte de lo que se considera un complejo específico de cardiomiocitos llamado cBAF (Takeuchi and Bruneau 2009). En ratón BAF60c interactúa con los factores de transcripción GATA4 y TBX5, estos tres factores son necesarios para que el complejo BAF sea reclutado a los *loci* cardiogénicos y para que se abra la cromatina en estas regiones promoviendo la expresión de factores como Nkx2-5, el cual es uno de los principales orquestadores de la cardiogénesis temprana (Scott 2012). El complejo cBAF puede inducir la diferenciación ectópica hacia cardiomiocitos mediante su expresión exógena en embriones de ratón (Takeuchi, Lou et al. 2011), y se ha demostrado que esta actividad se conserva evolutivamente, ya que en el pez cebra también el complejo cBAF actúa de forma autónoma para promover el destino cardíaco. Es decir, mediante experimentos de trasplantes de células que expresan BAF60c y GATA5 (homólogo de GATA4 de ratón) a un embrión hospedero se observó que son capaces de diferenciarse hacia cardiomiocitos (Lou, Deshwar et al. 2011).

## JUSTIFICACIÓN

Se sabe que alteraciones de subunidades accesorias del complejo BAF producen defectos que pueden aparecer de forma aislada o en el contexto de trastornos sindrómicos que afectan a múltiples órganos o sistemas, incluyendo el sistema cardiaco. También, se ha demostrado que alteraciones mínimas en la expresión de factores importantes durante la cardiogénesis dan como resultado defectos cardíacos congénitos, los cuales son una de las principales causas de mortalidad infantil. En general se conocen bien los procesos celulares y moleculares durante la formación del corazón en diferentes organismos modelo, sin embargo, aún falta estudiar a más detalle los factores epigénéticos que dirigen la formación de este órgano.

Por otro lado, no existe ningún reporte que describa una mutante nula del gen *baf57* en un organismo vivo completo. Aquí es importante mencionar que al hacer mutantes de algunas subunidades del complejo BAF en ratón estos mueren durante la implantación y que a diferencia del ratón, en pez cebra no existe un evento de implantación durante el desarrollo, además el pez cebra es capaz de sobrevivir hasta etapas avanzadas del desarrollo sin un sistema circulatorio funcional, por lo cual, este modelo podría facilitarnos el estudio del efecto global de la pérdida de la función de BAF57 durante el desarrollo en un organismo vivo.



## HIPÓTESIS

Por ser una subunidad única y presente solamente en animales que se encuentra siempre en todos los complejos BAF independientemente de la combinación de las otras subunidades, así como por evidencias que lo asocian a la diferenciación celular, es probable que BAF57 tenga un papel esencial durante procesos de desarrollo temprano, por lo tanto la inactivación de la expresión de *baf57* en experimentos de pérdida de función o *knockout*, nos permitirán entender su función durante el desarrollo embrionario.

## OBJETIVOS

### Objetivo general:

Caracterizar la función de BAF57 durante el desarrollo de pez cebra.

### Objetivos particulares:

- 1) Determinar el patrón de expresión del gen durante el desarrollo de pez cebra.
  - 1.1. Confirmar la expresión embrionaria y de tejidos adultos de BAF57
  - 1.2. Determinar la presencia de forma de *splicing* alternativo del gen *baf57*.
  
- 2) Analizar la consecuencia de la pérdida de función de BAF57 durante el desarrollo embrionario de pez cebra.
  - 2.1. Generar una línea mutante que cause la pérdida de función de *baf57*, mediante el uso del sistema CRISPR-Cas9.
  - 2.2. Estudiar el fenotipo que produzca dicha mutación.
  - 2.3. Determinar posibles genes blanco de BAF57 y su afectación por la falta de BAF57.
  - 2.4. Evaluar la importancia de BAF57 para el ensamblaje correcto de los complejos BAF.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Mantenimiento de las cepas de pez cebra.

Se utilizó una línea híbrida de pez cebra (*Danio rerio*) AB-TU-WIK. Los peces se mantuvieron en un sistema automatizado de recirculación continua que cuenta con temperatura controlada a 28° C, manteniendo el pH entre 6.8 y 7.2. El acuario se mantuvo a una temperatura controlada y un fotoperiodo de 14 horas de luz y 10 de oscuridad. Los embriones se obtuvieron mediante cruzas naturales y se colectaron máximo 60 embriones por caja petri y se criaron en una incubadora a 28° durante los primeros 5 días del desarrollo según los procedimientos estándar. Los estadios de desarrollo se determinaron según el sistema de Kimmel (Kimmel, Ballard et al. 1995). En algunos casos fue necesario retrasar el desarrollo por lo que algunos embriones se mantuvieron a 20°. Los peces se manejaron de acuerdo con las regulaciones locales de bienestar animal y todos los protocolos experimentales fueron aprobados por el Comité de ética (Instituto de Biotecnología, UNAM).

### Mutaciones mediadas por CRISPR-Cas9

El sitio blanco para el CRISPR-Cas9 se diseñó utilizando una herramienta en línea ZiFiT Targeter software <http://zifit.partners.org/ZiFiT/>. La secuencia genómica blanco de *baf57* es: 5'CCTACAACAACACTACAGGCTGG3' ubicada en el exón 4. Los oligonucleótidos 5'AAACGCCTGTAGTTGTTGTAGG3' y 5'TAGGCCTACAACAACACTACAGGC3' se alinearon calentando una solución 10 mM y dejando bajar la temperatura gradualmente, este alineamiento deja extremos cohesivos para el sitio BSA1y usando esta enzima este fragmento se clonó en el plásmido pDR274 (Hwang, Fu et al. 2013). El ARN guía se sintetizó usando ARN polimerasa de T7 (Roche). El Kit AmpliCap SP6 High Yield Message (CellScript) se usó para la síntesis del ARNm de la Cas9 utilizando el plásmido pCS2-nls-zCas9-nls como templado (Jao, Wente et al. 2013). Ambos transcritos fueron purificados utilizando una columna QIAprep (QIAGEN). Se inyectaron embriones en el estadio de una célula, la inyección fue directamente en la célula con ~13 ng/µl de sgRNA,

y ~ 40 ng/μl de ARNm de Cas9 diluido en KCl 100 mM. Como controles se inyectaron grupos de embriones solo con la Cas9.

## **Genotipificación**

Usando embriones o larvas individuales se amplificó un fragmento genómico que contiene el sitio blanco. Para mantener una alta fidelidad en el PCR, se usó la enzima Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (Thermo), utilizando los oligonucleótidos: 5'CATCGCGTACCCACATCCAC3' y 5'TCCTCTCGGCTGGCTTTTA3', que flanquean el sitio blanco a ~302 y ~96 bp río arriba y río abajo del sitio predicho del corte, respectivamente. Para determinar la naturaleza de la mutación el producto de la PCR se clonó en un plásmido TOPO (Invitrogen) para su secuenciación. Para la genotipificación, se utilizaron los oligonucleótidos 5'TCTGGCCTACAACAACACTACA3' y 5'TCCTCTCGGCTGGGCTTTTA3', que flanqueaban el sitio mutado, y amplifican un fragmento de 121 pb, y los productos de la PCR se separaron mediante un ensayo de formación de heterodúplex en geles de poliacrilamida al 14%, como describe Chen y colaboradores (Chen, Zhang et al. 2012).

## **Síntesis del ARNm de BAF57 y experimentos de rescate**

A partir del ADNc total de larvas de 24 hpf se amplificó la secuencia completa de *baf57* usando los oligonucleótidos 5'gccaattcCAAAGGAGCTGGGGAACCAA3' y 5'gcctcgagTTGTGGCTGGGTGGGCA3' que contienen los sitios EcoRI y XhoI respectivamente, y que se usaron para clonarlo en el plásmido pCS2+. Posteriormente se realizó la síntesis de ARNm con el kit mMessage mMachinE SP6 (Ambion). Antes de los ensayos de rescate, se inyectaron por separado 100, 400 y 800 pg de ARNm de *baf57* en embriones silvestres para generar una curva de dosis-respuesta. La cantidad óptima de ARNm que no produjo un número significativo de embriones defectuosos o muerte en comparación con los controles inyectados solo con el buffer fue de 400 pg. Para los experimentos posteriores, los embriones en etapa unicelular provenientes de cruces de peces heterocigotos se inyectaron con 400 pg de ARNm de *baf57*.

## **Histología**

Los embriones se fijaron durante una noche a 4° C en solución de Bouin, posteriormente se deshidrataron con una serie de etanol a diferentes grados. Las muestras se embebieron con parafina después del xileno. Se cortaron secciones de tejido de 10 µm y se tiñeron en hematoxilina-eosina según el manual publicado por Cardiff y colaboradores (Cardiff, Miller et al. 2014). Posteriormente, las secciones cortadas se montaron y fotografiaron en un microscopio Leica DMLB equipado con una cámara AxioCam MR5 (Zeiss).

## **Hibridaciones *in situ***

La hibridación *in situ* se realizó utilizando sondas de ARN antisentido marcadas con DIG siguiendo los protocolos estándar (Thisse and Thisse 2008). Los plásmidos utilizados para la síntesis de sondas *in situ* se fueron reportados previamente y fueron generosamente donados de la siguiente manera: *nkx2.5*, *cmlc2/myl7*, *amhc* y *vmhc* por Ian Scott (Lou, Deshwar et al. 2011), *gata5*, *versican*, *nppa* y *hand2* por Deborah Yelon (Yelon, Horne et al. 1999), *flk1* por Stephanie Woo (Bussmann, Bakkers et al. 2007) y *nfatc1* por Saulius Sumanas (Palencia-Desai, Rost et al. 2015). Para la síntesis de la sonda para la *in situ baf57* se diseñaron los siguientes oligonucleótidos: 5'CACAACCTCTCCAGCCTACCTT3' y 5'TTGTGGCTGGGTGGGCA3'.

## **Microscopia**

Para la adquisición de imágenes en vivo, los embriones se anestesiaron utilizando tricafina al 0,016% (Sigma). Los embriones vivos y fijos se montaron en agarosa de bajo punto de fusión al 0,6%. La adquisición de imágenes fluorescentes se realizó utilizando un excitador Zeiss LSM en un microscopio confocal Axio Observer. Los planos confocales se procesaron para proyecciones de máxima intensidad con el software Zeiss ZEN2009 o ImageJ. Las imágenes se ajustaron para el brillo y el contraste usando ImageJ. Las reconstrucciones 3D fueron ensambladas usando ImageJ.

## Inmunofluorescencia

Los embriones de pez cebra se colectaron en los estadios seleccionados, se decoraron y se fijaron en paraformaldeído al 4% en PBS por dos horas a temperatura ambiente, para posteriormente lavarse 3 veces con PBSX (PBS con Tritón X-100 0.2%) los embriones fueron incubados en solución de bloqueo conteniendo 10% de suero de cabra en PBT (PBS con Tween al 0.1%) Las inmunofluorescencias en embriones completos se realizó basándose en el trabajo de Yelon y colaboradores (Yelon, Horne et al. 1999) utilizando los anticuerpos primarios monoclonales S46 y MF20 (Developmental Studies Hybridoma Bank) y los anticuerpos secundarios anti-ratón IgG1 FITC e IgG2b-TRITC (SouthernBiotech) los cuales reconocen S46 y MF20, respectivamente. La señal de MF20 o S46 se observó mediante microscopía confocal.

## Análisis de PCR en tiempo real

Para los ensayos de PCR en tiempo real, grupos de aproximadamente 20 embriones se recolectaron en Trizol (Ambion) para la extracción de ARN siguiendo las instrucciones del fabricante. Cuando se utilizaron corazones aislados, se diseccionaron 15 corazones con una aguja y se transfirieron a Trizol. Después del tratamiento con DNase I (Thermo), se usó 1 µg para la transcripción reversa con M-MLV (Invitrogen) con oligo dT. El ADNc fue diluido 1:40, y se realizaron reacciones de 20 µl por quintuplicado. Para la reacción de qPCR se utilizó el Reactivo Maxima SYBR Green (Thermo) en un termociclador Light Cycler 480 (Roche), utilizando el siguiente programa: 95 ° C, 5 min; (95 ° C, 15 s; 58 ° C, 20 s; 72 ° C, 30 s -la cuantificación se tomo en este paso-) × 40 ciclos; y finalmente una curva de fusión de 72 a 95°C manteniendo durante 5 s cada 0.5 °C. Se realizó una cuantificación relativa con el software Light Cycler 480 con al menos tres de las cinco repeticiones que mostraron curvas de reacción similares, normalizando el nivel de expresión usando como control el factor de elongación 1 alfa (*ef1alpha*) y usando el método de la segunda derivada máxima con el software del equipo. Los oligonucleotidos *myl7*, *amhc*, *vmhc*, *nkx2.5*, *tbx5* y *gata5* se informaron en (Dohn and Waxman 2012) y *ntl* en (Su, Zhu et al. 2008).

## **Western blot**

Los lisados de los peces para la extracción de proteínas se prepararon utilizando el protocolo del kit Active Motif. Las proteínas se cuantificaron mediante el ensayo de Bradford (Bio-Rad) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las proteínas se separaron mediante electroforesis en gel (SDS – PAGE), el cual se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (Bio-Rad). La membrana conteniendo las proteínas se visulizaron con rojo de Ponceau y posteriormente se bloquearon con leche en polvo libre de grasa al 5%. se incubaron durante una noche a 4° con los anticuerpos apropiados a una dilución 1:1000. Para las subunidades BAF se usaron los anticuerpos anti-BAF57/SMARCE1 (Abcam ab131328) y anticuerpo anti-SNF5/SMARCB1 (Abcam ab126734), que son anticuerpos monoclonales de conejo contra las subunidades humanas y se sabe que reaccionan de forma cruzada con BAF57 y BAF47 de pez cebra respectivamente. Como control, todas las membranas se incubaron con el anticuerpo primario anti-ERK2 (Santa Cruz Biotechnology, EE. UU.; Cat. Nr. Sc-153) para confirmar la igual carga de proteínas. Al día siguiente la membrana se lavo con TBST por 5 veces. Se incubó con el anticuerpo secundario como corresponde anti-IgG de ratón conjugado con HRP (peroxidasa de rábano) o IgG de conejo conjugado con HRP (Santa Cruz). a una dilución 1:5000 durante 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente se lavo la membrana con TBST por 5 veces y se incubaron con un sistema de quimioluminiscencia para detectar la presencia de las proteínas con el kit de detección para Western ECL (Thermo Scientific Pierce).

## **Inmunoprecipitación de cromatina (ChIP)**

Para la inmunoprecipitación de cromatina se utilizaron 100 larvas de pez cebra a los 4 dpf. La inmunoprecipitación se realizó como se describió anteriormente (Lindeman, Vogt-Kielland et al. 2009) con pocas modificaciones. Primero, se usó la sonicación para cortar el ADN con un sonicador (modelo cv 334 Soniprep 150 MSE) mediante 30 s encendido y 30 s apagado durante un total de 6 ciclos. El ADN se mantuvo en hielo durante la sonicación. Los tamaños de los fragmentos de ADN fueron de entre 300 y 500 pb y se validaron mediante electroforesis en gel de agarosa. La inmunoprecipitación (IP) se

realizó utilizando 1.5 µg de los anticuerpos: BAF57/SMARCE1, BRG1 (Abcam ab110641), ARID1A (NB100-55334 Novus Biological Biological Systems), BAF180 / PBRM1 (ARP39332\_P05050 Aviva Biology Systems) (o de IgGs) unidos a 20 µl de perlas dynabeads en 80 µl de buffer RIPA a 4° C, posteriormente a estas perlas se añadieron 100 µl de cromatina. El ADN se eluyó con 50 µl de buffer de elución y luego se purificó por extracción con fenol: cloroformo: alcohol isoamílico. Los oligonucleotidos para el PCR gata5-chip-A gata5-chip-B gata5-chip-C utilizados para verificar los resultados de la inmunoprecipitación de la cromatina se reportaron en (Tseng, Jang et al. 2011), y para gata5-chip-Bp, se diseñaron los siguientes oligonucleotidos: 5'ACCTCGACGGGGGATATTCAA3 'y 5' ATCATCCGCGGGAATCAAGC3 '. Se realizaron cuarenta ciclos de PCR para verificar el enriquecimiento.

### **Co-inmunoprecipitación.**

Los extractos nucleares se prepararon a partir de larvas de 4 dpf utilizando el kit Active Motif Nuclear Complex Co-IP Kit. Se incubaron 300 microgramos de cada lisado con 3 µg de anticuerpo anti-SNF5/SMARCB1 a 4° C durante toda la noche. La incubación se continuó durante 2 h más después de la adición de 50 µl de perlas de proteína A/G-plus-agarosa (Thermo Scientific). El complejo proteína-anticuerpo-perla se lavó tres veces con buffer de lavado IP y NaCl 150 mM suplementado con BSA y tres veces con buffer de lavado IP y NaCl 300 mM sin BSA según las recomendaciones del kit Nuclear Complex Co-IP.

### **Identificación de proteínas por espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS)**

Las proteínas de cuatro experimentos de co-inmunoprecipitación se eluyeron de las perlas mediante elución con buffer de glicina y se limpiaron mediante precipitación usando el procedimiento TCA/acetona. Las muestras se enviaron a las instalaciones de proteómica en el Institut de Recherches Cliniques en Montreal, Canadá para su digestión en solución y análisis LC-MS/MS.



Búsqueda en base de datos: Todas las muestras de MS/MS se analizaron utilizando Mascot (Matrix Science, Londres, Reino Unido; versión Mascot in Proteome Discoverer 2.1.0.81). Mascot se programó para buscar en Refseq Danio\_rerio. Los criterios para la identificación de proteínas fueron los siguientes: se utilizó Scaffold (versión Scaffold\_4.8.4, Proteome Software Inc., Portland, OR) para validar los péptidos y proteínas identificados por MS/MS. Se aceptaron las identidades de los péptidos que pudieran establecerse con una probabilidad superior al 95,0%. Se aceptaron las identidades de proteínas si pudieran establecerse con una probabilidad mayor al 99.9% y contenían al menos 2 péptidos identificados. Las proteínas que contenían péptidos similares y no podían diferenciarse según el análisis de MS/MS se agruparon para satisfacer los principios de parsimonia.

## RESULTADOS

### Expresión del de *Baf57* es ubicua durante el desarrollo del pez cebra.

A pesar de que una gran parte del genoma del pez cebra se encuentra duplicado, una búsqueda en la base de datos GenBank de pez cebra indicó la presencia de un solo gen (Gene ID: 322248) en el cromosoma 3 que muestra alta homología con el gen *BAF57* de mamíferos. A nivel de secuencia de aminoácidos, la proteína BAF57 de pez cebra tiene 411 aa. mientras que su homólogo en mamífero tiene 420 aa. y comparten una identidad del 77% y una similitud del 84%.

Para determinar el patrón de expresión del mRNA de *baf57* se realizó un ensayo de RT-PCR, para esto se utilizaron grupos de peces en diferentes estadios del desarrollo, y diferentes órganos de peces adultos, se extrajo el RNA total de estos estadios y órganos. Para la PCR se usaron los oligonucleótidos JCR-1 y JCR2 que hibridan en el exón 4 y 8 respectivamente y que amplifican un producto de 472 pb del gen *baf57*. Como control de carga se amplificó un producto de 358 pb del gen constitutivo del factor de elongación 1 alfa (EF-1 $\alpha$ ). Por otro lado, como se describirá más adelante, usando los oligonucleótidos JCR-1 y JCR2, se generó una ribsonda antisentido para también determinar los patrones de expresión mediante una hibridación *in situ* (ISH) en diferentes etapas del desarrollo.

Como se esperaba, los resultados tanto del ensayo de RT-PCR (Fig. 8 ) como de la hibridación *in situ* (Fig. 12 B) indican que el transcrito de *baf57* se expresa claramente en todas las etapas probadas, mostrando que es heredado maternalmente, ya que se encuentra desde las divisiones tempranas en los estadios de una célula y domo, y posteriormente durante la gastrulación en el estadio de escudo, también en 6 somitas que corresponde a una etapa donde está ocurriendo la somitogénesis y su expresión continúa a los 5dpf (Fig. 8A). También se observó que *baf57* se expresa en todos los órganos probados de peces adultos: hígado, corazón, ojo, piel, cerebro, testículo y ovario (Fig. 8B). Estos resultados confirman que la expresión de *baf57* es ubicua.

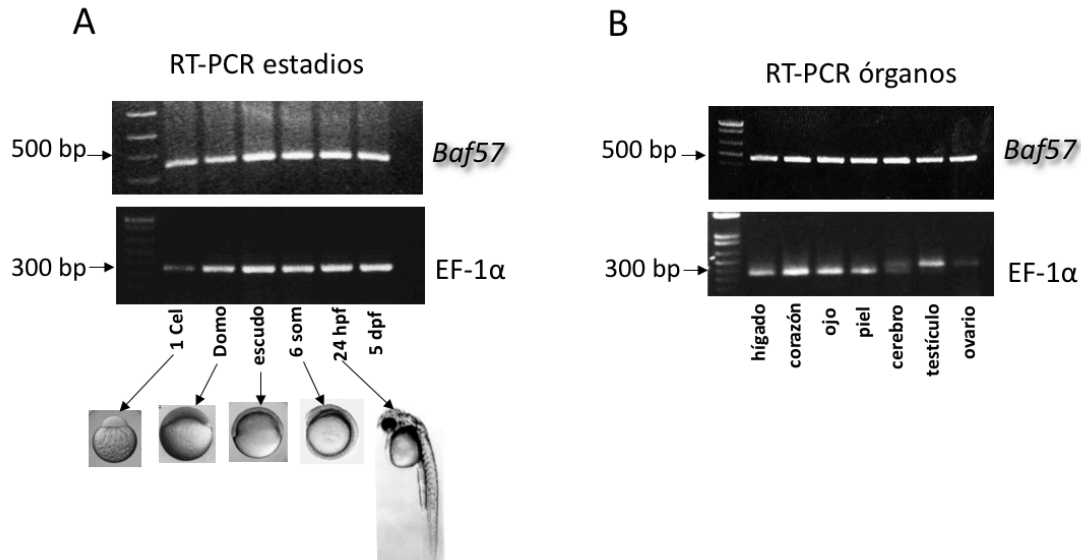


Figura 8. La expresión de *baf57* en el pez cebra. Geles de RT-PCR que muestran las bandas de los pesos esperados para *baf57*, 472 pb, y el factor de elongación  $1\alpha$ , 358 pb. Panel izquierdo, expresión en el desarrollo embrionario, desde una célula hasta los 5 dpf. Panel derecho, expresión de *baf57* en diferentes órganos adultos.

### ***baf57* de pez cebra presenta formas de *splicing* alternativo específicas de cerebro**

Como parte del análisis de expresión del mRNA, nos interesó explorar si en pez cebra existen también isoformas generadas por *splicing* alternativo y su posible expresión diferencial en tejidos, tomando en cuenta el antecedente de lo ya reportado en mamífero. Para este fin, primero se realizó un análisis computacional de los marcadores de secuencias expresadas o EST (por sus siglas en inglés; *Expressed Sequence Tag*), encontrando que es posible que existan isoformas que pierden los exones 4, 5 o incluso ambos (Fig. 9). Para probar si estas isoformas están conservadas en el pez cebra se diseñó un nuevo par de oligonucleótidos para PCR, ahora en el exón 1 y en el exón 7 (Fig. 9 A), de tal forma que fuera posible distinguir las posibles isoformas generadas por *splicing* alternativo. Se calculó que la escisión de los exones 4 o 5 generaría productos de 393 y 411 pb respectivamente, mientras que la de ambos exones generaría un producto de 312 pb. (Fig. 9A) El resultado muestra que en tejido neural de peces adultos aparecen bandas que corresponden a los tamaños predichos para las isoformas de 393 y 411 pb, pero no la isoforma predicha de 312 pb (Fig. 9B). Por otro lado, se observó que en tejidos no neurales solo se expresa la forma completa que corresponde a 492 pb (Fig.

9 B). Estos resultados sugieren fuertemente que algunas de las isoformas de *baf57* reportadas en mamífero están conservadas en pez cebra.

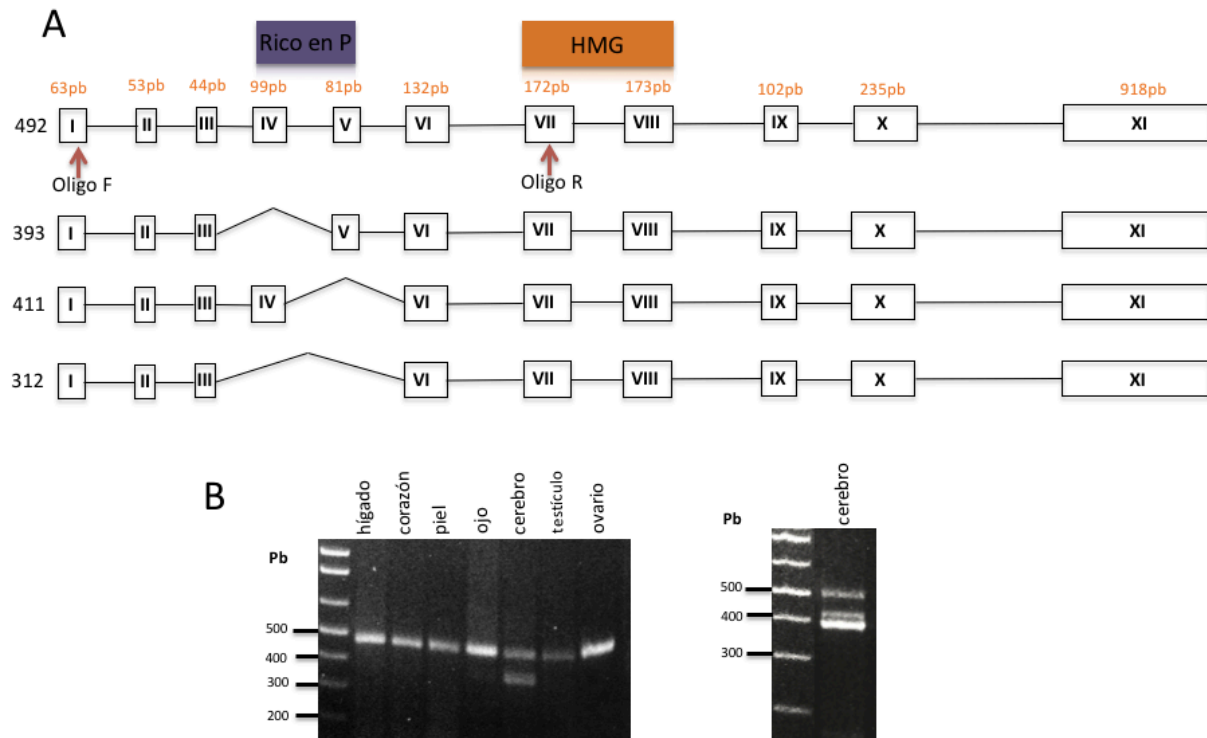


Figura 9. RT-PCR para ver isoformas producto del *splicing* alternativo. (A) Se observa los exones (cajas blancas) y se señalan el sitio de los oligonucleótidos (flechas rojas). (B) Abajo se muestran dos geles representativos donde se observa la expresión de las isoformas de *splicing* solamente en el tejido neural de peces adultos.

## Generando la pérdida de función de *Baf57* en pez cebra

En un principio se consideraron diferentes estrategias para generar la pérdida de función del Baf57. Por un lado, tratamos de disminuir su expresión mediante la inyección de morfolidos; alternativamente intentamos expresar una forma dominante negativa de BAF57 mediante la inyección del RNA mensajero correspondiente en embriones (los resultados no se muestran). Sin embargo, en ese tiempo comenzó a utilizarse el sistema CRISPR-Cas9 y consideramos que esta sería una mejor alternativa para estudiar la función de BAF57, ya que, entre otras ventajas, reduce de manera importante los problemas de variabilidad con los que se enfrentan las otras estrategias y hay más certeza de que los fenotipos que se generen sean específicos.

Para introducir mutaciones mediadas por CRISPR-Cas9 en el gen *baf57*, diseñamos una ARN guía (ARNg) dirigido al exón 4 de la secuencia genómica reportada. La inyección conjunta del ARNg con el ARNm de la endonucleasa Cas9 se hizo en embriones en estadio de una célula. Tres meses después, cuando estos peces alcanzaron la edad reproductiva y la talla adecuada, se extrajo DNA genómico de una muestra de tejido obtenido de un corte de la aleta caudal, la cual tiene la capacidad de regenerar. Posteriormente, mediante PCR, ensayos de heterodúplex y el aislamiento y secuenciación del gen *Baf57*, se lograron identificar diferentes mutaciones en la región blanco. Las mutaciones que se muestran son el resumen de varios eventos de inyecciones del sistema CRISPR-Cas9 en diferentes grupos de embriones (Fig. 10).

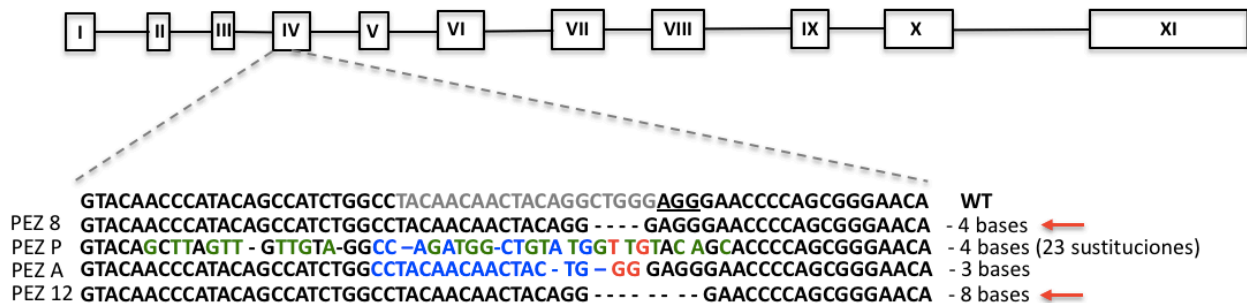


Figura 10. Las mutaciones generadas mediante el sistema CRISPR-Cas9. Arriba, diagrama esquemático del gen *baf57*. Abajo, en gris se muestra la secuencia de la región blanco dentro del exón IV, a donde se dirigió el ARN guía. La secuencia PAM se encuentra subrayada. Se encontraron diferentes mutaciones en el sitio blanco de las cuales se seleccionaron 2 alelos (flechas rojas) para generar las líneas estables.

A pesar de que se logró una alta efectividad, no todos los peces en los cuales se encontraron mutaciones podían ser fundadores. Como se sabe, la inyección en pez cebra suele provocar mosaicismos, de tal manera que no existía la certeza de que la mutación que portaban estos peces estuviera también en las células de la línea germinal y por lo tanto que pudieran heredar la mutación.

Para seleccionar de entre estos peces a los potencialmente fundadores (generación F0), solo los peces que portaban alguna mutación de interés en el gen *baf57* se cruzaron con un pez silvestre de la cepa AB. De la descendencia de cada una de estas cruza se tomaron aproximadamente el 10% de los embriones (entre 15 y 20) en estadio de 24hpf, los cuales se sacrificaron para extraer ADN genómico y genotipificar esperando

encontrar mutaciones en la secuencia blanco y así confirmar la herencia de la mutación. En los casos en los cuales se confirmó la herencia, las larvas restantes provenientes de las cruces F0 con AB se dejaron crecer hasta alcanzar una talla adecuada y mediante una muestra de tejido obtenida de un corte de la aleta caudal se logró obtener el genotipo y seleccionar los peces que hubieran heredado la mutación. Finalmente, solo los peces 8 y 12, que portaban y heredaban deleciones de 4 y 8 bases respectivamente, se usaron como fundadores (Fig. 10). La generación F1 lleva la mutación en todas las células, sin embargo, estos peces son heterocigotos ya que uno de sus padres es silvestre. Solamente cuando estos llegaron a la edad reproductiva, fue posible hacer cruces entre dos peces F1, y de acuerdo a las proporciones mendelianas un 25% de la progenie (generación F2) serían homocigotos mutantes para *baf57*, permitiéndonos observar el fenotipo que causa la pérdida de esta proteína.

Como ya se mencionó, los alelos seleccionados para generar las líneas, fueron una deleción de 4pb y una deleción de 8pb (Fig. 10), ambas mutaciones causan el corrimiento del marco de lectura abierto en la secuencia del transcrito de *baf57*, generando un codón de paro prematuro que conduciría a la producción de un péptido de 53 aa. que carecería de la parte de carboxilo terminal incluyendo todos los dominios relevantes descritos para la proteína BAF57 de pez cebra.

Sorprendentemente, al examinar la generación F2, observamos que estos peces aparentemente presentan un desarrollo normal hasta pasando las 48hpf, sin embargo, el genotipo mostró que existían las 3 condiciones posibles: homocigotos silvestres, heterocigotos y homocigotos mutantes, en las proporciones esperadas, por lo que se decidió dejar crecer estas larvas para observar si existían defectos más adelante en el desarrollo.

### **Las mutaciones generadas en *Baf57* causan severos defectos a los 4dpf**

Cuando las larvas F2 continuaron su desarrollo, se observaron defectos morfológicos evidentes a los 4dpf, los cuales incluyeron, entre otros: menor talla y pigmentación, una curvatura en la parte posterior, un edema en la cavidad cardiaca, también se observó que

no inflan la vejiga natatoria y que la vesícula ótica y el ojo son de menor tamaño (Fig. 11 A). Además, las larvas mutantes permanecen inmóviles y muestran una respuesta débil al tacto, comparado con sus hermanos silvestres. Finalmente, a los 6 dpf, en las larvas mutantes el edema cardíaco crece, no tienen ningún tipo de movilidad y mueren. Es importante mencionar que el fenotipo fue el mismo para ambos alelos, así como para todas las posibles combinaciones de cruzas heteroalélicas y como se esperaba, las proporciones fueron siempre cercanas al 25% (Fig. 11 B). Además, al hacer el genotipo de larvas de 4dpf, cuando ya se pueden seleccionar las larvas mediante su fenotipo, encontramos una perfecta correlación entre fenotipo y genotipo (Fig 11 C), lo cual indica que los defectos observados son derivados de la mutación generada en el gen *Baf57*.

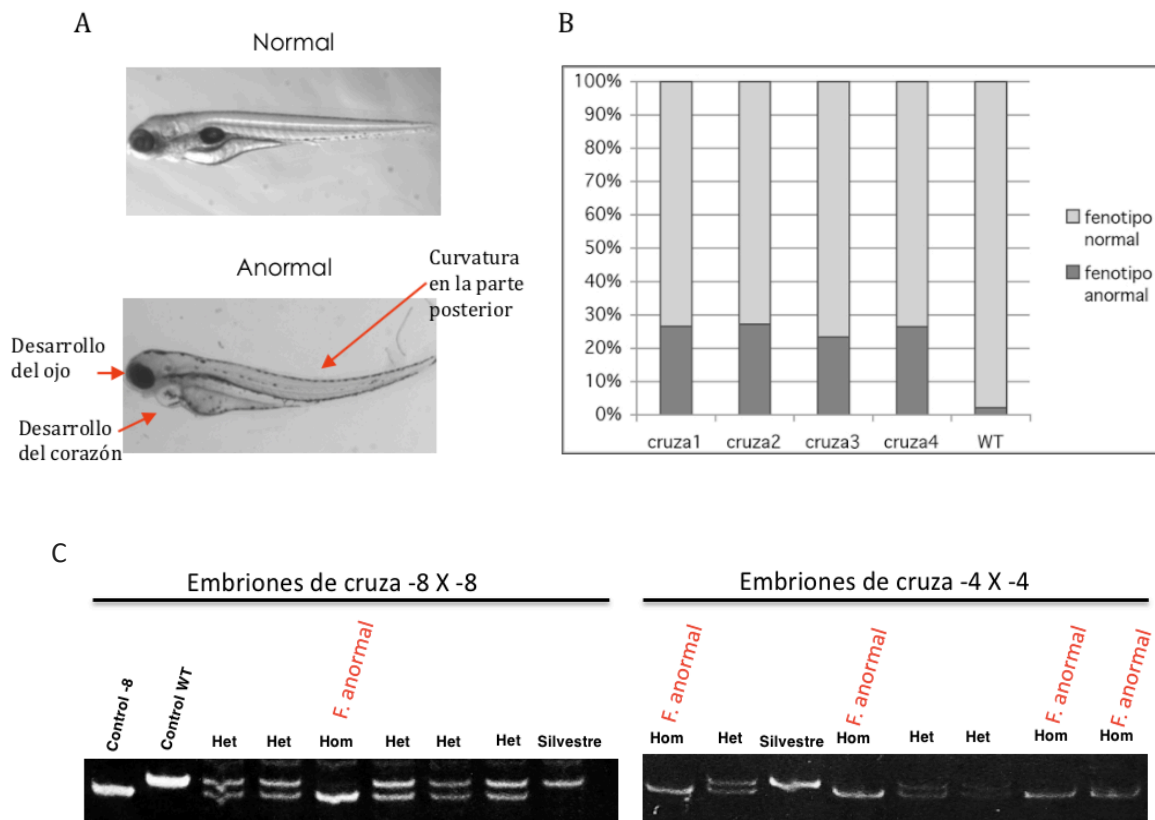


Figura 11. En la generación F2 se observa un fenotipo anormal a los 4dpf. (A) El fenotipo incluye entre otros defectos, una curvatura en el eje corporal, el ojo de menor tamaño y un edema cardíaco. (B) El fenotipo anormal aparece en las proporciones esperadas (~25%) como lo muestra la grafica de diferentes cruzas usando las posibles combinaciones  $\Delta 4X\Delta 4$ ,  $\Delta 4X\Delta 8$  y  $\Delta 8X\Delta 8$ . (C) Geles de genotipificación mediante PCR donde se muestran que solamente los peces que presenta un fenotipo anormal corresponden a mutantes bialélicos.

## Las mutaciones conducen a un abatimiento total de la proteína BAF57

Para comprobar que la expresión de la proteína BAF57 realmente se ve afectada se realizaron ensayos de *western blot* con un anticuerpo anti-BAF57, para este ensayo se usaron extractos de proteína total de grupos de larvas a los 4dpf con fenotipo normal, grupos con fenotipo anormal, y como control, grupos de larvas silvestres. El resultado mostró que la expresión de BAF57 decae en los peces con fenotipo normal, mientras que en los peces con fenotipo anormal la proteína desaparece por completo (Fig. 12 A). Este hallazgo es consistente con el genotipo, ya que el grupo de peces con fenotipo normal incluye individuos con un alelo mutado y por lo tanto presentarían disminución de BAF57; por otro lado los peces con fenotipo anormal tienen ambos alelos mutados lo que conlleva la pérdida total de BAF57 (Fig. 11 C). Además, fue posible demostrar mediante hibridación *in situ* que el ARNm de *Baf57* se degrada en los peces mutantes, probablemente mediante el mecanismo de degradación del ARN mensajero mediado por mutaciones terminadoras o NMD (por sus siglas en inglés; *Nonsense Mediated Decay*) (Fig.12 B).

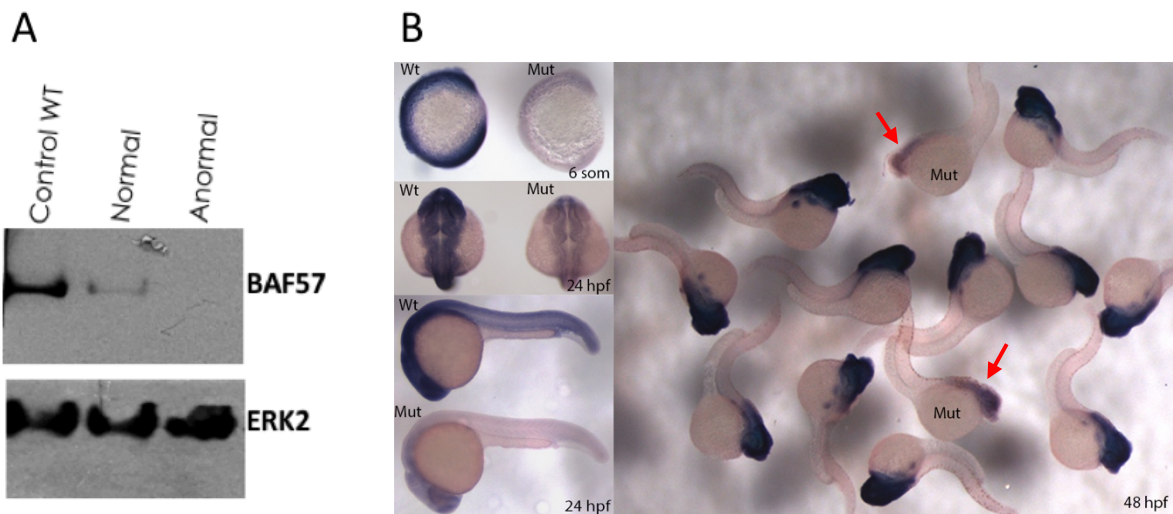


Figura 12. Los niveles la proteína y del transcrito de *baf57* se ven afectados en los peces de la línea mutante. (A) El western blot con el anticuerpo de BAF57 muestra que la expresión de la proteína en las larvas silvestre (WT) de 4dpf larvas de aspecto normal obtenidos de cruas *baf57*<sup>+/-</sup> y sus hermanos con fenotipo anormal. (B) Patrón de expresión de *baf57* mediante ISH en la progenie de cruas *baf57*<sup>+/-</sup> en las etapas indicadas (som = somitas). Se determinó que los embriones con menor señal (flechas rojas) son homocigotos *baf57*<sup>-/-</sup>.



De manera interesante, los defectos observados debido a la falta de BAF57 son parecidos a los fenotipos de dos alelos mutantes de la subunidad BRG1 ya reportados en pez cebra, *young* y *brg1<sup>s481</sup>* en los cuales tampoco se observan defectos a simple vista durante el desarrollo temprano. El mutante *young* (*yng*) tiene defectos en la neurogénesis, en el desarrollo de la retina y también presenta un edema pericárdico. (Gregg, Willer et al. 2003). Similarmente, la mutante *brg1<sup>s481</sup>* tiene severos problemas durante el desarrollo del corazón incluyendo arritmias y arrestos esporádicos en los latidos (Takeuchi, Lou et al. 2011). Aunque nuestras mutantes también presentan una gran variedad de defectos, en este trabajo decidimos enfocar primeramente nuestros esfuerzos al estudio del fenotipo observado en corazón, para tratar de contribuir al conocimiento del papel que tiene el complejo BAF durante la cardiogénesis, a la identificación del ensamblaje de los complejos BAF en los cardiomiocitos y para encontrar las posibles diferencias en los mecanismos moleculares que podrían existir entre las mutantes ya reportadas de BRG1 y la falta de BAF57.

### **El ARNm de *baf57* es capaz de rescatar el fenotipo.**

Para demostrar la especificidad de este fenotipo se realizó un rescate mediante la inyección del transcrito de *baf57*, primeramente, se clonó su secuencia en el vector pCDNA3.1+, este se usó para hacer una transcripción *in vitro* y obtener el ARNm de *Baf57*. Se realizaron inyecciones de este transcrito sintético de *Baf57* en embriones en estadio de una célula provenientes de cruces *Baf57<sup>+/-</sup>*. Después, a los 4dpf, se cuantificó y comparó la persistencia del edema cardíaco en los embriones inyectados solo con buffer contra los inyectados con el ARNm de *Baf57*. Los resultados muestran que el transcrito de *Baf57* es capaz de rescatar significativamente este defecto (Fig. 13 A). Además, a los 6 dpf, los embriones inyectados solo con buffer mantuvieron una mortalidad del 25%, lo cual es lo esperado para los individuos homocigotos, mientras que las larvas que fueron inyectadas con el ARNm de *Baf57* mostraron una disminución en el porcentaje de mortalidad, reduciéndose el número de larvas muertas hasta el 8% (Fig. 13 B). Estos resultados confirmaron que los fenotipos observados son una consecuencia directa de la pérdida de la subunidad BAF57.

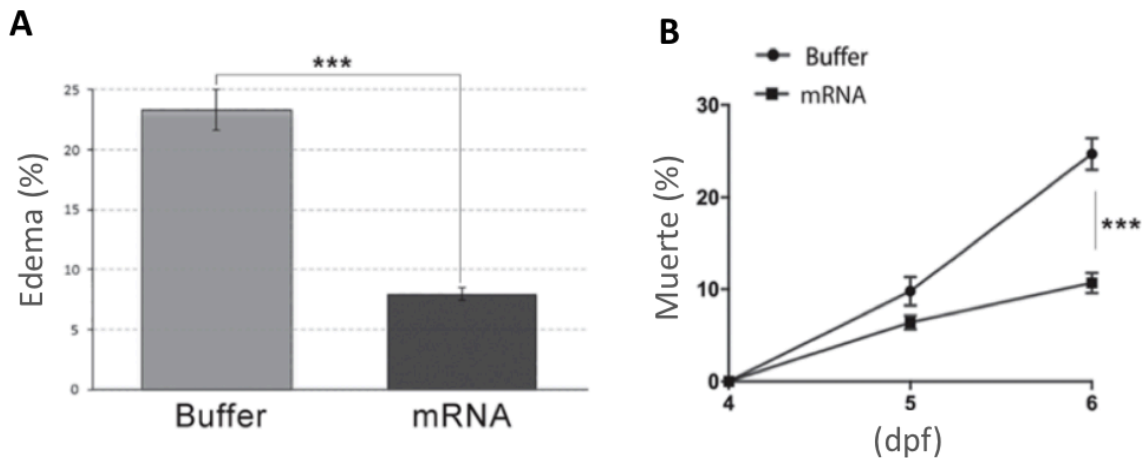


Figura 13. Gráficas del rescate mediante inyecciones del ARNm de *baf57*. (A) Se determinó un número significativamente menor de larvas con edema cardiaco en los grupos inyectados ARNm en relación con embriones inyectados con buffer (B) La tasa de supervivencia fue más alta en los grupos inyectados ARNm en relación con embriones inyectados con buffer. Los valores representan el promedio de tres inyecciones independientes de  $100 \pm 10$  embriones por experimento. \*\*\*  $P < 0.001$ .

### La estructura del corazón en las larvas *baf57*<sup>-/-</sup> presenta alteraciones importantes.

Para analizar el fenotipo cardiaco se realizaron cortes histológicos en larvas de 4 dpf. En estos ensayos además de que se seleccionaron las larvas por el fenotipo evidente, se confirmó su genotipo y se compararon larvas *baf57*<sup>-/-</sup> contra larvas *baf57*<sup>+/+</sup>. En estos cortes se observó que están presentes las células del miocardio y del endocardio de los corazones mutantes, sin embargo, los corazones mutantes tienen una morfología bastante alterada en la estructura general del corazón, presentan hipoplasia en el atrio y ventrículo, aunado a esto, no se logró observar una correcta formación del canal atrioventricular (AVC) (Fig. 14 A-C). Además, los corazones de las larvas mutantes presentan un latido significativamente más lento y en la mayoría de los casos la circulación está ausente. La morfología en los cortes muestra un corazón con forma tubular simple, esta forma es típica en otros mutantes de pez cebra con malformaciones en el corazón como el mutante llamado *heartstring* del gen *tbx5* (Garrity, Childs et al. 2002), el cual es uno de los principales factores involucrados en el desarrollo del corazón.

Para analizar a más detalle la organización celular de los corazones mutantes se utilizaron embriones mutantes fijados de 3dpf que portan el transgen (*cmlc2:egfp*), mediante reconstrucciones tridimensionales de imágenes de microscopía, se observó

también la presencia de cardiomiocitos diferenciados, pero al mismo tiempo se evidenció la desorganización del tejido y una compactación celular extrema en ambas cámaras, aunque al parecer, el atrio presenta mayor daño (Fig. 14 D-F).

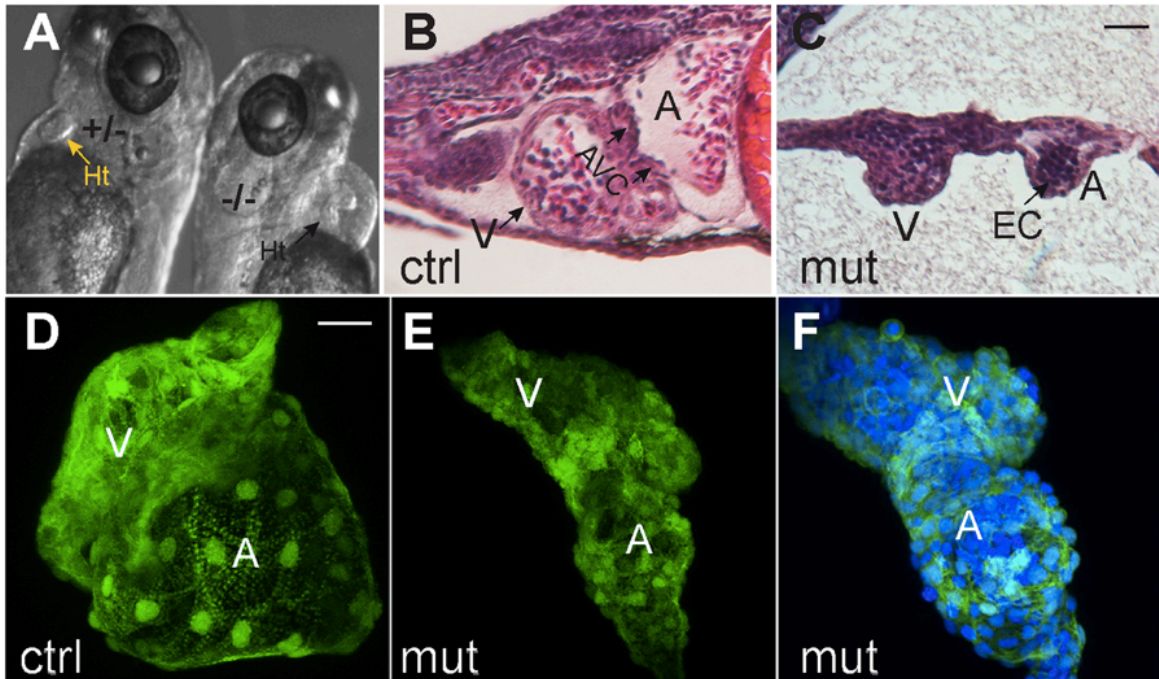


Figura 14. Defectos morfológicos en larvas *baf57<sup>-/-</sup>*. (A) Se aprecian los defectos morfológicos del corazón a 72 hpf en las larvas normales (flecha amarilla) en comparación con larvas mutantes (flecha negra). Secciones sagitales teñidas con hematoxilina-eosina de 96 hpf de embriones normales (B) y mutantes (C). (D – F) Proyecciones confocales en Z de *cmlc2:GFP/baf57* normal (D) y corazones con defectos (E, F) a 72 hpf. núcleos se tiñeron con DAPI en F. A: Atrio, V: ventrículo, AVC: canal atrioventricular, EC: endocardio, Barras de escala: 25  $\mu$ m.

### Los corazones en los mutantes no logran el proceso de torsión o *looping*

Para analizar defectos del desarrollo del corazón en etapas más tempranas, se realizaron hibridaciones “*in situ*” a las 48hpf con *cmcl2* que es marcador específico de cardiomiocitos. Los resultados mostraron que los embriones homocigotos nulos para *Baf57* no logran el proceso de *looping* (Fig. 15 A-B). Después, decidimos evaluar si el ARNm de *Baf57* también podía rescatar este defecto. Para este fin, se repitió el experimento anteriormente descrito, se inyectaron embriones obtenidos de cruces *baf57<sup>+/-</sup>* con el ARNm de *Baf57* y cuando estos llegaron a las 72 hpf se realizó la

hibridación “*in situ*” contra *cmcl2*. Posteriormente se fotografiaron los embriones y finalmente se genotipificaron y agruparon de acuerdo a su genotipo, los resultados nos permitieron observar que los embriones inyectados con el ARNm de *baf57* tuvieron un rescate en la formación del *looping* en diferentes grados (Fig. 15 C-H). De los 15 embriones inyectados 11 hicieron el *looping* de tal forma que la morfología del corazón es indistinguible de los silvestres (Fig. 15 F), otros 2 presentaron un grado de rescate intermedio, aunque todavía muy parecido al silvestre (Fig. 15 G), los dos restantes presentaron un menor grado de rescate, aunque incluso en estos se logró observar la curvatura en el corazón (Fig.15 H). Este resultado indica que *Baf57* es capaz de restaurar la forma del corazón.

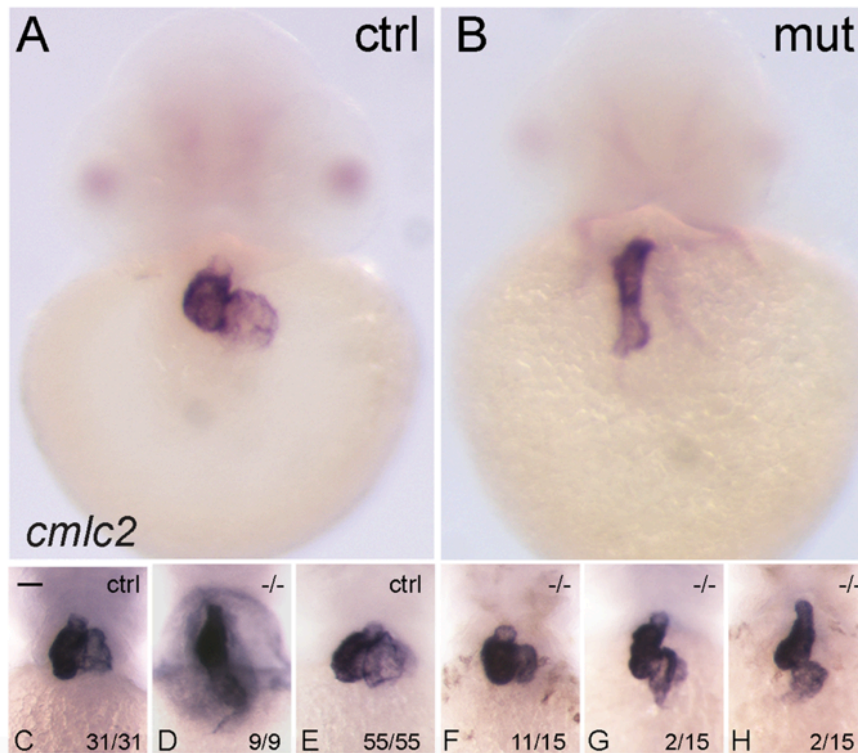


Figura 15. Rescate del *looping* mediante la inyección de ARNm de *baf57* en embriones mutantes de *baf57*. La hibridación *in situ* para el marcador de cardiomiocitos *cmcl2* revela la morfología del corazón. Embriones de 48 hpf que muestran un corazón normal (A) y un corazón de una larva *baf57*<sup>-/-</sup> con un *looping* defectuoso (B). (C – H) Análisis del *looping* cardíaco a 72 hpf. Los embriones inyectados con el buffer presentan un corazón normal en las larvas control (C) y un corazón sin *looping* en los mutantes (D). (E – H) Larvas inyectadas con el mRNA de *baf57* que muestra un rescate en diferentes grados en la morfología del corazón en los embriones mutantes. Un rescate completo se muestra en (F); un rescate parcial en (G); y un rescate mínimo en (H). Barras de escala: 50  $\mu$ m.

Para evaluar la correcta diferenciación de las cámaras cardíacas, se realizaron hibridaciones “*in situ*” contra *amhc* que marca específicamente el atrio y contra *vmhc* que marca específicamente el ventrículo (Fig. 16). Ambos marcadores se detectaron en los dominios esperados, lo que indica el adecuado establecimiento del patrón cardíaco. Por otro lado, estudios previos han descrito que defectos en el corazón en pez cebra incluyen alteraciones y cambios en la identidad que pueden producirse después de la diferenciación, por ejemplo mutaciones en los factores transcripcionales *nkx2.5* y *nkx2.7* producen una expansión de los cardiomiocitos que forman el dominio auricular lo que produce la invasión del dominio ventricular (Targoff, Colombo et al. 2013). Para evaluar la posibilidad de que en la mutante de *baf57* ocurriera algo similar, obtuvimos patrones de expresión específicos de los transcritos y las proteínas Amhc y Vmhc. Mediante inmunofluorescencias usando los anticuerpos MF20/S46 en larvas de 72 hpf, encontramos que la identidad de las cámaras no se vio alterada; no se detectó una transdiferenciación ventricular a auricular, y aunque la morfología de ambas cámaras esta defectuosa, la proporción relativa entre las cámaras no parece estar afectada (Fig. 16).

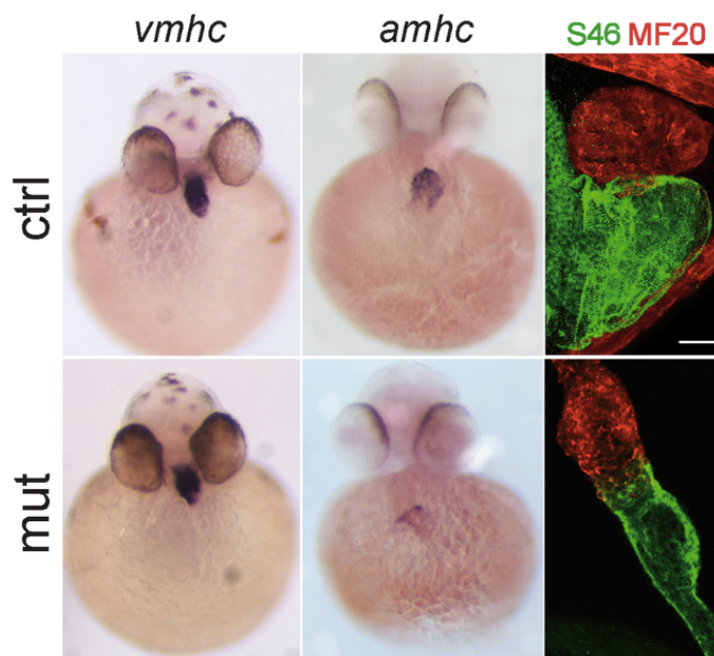


Figura 16. Patrón de expresión del atrio y del ventrículo. Embriones control (panel superior) embriones mutantes (panel inferior). Se muestran la expresión a las 48 hpf del marcador ventricular *vmhc*, y embriones que muestran la expresión del marcador de atrio *amhc*. A la derecha, embriones de 72 hpf marcados con los anticuerpos MF20 y S46 para detectar el ventrículo (rojo) y el atrio (verde) comparando embriones de tipo silvestre (ctrl) con embriones mutantes (mut). Barra de escala: 25  $\mu$ m.

## **La falta de BAF57 no afecta la formación del mesodermo, endodermo ni del miocardio durante las etapas tempranas del desarrollo**

Para tratar de identificar en qué momento se originan los defectos cardíacos en los mutantes de *baf57*, decidimos examinar si la diferenciación del mesodermo y el endodermo se vieron afectadas durante el transcurso de diferentes estadios del desarrollo, para este fin, mediante hibridaciones *in situ*, se observaron los patrones de expresión de marcadores específicos del mesodermo, endodermo y precursores cardíacos, durante la epibolia y la gastrulación (Fig. 17). Nuestros resultados indican que la expresión de *ntl* en embriones mutantes durante la epibolia y la somitogénesis presentó un patrón normal, lo cual indica que no hay defectos en el desarrollo del mesodermo (Fig.17 A). De igual forma, se observó que la expresión de *gata5* en células del endodermo durante la epibolia y la somitogénesis es normal en estas etapas, por lo tanto, concluimos que tampoco el endodermo se ve afectado (Fig. 17 B).

A continuación, examinamos la expresión de los marcadores cardíacos tempranos *nkx2.5*, *gata5* y *hand2*, que en los estadios de 6 a 9 somitas tiene patrones específicos en diferentes regiones de la placa anterior del mesodermo lateral (ALPM). Los patrones de expresión de estos tres genes no se vieron alterados en los embriones mutantes de *baf57* comparados con los silvestres (Fig. 17 C-D), lo que sugiere que las células progenitoras cardíacas que residen en el ALPM se distribuyen normalmente. También, en los embriones *baf57<sup>-/-</sup>* de 14 somitas, la expresión de *cmhc2* tiene un patrón normal (Fig. 17 F), lo que indica una correcta migración de las células miocárdicas. En conjunto, estos resultados muestran que, hasta esta etapa, los mutantes de *baf57* parecen tener un desarrollo normal del corazón.



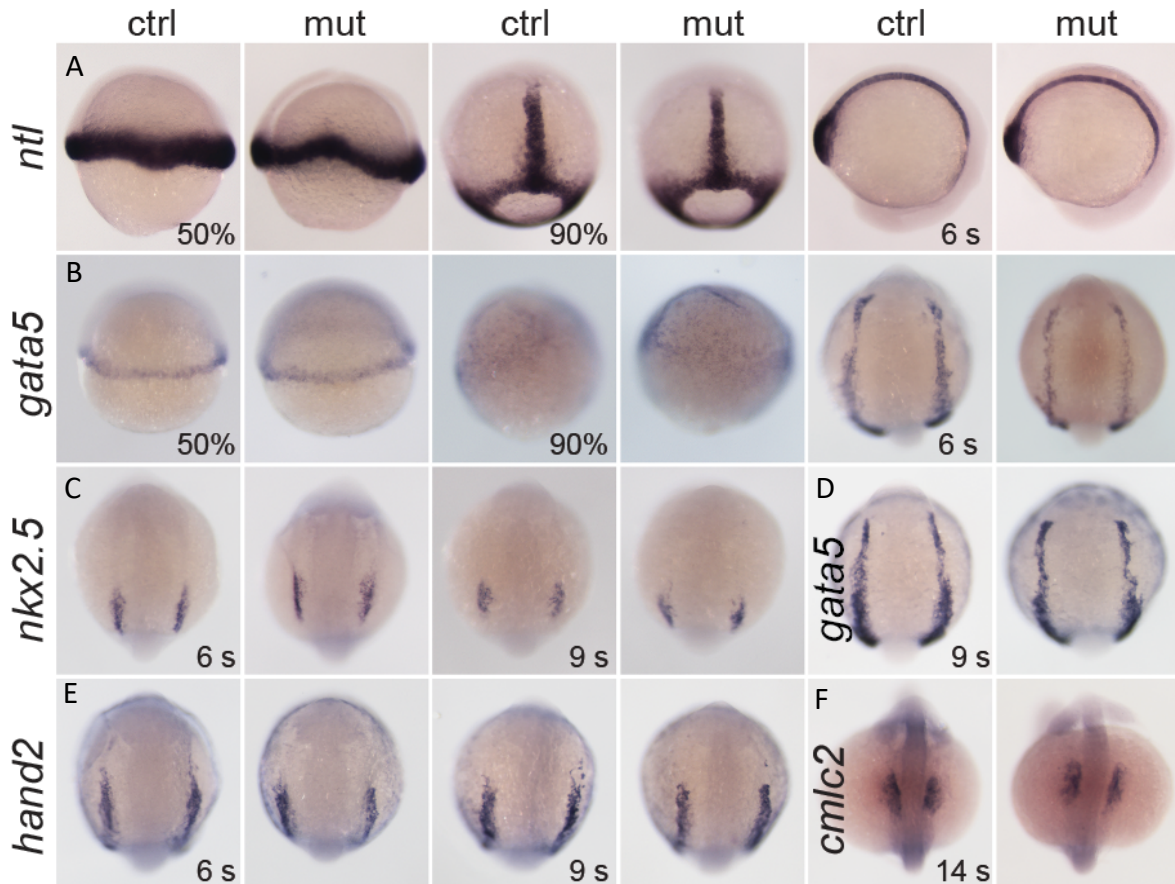


Figura 17. Hibridación *in situ* muestra los patrones de expresión de diferentes marcadores no alterados en embriones mutantes *baf57*. (A) *ntl* para mesodermo en embriones de 50%, y 90% de epibolia y 6 somitas (vista lateral). (B) para endodermo *gata5* en embriones de 50%, y 90% (vista lateral) de epibolia y 6 somitas. Para cardiomiocitos *nkx2.5* a las 6 y 9 somitas (C), *gata5* a las 9 somitas (D), y *hand2* a las 6 y 9 somitas (E). para células del miocardio *cmhc2* a las 14 somitas (F). (Los embriones en la etapa 6, 9 y 14 somitas para *gata5*, *hand2*, *nkx2.5* y *cmhc2* están en vista dorsal con el lado anterior hacia la parte superior de la imagen). (s = somitas).

### La falta de BAF57 conduce a defectos durante el desarrollo del endocardio

Para seguir examinando en que momento durante el desarrollo se originan los defectos observados en el corazón, se analizó la expresión de marcadores específicos de progenitores de miocardio y de endocardio en diferentes momentos clave del desarrollo del corazón. El análisis del marcador de miocardio *cmhc2* a las 24 hpf, mostró que la mayoría de los embriones identificados como mutantes tienen un patrón de expresión indistinguible de los silvestres, lo cual refleja un correcto ensamblaje del tubo cardíaco (Fig. 18A-B). Sin embargo, uno de los seis mutantes tenía un patrón de expresión alterado (Fig. 18 C), consistente con la idea de que los defectos observados

más adelante en el desarrollo, podrían incluir una extensión tardía o incompleta del tubo cardíaco. Al observar la expresión de *gata5*, que a las 24 hpf se vuelve principalmente endocardial (Reiter, Alexander et al. 1999) se vio un patrón anormal en los embriones mutantes (Fig. 18 D-F), lo cual sugiere que BAF57 es indispensable para el correcto desarrollo del endocardio.

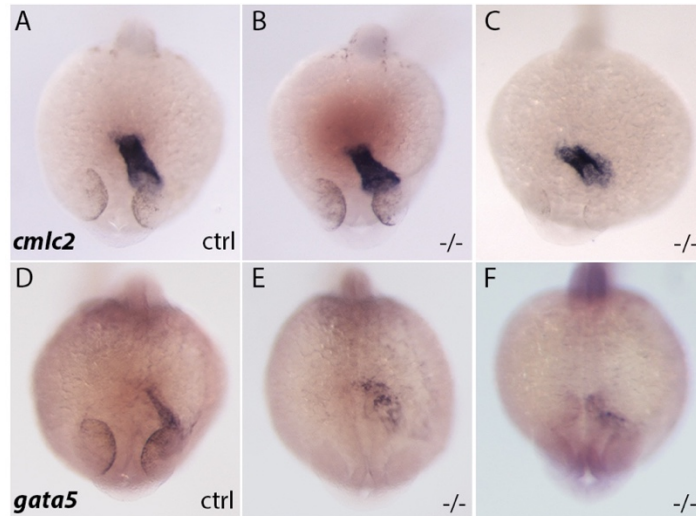


Figura 18. Las mutantes *ba57* presentan defectos en el endocardio. Embriones a 24 hpf que muestran la expresión del marcador del miocardio *cmlc2* (A-C), y el marcador de endocardio *gata5* (E-F). Se detectó un patrón dismórfico para *cmlc2* en uno de cada seis embriones (C). La expresión de *gata5* en el endocardio de todos los embriones mutantes es anormal y tiene una señal más baja (E-F).

Debido a que, como se verá mas adelante, teníamos evidencias que sugerían que BAF57 participa en la regulacion a nivel transcripcional de *gata5*, nos cuestionamos si los defectos observados con el marcador de endocardio *gata5* eran realmente una causa de las malformaciones del corazón o una consecuencia de su desregulacion transcripcional. Para confirmar los defectos endocardiales, y para determinar en qué momento comienzan, se hicieron nuevamente hibridaciones *in situ* usando otros marcadores específicos para los progenitores de endocardio en diferentes etapas del desarrollo. *flk1*, también conocido como *kdr*, codifica para un receptor del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), y ha sido ampliamente usado como un marcador temprano de precursores del endocardio en el ALPM. Nuestros resultados en las etapas de 9 y 14 somitas con este marcador no mostraron cambios significativos entre los embriones mutantes y silvestres, lo que sugiere que la especificación de los progenitores del endocardio no se ve afectada hasta estos estadios (Fig. 19 A-D). A partir del estadio de



18 somitas, las dos poblaciones de progenitores del endocardio comienzan a llegar a la línea media para fusionarse en la región donde habrá de formarse el cono cardiaco, poco después, en la etapa de 20 somitas estas células forman un agregado que adopta una forma de “U” (Bussmann, Bakkers et al. 2007). Nuestro análisis en la etapa de 20 somitas indica que la expresión de *flk1* adoptó la morfología normal de “U” en los embriones control (Fig. 19 E), sin embargo, en los mutantes *Baf57*, la expresión de *flk1* tiene un patrón bastante desorganizado, confirmando las alteraciones durante la morfogénesis del endocardio (Fig. 19, F).

Para estudiar el endocardio en estadios posteriores usamos la sonda contra *nfatc1*, el cual codifica para un factor transcripcional conservado en vertebrados, esencial para el desarrollo temprano del corazón (Chen and Cao 2009). En pez cebra *nfatc1* comienza a expresarse alrededor de las 22 hpf en las células endoteliales del endocardio, pero no en las células endoteliales vasculares (Palencia-Desai, Rost et al. 2015). Al revelar la expresión de *nfatc1* en embriones de 26, 30 y 35 hpf se observó claramente una desorganización en las células del endocardio, lo cual confirmó nuevamente que esta estructura tiene una morfología alterada en los mutantes de *Baf57* (Fig. 19 G-L).

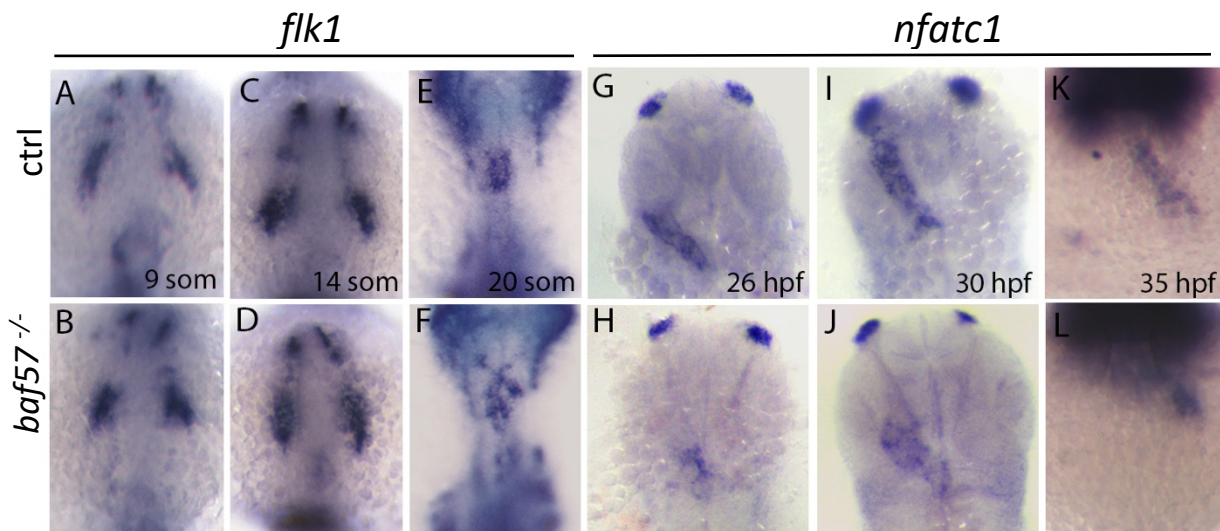


Figura 19. Defectos en el endocardio en mutantes *baf57*. Embriones en estadios de 9 somitas (A, B), 14 somitas (C, D) y 20 somitas (E, F) que muestran la expresión normal del marcador endotelial *flk1* en embriones silvestres y mutantes hasta las 14 somitas. Mientras que los embriones mutantes *baf57* presentan una distribución anormal de las células endocárdicas a las 20 somitas. La expresión de *nfatc1* en embriones mutantes *baf57* a 26 (G-H), 30 (I-L) y 35 hpf (K-L) revela un patrón desorganizado del endocardio

En conjunto, estos resultados muestran que *Baf57* es indispensable para el correcto desarrollo del endocardio en embriones de pez cebra e indican que los defectos en los corazones de los mutantes comienzan a ser evidentes durante el ensamblaje y extensión del tubo cardíaco.

Debido a que las interacciones entre el miocardio y el endocardio son esenciales para un correcto ensamblaje del tubo cardíaco (Holtzman, Schoenebeck et al. 2007), es posible que los defectos en el endocardio de los mutantes de *Baf57* no permitan que los cardiomiocitos logren organizarse apropiadamente y en consecuencia no se forme adecuadamente el tubo cardíaco. Este problema podría ser la causa inicial de las malformaciones del corazón en los mutantes.

### **La formación del canal atrioventricular se ve severamente afectada en los mutantes de *baf57*<sup>-/-</sup>.**

Para analizar los efectos de la falta de *baf57* en el desarrollo del canal atrioventricular (AVC), examinamos la expresión de los genes *nppa* y *versican* en el límite atrioventricular. En los embriones silvestres, normalmente la expresión de *nppa* se excluye en la frontera entre el atrio y el ventrículo (Fig. 20 A), mientras que, en los corazones mutantes, se detectó ARNm de *nppa* en todo el corazón, sin una exclusión en el límite atrioventricular (Fig. 20 B).

Al contrario de *nppa*, el marcador *versican* se expresa justo en el límite entre el atrio y el ventrículo a las 72hpf en las larvas silvestres (Fig. 20 C). Sin embargo, en las larvas mutantes se detectó un cambio dramático en la expresión de *versican* mostrando una amplia expresión en ambas cámaras, con una la mayor intensidad en la parte inferior de la aurícula (Fig. 20 D). Estos resultados sugieren alteraciones importantes en el canal atrioventricular de las larvas mutantes de *baf57*.

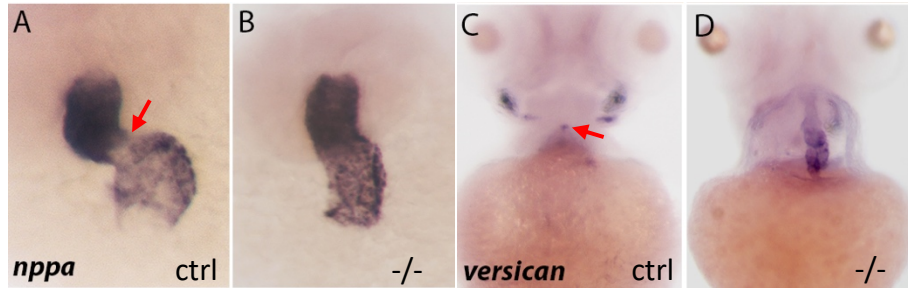


Figura 20. Defectos en la formación del canal atrioventricular. La expresión de *nppa* en embriones silvestres de 48 hpf muestran la ausencia de *nppa* en el límite atrioventricular (flecha roja en A) mientras que se observa una expresión continua en los embriones mutantes (B). La expresión de *versican* en larvas silvestres de 4 dpf se encuentra solamente en el límite atrioventricular (flecha roja en C) mientras que en larvas mutantes se observa una expresión en todo el corazón. Barra de escala: 50  $\mu$ m.

### La pérdida de Baf57 provoca una sobreexpresión de varios factores transcripciones cardiacos.

Para explorar que genes están desregulados en los peces mutantes, se hicieron qRT-PCR en los estadios de 24, 48 y 96 hpf de varios factores involucrados en el desarrollo del corazón dependiendo de cada etapa, para esto se usaron oligonucleótidos específicos ya reportados para cada gen, mientras que, como control, se eligió el factor de elongación 1 $\alpha$  (*elf1 $\alpha$* ) ampliamente usado en este tipo de ensayos. Es importante mencionar que previo al ensayo de qRT-PCR las larvas fueron genotipificadas, seleccionadas y agrupadas en mutantes y silvestres. Los genes cuantificados a 24 hpf fueron *gata5*, *nkx2.5*, *ntl* y *baf60ca* y *baf60cb*. Las isoformas de la subunidad Baf60c se consideraron porque como ya se mencionó, estudios previos encontraron que es la subunidad más relevante en el complejo cBAF y que en conjunto con Tbx5 y Gata5 participa en la inducción temprana de los cardiomiocitos. Nuestros resultados muestran que ninguno de estos genes presentó un cambio significativo en sus niveles de expresión a las 24 hpf (Fig. 21A). A los 48 y 96 hpf, cuantificamos *gata5*, *nkx2.5*, *nkx2.7*, *nppa*, *tbx5* y *bmp4*. A las 48 hpf la expresión de *nkx2.5* aumentó cinco veces, mientras que su homólogo *nkx2.7* mostró una reducción del 50%, además, *gata5* aumento el 40% su expresión (Fig. 21B). A los 4 dpf, todos los factores cardíacos presentaron un aumento sustancial (Fig. 21B). Los factores transcripcionales que mostraron el mayor incremento fueron *gata5*, *nkx2.5* y *nppa*, que sorprendentemente se elevaron entre 10 y 20 veces.

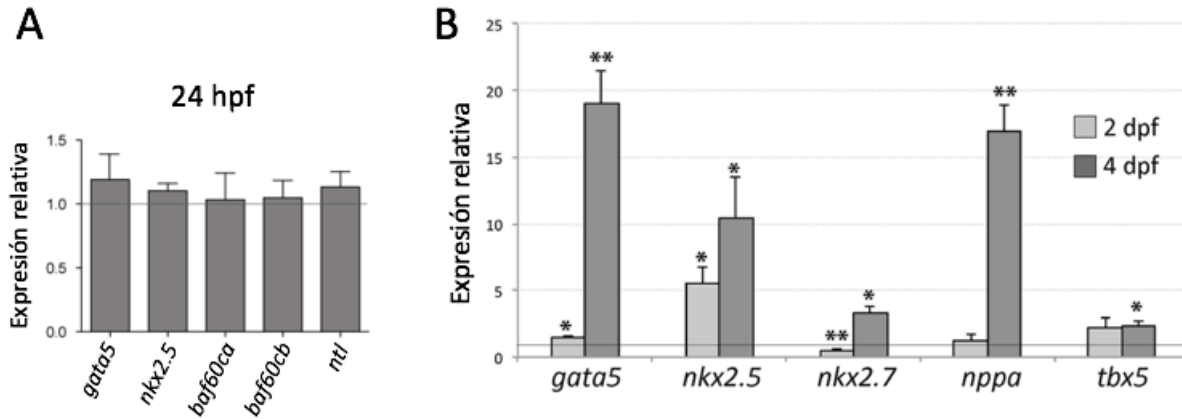


Figura 21. A. Cuantificación por qPCR de la expresión de los genes *gata5*, *nkx2.5*, *baf60ca*, *baf60cb* y *ntl*. Se genotipificaron y evaluaron embriones de 24 hpf. No se detectaron cambios significativos con respecto a los controles. Para todos los genes  $n \geq 3$ . B. Cuantificación por qPCR de la expresión de factores cardíacos. Los embriones de 2 dpf y 4 dpf fueron genotipificados y evaluados. Se observan cambios significativos en la expresión de los genes *gata5*, *nppa* y *nkx2.5*. Para todos los genes  $n \geq 3$ . \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ .

Para validar el aumento específico en corazón se hicieron ISH de estos tres factores a los 5 dpf (Fig. 22A-C). Se observó que efectivamente, los tres genes se están sobreexpresando en el corazón de las larvas mutantes, si bien, para el caso de *gata5* también se detectó un aumento de su expresión en zonas alrededor del vitelo que podrían corresponder al intestino. Para estimar la sobreexpresión específica del corazón de las larvas *baf57<sup>-/-</sup>*, se disectaron corazones y se cuantificó el nivel de expresión de *gata5* mediante qRT-PCR observando que aumenta más de seis veces en comparación con los corazones de larvas control (Fig. 22E).

Consistentemente, el análisis por ISH de la expresión de *baf57* a los 4 dpf confirmó su presencia en el corazón de larvas silvestres, mientras que en los mutantes no se detectó su expresión (Fig. 22D). En conjunto, estos resultados indican que BAF57 participa en la represión de la expresión de factores cardíacos después de las 48 hpf y para el caso de *gata5* está involucrado en su represión en distintas regiones del embrión.

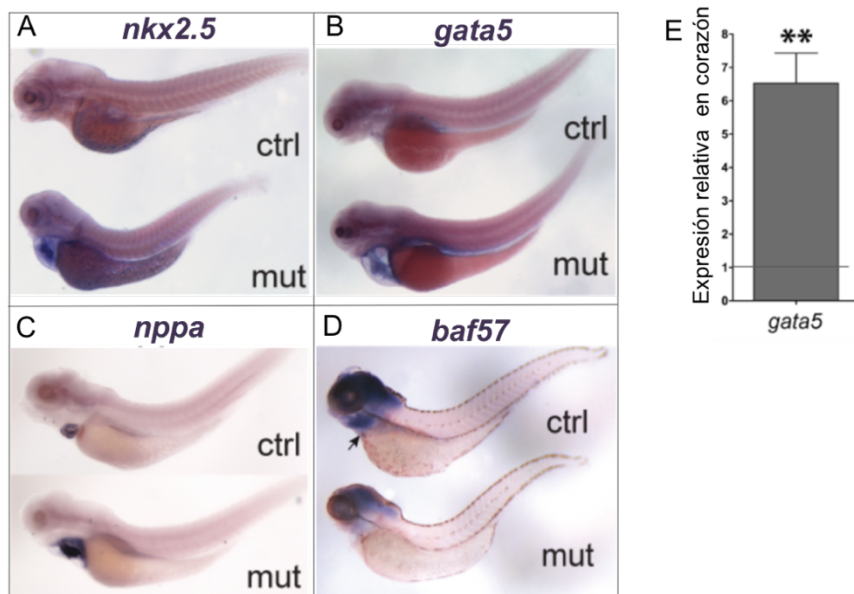


Figura 22. Las hibridaciones *in situ* confirman un aumento en el corazón, de *nkx2.5* (A) *gata5* (B) y *nppa* (C) en larvas mutantes de 5dpf, y una disminución de *baf57* (D) en larvas mutantes de 4 dpf. (vista lateral). (E) La cuantificación por qPCR de la expresión del gen *gata5* de corazones aislados de larvas mutantes de 4 dpf, indicó una diferencia significativa en comparación con corazones de larvas normales. (P value = 0,0087)

### La subunidad BAF57 es necesaria para que el complejo BAF se una a regiones regulatorias de *gata5*

El gen *gata5* es uno de los primeros marcadores cardiogénicos durante el desarrollo del corazón en pez cebra (Targoff, Colombo et al. 2013). De hecho, se ha reportado que *Nkx2-5* es activado por los factores de transcripción GATA en vertebrados (Brown, Chi et al. 2004). De manera similar, los factores *Nkx2-5* y GATA cooperan para activar la transcripción de genes posteriores como *nppa* (Sergeeva and Christoffels 2013). Debido a estas interacciones genéticas, el aumento de los niveles de transcripción de estos genes en el mutante podría deberse a la desregulación de cualquiera de ellos. Por este motivo, intentamos analizar la posibilidad de una interacción directa entre *Baf57* y algún gen blanco conocido. Para este propósito, realizamos inmunoprecipitación de cromatina utilizando el anticuerpo de *BAF57*. Como las regiones reguladoras de los genes *nkx2* y *nppa* aún no se han reportado, nos centramos en *gata5* en cuyo gen se habían identificado previamente tres regiones reguladoras funcionales en *cis* y una secuencia promotora basal (Tseng, Jang et al. 2011).

En ese trabajo se demostró que el factor de transcripción Otx2 se unía *in vivo* a los módulos C y B, ubicados aproximadamente a 17 y 8 kb respectivamente río arriba del sitio de inicio de la transcripción, así como a la secuencia promotora, la unión de Otx2 a estas tres secuencias regulatorias promueve la activación transcripcional del gen *gata5*. En contraste, Otx2 no se unió al módulo A conservado evolutivamente y ubicado entre 1.8 y 1.4 kb río arriba del sitio de inicio de la transcripción. Basándonos en estas regiones genómicas, realizamos la inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) utilizando el anticuerpo contra BAF57 y muestras de cromatina obtenida de larvas silvestres de 72 hpf. Interesantemente, los resultados mostraron que, en la condición silvestre, donde normalmente *gata5* se encuentra reprimido, BAF57 se une a el módulo A, el modulo B y al promotor, encontrándose claramente enriquecidos en este ensayo, mientras que, por el contrario, el módulo C no se amplificó (Figs. 6B y S5). Cuando se repitió el mismo ensayo con larvas mutantes no se observó el enriquecimiento de estos módulos. Además, cuando se usaron anticuerpos contra otras subunidades del complejo BAF incluyendo la subunidad central BRG1 y las subunidades alternativas ARID1A y BAF180, si se observó la amplificación de los mismos módulos en la condición silvestre, mientras que en la condición mutante no se produjo ninguna señal (Fig. S6).

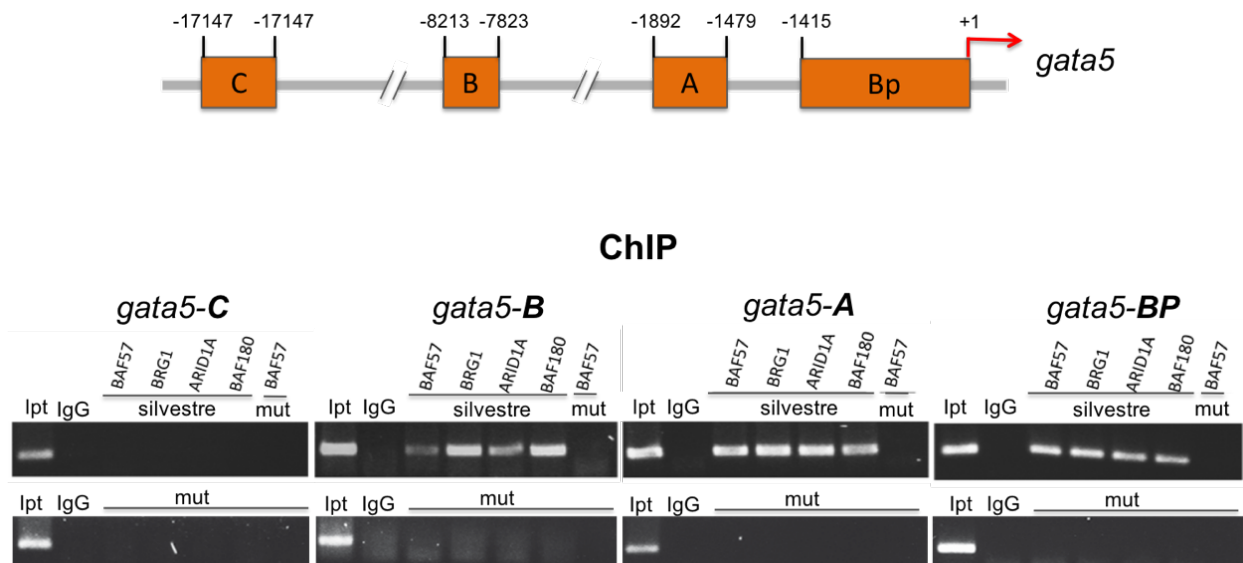


Figura 23. Geles representativos de los ensayos de ChIP. El panel superior representa las regiones reguladoras del gen *gata5* descritas anteriormente (Tseng, Jang et al. 2011). Se incluye el promotor básico (Bp), seguido del módulo A (A), el módulo B (B) y el módulo C (C) que se encuentra más distal. IgG, BAF57, BRG1, ARID1A y BAF180 indican los productos de PCR del ADN genómico precipitado utilizando el anticuerpo correspondiente. Silvestre y Mutante (mut) indican la fuente de ADN genómico. El input (lpt) es el producto total del PCR del ADN genómico.

En conjunto, estos resultados indicaron que BAF57 es esencial para el reclutamiento del complejo BAF en las regiones reguladoras de *gata5*, y sugieren que tanto los complejos BAF como los complejos PBAF pueden unirse a estas regiones.

### **BAF57 es esencial para mantener la estabilidad del complejo BAF**

Se sabe que los niveles de BAF57 en la célula están estrictamente regulados, de modo que toda la proteína de BAF57 disponible se encuentra ensamblada dentro de un complejo BAF, ya que de encontrarse no acompañada se induce su degradación. Como ya se mencionó, las subunidades que mantienen la estabilidad de BAF57 son BAF155 y BAF170, las cuales forman un heterodímero que se unen al dominio C-terminal de BAF57, promoviendo su estabilización (Chen and Archer 2005, Keppler and Archer 2010). Además, los estudios proteómicos cuantitativos mostraron que quitar a BAF57 en líneas celulares produce una disminución significativa de BAF180 en el complejo, sin afectar los niveles de la proteína BAF180 ni de su ARNm (Hah, Kolkman et al. 2010). Estos resultados resaltan la importancia de la regulación del ensamblaje de los complejos BAF y sugieren que la subunidad BAF57 podría tener un papel importante en el mantenimiento de la estequiometría correcta en los complejos.

Para determinar si en un contexto *in vivo* la pérdida de BAF57 también conduce a una desestabilización de los complejos BAF, decidimos hacer un ensayo de co-inmunoprecipitación seguido de análisis proteómicos comparativos utilizando el anticuerpo contra BAF47, que es una subunidad que pertenece al *core* del complejo BAF. Para este propósito, primero obtuvimos extractos de proteínas de larvas silvestres y mutantes a los 4dpf y analizamos mediante *western blot* los niveles de la proteína BAF47 en peces mutantes y silvestres, confirmando que son similares. Posteriormente se realizaron los ensayos de co-inmunoprecipitación de proteínas (Co-IP) y se mandaron a secuenciar mediante MS/MS. La secuenciación proteómica de las proteínas recuperadas del ensayo de co-IP de embriones silvestres confirmó la presencia de BAF57, así como las subunidades del “*core*” del complejo BAF (tabla 3).

Nomenclatura oficial de las proteínas identificadas	miembro del complejo BAF	Numero de acceso	Peso molecular	Prueba exacta de Fisher (p-value): (p < 0.01)	Significancia	Veces que cambia	No. De péptidos WT (cobertura)	No. De Péptidos MUT (cobertura)
SWI/SNF-related matrix-associated actin-dependent regulator of chromatin subfamily E member 1 [Danio rerio]	<b>BAF57</b>	XP_005164046.1, XP_005164047.1	48 kDa	< 0.00010	***	INF	34 (21%)	0
transcription activator BRG1 [Danio rerio]	<b>BRG1</b>	XP_021325403.1	182 kDa	0.00028	***	INF	14 (18%)	0
SWI/SNF complex subunit SMARCC1 [Danio rerio]	<b>BAF155</b>	XP_003200294.1, XP_005158339.1	121 kDa	< 0.00010	***	5	45 (35%)	9 (16%)
SWI/SNF complex subunit SMARCC2 [Danio rerio]	<b>BAF170</b>	XP_021330286.1	115 kDa	0.0023	**	4.3	26 (18%)	6 (7%)
SWI/SNF-related matrix-associated actin-dependent regulator of chromatin subfamily D member 1 [Danio rerio]	<b>BAF60a</b>	NP_938172.1	58 kDa	0.069		3.2	13 (9%)	4 (5%)
SWI/SNF-related matrix-associated actin-dependent regulator of chromatin subfamily D member 3 [Danio rerio]	<b>BAF60c</b>	XP_005166476.1, XP_021333239.1	53 kDa	0.098		INF	4 (5%)	0
SWI/SNF-related matrix-associated actin-dependent regulator of chromatin subfamily B member 1 [Danio rerio]	<b>BAF47</b>	XP_005167240.1, XP_005161203.1	43 kDa	0.018		2.8	28 (21%)	18 (15%)

Tabla 3. Se representan datos de las proteínas para el análisis LC-MS/MS de cuatro experimentos separados y que cumplieron con los siguientes criterios: > 1.5 veces de cambio, los valores p de la Prueba Exacta de Fisher se proporcionan como una medida de confianza para la relación de cada medición. Las proteínas fueron identificadas por dos o más péptidos únicos.

Como se esperaba, las proteínas recuperadas de la co-IP de las larvas mutantes no incluían la proteína BAF57, lo cual confirmó nuestros resultados obtenidos anteriormente mediante *western blot*. Además, la pérdida de BAF57 dio como resultado un número significativamente reducido de péptidos de otras subunidades centrales, incluidas BGR1, BAF155 y BAF170 que podría explicarse por una incorporación reducida en el complejo BAF de estas subunidades y la consiguiente degradación de las proteínas libres. En conclusión, estos datos sugieren que BAF57 es un factor esencial en la estabilidad de los complejos BAF.



## DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

La proteína BAF57 es una subunidad que forma parte del complejo remodelador de cromatina SWI/SNF también conocido en mamíferos como BAF. BAF57 se encuentra solamente en animales y esta presente en cualquier combinación de los complejos BAF, por esta razón, como se esperaba, encontramos su expresión de forma ubicua.

Para estudiar la función de BAF57, generamos mutaciones en su secuencia genética mediante el sistema CRISPR-Cas9, logrando generar 2 líneas mutantes con delaciones de 8 y 4 pb. Estas mutaciones provocan un corrimiento del marco de lectura abierto en la secuencia del transcrito, lo cual genera un codón de paro prematuro en ambos casos; como consecuencia se produce un ARNm corto, que de lograr ser traducido generaría una proteína trunca de 53 aminoácidos, además se espera que el ARN generado de la mutación sea eliminado por un sistema encargado de censar la calidad de los transcritos llamado "*Nonsense Mediated mRNA Decay*" el cual es capaz de identificar mensajeros que contengan codones de paro prematuros e inducir su degradación. Nosotros confirmamos que en los embriones mutantes sí hay degradación del mensajero de *baf57*.

Por ser BAF57 una subunidad constitutiva de todos los diferentes complejos BAF, pensamos que probablemente observaríamos defectos muy tempranos e importantes debido a la pérdida de su función. Sorpresivamente los embriones *baf57<sup>-/-</sup>* no presentan ningún fenotipo evidente en los primeros 2 días de desarrollo, deducimos que esto puede explicarse principalmente por dos razones: 1) debido a la herencia materna, existe transcrito de *baf57* en el embrión temprano, lo cual le permite llevar a cabo las primeras etapas del desarrollo sin importar que acarree la mutación, solo hasta que el genoma cigótico es activado durante la transición de la blástula media, es cuando el efecto de la mutación cobra importancia, 2) Aunado a esto, hay que tener presente que en mamíferos se han reportado isoformas de *baf57* con expresión específica en el cerebro. Nosotros mostramos resultados preliminares que sugieren que también en el cerebro del pez cebra se expresan isoformas de *baf57*, una de esas isoformas pierde el exón 4, contra el cual fue diseñado el RNA guía, por lo tanto, suponemos que esa isoforma permanece y se ensambla en complejos BAF que seguirían siendo funcionales. Esta idea se refuerza por

la observación de que en los ensayos de ISH existe una expresión reminiscente del RNAm de *baf57* en la zona de la cabeza de las larvas mutantes. La herencia materna sumada a la expresión de una de las isoformas cortas de *baf57* explicarían por qué no se observa un fenotipo más severo en etapas tempranas del desarrollo embrionario y por qué tampoco observamos defectos específicos en el cerebro.

No obstante, se observaron severos defectos fenotípicos en las larvas *baf57*<sup>-/-</sup> cuando llegan a los 3 dpf. Los defectos incluyen entre otras cosas, una menor talla y pigmentación, una curvatura del eje corporal, un edema pericárdico, defectos en la morfología del corazón, disminución en el tamaño de los ojos y anomalías en la vesícula ótica. Aunado a esto las larvas mutantes tienen disminuida su capacidad de movilidad y mueren a los 6 dpf. Aunque es difícil determinar la causa de muerte debido a los diversos problemas que presentan, suponemos que podría deberse a los defectos cardiacos, ya que esta bien descrito en otras mutantes de pez cebra que afectan severamente el sistema cardiovascular, que son capaces de sobrevivir hasta los 6 dpf, que es justamente lo que observamos en este estudio. Por lo tanto, en este trabajo nos enfocamos primeramente al estudio de los problemas que comprometen el desarrollo del corazón, aunque, cabe señalar, que nuestro grupo ha continuado con estudios enfocados a otros aspectos de esta mutación.

La evidencia de que los defectos observados son los mismos en ambos alelos y en cualquiera de sus combinaciones, la demostración de que la proteína BAF57 se abate completamente en las larvas mutantes, más el hecho de que el RNAm de *baf57* es capaz de rescatar significativamente la morfología del corazón y la muerte observada en la mutante, indican contundentemente que los defectos se deben específicamente a la pérdida de BAF57.

Las larvas mutantes de *baf57* mostraron que tienen una morfología similar a la mutación llamada *heartstring* que se ha reportado en las mutantes del gen *tbx5* y *brg1* y que se caracteriza por la forma tubular del corazón (Garrity, Childs et al. 2002, Takeuchi, Lou et al. 2011), también se detectaron latidos más lentos e incluso paradas esporádicas. Sorpresivamente, un análisis más a fondo de los problemas cardiacos indica que las primeras etapas en el desarrollo cardíaco como la especificación y localización en el

ALPM de las células precursoras cardíacas no se ven afectadas. Las poblaciones tanto de los precursores atriales como de los precursores ventriculares se encuentran ubicados normalmente, de hecho, los análisis a las 72 hpf indican que las poblaciones celulares de ambas cámaras mantienen sus dominios de expresión sin alteraciones.

Sin embargo, nuestro escrutinio usando los marcadores endocardiales *gata5*, *flk* y *nfatc1* muestra que a partir de la etapa de 20 somitas se hace evidente una desorganización de células del endocardio en los embriones mutantes. Se sabe que la formación del endocardio es indispensable para la correcta organización y movimiento del miocardio durante el ensamblaje del tubo cardíaco, por ejemplo, los mutantes de pez cebra de los genes *gata5*, *tal1* y *cloche* (Reiter, Alexander et al. 1999, Bussmann, Bakkers et al. 2007, Reischauer, Stone et al. 2016), tienen defectos en la formación del endocardio lo cual causa una desorganización durante la morfogénesis del miocardio, por lo tanto, es fácil suponer que la desorganización que observamos del endocardio podría afectar el movimiento de los cardiomicitos desembocando en defectos durante la formación del tubo cardíaco.

Debido a que estos defectos podrían deberse a diferentes causas como problemas durante la diferenciación de los progenitores endocárdicos o a una migración deficiente hacia el campo cardíaco, sería interesante hacer un análisis de los factores transcripcionales Cloche y Tal1 que son esenciales para la especificación del endocardio e igualmente un análisis de la señalización mediada por Slit2 a través de su receptor Robo1, esta señalización a su vez esta regulada por el microRNA mir-218 y está encargada de la correcta migración de los progenitores del endocardio (Fish, Wythe et al. 2011). Como puede verse, es necesario hacer experimentos adicionales para poder determinar detalladamente el origen de los defectos observados en el endocardio que se originan debido a la pérdida de BAF57.

Se sabe que el endocardio también es un componente esencial en la formación del canal atrioventricular en etapas de entre 2 y 3 dpf, posteriormente a los 4 dpf es esencial para la formación de la válvula encargada de mantener el flujo sanguíneo del atrio hacia el ventrículo y no permitir su regreso.

Observamos que en los corazones de las larvas *baf57<sup>-/-</sup>* los límites de expresión de *nppa* que marca el miocardio de ambas cámaras (pero no el canal atrioventricular) y de *versican* que marca exclusivamente el miocardio del canal atrioventricular no están correctamente delimitados, lo cual indica defectos en la morfología de esta estructura. Aunado a esto, en etapas posteriores las secciones histológicas muestran defectos tanto en el endocardio como en el miocardio, y no se logra distinguir el canal atrioventricular. Aunque se necesitan análisis más detallados tanto de marcadores del canal atrioventricular como ensayos de funcionalidad, nuestros datos sugieren que los problemas que se detectaron en el endocardio durante las etapas tempranas podrían influir de manera directa en la ausencia de la formación del *looping* que se detecta más adelante en el desarrollo de las larvas *baf57<sup>-/-</sup>*, y se podría especular que esto a su vez provoque defectos durante la formación de la válvula. Esta hipótesis se ve reforzada por la observación de que el flujo sanguíneo es extremadamente lento y en muchos casos ausente en larvas *baf57<sup>-/-</sup>*.

Nuestros resultados indican que la pérdida de BAF57 provoca un aumento significativo de varios factores transcripcionales esenciales durante la cardiogénesis como *nkx2.5*, *nppa* y *gata5*, este aumento se detectó a partir de las 48 hpf pero se eleva considerablemente a los 4dpf, sugiriendo que en un contexto silvestre BAF57 podría estar involucrado directa o indirectamente en la represión transcripcional de estos genes después de las 48 hpf (Fig. 24A).

Aprovechando regiones regulatorias del gen *gata5* que se habían descrito previamente en pez cebra (Tseng, Jang et al. 2011), demostramos que BAF57 y otras subunidades del complejo BAF se unen directamente a estas regiones en las larvas silvestres de 3dpf, indicando que la falta de BAF57 provoca una desrepresión del gen *gata5*. Además, al estar ausente BAF57 en las larvas mutantes, evidentemente no se detecta unión a las mismas regiones regulatorias, sin embargo, tampoco se detectó la unión de ninguna de las otras subunidades probadas del complejo BAF, sugiriendo que BAF57 es indispensable para que el complejo BAF pueda unirse a las regiones regulatorias del gen *gata5* (Fig. 24B).

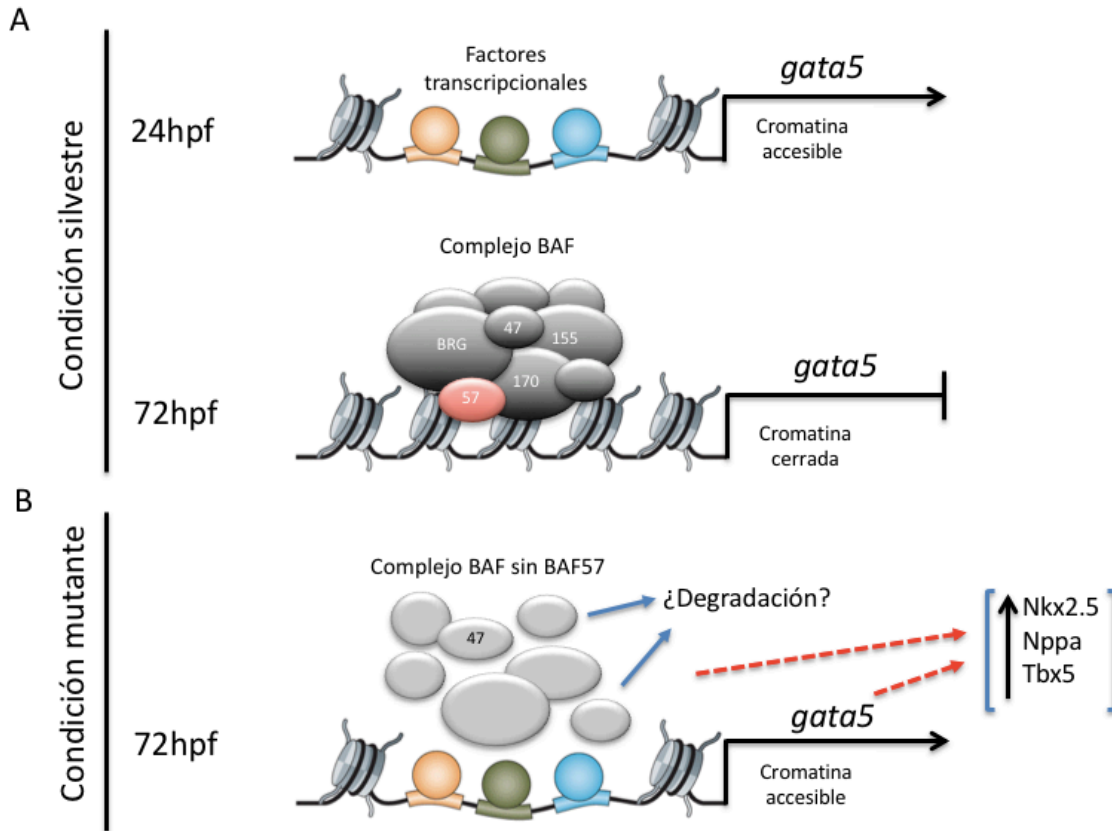


Figura 24. Modelo de probables mecanismos que ejemplifican los resultados de los ensayos de ChIP en las regiones regulatorias de gen *gata5* y de la proteómica. El panel A representa el estado de la cromatina que permite la expresión de *gata5* a las 24hpf en la condición silvestre, después, en estadios del desarrollo más avanzados se encuentra el complejo BAF unido a las regiones regulatorias inhibiendo la expresión de *gata5*. El panel B representa la condición mutante donde la falta de BAF57 a las 72 hpf provoca que el complejo BAF no se una a las regiones regulatorias, probablemente por problemas en el ensamblaje del complejo BAF y la posible degradación de las subunidades no ensambladas. La imposibilidad de el complejo BAF para unirse a regiones regulatorias también afecta directa o indirectamente la expresión de factores transcripcionales importantes durante la cardiogénesis

Nuestros experimentos de co-inmunoprecipitación (Co-IP) junto con los estudios de proteómica indican que la subunidad BAF57 es necesaria para la estabilidad en los complejos BAF, ya que la pérdida de BAF57 conduce a una disminución drástica de las subunidades del “core” BRG1, BAF155 y BAF170. Esto es consistente con un papel de BAF57 en la regulación de la estequiometría de los complejos BAF. Como ya se mencionó, los niveles de proteína de BAF57 deben regularse cuidadosamente *in vivo* y las proteínas de andamiaje BAF155 y BAF170 son necesarias para esta regulación, lo que sugiere que estas tres subunidades podrían ser fundamentales para la estabilidad de los complejos de BAF. Aún falta hacer experimentos para confirmar nuestra hipótesis de que la falta de estas proteínas que observamos en nuestros ensayos de Co-IP y

proteómica se debe a una reducción de la incorporación de subunidades a los complejos BAF, también está abierta la pregunta de si en consecuencia las proteínas libres se degradan (Fig. 24B). Otra implicación de nuestro experimento de Co-IP es que el fenotipo descrito aquí puede no ser completamente debido a la falta específica de BAF57, sino a la pérdida de alguna otra subunidad. De hecho, los defectos observados en la mutación *baf57* son muy similares en apariencia a los descritos en la mutación *brg1* (Takeuchi, Lou et al. 2011), a pesar de que, como ya se mencionó, estas dos mutaciones no son funcionalmente equivalentes. La demostración de que BRG1 no está incorporada a los complejos BAF podría explicar las similitudes fenotípicas entre estos mutantes.

Por otro lado, también sería interesante determinar si se pierden interacciones con proteínas conocidas por su función represora como es el caso de HDAC1, un importante componente de complejos que intervienen en la represión transcripcional y con los cuales se ha reportado que interactúa el complejo BAF.

Diferentes análisis han demostrado que otras subunidades del complejo BAF también intervienen en la represión transcripcional de genes cardiacos. Por ejemplo, durante la diferenciación temprana de los cardiomiocitos en ratón, ARID1a coopera con Tbx3 y HDAC3 para reprimir la expresión de *Nkx2-5* (Wu, Peng et al. 2014). En células P19 inducidas hacia cardiomiocitos, se demostró que ARID1a reprime directamente la transcripción de genes cardíacos a través de la interacción directa con el complejo remodelador de cromatina NuRD (Singh and Archer 2014). También se describió que Brg1 promueve la proliferación del miocardio en pez cebra a través de silenciar la expresión de *cdkn1c*, Brg1 interactúa directamente con Dnmt3 y aumentan los niveles de metilación de los sitios CpG en el promotor *cdkn1c* (Xiao, Gao et al. 2016). Por otro lado, es claro que diferentes combinaciones del complejo BAF con actividades alternativas de remodelación pueden coexistir en el corazón en desarrollo. En las primeras etapas del desarrollo cardiaco del ratón BAF60c interactúa con los factores de transcripción GATA4 y TBX5, y los tres juntos reclutan al complejo BAF que ocupa y abre loci cardiogénicos como el de *Nkx2-5*, y seguramente otras combinaciones del complejo BAF promueven el cierre de las mismas zonas de la cromatina en etapas posteriores.

Aunque BAF57 está presente en todas las combinaciones, se puede especular que es una subunidad fundamental en actividades represivas del complejo.

En conclusión, en este trabajo encontramos que la pérdida de BAF57 no afecta las etapas iniciales del desarrollo de pez cebra. Sin embargo, En etapas posteriores, BAF57 es fundamental para el desarrollo. Específicamente demostramos que la falta de BAF57 provoca defectos durante la formación del endocardio. Aunque sí se logra formar el tubo cardíaco y las cámaras cardiacas conservan su identidad, observamos severos defectos durante la formación del *looping*, el cual es indispensable para concluir la formación de estructuras importantes y la correcta funcionalidad del corazón. BAF57 es esencial para el correcto ensamblaje de los complejos BAF y participa para reprimir la transcripción de genes cardíacos en etapas avanzadas del desarrollo del corazón. Estos hallazgos contribuyen al entendimiento de los mecanismos epigenéticos que regulan las redes genéticas durante la formación del corazón y las cuales están altamente conservadas en animales, por lo tanto nuestra contribución se vuelve relevante para el estudio de enfermedades congénitas en el humano, por ejemplo, mutaciones en *BAF57* se han asociado con el síndrome de Coffin-Siris, un síndrome multisistémico que incluye, entre otras cosas, un severo retraso mental y problemas durante el desarrollo de órganos internos incluyendo el corazón. Las mutaciones generadas en este trabajo pueden servir como un modelo para el estudio de este síndrome.

## BIBLIOGRAFÍA

- Auman, H. J., H. Coleman, H. E. Riley, F. Olale, H. J. Tsai and D. Yelon (2007). "Functional modulation of cardiac form through regionally confined cell shape changes." *PLoS Biol* **5**(3): e53.
- Barron, M., M. Gao and J. Lough (2000). "Requirement for BMP and FGF signaling during cardiogenic induction in non-precardiac mesoderm is specific, transient, and cooperative." *Dev Dyn* **218**(2): 383-393.
- Battaglioli, E., M. E. Andres, D. W. Rose, J. G. Chenoweth, M. G. Rosenfeld, M. E. Anderson and G. Mandel (2002). "REST repression of neuronal genes requires components of the hSWI.SNF complex." *J Biol Chem* **277**(43): 41038-41045.
- Beis, D., T. Bartman, S. W. Jin, I. C. Scott, L. A. D'Amico, E. A. Ober, H. Verkade, J. Frantsve, H. A. Field, A. Wehman, H. Baier, A. Tallafuss, L. Bally-Cuif, J. N. Chen, D. Y. Stainier and B. Jungblut (2005). "Genetic and cellular analyses of zebrafish atrioventricular cushion and valve development." *Development* **132**(18): 4193-4204.
- Bell, J. T. and T. D. Spector (2011). "A twin approach to unraveling epigenetics." *Trends Genet* **27**(3): 116-125.
- Berger, S. L. (2007). "The complex language of chromatin regulation during transcription." *Nature* **447**(7143): 407-412.
- Bogershausen, N. and B. Wollnik (2018). "Mutational Landscapes and Phenotypic Spectrum of SWI/SNF-Related Intellectual Disability Disorders." *Front Mol Neurosci* **11**: 252.
- Brown, C. O., 3rd, X. Chi, E. Garcia-Gras, M. Shirai, X. H. Feng and R. J. Schwartz (2004). "The cardiac determination factor, Nkx2-5, is activated by mutual cofactors GATA-4 and Smad1/4 via a novel upstream enhancer." *J Biol Chem* **279**(11): 10659-10669.
- Bruneau, B. G. (2008). "The developmental genetics of congenital heart disease." *Nature* **451**(7181): 943-948.
- Bultman, S., T. Gebuhr, D. Yee, C. La Mantia, J. Nicholson, A. Gilliam, F. Randazzo, D. Metzger, P. Chambon, G. Crabtree and T. Magnuson (2000). "A Brg1 null mutation in the mouse reveals functional differences among mammalian SWI/SNF complexes." *Mol Cell* **6**(6): 1287-1295.
- Bultman, S. J., T. C. Gebuhr and T. Magnuson (2005). "A Brg1 mutation that uncouples ATPase activity from chromatin remodeling reveals an essential role for SWI/SNF-related complexes in beta-globin expression and erythroid development." *Genes Dev* **19**(23): 2849-2861.
- Bussmann, J., J. Bakkers and S. Schulte-Merker (2007). "Early endocardial morphogenesis requires Scf/Tal1." *PLoS Genet* **3**(8): e140.
- Cairns, B. R. (2007). "Chromatin remodeling: insights and intrigue from single-molecule studies." *Nat Struct Mol Biol* **14**(11): 989-996.
- Cardiff, R. D., C. H. Miller and R. J. Munn (2014). "Manual hematoxylin and eosin staining of mouse tissue sections." *Cold Spring Harb Protoc* **2014**(6): 655-658.
- Chen, J. and T. K. Archer (2005). "Regulating SWI/SNF subunit levels via protein-protein interactions and proteasomal degradation: BAF155 and BAF170 limit expression of BAF57." *Mol Cell Biol* **25**(20): 9016-9027.
- Chen, J., X. Zhang, T. Wang, Z. Li, G. Guan and Y. Hong (2012). "Efficient detection, quantification and enrichment of subtle allelic alterations." *DNA Res* **19**(5): 423-433.
- Chen, Y. and X. Cao (2009). "NFAT directly regulates Nkx2-5 transcription during cardiac cell differentiation." *Biol Cell* **101**(6): 335-349.
- Chi, T. H., M. Wan, K. Zhao, I. Taniuchi, L. Chen, D. R. Littman and G. R. Crabtree (2002). "Reciprocal regulation of CD4/CD8 expression by SWI/SNF-like BAF complexes." *Nature* **418**(6894): 195-199.
- Clapier, C. R. and B. R. Cairns (2009). "The biology of chromatin remodeling complexes." *Annu Rev Biochem* **78**: 273-304.



- de la Serna, I. L., K. A. Carlson and A. N. Imbalzano (2001). "Mammalian SWI/SNF complexes promote MyoD-mediated muscle differentiation." Nat Genet **27**(2): 187-190.
- Dohn, T. E. and J. S. Waxman (2012). "Distinct phases of Wnt/beta-catenin signaling direct cardiomyocyte formation in zebrafish." Dev Biol **361**(2): 364-376.
- Eroglu, B., G. Wang, N. Tu, X. Sun and N. F. Mivechi (2006). "Critical role of Brg1 member of the SWI/SNF chromatin remodeling complex during neurogenesis and neural crest induction in zebrafish." Dev Dyn **235**(10): 2722-2735.
- Evans, L. T., J. Van Hoff, W. F. Hickey, M. J. Smith, D. G. Evans, W. G. Newman and D. F. Bauer (2015). "SMARCE1 mutations in pediatric clear cell meningioma: case report." J Neurosurg Pediatr **16**(3): 296-300.
- Fish, J. E., J. D. Wythe, T. Xiao, B. G. Bruneau, D. Y. Stainier, D. Srivastava and S. Woo (2011). "A Slit/miR-218/Robo regulatory loop is required during heart tube formation in zebrafish." Development **138**(7): 1409-1419.
- Flaus, A., D. M. Martin, G. J. Barton and T. Owen-Hughes (2006). "Identification of multiple distinct Snf2 subfamilies with conserved structural motifs." Nucleic Acids Res **34**(10): 2887-2905.
- Fleck, B. J., A. Pandya, L. Vanner, K. Kerkering and J. Bodurtha (2001). "Coffin-Siris syndrome: review and presentation of new cases from a questionnaire study." Am J Med Genet **99**(1): 1-7.
- Flowers, S., N. G. Nagl, Jr., G. R. Beck, Jr. and E. Moran (2009). "Antagonistic roles for BRM and BRG1 SWI/SNF complexes in differentiation." J Biol Chem **284**(15): 10067-10075.
- Gao, X., P. Tate, P. Hu, R. Tjian, W. C. Skarnes and Z. Wang (2008). "ES cell pluripotency and germ-layer formation require the SWI/SNF chromatin remodeling component BAF250a." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(18): 6656-6661.
- Garrity, D. M., S. Childs and M. C. Fishman (2002). "The heartstrings mutation in zebrafish causes heart/fin Tbx5 deficiency syndrome." Development **129**(19): 4635-4645.
- Gerkes, E. H., J. M. Fock, W. F. den Dunnen, M. J. van Belzen, C. A. van der Lans, E. W. Hoving, I. E. Fakkert, M. J. Smith, D. G. Evans and M. J. Olderode-Berends (2016). "A heritable form of SMARCE1-related meningiomas with important implications for follow-up and family screening." Neurogenetics **17**(2): 83-89.
- Gilbert, S. F. (2006). Developmental biology. Sunderland, Mass., Sinauer Associates, Inc. Publishers.
- Goldberg, A. D., C. D. Allis and E. Bernstein (2007). "Epigenetics: a landscape takes shape." Cell **128**(4): 635-638.
- Gregg, R. G., G. B. Willer, J. M. Fadool, J. E. Dowling and B. A. Link (2003). "Positional cloning of the young mutation identifies an essential role for the Brahma chromatin remodeling complex in mediating retinal cell differentiation." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(11): 6535-6540.
- Hah, N., A. Kolkman, D. D. Ruhl, W. W. Pijnappel, A. J. Heck, H. T. Timmers and W. L. Kraus (2010). "A role for BAF57 in cell cycle-dependent transcriptional regulation by the SWI/SNF chromatin remodeling complex." Cancer Res **70**(11): 4402-4411.
- Hargreaves, D. C. and G. R. Crabtree (2011). "ATP-dependent chromatin remodeling: genetics, genomics and mechanisms." Cell Res **21**(3): 396-420.
- Hirschhorn, J. N., S. A. Brown, C. D. Clark and F. Winston (1992). "Evidence that SNF2/SWI2 and SNF5 activate transcription in yeast by altering chromatin structure." Genes Dev **6**(12A): 2288-2298.
- Ho, L., J. L. Ronan, J. Wu, B. T. Staahl, L. Chen, A. Kuo, J. Lessard, A. I. Nesvizhskii, J. Ranish and G. R. Crabtree (2009). "An embryonic stem cell chromatin remodeling complex, esBAF, is essential for embryonic stem cell self-renewal and pluripotency." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(13): 5181-5186.
- Holtzman, N. G., J. J. Schoenebeck, H. J. Tsai and D. Yelon (2007). "Endocardium is necessary for cardiomyocyte movement during heart tube assembly." Development **134**(12): 2379-2386.

- Houston, D. W. and M. L. King (2000). "Germ plasm and molecular determinants of germ cell fate." *Curr Top Dev Biol* **50**: 155-181.
- Hu, N., D. Sedmera, H. J. Yost and E. B. Clark (2000). "Structure and function of the developing zebrafish heart." *Anat Rec* **260**(2): 148-157.
- Hwang, W. Y., Y. Fu, D. Reyon, M. L. Maeder, S. Q. Tsai, J. D. Sander, R. T. Peterson, J. R. Yeh and J. K. Joung (2013). "Efficient genome editing in zebrafish using a CRISPR-Cas system." *Nat Biotechnol* **31**(3): 227-229.
- Jao, L. E., S. R. Wente and W. Chen (2013). "Efficient multiplex biallelic zebrafish genome editing using a CRISPR nuclease system." *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**(34): 13904-13909.
- Kadoch, C. and G. R. Crabtree (2015). "Mammalian SWI/SNF chromatin remodeling complexes and cancer: Mechanistic insights gained from human genomics." *Sci Adv* **1**(5): e1500447.
- Kadoch, C., D. C. Hargreaves, C. Hodges, L. Elias, L. Ho, J. Ranish and G. R. Crabtree (2013). "Proteomic and bioinformatic analysis of mammalian SWI/SNF complexes identifies extensive roles in human malignancy." *Nat Genet* **45**(6): 592-601.
- Kane, D. A. (1999). "Cell cycles and development in the embryonic zebrafish." *Methods Cell Biol* **59**: 11-26.
- Kasten, M. M., C. R. Clapier and B. R. Cairns (2011). "SnapShot: Chromatin remodeling: SWI/SNF." *Cell* **144**(2): 310 e311.
- Kazantseva, A., M. Sepp, J. Kazantseva, H. Sadam, P. Pruunsild, T. Timmusk, T. Neuman and K. Palm (2009). "N-terminally truncated BAF57 isoforms contribute to the diversity of SWI/SNF complexes in neurons." *J Neurochem* **109**(3): 807-818.
- Keegan, B. R., D. Meyer and D. Yelon (2004). "Organization of cardiac chamber progenitors in the zebrafish blastula." *Development* **131**(13): 3081-3091.
- Kennison, J. A. (1995). "The Polycomb and trithorax group proteins of Drosophila: trans-regulators of homeotic gene function." *Annu Rev Genet* **29**: 289-303.
- Keppler, B. R. and T. K. Archer (2010). "Ubiquitin-dependent and ubiquitin-independent control of subunit stoichiometry in the SWI/SNF complex." *J Biol Chem* **285**(46): 35665-35674.
- Kim, J. K., S. O. Huh, H. Choi, K. S. Lee, D. Shin, C. Lee, J. S. Nam, H. Kim, H. Chung, H. W. Lee, S. D. Park and R. H. Seong (2001). "Srg3, a mouse homolog of yeast SWI3, is essential for early embryogenesis and involved in brain development." *Mol Cell Biol* **21**(22): 7787-7795.
- Kimmel, C. B., W. W. Ballard, S. R. Kimmel, B. Ullmann and T. F. Schilling (1995). "Stages of embryonic development of the zebrafish." *Dev Dyn* **203**(3): 253-310.
- Klochender-Yeivin, A., L. Fiette, J. Barra, C. Muchardt, C. Babinet and M. Yaniv (2000). "The murine SNF5/INI1 chromatin remodeling factor is essential for embryonic development and tumor suppression." *EMBO Rep* **1**(6): 500-506.
- Kornberg, R. D. (1974). "Chromatin structure: a repeating unit of histones and DNA." *Science* **184**(4139): 868-871.
- Kosho, T., N. Okamoto, H. Ohashi, Y. Tsurusaki, Y. Imai, Y. Hibi-Ko, H. Kawame, T. Homma, S. Tanabe, M. Kato, Y. Hiraki, T. Yamagata, S. Yano, S. Sakazume, T. Ishii, T. Nagai, T. Ohta, N. Niikawa, S. Mizuno, T. Kaname, K. Naritomi, Y. Narumi, K. Wakui, Y. Fukushima, S. Miyatake, T. Mizuguchi, H. Saito, N. Miyake and N. Matsumoto (2013). "Clinical correlations of mutations affecting six components of the SWI/SNF complex: detailed description of 21 patients and a review of the literature." *Am J Med Genet A* **161A**(6): 1221-1237.
- Lessard, J., J. I. Wu, J. A. Ranish, M. Wan, M. M. Winslow, B. T. Staahl, H. Wu, R. Aebbersold, I. A. Graef and G. R. Crabtree (2007). "An essential switch in subunit composition of a chromatin remodeling complex during neural development." *Neuron* **55**(2): 201-215.
- Leung, C. F., S. E. Webb and A. L. Miller (1998). "Calcium transients accompany ooplasmic segregation in zebrafish embryos." *Dev Growth Differ* **40**(3): 313-326.
- Lindeman, L. C., L. T. Vogt-Kielland, P. Alestrom and P. Collas (2009). "Fish'n ChIPs: chromatin immunoprecipitation in the zebrafish embryo." *Methods Mol Biol* **567**: 75-86.
- Lomeli, H. and J. Castillo-Robles (2016). "The developmental and pathogenic roles of BAF57, a special subunit of the BAF chromatin-remodeling complex." *FEBS Lett* **590**(11): 1555-1569.

- Lou, X., A. R. Deshwar, J. G. Crump and I. C. Scott (2011). "Smarcd3b and Gata5 promote a cardiac progenitor fate in the zebrafish embryo." *Development* **138**(15): 3113-3123.
- Miyake, N., Y. Tsurusaki and N. Matsumoto (2014). "Numerous BAF complex genes are mutated in Coffin-Siris syndrome." *Am J Med Genet C Semin Med Genet* **166C**(3): 257-261.
- Mohrmann, L. and C. P. Verrijzer (2005). "Composition and functional specificity of SWI2/SNF2 class chromatin remodeling complexes." *Biochim Biophys Acta* **1681**(2-3): 59-73.
- Mohtat, D. and K. Susztak (2010). "Fine tuning gene expression: the epigenome." *Semin Nephrol* **30**(5): 468-476.
- Narlikar, G. J., R. Sundaramoorthy and T. Owen-Hughes (2013). "Mechanisms and functions of ATP-dependent chromatin-remodeling enzymes." *Cell* **154**(3): 490-503.
- Neigeborn, L. and M. Carlson (1984). "Genes affecting the regulation of SUC2 gene expression by glucose repression in *Saccharomyces cerevisiae*." *Genetics* **108**(4): 845-858.
- Olave, I., W. Wang, Y. Xue, A. Kuo and G. R. Crabtree (2002). "Identification of a polymorphic, neuron-specific chromatin remodeling complex." *Genes Dev* **16**(19): 2509-2517.
- Pal, S., R. Yun, A. Datta, L. Lacomis, H. Erdjument-Bromage, J. Kumar, P. Tempst and S. Sif (2003). "mSin3A/histone deacetylase 2- and PRMT5-containing Brg1 complex is involved in transcriptional repression of the Myc target gene *cad*." *Mol Cell Biol* **23**(21): 7475-7487.
- Palencia-Desai, S., M. S. Rost, J. A. Schumacher, Q. V. Ton, M. P. Craig, K. Baltrunaite, A. L. Koenig, J. Wang, K. D. Poss, N. C. Chi, D. Y. Stainier and S. Sumanas (2015). "Myocardium and BMP signaling are required for endocardial differentiation." *Development* **142**(13): 2304-2315.
- Park, J. H., E. J. Park, H. S. Lee, S. J. Kim, S. K. Hur, A. N. Imbalzano and J. Kwon (2006). "Mammalian SWI/SNF complexes facilitate DNA double-strand break repair by promoting gamma-H2AX induction." *EMBO J* **25**(17): 3986-3997.
- Pedersen, T. A., E. Kowenz-Leutz, A. Leutz and C. Nerlov (2001). "Cooperation between C/EBPalpha TBP/TFIIB and SWI/SNF recruiting domains is required for adipocyte differentiation." *Genes Dev* **15**(23): 3208-3216.
- Peterson, C. L. and I. Herskowitz (1992). "Characterization of the yeast SWI1, SWI2, and SWI3 genes, which encode a global activator of transcription." *Cell* **68**(3): 573-583.
- Phelan, M. L., S. Sif, G. J. Narlikar and R. E. Kingston (1999). "Reconstitution of a core chromatin remodeling complex from SWI/SNF subunits." *Mol Cell* **3**(2): 247-253.
- Reifers, F., J. Adams, I. J. Mason, S. Schulte-Merker and M. Brand (2000). "Overlapping and distinct functions provided by *fgf17*, a new zebrafish member of the *Fgf8/17/18* subgroup of Fgfs." *Mech Dev* **99**(1-2): 39-49.
- Reischauer, S., O. A. Stone, A. Villasenor, N. Chi, S. W. Jin, M. Martin, M. T. Lee, N. Fukuda, M. Marass, A. Witty, I. Fiddes, T. Kuo, W. S. Chung, S. Salek, R. Lerrigo, J. Alsio, S. Luo, D. Tworus, S. M. Augustine, S. Muceniks, B. Nystedt, A. J. Giraldez, G. P. Schroth, O. Andersson and D. Y. Stainier (2016). "Cloche is a bHLH-PAS transcription factor that drives haemato-vascular specification." *Nature* **535**(7611): 294-298.
- Reiter, J. F., J. Alexander, A. Rodaway, D. Yelon, R. Patient, N. Holder and D. Y. Stainier (1999). "Gata5 is required for the development of the heart and endoderm in zebrafish." *Genes Dev* **13**(22): 2983-2995.
- Reyes, J. C., J. Barra, C. Muchardt, A. Camus, C. Babinet and M. Yaniv (1998). "Altered control of cellular proliferation in the absence of mammalian brahma (SNF2alpha)." *EMBO J* **17**(23): 6979-6991.
- Ring, H. Z., V. Vameghi-Meyers, W. Wang, G. R. Crabtree and U. Francke (1998). "Five SWI/SNF-related, matrix-associated, actin-dependent regulator of chromatin (SMARC) genes are dispersed in the human genome." *Genomics* **51**(1): 140-143.
- Roberts, C. W., S. A. Galusha, M. E. McMenamin, C. D. Fletcher and S. H. Orkin (2000). "Haploinsufficiency of *Snf5* (integrator interactor 1) predisposes to malignant rhabdoid tumors in mice." *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(25): 13796-13800.

- Roberts, C. W. and S. H. Orkin (2004). "The SWI/SNF complex--chromatin and cancer." Nat Rev Cancer **4**(2): 133-142.
- Ruttledge, M. H., J. Sarrazin, S. Rangaratnam, C. M. Phelan, E. Twist, P. Merel, O. Delattre, G. Thomas, M. Nordenskjold, V. P. Collins and et al. (1994). "Evidence for the complete inactivation of the NF2 gene in the majority of sporadic meningiomas." Nat Genet **6**(2): 180-184.
- Santen, G. W., E. Aten, Y. Sun, R. Almomani, C. Gilissen, M. Nielsen, S. G. Kant, I. N. Snoeck, E. A. Peeters, Y. Hilhorst-Hofstee, M. W. Wessels, N. S. den Hollander, C. A. Ruivenkamp, G. J. van Ommen, M. H. Breuning, J. T. den Dunnen, A. van Haeringen and M. Kriek (2012). "Mutations in SWI/SNF chromatin remodeling complex gene ARID1B cause Coffin-Siris syndrome." Nat Genet **44**(4): 379-380.
- Santen, G. W., M. Kriek and H. van Attikum (2012). "SWI/SNF complex in disorder: SWItching from malignancies to intellectual disability." Epigenetics **7**(11): 1219-1224.
- Scherz, P. J., J. Huisken, P. Sahai-Hernandez and D. Y. Stainier (2008). "High-speed imaging of developing heart valves reveals interplay of morphogenesis and function." Development **135**(6): 1179-1187.
- Schoenherr, C. J. and D. J. Anderson (1995). "The neuron-restrictive silencer factor (NRSF): a coordinate repressor of multiple neuron-specific genes." Science **267**(5202): 1360-1363.
- Schrier, S. A., J. N. Bodurtha, B. Burton, A. E. Chudley, M. A. Chiong, G. D'Avanzo M, S. A. Lynch, A. Musio, D. M. Nyazov, P. A. Sanchez-Lara, S. A. Shalev and M. A. Deardorff (2012). "The Coffin-Siris syndrome: a proposed diagnostic approach and assessment of 15 overlapping cases." Am J Med Genet A **158A**(8): 1865-1876.
- Scott, I. C. (2012). "Life before Nkx2.5: cardiovascular progenitor cells: embryonic origins and development." Curr Top Dev Biol **100**: 1-31.
- Seo, S., G. A. Richardson and K. L. Kroll (2005). "The SWI/SNF chromatin remodeling protein Brg1 is required for vertebrate neurogenesis and mediates transactivation of Ngn and NeuroD." Development **132**(1): 105-115.
- Sergeeva, I. A. and V. M. Christoffels (2013). "Regulation of expression of atrial and brain natriuretic peptide, biomarkers for heart development and disease." Biochim Biophys Acta **1832**(12): 2403-2413.
- Shi, Y., S. Katsev, C. Cai and S. Evans (2000). "BMP signaling is required for heart formation in vertebrates." Dev Biol **224**(2): 226-237.
- Sif, S., A. J. Saurin, A. N. Imbalzano and R. E. Kingston (2001). "Purification and characterization of mSin3A-containing Brg1 and hBrm chromatin remodeling complexes." Genes Dev **15**(5): 603-618.
- Singh, A. P. and T. K. Archer (2014). "Analysis of the SWI/SNF chromatin-remodeling complex during early heart development and BAF250a repression cardiac gene transcription during P19 cell differentiation." Nucleic Acids Res **42**(5): 2958-2975.
- Smith, M. J., J. O'Sullivan, S. S. Bhaskar, K. D. Hadfield, G. Poke, J. Caird, S. Sharif, D. Eccles, D. Fitzpatrick, D. Rawluk, D. du Plessis, W. G. Newman and D. G. Evans (2013). "Loss-of-function mutations in SMARCE1 cause an inherited disorder of multiple spinal meningiomas." Nat Genet **45**(3): 295-298.
- Smith, M. J., A. J. Wallace, C. Bennett, M. Hasselblatt, E. Elert-Dobkowska, L. T. Evans, W. F. Hickey, J. van Hoff, D. Bauer, A. Lee, R. F. Hevner, C. Beetz, D. du Plessis, J. P. Kilday, W. G. Newman and D. G. Evans (2014). "Germline SMARCE1 mutations predispose to both spinal and cranial clear cell meningiomas." J Pathol **234**(4): 436-440.
- Stainier, D. Y. (2001). "Zebrafish genetics and vertebrate heart formation." Nat Rev Genet **2**(1): 39-48.
- Stainier, D. Y., B. Fouquet, J. N. Chen, K. S. Warren, B. M. Weinstein, S. E. Meiler, M. A. Mohideen, S. C. Neuhauss, L. Solnica-Krezel, A. F. Schier, F. Zwartkruis, D. L. Stemple, J. Malicki, W. Driever and M. C. Fishman (1996). "Mutations affecting the formation and function of the cardiovascular system in the zebrafish embryo." Development **123**: 285-292.

- Stainier, D. Y., R. K. Lee and M. C. Fishman (1993). "Cardiovascular development in the zebrafish. I. Myocardial fate map and heart tube formation." Development **119**(1): 31-40.
- Staudt, D. and D. Stainier (2012). "Uncovering the molecular and cellular mechanisms of heart development using the zebrafish." Annu Rev Genet **46**: 397-418.
- Stern, M., R. Jensen and I. Herskowitz (1984). "Five SWI genes are required for expression of the HO gene in yeast." J Mol Biol **178**(4): 853-868.
- Su, J., Z. Zhu, Y. Wang, F. Xiong and J. Zou (2008). "The cytomegalovirus promoter-driven short hairpin RNA constructs mediate effective RNA interference in zebrafish in vivo." Mar Biotechnol (NY) **10**(3): 262-269.
- Sudarsanam, P., V. R. Iyer, P. O. Brown and F. Winston (2000). "Whole-genome expression analysis of snf/swi mutants of *Saccharomyces cerevisiae*." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(7): 3364-3369.
- Takeuchi, J. K. and B. G. Bruneau (2009). "Directed transdifferentiation of mouse mesoderm to heart tissue by defined factors." Nature **459**(7247): 708-711.
- Takeuchi, J. K., X. Lou, J. M. Alexander, H. Sugizaki, P. Delgado-Olguin, A. K. Holloway, A. D. Mori, J. N. Wylie, C. Munson, Y. Zhu, Y. Q. Zhou, R. F. Yeh, R. M. Henkelman, R. P. Harvey, D. Metzger, P. Chambon, D. Y. Stainier, K. S. Pollard, I. C. Scott and B. G. Bruneau (2011). "Chromatin remodelling complex dosage modulates transcription factor function in heart development." Nat Commun **2**: 187.
- Targoff, K. L., S. Colombo, V. George, T. Schell, S. H. Kim, L. Solnica-Krezel and D. Yelon (2013). "Nkx genes are essential for maintenance of ventricular identity." Development **140**(20): 4203-4213.
- Thisse, C. and B. Thisse (2008). "High-resolution in situ hybridization to whole-mount zebrafish embryos." Nat Protoc **3**(1): 59-69.
- Tseng, W. F., T. H. Jang, C. B. Huang and C. H. Yuh (2011). "An evolutionarily conserved kernel of *gata5*, *gata6*, *otx2* and *prdm1a* operates in the formation of endoderm in zebrafish." Dev Biol **357**(2): 541-557.
- Tsurusaki, Y., N. Okamoto, H. Ohashi, T. Kosho, Y. Imai, Y. Hibi-Ko, T. Kaname, K. Naritomi, H. Kawame, K. Wakui, Y. Fukushima, T. Homma, M. Kato, Y. Hiraki, T. Yamagata, S. Yano, S. Mizuno, S. Sakazume, T. Ishii, T. Nagai, M. Shiina, K. Ogata, T. Ohta, N. Niikawa, S. Miyatake, I. Okada, T. Mizuguchi, H. Doi, H. Saitsu, N. Miyake and N. Matsumoto (2012). "Mutations affecting components of the SWI/SNF complex cause Coffin-Siris syndrome." Nat Genet **44**(4): 376-378.
- Tsurusaki, Y., N. Okamoto, H. Ohashi, S. Mizuno, N. Matsumoto, Y. Makita, M. Fukuda, B. Isidor, J. Perrier, S. Aggarwal, A. B. Dalal, A. Al-Kindy, J. Liebelt, D. Mowat, M. Nakashima, H. Saitsu, N. Miyake and N. Matsumoto (2014). "Coffin-Siris syndrome is a SWI/SNF complex disorder." Clin Genet **85**(6): 548-554.
- Tu, S. and N. C. Chi (2012). "Zebrafish models in cardiac development and congenital heart birth defects." Differentiation **84**(1): 4-16.
- Wan, M., J. Zhang, D. Lai, A. Jani, P. Prestone-Hurlburt, L. Zhao, A. Ramachandran, G. R. Schnitzler and T. Chi (2009). "Molecular basis of CD4 repression by the Swi/Snf-like BAF chromatin remodeling complex." Eur J Immunol **39**(2): 580-588.
- Wang, W., T. Chi, Y. Xue, S. Zhou, A. Kuo and G. R. Crabtree (1998). "Architectural DNA binding by a high-mobility-group/kinesin-like subunit in mammalian SWI/SNF-related complexes." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(2): 492-498.
- Wang, Z., W. Zhai, J. A. Richardson, E. N. Olson, J. J. Meneses, M. T. Firpo, C. Kang, W. C. Skarnes and R. Tjian (2004). "Polybromo protein BAF180 functions in mammalian cardiac chamber maturation." Genes Dev **18**(24): 3106-3116.
- Watanabe, H., T. Mizutani, T. Haraguchi, N. Yamamichi, S. Minoguchi, M. Yamamichi-Nishina, N. Mori, T. Kameda, T. Sugiyama and H. Iba (2006). "SWI/SNF complex is essential for NRSF-mediated suppression of neuronal genes in human nonsmall cell lung carcinoma cell lines." Oncogene **25**(3): 470-479.

- Wieczorek, D., N. Bogershausen, F. Beleggia, S. Steiner-Haldenstatt, E. Pohl, Y. Li, E. Milz, M. Martin, H. Thiele, J. Altmüller, Y. Alanay, H. Kayserili, L. Klein-Hitpass, S. Bohringer, A. Wollstein, B. Albrecht, K. Boduroglu, A. Caliebe, K. Chrzanowska, O. Cogulu, F. Cristofoli, J. C. Czeschik, K. Devriendt, M. T. Dotti, N. Elcioglu, B. Gener, T. O. Goecke, M. Krajewska-Walasek, E. Guillen-Navarro, J. Hayek, G. Houge, E. Kilic, P. O. Simsek-Kiper, V. Lopez-Gonzalez, A. Kuechler, S. Lyonnet, F. Mari, A. Marozza, M. Mathieu Dramard, B. Mikat, G. Morin, F. Morice-Picard, F. Ozkinay, A. Rauch, A. Renieri, S. Tinschert, G. E. Utine, C. Vilain, R. Vivarelli, C. Zweier, P. Nurnberg, S. Rahmann, J. Vermeesch, H. J. Ludecke, M. Zeschnigk and B. Wollnik (2013). "A comprehensive molecular study on Coffin-Siris and Nicolaides-Baraitser syndromes identifies a broad molecular and clinical spectrum converging on altered chromatin remodeling." Hum Mol Genet **22**(25): 5121-5135.
- Wilson, B. G. and C. W. Roberts (2011). "SWI/SNF nucleosome remodellers and cancer." Nat Rev Cancer **11**(7): 481-492.
- Wu, J. I., J. Lessard and G. R. Crabtree (2009). "Understanding the words of chromatin regulation." Cell **136**(2): 200-206.
- Wu, J. I., J. Lessard, I. A. Olave, Z. Qiu, A. Ghosh, I. A. Graef and G. R. Crabtree (2007). "Regulation of dendritic development by neuron-specific chromatin remodeling complexes." Neuron **56**(1): 94-108.
- Wu, M., S. Peng, J. Yang, Z. Tu, X. Cai, C. L. Cai, Z. Wang and Y. Zhao (2014). "Baf250a orchestrates an epigenetic pathway to repress the Nkx2.5-directed contractile cardiomyocyte program in the sinoatrial node." Cell Res **24**(10): 1201-1213.
- Xiao, C., L. Gao, Y. Hou, C. Xu, N. Chang, F. Wang, K. Hu, A. He, Y. Luo, J. Wang, J. Peng, F. Tang, X. Zhu and J. W. Xiong (2016). "Chromatin-remodelling factor Brg1 regulates myocardial proliferation and regeneration in zebrafish." Nat Commun **7**: 13787.
- Yan, H. B., X. F. Wang, Q. Zhang, Z. Q. Tang, Y. H. Jiang, H. Z. Fan, Y. H. Sun, P. Y. Yang and F. Liu (2014). "Reduced expression of the chromatin remodeling gene ARID1A enhances gastric cancer cell migration and invasion via downregulation of E-cadherin transcription." Carcinogenesis **35**(4): 867-876.
- Yaniv, M. (2014). "Chromatin remodeling: from transcription to cancer." Cancer Genet **207**(9): 352-357.
- Yano, S., A. Fujimoto, J. Morin-Leisk, N. Matumoto, N. Miyake, M. Gillespie and H. Gao (2018). "New SMARCE1 variant in a patient with features overlapping with oculauroiculofrontonasal syndrome." Clin Genet **94**(5): 487-488.
- Yelon, D., S. A. Horne and D. Y. Stainier (1999). "Restricted expression of cardiac myosin genes reveals regulated aspects of heart tube assembly in zebrafish." Dev Biol **214**(1): 23-37.
- Zheng, C. and J. J. Hayes (2003). "Structures and interactions of the core histone tail domains." Biopolymers **68**(4): 539-546.