

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
PROGRAMA DE DESARROLLO DE LAS CIENCIAS BÁSICAS
ÁREA BIOLOGÍA

TESIS PRESENTADA PARA ACCEDER A LA
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
Opción Biología Celular y Molecular

**Proteínas MARCKS en el pez cebra: caracterización y análisis funcional en el desarrollo del
sistema nervioso**

Daniel Prieto Mena

Laboratorio de Cultivo de Tejidos
Sección Biología Celular
Departamento de Biología Celular y Molecular
Facultad de Ciencias
Universidad de la República

ORIENTADOR DE TESIS:

Dr. Flavio R. Zolessi
Laboratorio de Cultivo de Tejidos, Facultad de
Ciencias, tel.: 525 8618 ext. 144

TRIBUNAL:

Dr. Rafael Cantera (Presidente)
Dra. Nibia Berois (Vocal)
Dr. Fernando Álvarez (Vocal)

2012

Resumen

La familia MARCKS está constituida sólo por dos miembros, MARCKS (Myristoylated Alanin-Rich C Kinase Substrate) y MRP. Ambas son proteínas naturalmente desplegadas, de carácter ácido y de distribución ubicua, que son sustratos específicos de la proteína kinasa C (PKC). Son reguladoras de la morfología y motilidad celular, y se ha descrito su vinculación a múltiples procesos relacionados al desarrollo del sistema nervioso, donde son especialmente abundantes.

En el presente trabajo identificamos y caracterizamos cuatro secuencias en el genoma del pez cebra que corresponden a la duplicación de MARCKS y MRP, que hemos denominado *marcksa*, *marcksb*, *mrpa* y *mrpb*. Analizamos sus secuencias regulatorias, tanto a nivel genómico mediante el estudio de la región 1kb *upstream*, como a nivel del ARNm estudiando su región 3' no traducida, identificando varios elementos que no habían sido estudiados hasta el momento en los genes de la familia *marcks*. Nuestro análisis ha sido realizado desde dos perspectivas fundamentales: el de su posible funcionalidad, y el de sus relaciones evolutivas. Hemos analizado algunas características fisicoquímicas de las proteínas putativas, y encontrado que además de su homología de secuencia con otras especies, la estructura de sus dominios y sus regiones consenso de modificación postraducciona también se encuentran conservadas. Describimos el patrón temporal de expresión de los cuatro genes, caracterizamos el patrón espacial de expresión de *marcksa* y *marcksb* en el sistema nervioso central durante el desarrollo, y comenzamos la caracterización de *mrpa* y *mrpb*, generando además las herramientas moleculares para su análisis ulterior. Comparamos sus patrones de expresión con los de algunos microARNs que identificamos como buenos candidatos a reguladores de la abundancia de mensajeros de la familia *marcks*. Mostramos además que *marcksa* y *marcksb* parecen ser funcionales, y que podrían tener roles diferentes en el desarrollo del sistema nervioso. Caracterizamos los fenotipos morfantes de ambos genes, y exploramos sus posibles interacciones mediante experimentos de doble silenciamiento, identificando defectos en la gastrulación. Estudiamos además los efectos del silenciamiento de *marcksa* y *marcksb* sobre la formación del esqueleto craneofacial, la polaridad del neuroepitelio, y la diferenciación de algunos tipos celulares en la retina.

En conclusión, mostramos que en el pez cebra existen dos genes *marcks* y dos *mrp* que presentan grandes similitudes con sus ortólogos previamente estudiados, y presentamos un escenario evolutivo para sus sistemas de regulación. MARCKSa y MARCKSb son esenciales para el correcto desarrollo del sistema nervioso, y su deficiencia provoca severos efectos en la morfogénesis.

INTRODUCCIÓN

La familia MARCKS: aspectos generales

La proteína MARCKS (Myristoylated Alanin-Rich C Kinase Substrate) fue caracterizada a principios de la década de 1980 como el principal blanco de fosforilaciones inducidas por despolarización en preparaciones de sinaptosomas (Wu *et al.*, 1982). La quinasa responsable de dicha fosforilación, resultó ser dependiente de Ca^{++} /Calmodulina y de la estimulación con fosfolípidos: se trataba de la proteína quinasa C, PKC. El único otro miembro de la familia MARCKS es una proteína estrechamente emparentada, inicialmente identificada por la similitud en la secuencia de ADNc de cerebro de ratón, MRP (MARCKS-Related Protein; Umekage & Kato, 1991), también llamada MacMARCKS, F52 por el porcentaje de identidad entre las secuencias de ratón con la de vaca y pollo, o MLP por MARCKS-like protein, con la que comparte sus principales características estructurales y funcionales

Originalmente descrita como una proteína con una Mr de 87 kDa en geles desnaturalizantes (SDS-PAGE), hoy en día se sabe que se trata de un polipéptido con una masa de alrededor de 30 kDa que presenta una migración aberrante en este tipo de geles debido – entre otras características – a su baja solubilidad en SDS (Stumpo *et al.*, 1989a), y que debe parte de su nombre a su cualidad de sustrato de PKC: MARCKS (Myristoylated Alanin-Rich C Kinase Sustrate). Es una proteína de carácter ácido, de alrededor de 300 residuos aminoacídicos, con una estructura tridimensional naturalmente desplegada que posee un extremo amino terminal unido covalentemente a un ácido mirístico; un dominio conocido como MH2 que rodea al sitio de corte y empalme del ARNm dentro del cual se ubica una secuencia consenso de fosforilación no canónica en Ser25 por Cdks, específica de neuronas en diferenciación (Zolessi *et al.*, 2004a); y un “dominio efector” o ED rico en serinas que le confieren una carga neta positiva, mediante la cual puede anclarse a la membrana plasmática, actuando en forma sinérgica con la cadena hidrofóbica de miristato N-terminal, ya que por separado ni el miristato ni el ED son suficientes para el anclaje. Este último dominio, también llamado PSD (phosphorylation site domain), es el blanco de las fosforilaciones por PKC que le dieron nombre a la proteína. Al ser fosforilado el ED, las cargas positivas de las serinas que proporcionaban el componente electrostático de anclaje a la membranas son neutralizadas por los grupos fosfato, modificando así la localización de la proteína de una ubicación en el córtex celular a una citosólica (Blackshear, 1993; Arbuzova *et al.*, 2002; Tapp *et al.*, 2005).

Se sabe que cuando el ED no está fosforilado se une a actina F, provocando su agregación, y también secuestra mediadores lipídicos de membrana como PIP2. Por estas cualidades, se ha pensado que podría regular el recambio de membrana, y remodelación del citoesqueleto (Sundaram *et al.*, 2004). Además, algunos resultados de nuestro laboratorio indican que el desensamblaje del citoesqueleto de actina tiene por consecuencia la defosforilación de MARCKS en Ser25 (Toledo &

Arruti, 2009). Esta capacidad de regular la formación del citoesqueleto de actina cortical, y de interactuar con múltiples vías de señalización, le confiere a MARCKS un papel de pivote en procesos celulares como el control de la polaridad, motilidad y adhesión (Iioka *et al.*, 2004).

Aunque presenta una localización ubicua, MARCKS es especialmente abundante en el encéfalo (Blackshear *et al.*, 1986; Ouimet *et al.*, 1990) al igual que MRP, con la que comparte características estructurales y funcionales: ambas poseen un dominio N terminal miristilable, un dominio MH2, y un ED de naturaleza ácida rico en serinas, blanco de PKC y de unión a Ca^{++} /CAM, actina y ácidos grasos (Arbuzova *et al.*, 2002), y ambas son miristilables en respuesta a estimulación con lipopolisacárido (Aderem & Cohn, 1988).

La regulación de estas proteínas no se restringe sólo a un patrón espacial, ya que el seguimiento de los niveles proteicos por métodos fisicoquímicos durante el desarrollo del cerebro de la rata ha mostrado que existe un nivel de regulación temporal (Patel & Kligman, 1987). Además, se ha observado que existe una relación directa entre la presencia de la proteína MARCKS y su ARNm (Stumpo *et al.*, 1989a)

Los genes de la familia *marcks*

Como parte de una serie de trabajos fermentales del grupo de Perry Blackshear acerca de las proteínas MARCKS, se clonó el gen que codificaba la proteína MARCKS de bovino (Stumpo *et al.*, 1989a y b), y casi en paralelo y de forma independiente se clonó y caracterizó el gen que codificaba MRP (Umekage & Kato, 1991; Li & Aderem, 1992) a partir de bibliotecas genómicas de cerebro de ratón y de macrófagos activados.

Debido a la disponibilidad de secuencias que conllevó la realización del proyecto Genoma Humano, los primeros datos de análisis genómico provinieron del gen de humano, denominado *MACS* (*Macs* en ratón). Se trata de un gen con un promotor TATA-menos clasificado como de tipo II, debido al marcado incremento en los niveles de ARNm en algunos tejidos durante la vida fetal. Se ha mostrado que las 248 pb *upstream* al sitio de iniciación de la transcripción son importantes para la función del promotor, a través de la unión del factor trans Sp1, y que este fragmento es capaz de dirigir correctamente la expresión de XMARCKS, el gen homólogo de *Xenopus* sp. (Harlan *et al.*, 1991; Shi *et al.*, 1997).

El gen de MRP (*MLP* en humano, *Mlp* en ratón, *XMLP* en *Xenopus*) posee una caja TATA en una posición cercana a -40 pb del sitio de inicio de la transcripción (Umekage & Kato, 1991), y aunque en la secuencia promotora ~400 pb *upstream* al sitio de inicio de la transcripción existen

secuencias de unión a factores trans como SP1, AP2, CTF y TFII-I, se ha observado que clones carentes del extremo 5' son capaces de dirigir la transcripción en cultivos celulares, probablemente a través de secuencias regulatorias internas (Stumpo *et al.*, 1998).

Algunos estudios realizados en ratón han indicado que tanto la inducción de la expresión de ambos genes – *macs* y *mrp* – en respuesta a lipopolisacárido (LPS), así como su patrón de expresión tisular son similares, sugiriendo una regulación análoga. Curiosamente, el análisis pareado de ambas secuencias ha mostrado que la región regulatoria (~480 pb *upstream* al inicio de la transcripción) es sólo modestamente similar presentando 37% de identidad, en tanto que sus ortólogos humanos poseen un 36% de identidad entre sí (Lobach *et al.*, 1993; Blackshear, 1993; Stumpo *et al.*, 1998).

Los genes *macs*, *mrp*, y sus respectivos homólogos humanos poseen un único intrón ubicado dentro de la región que codifica el dominio MH2, que separa 2 exones que son transcritos y constituyen el ARN mensajero canónico de estas proteínas. Sin embargo, existe evidencia que indica que ambos genes tanto en ratones como en humanos podrían utilizar múltiples sitios de inicio de la transcripción (Lobach *et al.*, 1993).

Tanto en ratón como en humano, de los más de 4000 pb que poseen los transcritos de *macs* y de los más de 1600 pb de los transcritos de *mrp*, sólo una pequeña parte codifica las pequeñas proteínas de la familia MARCKS de apenas 300 y 200 aa respectivamente, siendo la mayor parte de los transcritos constituidos por secuencia no codificante. De estas secuencias no codificantes, debe destacarse la presencia de más de 1 kb ubicado en el extremo 3'-no traducido (3'-UTR), región habitualmente relacionada con sistemas postranscripcionales de regulación de la expresión génica. En efecto, ha sido descrita la presencia de un elemento ARES constituido por una serie de repetidos de CU en el extremo 3'-UTR del mensajero de *macs* capaz de interactuar en trans con factores reguladores de la estabilidad (Wein *et al.*, 2003). Este hallazgo es consistente con una serie de experimentos independientes que exploraron la respuesta de la proteína MARCKS a drogas (revisados en Blackshear, 1993) y mostraron que los niveles de ARNm y de proteína pueden cambiar rápidamente sin verse alterada la transcripción del gen, sugiriendo la existencia de un nivel postranscripcional de control de la expresión a través del control de la estabilidad de los mensajeros. Tampoco existen antecedentes en la literatura referentes a ninguno de los genes de la familia *marcks* en el pez cebra, ni en ningún otro pez teleosteo o cartilaginoso.

La proteína MARCKS en el desarrollo del sistema nervioso.

MARCKS es esencial para el correcto desarrollo del sistema nervioso. Este hecho ha sido demostrado de la forma más impactante quizá en los primeros experimentos de pérdida de función en ratones *knockout*. En ellos el fenotipo es complejo, y presenta severas alteraciones anatómicas

derivadas de un cierre defectuoso del tubo neural como exencefalia, agenesia del cuerpo caloso y otras comisuras asociadas a la falla de la fusión hemisférica, ectopia neuronal asociada a perturbaciones de la laminación cortical y retiniana, y la muerte perinatal es universal (Stumpo *et al.*, 1995).

Mediante estudios inmunohistoquímicos realizados en ratones se ha determinado que MARCKS está presente en el córtex celular de todas las células potencialmente involucradas en la neurulación, es decir, en el ectodermo superficial, las células neuroepiteliales, y el mesénquima subyacente (Blackshear *et al.*, 1996). Algunos resultados de nuestro laboratorio han mostrado que en embriones de pollo, durante los movimientos de curvatura, tanto de la placa neural para formar el tubo, como de la placoda cristalínea para formar la vesícula cristalina, hay una acumulación apical de MARCKS en las células involucradas (Zolessi & Arruti, 2001a). Esta acumulación contribuye probablemente a los cambios de forma de las células, asociándose al cinturón de actina apical, y mediando el estrechamiento apical de las células de la placa que ocurre durante la neurulación primaria.

Se ha demostrado además que una de las isoformas de MARCKS descritas en nuestro laboratorio, S25p-MARCKS se acumula tempranamente en territorios neurogénicos durante el desarrollo del pollo, especialmente en neuronas en diferenciación, constituyendo un marcador, aún más temprano que las proteínas Islet 1/2. S25p-MARCKS se acumula en la periferia celular y en los axones en formación de las neuronas ganglionares de la retina, de modo que podría tener también un rol en la axonogénesis (Zolessi & Arruti, 2001b). Paralelamente, se ha reportado que el patrón de distribución de MARCKS y S25p-MARCKS varía diferencialmente en diferentes regiones de la retina del pollo entre el período neurogénico y la madurez (Zolessi *et al.*, 1999; Zolessi & Arruti, 2004b) sugiriendo un sistema complejo de regulación mediado en parte por un tradicional balance entre quinasas y fosfatasa, así como por la competencia mutuamente excluyente de fosforilaciones en dominios diferentes (Toledo *et al.*, trabajo enviado).

En cultivos de neuronas hipotalámicas de rata, MARCKS se localiza en las neuritas, espinas dendríticas y sinaptosomas, y colocaliza con las vesículas sinápticas. El bloqueo de la fosforilación en el ED mediante la adición de un péptido competitivo, inhibe la redistribución de MARCKS en las neuritas promovida por angiotensina II, provocando su acumulación en regiones varicosas (Lu *et al.*, 1998).

Estudios realizados con construcciones no fosforilables en el ED sustituyendo serinas por asparaginas, no fosforilables, o seudofosforiladas mediante el reemplazo de residuos de serina por aspartato han mostrado que la interacción de MARCKS con la membrana plasmática de neuronas de hipocampo en cultivo, induce la ramificación dendrítica. Estos resultados han sido reproducidos *in vivo*, mediante electroporación intrauterina de las construcciones. Según se ha reportado,

MARCKS promueve la formación de filopodios de dos tipos, unos estáticos, que no presentan variaciones temporales en su longitud, y otros de carácter dinámico con movimientos de extensión y retracción. Además, promueve también el aumento de la movilidad espontánea de los filopodios por un mecanismo dependiente de PIP2 (Li *et al.*, 2008).

Más recientemente se ha demostrado que hay un enriquecimiento en MARCKS en la región apical de los progenitores de la glía radial cerebral de ratones, y que allí colocaliza con complejos de señalización relacionados con la polaridad formados por PAR3/PAR6/aPKC ζ donde podría actuar como moduladora mediante mecanismos aún no elucidados. Más aún, en mutantes nulos de MARCKS los progenitores de la glía radial se localizan en posiciones aberrantes del córtex durante la corticogénesis, lo que provoca una severa afectación de la migración y consecuentemente de la laminación neuronal (Weimer *et al.*, 2009).

Estos resultados, y la observación de que S25p-MARCKS no es detectable en la glía de la retina en ninguna de las etapas estudiadas (Zolessi & Arruti, 2004b) sugieren que de las posibles modificaciones postraduccionales de MARCKS, al menos la fosforilación en S25 no estaría involucrada en el establecimiento de la polaridad, ni en el proceso de laminación neuronal, que parecen ser dependientes de la miristilación en el extremo amino terminal (Weimer *et al.*, 2009).

El pez cebra como modelo de desarrollo del sistema nervioso.

El embrión de pez cebra (*Danio rerio*) provee un sistema ideal para el estudio genético y molecular del desarrollo de los vertebrados. Es transparente en las primeras etapas, posee un corto tiempo de generación, su desarrollo es externo, y los embriones pueden obtenerse en grandes cantidades. El gran volumen de información disponible acerca de los fenómenos celulares y moleculares que tienen lugar durante el desarrollo de estructuras del sistema nervioso puede atribuirse en parte a algunas de estas características que posicionan al pez cebra en situación de ventaja respecto a otros organismos modelo de investigación.

En los peces teleósteos, el tubo neural se forma por un proceso diferente a los de neurulación del resto de los vertebrados. En este grupo zoológico, la placa neural origina una estructura transitoria denominada quilla neural. Esta es un primordio condensado, sin lumen, que se forma por un proceso de convergencia epitelial hacia la línea media, y plegamiento sobre la misma, en un proceso comparable al arreglo paralelo de los pliegues neurales que ocurre en la neurulación primaria (Kimmel *et al.*, 1995). La convergencia de los tejidos dorsales es crítica para la formación de un centro de neurulación único, y está dirigida en gran parte por la vía de PCP (Planar Cell Polarity), y mediada por la vía no canónica de Wnt (Bally-Cuif & Vernier, 2010).

Las caras apicales de las células de los lados derecho e izquierdo de la placa neural, que originariamente se encuentran en la superficie externa, se yuxtaponen enfrentando sus extremos apicales hacia la línea media de la quilla neural en formación, que luego de redondearse formará el cordón neural. Estas caras apicales son las que posteriormente se alejan unas de otras cavitando el cordón para formar el neurocele.

El plegamiento y yuxtaposición de las mitades izquierda y derecha de la placa neural requiere del establecimiento de puntos bisagra, proceso mediado por la actividad de genes *zic* como reguladores del citoesqueleto y de moléculas de adhesión como cadherinas. La formación del cordón neural implica la intercalación radial de las células, y la actividad de factores de mantenimiento de la estructura epitelial o de la polarización celular como la N-cadherina. El cordón es mantenido por una combinación de procesos de epitelialización, establecimiento de la polaridad ápico-basal, y de la translocación de las células hijas al lado opuesto del cordón luego de cada división. La coordinación de estos eventos integra señales de las vías PCP y Par3/Par6/aPKC, y es esencial para la formación del neurocele.

El proceso de cavitación ocurre en la fase tardía de la segmentación y depende en gran medida de la actividad de una ATPasa de Na^+/K^+ que crea un gradiente iónico que mediante un efecto osmótico permite la formación de una cavidad llena de líquido cefalorraquídeo embrionario. Debido al gran solapamiento que existe entre los procesos de segmentación y neurulación es que en el desarrollo del pez cebra no se distingue una fase individual de néurula, como ocurre con otros grupos de vertebrados (Kimmel *et al.*, 1995).

Los primordios ópticos se forman inicialmente como masas celulares sólidas que brotan de la porción anterior de la quilla neural en la región que originará el diencéfalo. La luz de las vesículas ópticas surge *a posteriori* dentro del primordio por un proceso de cavitación paralelamente con la formación de los ventrículos en la quilla neural (Schmitt & Dowling, 1994).

A las 16 horas post fecundación (hpf) la vesícula óptica es aplanada y consta de dos poblaciones epiteliales columnares de aproximadamente el mismo grosor, la capa medial y la capa lateral, separadas por el lumen óptico. En las horas siguientes, la vesícula toma forma de copa y sus dos capas adquieren características diferentes. Las células cúbicas de la capa medial-dorsal se aplanan para formar un epitelio escamoso que se extiende ventral y lateralmente hasta ocupar toda la capa medial, y se pigmentan haciendo reconocible ya el epitelio pigmentario. La capa lateral se mantiene columnar y se engrosa considerablemente para originar la retina neural (Li *et al.*, 2000). A las 24 hpf, la copa óptica es esencialmente esférica y posee aberturas en la pupila y la cisura coroidea.

El primordio ocular comprende la retina neural, el epitelio pigmentario y el cristalino, y su morfogénesis puede dividirse en cuatro etapas: evaginación de un bolsillo a los lados del cerebro

para formar la vesícula óptica; la elongación de la vesícula óptica con la formación de un surco que limitará el contacto entre el ojo y el cerebro para constituir el tallo óptico; invaginación de la superficie lateral de la vesícula para formar una copa en que la retina neural y el epitelio pigmentario envuelven al cristalino a medida que emerge del ectodermo suprayacente hasta que el cristalino se desprenda del ectodermo por completo. Casi enseguida, comienza la fase de diferenciación neuronal posmitótica que ocurre como una oleada que se desplaza desde el centro hacia la periferia de la retina. Esta fase neurogénica es inducida en etapas tempranas por la vía de Hedgehog que dirige una oleada de expresión de *shh* y de neurogénesis a lo largo de la capa de células ganglionares (GCL), que es la que contiene a las primeras neuronas de la retina en nacer (Neumann & Nüsslein-Volhard, 2000). La diferenciación de las células ganglionares ocurre alrededor de las 32 hpf y es seguida por las células de la capa nuclear interna.

Los axones retinianos se originan en la capa de células ganglionares, que constituyen el principal tipo celular en la capa celular más interna de la retina. Los axones discurren radialmente hacia el nacimiento del nervio óptico cerca del centro de la retina y salen del ojo. Luego cruzan la línea media del animal e ingresan al tracto óptico contralateral, por donde discurren en sentido dorsal a través del diencefalo hasta que alcanzan los núcleos pretectales y el *tectum* óptico a las 48 hpf. El *tectum*, que se ubica en el techo dorsal del mesencéfalo es el área visual primaria de los vertebrados no mamíferos y, probablemente, el principal responsable de la visión espacial de alta resolución. La arborización axonal se refina con el tiempo a través de mecanismos dependientes de la actividad (Schmidt, 2004). La diferenciación de conos y bastones ocurre alrededor de 55 hpf, cuando ya pueden reconocerse los segmentos externos, y a las 65 hpf ya se evidencia diferenciación funcional de los fotorreceptores. Los primeros axones retinianos alcanzan el *tectum* antes que comience toda función visual, pero alrededor de 3 dpf, las larvas ya comienzan a mostrar comportamiento evocado por estímulos visuales, y a los 5 dpf ya es posible observar comportamientos como la respuesta optocinética (okr, Easter & Nicola, 1996; Neuhauss, 2003).

Durante la morfogénesis normal de la copa óptica en el pez cebra rara vez se observan células apoptóticas, por lo que la muerte celular no parece tener un papel importante en este proceso, y el bloqueo de la división celular mitótica tampoco parece tener efectos más que en el tamaño afectando la cantidad de células y el tamaño de las mismas, pero no afecta la organización (Kwan *et al.*, 2012).

Hasta el momento en que comenzó el presente trabajo de tesis, existían datos parciales de la bioquímica, distribución y función de las proteínas MARCKS en humano (Blackshear, 1993), ratón (Stumpo *et al.*, 1995), rata (Blackshear *et al.*, 1986; Nakaoka *et al.*, 1993 y 1995), bovino (Wu *et al.*, 1982; Chao *et al.*, 1994; Filley *et al.*, 2000), pollo (Graff *et al.*, 1989 a, b y c) y anfibio (Ali *et al.*, 1997; Iioka *et al.*, 2004). Los genes *marcks* y *mrp* fueron mapeados, parcialmente

caracterizados en humano y su expresión estudiada en humanos (Harlan *et al.*, 1991; Blackshear *et al.*, 1992), macaco (Higo *et al.*, 2002), ratón (Blackshear *et al.*, 1992), rata (Patel & Kligman, 1987; McGill & Brooks, 1997; McNamara & Lenox, 1998), pollo (Graff *et al.*, 1989a), anfibio (Zhao *et al.*, 2001; Shi *et al.*, 1997; Ali *et al.*, 1997). Los únicos datos existentes de anamniotas son los del anfibio *Xenopus laevis*, y el reciente trabajo de pez cebra (Ott *et al.*, 2011), careciendo de información de grupos de divergencia más ancestral. Siendo las proteínas de la familia MARCKS han sido identificadas exclusivamente en vertebrados gnatostomados hasta el momento, el estudio de las mismas y de sus genes en los peces teleósteos presenta relevancia desde el punto de vista evolutivo. Por otra parte, debido a la estrecha relación que presentan las proteínas de ésta familia con el desarrollo del sistema nervioso, resulta ineludible su estudio a la luz de un modelo como el pez cebra, en el que es posible realizar manipulaciones genéticas de manera técnicamente accesible, y del que existe un gran volumen de información sobre su embriología.

Objetivos

Objetivo general

Estudiar la expresión y función de los genes ortólogos de MARCKS en el desarrollo temprano del pez cebra.

Objetivos específicos

- (1) Identificar y caracterizar la expresión del o los ortólogos de *marcks* y *mrp* mediante análisis *in silico*.
- (2) Caracterizar el patrón de expresión de *marcks* en el embrión de pez cebra.
- (3) Estudiar los efectos del silenciamiento génico de los posibles ortólogos de *marcks* en el embrión de pez cebra.

MATERIALES Y METODOS

Reactivos biológicos

Se utilizaron peces cebra tipo salvaje exocriados obtenidos de acuaristas locales, y de la cepa SAT (Sanger AB Tübingen, <http://zfin.org/ZDB-GENO-100413-1>). Los peces fueron mantenidos a 27 °C en condiciones de cría estándar (http://zfin.org/zf_info/zfbook/cont.html).

Cultivo de embriones

Los embriones de pez cebra se cultivaron a 28 °C en medio E3 (5 mM NaCl/ 0,17 mM KCl/ 0,33 mM CaCl₂·2H₂O/ 0,33 mM MgSO₄·7H₂O) suplementado con tampón fosfato 0,1 mM y azul de metileno (1 ppm) como antifúngico (http://zfin.org/zf_info/zfbook/cont.html).

Antestesia

Los embriones de pez cebra fueron anestesiados con eugenol 100 ppm de acuerdo a lo descrito en la bibliografía (Grush *et al.*, 2004). Se preparó una solución *stock* de eugenol 10% en etanol 95%, y la solución de trabajo 100 ppm en medio E3 se preparó en el momento.

El eugenol (4-alil-2-metoxifenol) se obtiene del aceite de clavo de olor (*Eugenia aromatica*) y representa entre un 70 y un 95% del peso de este aceite esencial. Esta sustancia que posee un grupo vainilloide ha sido utilizada desde hace mucho tiempo como anestésico local en odontología. Recientemente se ha demostrado que ejerce su acción anestésica inhibiendo corrientes de calcio y de sodio dependientes de voltaje en neuronas sensoriales primarias dentales en ratas (Park *et al.*, 2006) y corrientes de potasio dependientes de voltaje en neuronas del trigémino (V) también en ratas (Li *et al.*, 2007) de manera independiente del TRPV1.

El eugenol es un anestésico más eficiente en el pez cebra que el metanosulfonato del etil éster del ácido 3-aminobenzoico (tricaina, MS-222), ya que permite obtener los mismos planos de anestesia con dosis menores y más rápidamente, y posee un rango de seguridad mayor (Grush *et al.*, 2004).

I. Identificación y caracterización de la expresión del o los ortólogos de *marcks* y *mrp* mediante análisis *in silico*

Análisis de secuencias

Uso de codones

Se tomaron las regiones codificantes de los ADNc y se realizó un análisis de adaptación utilizando GCUA (Graphical Codon Use Analyzer; Fuhrmann *et al.*, 2004). El análisis asigna un valor de 100 para el codón de uso más frecuente para un determinado aminoácido, y luego asigna valores proporcionales al resto de los codones para el mismo aminoácido en función de su frecuencia. Se utilizaron como valores de referencia los de la tabla de uso de codones del pez cebra (http://zfin.org/zf_info/monitor/vol2.2/1.html).

Predicción de islas CpG

Se obtuvieron las secuencias 1kb 5' al codón +1 del gen a partir de los ensamblajes genómicos. Dichas secuencias se analizaron utilizando el software cpgplot (Larsen *et al.*, 1992) dentro de una ventana de 200 pb, considerando las islas putativas de longitud mayor a 50 pb.

Predicción de promotores

La predicción de regiones promotoras y de regiones de unión a factores trans se realizó con Proscan (<http://www-bimas.cit.nih.gov/molbio/proscan/>) sobre la secuencia 1kb de los genes de interés. Se realizó además una búsqueda de secuencias consenso con el software GeneRunner (Hastings Software).

Predicción de parámetros fisicoquímicos y sitios de fosforilación de las proteínas

El análisis teórico de parámetros fisicoquímicos se realizó con el software ProtParam (Gasteiger *et al.*, 2005). El programa calcula la masa molar molecular mediante la suma de las masas isotópicas promedio de los aminoácidos y la masa isotópica promedio de una molécula de agua. El pI es calculado utilizando valores publicados de pKa de los aminoácidos, determinados por la movilidad en un gradiente de pH de 4,5 a 7,3. Los valores resultantes pueden considerarse como una aproximación a los valores experimentales, ya que las proteínas de la familia MARCKS son de carácter ácido, y es en este rango que el programa ha mostrado ser eficiente. Sin embargo la capacidad de *buffer* intrínseca de las proteínas podría afectar este cálculo, lo que debe ser tenido en cuenta ya que hasta el momento no hay estudios experimentales de las características fisicoquímicas

de estas proteínas en el pez cebra.

Para identificar los sitios putativos de fosforilación se utilizó el software NetPhos (Blom *et al.*, 1999), que utiliza un algoritmo basado en redes neurales no lineales, entrenadas para la predicción de serinas, treoninas o tirosinas fosforilables dependiente de contexto, reportando los resultados con una probabilidad mayor a 0,7. El sistema analiza una ventana de nueve residuos para tirosinas y treoninas, y de once residuos para las serinas; luego superpone los datos con un análisis de una secuencia peptídica de 33 residuos con centro en el sitio de fosforilación putativo, de la que realiza un mapa de contactos con el carbono alfa. De este modo evalúa la probabilidad de que el sitio sea espacialmente accesible a la quinasa, siendo el resultado global un valor de probabilidad de fosforilación determinada por la secuencia, su entorno y la accesibilidad debida a la conformación tridimensional local.

La predicción de sitios de miristilación se realizó con el software NMT (<http://mendel.imp.ac.at/myristate/SUPLpredictor.htm>, Maurer-Stroh *et al.*, 2002). En el análisis se incluyeron los residuos internos de glicina además de los terminales. El algoritmo que utiliza el predictor es de carácter mixto y evalúa tanto la tendencia en la composición de la secuencia en el extremo amino terminal, así como las propiedades fisicoquímicas del patrón de cadenas laterales de los aminoácidos de la secuencia consenso de miristilación. La tasa de predicción de falsos positivos se ha estimado cercana al 0,5%.

Búsqueda de sitios putativos de unión a microARNs

La búsqueda se realizó utilizando el servidor MicroCosm (<http://www.ebi.ac.uk/enright-srv/microcosm>). Con el propósito de valorar los candidatos se realizó un tamizado de los microARNs con mayor puntaje en función de los patrones de expresión espaciales (hibridación *in situ*) y/o temporales (RNA-seq) conocidos (Chen *et al.*, 2005; Wienholds *et al.*, 2005), de los cuales se seleccionaron los 2 candidatos mejor puntuados que además se expresaran durante el desarrollo en la ventana temporal de las 0 – 48 hpf. El algoritmo miRanda busca alineamientos con la máxima complementariedad local, que corresponde a un dúplex antiparalelo de doble hebra. Se otorga un puntaje positivo a un apareamiento de bases complementario, y un puntaje negativo a los *mismatches*, gaps y a extensión de gaps. Los puntajes derivados del extremo 5' del miARN se multiplican por un factor de escala de 4.0 para ponderar la aparente importancia (derivada de datos experimentales) de un alineamiento tipo Watson-Crick perfecto. El puntaje total (*score*) resulta de la suma de estos puntajes a lo largo del miARN vs. el alineamiento de UTR.

Búsqueda de sitios regulatorios en los ARNm

La búsqueda se realizó utilizando el software Transterm (Jacobs *et al.*, 2006), seleccionando entre los resultados aquellos que identificaran secuencias consenso mayores a 5 pb para minimizar falsos positivos por aleatoriedad. Se realizaron además búsquedas en la base de datos de secuencias de elementos funcionales de regiones no traducidas de eucariotas UTRdb (Pessole *et al.*, 2002).

Alineamiento de secuencias

Alineamientos múltiples

Las secuencias de proteínas se obtuvieron realizando búsquedas con secuencias de proteína obtenidas a partir de ADNcs traducidos *in silico*. Las secuencias genómicas se obtuvieron mediante alineamiento de las secuencias de ADNc contra el ensamble de genoma utilizando BLAST. Las secuencias se alinearon globalmente utilizando clustalW2 (Larkin *et al.*, 2007).

Alineamientos pareados

Para realizar los alineamientos pareados de ARNm se utilizó EMBOSS Stretcher (Myers & Miller, 1988), que realiza un alineamiento global, y se utilizó la matriz de sustitución DNFull con un valor para el primer gap de 16 y una penalización por extensión de gap de 4.

Los alineamientos locales de secuencias proteicas se realizaron con EMBOSS Water, utilizando la matriz EBLOSUM62. El programa utiliza una modificación del algoritmo de Smith-Waterman que permite maximizar el puntaje de cada alineamiento en el orden de pasos mn, siendo m y n los largos de las secuencias a comparar, obteniendo un alineamiento local óptimo mediante la comparación de todos los alineamientos posibles y seleccionando el mejor. La apertura de un gap recibió un valor de penalización de 10, mientras que la extensión de gap recibió un valor de 0,5.

Alineamientos ARNm-genoma

Se utilizó el software Spidey (www.ncbi.nlm.nih.gov/spidey/) y se alinearon las secuencias de los mensajeros BC095101 (*marcksa*), BC092814 (*marcksb*), NM_213223 (*mrpa*), NM_213133

(*mrpb*) con el ensamble genómico de pez cebra zv9 (http://www.sanger.ac.uk/Projects/D_rerio/Zv9_assembly_information.shtml).

Reconstrucción de filogenias

Para la reconstrucción de filogenias se realizaron árboles de máxima verosimilitud utilizando el software PhyML 3.0 (<http://www.phylogeny.fr>) con el algoritmo aLRT que utiliza el modelo de sustitución WAG para proteínas y reporta árboles con apoyo estadístico similar al de bootstrap.

El control de las filogenias reconstruídas se realizó utilizando el software MEGA4 (Tamura *et al.*, 2007) mediante un análisis de soporte estadístico de bootstrap con 1000 réplicas utilizando el modelo de Tamura-Nei y se colapsaron las ramas con soporte estadístico menor a 0,5.

Los árboles se procesaron utilizando el software figtree 1.3.1 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/>).

II. Caracterización del patrón de expresión de *marcks* en el embrión de pez cebra.

Salvo cuando se indica lo contrario, las técnicas fundamentales de biología molecular utilizadas son las descritas en Ausubel *et al.*, 2006 y Green *et al.*, 2007.

Diseño de *primers*

Se obtuvieron las secuencias conocidas de los genes de interés (*marcksa*, *marcksb*, *mrpa*, *mrpb*, *rpl13a*, *ef1a*) de la base de datos GenBank. Se diseñaron oligonucleótidos cebadores (en adelante *primers*) que presentaran complementariedad específica con las secuencias de los genes de interés con la asistencia del software FastPCR (Kalendar *et al.*, 2009). Las T_m de los *primers* se calcularon mediante el algoritmo de Allawi (Allawi & SantaLucia, 1997). En todos los casos se intentó minimizar las diferencias en las T_m del par de *primers*, mantener el contenido GC en el entorno del 50% y, con el fin de identificar posibles contaminaciones con ADN genómico, dirigir los *primers* a regiones exónicas interrumpidas por intrones que durante la maduración del mensajero se eliminaran, pudiendo así reconocer el origen del producto de PCR de acuerdo a la migración relativa del amplicón en una electroforesis en gel.

En los casos en que se diseñaron *primers* para PCR cuantitativa en tiempo real (en adelante qPCR), se prefirió además que el extremo 3' de los primers coincidiera con la regla WSS SSW SWS, siendo $W=A/T$ y $S=G/C$. Se consideró también que los productos tuviesen entre 100 y 200 pb, y que los *primers* estuvieran dirigidos a secuencias producto de corte y empalme por lo que, idealmente, no se aparearían con ARNs inmaduros ni ADN genómico, amplificando así únicamente ADNc derivado de mensajeros maduros.

Clones y construcciones

Los clones de *marcksa* (número de acceso BC095101) y *marcksb* (número de acceso BC092814) de pez cebra se obtuvieron de openBiosystems en el vector pME-18S. El vector receptor pCS2+ (Kawakami *et al.*) fue generosamente donado por el Dr. Manuel Aybar de la Universidad Nacional de Tucumán, Argentina.

Las secuencias de mensajeros de *mrpa* y *mrpb* fueron clonadas en el vector T pJET1.2 (Fermentas) a partir de productos de PCR.

Subclonado de *marcksa* y *marcksb*

Transformamos células de *E. coli* XL1-blue competentes con los plásmidos conteniendo los clones *marcksa* o *marcksb* y con el plásmido aceptor pCS2+. Realizamos la digestión con las enzimas de restricción *EcoRI* y *XhoI* (Fermentas) para liberar del vector pME18S un inserto que contuviera las secuencias completas de *marcksa* o *marcksb*, así como para generar extremos cohesivos. En paralelo se realizó la digestión del vector pCS2+ en las mismas condiciones. Los productos de las digestiones fueron cuantificadas densitométricamente a partir de electroferogramas de geles de agarosa al 1% utilizando el *software* de código abierto ImageJ (Abramoff *et al.*, 2004).

Las reacciones de ligación con T4 ligasa (Fermentas) se llevaron a cabo durante 16 hs a 10°C utilizando una relación molar 3:1 (inserto:vector). Para mejorar la eficiencia de las reacciones de transformación (Michelsen, 1995) inactivamos la ligasa mediante la incubación a 70 °C durante 15 min. El protocolo experimental se muestra en la tabla MM-1.

se transformó con	cantidad	objetivo
pCS2+ <i>marcksa</i> (ligación)	10 µL	experimental
pCS2+ <i>marcksb</i> (ligación)	10 µL	experimental
pCS2+	1 µL	control positivo
Sin plásmido	-	control negativo

Estriamos 10 colonias de cada placa de transformación y purificamos con una segunda estría. Como se observó inestabilidad en las colonias de la primera estría, probablemente por sobrecrecimiento de colonias satélites, la segunda estría se realizó en placas de LB-agar con menor concentración de antibiótico (80 µg/mL) y se las creció a baja temperatura (30 °C).

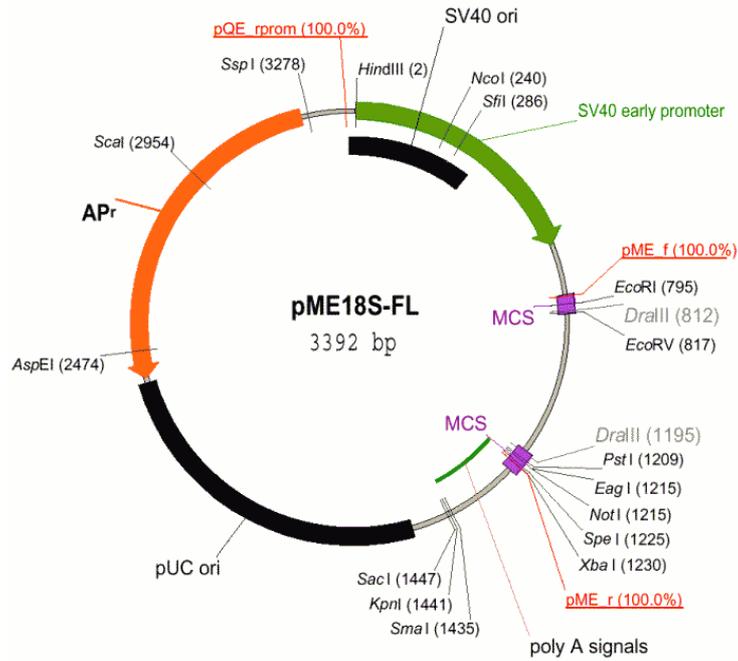
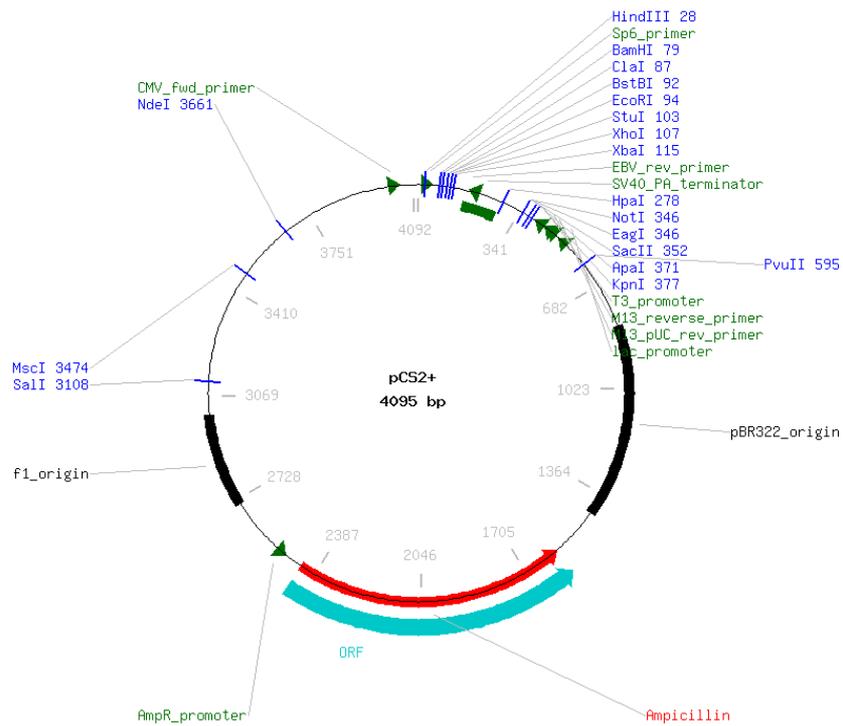
A**B**

Figura MM-1. Mapas de los plásmidos donador pME18S (A) y aceptor pCS2+ (B). Se indican las principales características y sitios de restricción.

Como las colonias presentaban la inestabilidad antes mencionada, introdujimos los plásmidos mediante transformación en la cepa de *E. coli* MC4100, según el esquema de la tabla

MM-2.

Tabla MM-2. Transformación de *E. coli* MC4100 competentes con pCS2+*marcks*a o pCS2+*marcks*b

se transformó con	cantidad	objetivo
pCS2+ <i>marcks</i> a	3 µL	experimental
pCS2+ <i>marcks</i> b	3 µL	experimental
pCS2+	1 µL	control positivo
Sin plásmido	-	control negativo

Estriamos 5 colonias de transformantes y las purificamos mediante una segunda estría. Las cultivamos en medio líquido y las almacenamos a -80 °C hasta su uso.

Clonado de *mrpa* y *mrpb*

Se diseñaron *primers* que presentaran complementariedad con las secuencias publicadas de los ESTs *mrpa* y *mrpb* (números de acceso NM213223.1 y NM213133.1 respectivamente), cuyas características se detallan en la tabla MM-3). Se optimizaron las reacciones de RT-PCR para amplificar la secuencia completa de los transcritos de interés, y se purificaron los productos de PCR a partir de bandas de geles de agarosa con el método de Heery *et al.* (1990), consistente en escindir con un escalpelo la banda de interés del gel y eluir el ADN de la agarosa en un colchón de lana de vidrio estéril mediante centrifugación. Posteriormente se precipita el ADN con acetato de sodio y etanol como se describirá. Los eluatos fueron concentrados mediante precipitación con acetato de sodio y etanol en presencia de dextrano como *carrier*.

Las bandas eluidas fueron cuantificadas densitométricamente a partir de electroferogramas de geles de agarosa al 1% como se describió anteriormente. Los geles duplicados fueron expuestos a la radiación UV durante el menor tiempo posible a fin de minimizar la aparición de mutaciones derivadas del procedimiento experimental, y recortamos las bandas correspondientes a *mrpa* y *mrpb* amplificadas a partir de cerebro. Eluimos el ADN de las bandas y lo purificamos mediante precipitación con etanol y acetato de sodio. Las reacciones de ligación en el vector pJET1.2 (figura MM-2) se realizaron siguiendo las instrucciones del fabricante del kit (GeneJet II, Fermentas) y la ligación se efectuó durante 16 hs a 10 °C.

Tabla MM-3. *Primers* para amplificación de *mrpa* y *mrpb* (longitud completa) para clonado.

Gen (residuos Nt de la proteína)	Nombre del <i>primer</i> y secuencia	Tm (Allawi)	Tamaño del producto esperado
<i>mrpa</i> (MGSQ)	sqcf - ATACCGATCCCAGGCATCAAAGGGAGGAGTGGCT	68,2 °C	619 pb
	sqcr - CCTTCTGTTCAGATGGTGCAGGTGT	60,5 °C	
<i>mrpb</i> (MGAQ)	aqcf - ATGGGTGCTCAGTTGACT	53,8 °C	668 pb
	aqcr - GTCTAGGTTGTCACAGCG	53,2 °C	

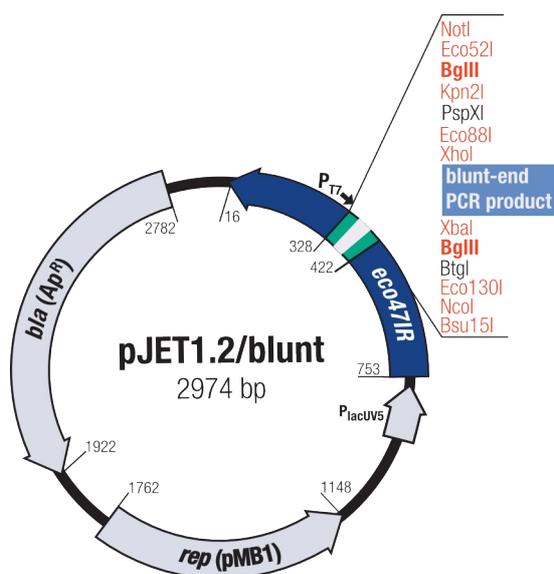


Figura MM-2. Mapa del vector T pJET1.2. Se indica el sitio de clonado múltiple con los sitios de restricción y las principales características del plásmido.

Transformación y selección de colonias transformantes

Para la transformación con productos de ligación se utilizó la cepa de *E. coli* XL1-blue, previamente seleccionada por su resistencia al ácido nalidíxico. Para hacer competentes a las células se utilizó el método del cloruro de calcio (Hanahan, 1983), y se las transformó con la mezcla de ligación mediante un choque térmico a 42 °C durante 45 segundos y mediante el protocolo usual (Green *et al.*, 2007). Se sembró un volumen de 100 μ L de la mezcla de transformación en placas de LB-agar con 100 μ g/mL de ampicilina para selección negativa de los transformantes por su resistencia al antibiótico. En todas las reacciones de transformación se utilizó como control positivo el plásmido pBluescript KS+ y como control negativo las células competentes sin ADN exógeno.

Se seleccionaron múltiples colonias de las placas de transformación y se purificaron mediante doble estría en placas con antibiótico. En ningún caso se utilizó selección positiva por

complementación en α , ya porque el vector pCS2+ no lo permite, o bien porque el vector pJET en que se realizó el clonado con extremos romos posee el sitio de múltiple clonado interrumpiendo un gen letal que impide el crecimiento de colonias que incorporan plásmidos autoligados.

Las colonias purificadas fueron cultivadas en medio líquido con antibiótico y el ADN plasmídico purificado mediante minipreps caseras.

En los casos en que debió transformarse con plásmidos que no eran productos de ligación se utilizó el método de transformación rápida de Chung (Chung *et al.*, 1989), y se realizaron las selecciones correspondientes de forma análoga a la anteriormente descrita.

Purificación y concentración de ácidos nucleicos

El ADN se concentró utilizando 1/10 de volumen de acetato de sodio 3M pH=4,8 y 2 volúmenes de etanol absoluto.

Para optimizar el tiempo de precipitación se introdujo una modificación al protocolo de Ausubel *et al.* Como la precipitación del ADN en presencia de acetato de sodio y etanol es función de la temperatura, una vez preparada la mezcla de precipitación se sumergieron los tubos en nitrógeno líquido para sustituir prolongadas incubaciones en hielo o en freezer, y se procedió a la centrifugación y procesamiento habitual.

Purificación de ADN plasmídico utilizando *minipreps* con columnas de fabricación casera (Merlin)

Se purificó el ADN plasmídico utilizando lisis alcalina y purificación por adsorción en tierra de diatomeas según el protocolo gentilmente comunicado por el Dr. Ravi Iyer (Harvard University Medical School, Boston, MA).

El cultivo líquido se centrifugó durante 30 seg a 12000 rpm hasta obtener un *pellet* seco que se resuspende en el *buffer* Merlin I (50mM Tris.HCl pH 7.5, 10mM EDTA, 100 μ g/ml RNasa A libre de DNasa). Se realizó una lisis en medio básico con la solución Merlin II (0.2M NaOH, 1% SDS), que luego se neutralizó y precipitó el ADN genómico con el buffer Merlin III (14,3% ácido acético glacial, 12,27% m/v acetato de potasio). Se centrifugó durante 5 min a 12.000 rpm y se recuperó el sobrenadante con el ADN plasmídico en solución. Éste se adsorbió a una suspensión 1,5% m/v de tierra de diatomeas en una solución caotrópica de 6M clorhidrato de guanidina pH=5,5 en buffer Merlin III. Se acopló una columna de minífuga limpia con un filtro a una línea de vacío

para retener la fase sólida de la suspensión y se lavó con 2 volúmenes del *buffer* Merlin V (20mM Tris-HCl pH=7,5, 200mM NaCl; 5mM EDTA, 50% etanol). Se centrifugó brevemente para secar las columnas y finalmente se eluyó el ADN plasmídico con 50 µL de agua mQ a 60 °C y se centrifugó durante 30 segundos a 12000 rpm. Volvimos a purificar el ADNp mediante precipitación con etanol y acetato de sodio (figura 31 B). Como ambos plásmidos poseían el inserto en la misma orientación (figura 31 A), linealizamos el ADNp recuperado con una digestión con la enzima de restricción *EcoRI* (figura 31 C), y lo volvimos a precipitar (figura 31 D).

Los moldes linealizados y purificados se transcribieron; verificamos el procedimiento en un gel de agarosa (figura 32 A), y transferimos a una membrana para determinar que la marca hubiera sido incorporada (figura 32 B).

Síntesis de ADNc molde quimérico con promotores virales para transcripción *in vitro* de ribosondas marcadas con digoxigenina

Se diseñaron cebadores para obtener sondas antisentido de tamaño pequeño (< 200pb) y adicionando en el cebador 3' una secuencia promotora de la ARN polimerasa ADN dependiente del bacteriófago T7. Las combinaciones de cebadores utilizadas se detallan en la tabla MM-4. Se agregó además del promotor mínimo una secuencia líder 5' y una espaciadora 3' con el fin de incrementar la afinidad de la enzima por el promotor (Tang *et al.*, 2005).

Tabla MM-4. *Primers* para amplificación de *mrpa* y *mrpb* con sitios promotores de la polimerasa viral T7 para síntesis de ribosonda antisentido.

Gen	Nombre del <i>primer</i> y secuencia	Tm (Allawi)	Tamaño esperado
<i>mrpa</i>	sqs_f_T7 - GAAATTAATACGACTCACTATA CCCTGCAGAACCGTTGGTGG	64,9 °C	189 pb
	sqs_r - GATCCCAGGCATCAAAGGGAGG	59,9 °C	
<i>mrpb</i>	aqs_f_t7 - GAAATTAATACGACTCACTATA CCTTTGCAGCCTCGCCGTCAGAT	65,9 °C	165 pb
	aqs_r - CGGAGATGTATCCACCAAGCCA	58,6 °C	

Los residuos destacados con fondo gris corresponden a la secuencia líder 5', los destacados con fondo amarillo corresponden a la secuencia consenso del promotor viral T7, y los destacados con fondo celeste corresponden al espaciador 3'; en tanto, los residuos con fondo sin destacar corresponden a la secuencia a hibridar con el ADNc molde.

Síntesis de ribosondas marcadas con digoxigenina para hibridación *in situ*

En todos los casos se realizó una transcripción *in vitro* de 1 µg de ADN molde con polimerasas virales (SP6 o T7 pol, según correspondiera) siguiendo el protocolo del fabricante, y sustituyendo en la mezcla de reacción 10% de la masa de UTP por DIG-11-UTP. Se incubaron las reacciones durante 2 hs a 37 °C. Se realizó una digestión del ADN molde mediante una incubación con DNasa I (libre de RNasas, Roche) durante 30 min a 37 °C. La digestión se terminó de acuerdo al protocolo del fabricante y el ARN se precipitó con LiCl, se resuspendió en formamida al 50% en agua mQ y se almacenó a -80 °C hasta su uso.

La síntesis fue evaluada en una corrida electroforética y transferida en seco a una membrana de nylon (Hybond N+), el ARN fue fijado a la membrana mediante irradiación UV o secado en estufa seca a 60 °C durante 30 min. Se rehidrataron las membranas con *buffer* I (0,1M Tris-HCl pH=7,5 / 0,15 M NaCl) durante 5 min. Se realizó un bloqueo con *buffer* II (*buffer* I / 0,5 % m/v bloqueante Roche) durante 20 min. Se incubaron con anticuerpo anti digoxigenina conjugados a fosfatasa alcalina (anti-DIG AP, Roche) 1:2000 en *buffer* I durante 20 min, se realizaron 2 lavados con *buffer* I de 10 min. Las membranas fueron equilibradas a pH=9,5 con *buffer* AP (0,1 M Tris-HCl pH=9,5/ 0,1 M NaCl/ 50 mM MgCl₂), y se revelaron con NBT/BCIP.

2.3. Generación de ribosondas para hibridación *in situ* de los ARNm de *marcks* de pez cebra

2.3.1. *marcksa* y *marcksb*

Las sondas obtenidas fueron cuantificadas mediante dot-blot. Estimamos las concentraciones de sonda en 5 ng/µL para la sonda *marcksa*-AS (AS: antisentido) y en 50 ng/µL para *marcksb*-AS. Almacenamos las sondas a -80 °C hasta su uso.

Cuantificación de ribosondas marcadas con digoxigenina mediante Dot Blot

Se realizaron dot-blots sobre membranas de nylon (Hybond N+) sembrando 1 µL de sonda, fijando en estufa seca durante 30 min a 60 °C. Se rehidrataron las membranas con *buffer* I (0,1M Tris-HCl pH=7,5 / 0,15 M NaCl) durante 5 min. Se realizó un bloqueo con *buffer* II (*buffer* I / 0,5 % m/v bloqueante Roche) durante 20 min. Se incubaron con anticuerpo anti digoxigenina conjugados a fosfatasa alcalina (anti-DIG AP, Roche) 1:2000 en *buffer* I durante 20 min, se realizaron 2 lavados

con *buffer* I de 10 min. Las membranas fueron equilibradas a pH=9,5 con *buffer* AP (0,1 M Tris-HCl pH=9,5/ 0,1 M NaCl /50 mM MgCl₂), y se revelaron con NBT/BCIP.

Extracción de ARN total de embriones de pez cebra y síntesis de ADNc

Se homogeneizaron embriones en cantidad aproximada a un volumen de 100 uL en 10 volúmenes de Trizol siguiendo el protocolo del fabricante. Se resuspendió en todos los casos en un volumen de 10 uL en agua milliQ. Se realizó una digestión con DNasaI (libre de RNasas, Roche) de 15 min a 37 °C para la eliminación de trazas de ADN genómico, posteriormente se inactivó con el protocolo del fabricante y se almacenó a -80 °C hasta ser utilizado.

Se retrotranscribieron 200 ng de ARN total con la retrotranscriptasa de MMLV RevertAid® (Fermentas) según el protocolo del fabricante y el ADNc fue almacenado a -20 °C hasta su utilización.

Determinación de la expresión de ARNms mediante RT-PCR

Se prepararon mezclas de reacción con 0,2 µM (c/u) de dNTPs, 1,5 mM de MgCl₂, 1 µL de ADNc molde, y en los casos en que las T_m de los pares de cebadores superaba los 61 °C (*mrpa* y *mrpb*) se agregó DMSO a una dilución final de 10% v/v. Se utilizó la enzima Taq ADN polimerasa recombinante (Invitrogen) según el protocolo del fabricante.

Tabla MM-5. Protocolo general de amplificación mediante RT-PCR.

	Temperatura (°C)	Tiempo
Predesnaturalización	94	5 min
Desnaturalización	94	45 seg
Hibridación	Variable según detalle en tabla MM-7	
Elongación	72	1 min
Elongación final	72	5 min

Los 40 ciclos de amplificación se realizaron con el protocolo general de la tabla MM-5. Las temperaturas de hibridación (*annealing*, T_a) se detallan según el juego de cebadores en la tabla MM-6.

Tabla MM-6. Temperaturas de hibridación para cada juego de cebadores.

transcripto	Ta (°C)	Tiempo	Tamaño del amplicón
<i>marcksa</i>	55 °C	45 seg	400 pb
<i>marcksb</i>	72 °C	1 min	300 pb
<i>mrpa</i> (MGSQ)	60 °C	1 min	619 pb
<i>mrpb</i> (MGAQ)	60 °C	1 min	668 pb
<i>rpl13a</i>	60 °C	1 min	148 pb

En todos los casos se realizó un protocolo *hot-start*, en que la enzima se agregó a las mezclas de reacción luego de los 5 minutos de pre-desnaturalización a 94 °C con el fin de reducir la posible amplificación de productos inespecíficos.

Determinación de variaciones temporales en los niveles de expresión: RT-PCR semicuantitativa (sqPCR)

Se deseaba determinar si existían variaciones en los niveles de expresión de los genes de la familia *marcks* entre diferentes etapas del desarrollo embrionario, en particular entre las 24 y las 48 hpf. Para dilucidarlo, se realizaron las reacciones de RT-PCR con un protocolo *hot-start* como se ha descrito, y se tomaron muestras de los productos de amplificación en los ciclos 31, 34, 37 y 40. Las reacciones se realizaron para todos los genes simultáneamente, a fin de minimizar diferencias derivadas de la manipulación. En todos los casos se incluyó un juego de cebadores del gen de referencia *rpl13a*. Se corrieron todas las muestras de un gen simultáneamente en el mismo gel de agarosa, se tomaron las fotografías correspondientes y se cuantificó densitométricamente utilizando el software ImageJ. Se analizó realizando la relación entre una muestra del gen de interés y el gen de referencia en el ciclo correspondiente para los cuatro ciclos analizados, obteniéndose así un nivel de expresión relativo al gen de referencia en unidades arbitrarias. Se graficaron estos niveles y se linealizó en un gráfico semilogarítmico, asumiendo que las curvas de amplificación se aproximaban a una sigmoide. Se realizaron regresiones lineales de las curvas semilogarítmicas y se compararon sus pendientes. La existencia de diferencias en las pendientes se utilizó como indicador de la existencia de variaciones en los niveles de expresión de un mismo gen en las dos etapas analizadas. El método no permite la comparación fiable entre genes, puesto que no considera las diferencias en

las eficiencias de amplificación entre los juegos de cebadores, pero permite determinar diferencias temporales para cada combinación de cebadores.

Cuantificación relativa de los niveles de expresión: real-time RT-PCR (qPCR)

Se prepararon mezclas de reacción para un volumen final de 20 μ L por tubo utilizando el kit Kapa SYBR Fast® qPCR kit (Kapa biosystems) según el protocolo del fabricante. En todos los casos se utilizó 1 μ L de ADNc, y en todos los casos se partió de 200 ng de ARN total como se ha descrito. Los juegos de cebadores utilizados se indican en la tabla MM-7. El procesamiento de los datos se realizó utilizando triplicados promediados de cada experimento, con dos genes de referencia (*rpl13a* y *ef1a*) que han sido reportados como los de menor variación durante el desarrollo (Tang *et al.*, 2007). Se analizaron los datos utilizando el software REST 2009 (Quiagen), normalizando la eficiencia de los juegos de cebadores (Pfaffl, 2001 y 2004) según:

$$\text{Nivel de expresión} = \frac{(E_{\text{blanco}})^{\Delta CP_{\text{target}} (\text{control} - \text{muestra})}}{(E_{\text{referencia}})^{\Delta CP_{\text{referencia}} (\text{control} - \text{muestra})}}$$

Siendo E las eficiencias de los cebadores, y CP el punto en el que la fluorescencia cruza el umbral de ruido de fondo. Como grupo control se utilizó ADNc de ovocitos.

Tabla MM-7. *Primers* para RT-PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR)

Gen	Nombre del <i>primer</i> y secuencia	T _m (Allawi)	Tamaño del producto esperado
<i>marcks</i> a	qm1f - TGGGAGCGCAATTCAC	52,6 °C	252 pb
	qm1r - TTCCATCTGTGGCCTCC	54,0 °C	
<i>marcks</i> b	qm2f - GCGATTCTTTGTTGCGTGTGAAAGCA	60,6 °C	154 pb
	qm2r - ATTCGGAGAGGCATTCCCGT	58,1 °C	
<i>mrpa</i>	qmrpaf - CGTTACGCCCATTTGGTC	53,6 °C	223 pb
	qmrrpar - ATTCGGAGAGGCATTCCCGT	52,4 °C	
<i>mrpb</i>	qmrpbf - AGGTGAAGCCACAGTGG	54,5 °C	190 pb
	qmrpbr - GGCTTCAATGCCGTCTCC	56,3 °C	
<i>ef1a</i>	ef1af - CTACCTACCCTCCTCTTGGTCG	68,2 °C	182 pb
	ef1ar - ACACGCCGCAACCTTTGGAA	60,5 °C	
<i>rpl13a</i>	rp113af - TCTGGAGGACTGTAAGAGGTATGC	53,8 °C	148 pb
	rp113ar - ACACGCACAATCTTGAGAGCAG	53,2 °C	

Extracción de proteínas

Los embriones anestesiados fueron desvitelinizados haciéndolos pasar varias veces por una pipeta Pasteur de vidrio modificada con una abertura del tamaño aproximado al de la bola de vitelo.

Se realizó un lavado en PBS 0,8X en hielo y se transfirieron a un tubo eppendorf de 1,5 mL. Se retiró el PBS y se agregó 1 µL de *buffer* de muestra (63 mM Tris·HCl pH=6,8 / 10% v/v glicerol/ 5% v/v 2-mercaptoetanol/ 3,5% m/v SDS) por embrión. Se homogeneizó la muestra con un émbolo para tubos eppendorf y se agregó una cantidad igual de *buffer* de muestra con la que se lavó el émbolo y se volvió a homogeneizar.

Las muestras se calentaron a 100 °C a baño maría durante 5 min, se centrifugaron a 12.000 g durante 5 min y se recuperó el sobrenadante (http://zfin.org/zf_info/zfbook/cont.html). Sabíamos que, en el caso del pollo, someter el extracto a 100 °C a baño maría resulta en un enriquecimiento relativo de la muestra en MARCKS, siendo que la mayor parte de las demás proteínas precipita en estas condiciones. Por este motivo incluimos además un extracto de embriones de pez de 48 hpf sometido al tratamiento con calor (Zolessi, 2003).

Western Blot (Inmunodetección sobre membranas de nitrocelulosa)

Las muestras complejas de proteínas se separaron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida 10% (12,7%T 0,3%C) en condiciones desnaturizantes con sistema discontinuo (Laemmli, 1970). Los geles de poliacrilamida fueron sometidos a electrotransferencia sobre membranas de nitrocelulosa en tanque (Towbin *et al.*, 1979) durante toda la noche a 100 mA. Las membranas fueron coloreadas durante 10 minutos con rojo Ponceau (0,2% rojo Ponceau S en 3% ácido tricloroacético), lavadas con agua milli-Q y fotografiadas. Luego se removió el colorante con dos lavados con PBS y se bloquearon los sitios de unión inespecíficos con L5T (5% leche descremada, 0,1% Tween 20 en PBS) durante 30 min a temperatura ambiente. Posteriormente se incubó con los anticuerpos primarios indicados durante 1 hora a temperatura ambiente en L1T (1% leche descremada, 0,1% Tween 20 en PBS) en las concentraciones de la tabla MM-9. Se realizaron tres lavados de 10 min con L1T, y se incubó durante 1 h con los anticuerpos secundarios descritos en la tabla preparados en L1T. Se practicó un lavado con PTw (0,1% Tween 20 en PBS), dos lavados con PBS y se reveló utilizando el kit quimioluminiscente Pierce West Pico® con placas radiográficas Agfa.

Tabla MM-9. Anticuerpos utilizados para inmunodetección sobre nitrocelulosa, diluciones y especificidades.

Nombre	Dilución	Inmunógeno
Martin	1:5000	MARCKS pollo
Marisa	1:5000	MARCKS pollo
MCt	1:5000	MARCKS pollo C-terminal
3C3	sobrenadante de cultivo puro	S25p-MARCKS
Polo52	1:5000	MARCKS
9300	1:2000	MARCKS ED

Inmunolocalización *in situ* con anticuerpos anti MARCKS y S25pMARCKS en cortes a congelación de embriones de pez cebra

Se utilizaron embriones de 40, 48 y 72 hpf fijados con formaldehído al 4% a partir de paraformaldehído en PBS. Posteriormente, se realizó la crioprotección mediante incubaciones en sacarosa 5% en PBS durante 4 hs y luego en sacarosa 20% toda la noche. Luego, se incluyeron en OCT®, y se congelaron con nitrógeno líquido y se realizaron cortes en crióstato de 5 µm que se

levantaron sobre portaobjetos gelatinizados.

Se removió el medio de inclusión mediante 3 lavados con PBS y se bloquearon los sitios de unión inespecíficos con una incubación de 1 hora en BSA 3% a temperatura ambiente. Se incubó durante 1 hora con el anticuerpo primario con 1% BSA en PBS, se practicaron 3 lavados de 5 min con PBS y se incubó con el anticuerpo secundario correspondiente BSA 1% en PBS durante 1 hora. Se realizaron 3 lavados de 5 min con PBS, y se montó en 50% glicerol pH=7,4 en PBS. Los anticuerpos utilizados, y sus respectivas diluciones se especifican en la tabla MM-3.

III. Estudio de los efectos del silenciamiento génico de los posibles ortólogos de *marcks* en el embrión de pez cebra

Silenciamiento génico mediante microinyección de oligonucleóticos de morfolino antisentido (morfolinos)

Se diseñaron morfolinos para bloqueo de la traducción dirigidos contra el extremo 5' no traducido (5'-UTR) de los ARN mensajeros de *marcks*a y *marcks*b (tabla MM-8) utilizando el software AMOD (Klee *et al.*, 2005). doi: 10.1093/nar/gki453

Se prepararon soluciones *stock* 1 mM en agua mQ, y soluciones de trabajo 0,2 mM también en agua mQ. Los morfolinos fueron inyectados en el vitelo entre las etapas de 1 – 8 células utilizando un inyector neumático con pulsos de duración controlada de aire comprimido a una presión de 40 PSI, y en ningún caso se inyectaron volúmenes mayores a 6 nL. Las microagujas se realizaron estirando capilares de vidrio borosilicato de 1,5 mm de diámetro externo con filamento interno (World Precision Instruments) en un estirador horizontal de pipetas (*puller*). El volumen de inyección se determinó calibrando el tamaño de la gota, midiendo su diámetro con un micrómetro bajo la lupa, y aproximando su volumen al de una esfera.

Tabla MM-8. Secuencias y dosis de los morfolinos utilizados para silenciamiento génico

	Secuencia	Dosis efectiva mínima *
<i>marcks</i> a MO	CAAGCCACCGACTCCTCACTATAAA	0,1 pmol
<i>marcks</i> b MO	CAAATGAATGAACAAAGAGCGCGAG	0,1 pmol
<i>p53</i> MO	GCGCCATTGCTTTGCAAGAATTG	0,2 pmol
control MO**	CCTCTTACCTCAGTTACAATTTATA	0,3 pmol [†]

* Dosis mínima necesaria por embrión para producir fenotipo identificable.

** Morfolino diseñado contra una secuencia que no está presente en el genoma del pez cebra.

† Dosis resultante de la suma de las dosis de los morfolinos de *marcks* y *p53*. No se espera un fenotipo observable producto de la inyección de este morfolino.

Inclusión en parafina y coloración histológica con hematoxilina y eosina

Se utilizaron embriones de 48 hpf y 5 dpf fijados en formaldehído 4% a partir de paraformaldehído (Kiernan, 1999) durante toda la noche. Se realizaron tres lavados de 30 min con PBS para remover el fijador. Los embriones fueron deshidratados gradualmente según el protocolo de la tabla MM-10 e incluidos en parafina. Se realizaron cortes en micrótomos de 3 µm de espesor y se levantaron sobre portas albuminados que se curaron con vapores de formalina a 37 °C durante toda la noche.

Tabla MM-10. Protocolo de deshidratación de tejidos de embriones de 48 hpf y larvas de 5dpf e inclusión en parafina.

Incubaciones con	tiempo
Etanol 70%	15 min
Etanol 95%	15 min
Etanol 100%	15 min
Cloroformo	15 min
Parafina	3 x 30 min

Se removió la parafina con dos incubaciones de 5 min en xilol, se removió el xilol con un pasaje de 5 min en etanol 100% y se rehidrataron los cortes en una serie de alcoholes de concentración decreciente (dos lavados con etanol 95% de 5 min, un lavado con etanol 70% de 5 minutos) y un lavado final con agua mRO de 5 min. Se colorearon con hematoxilina de Mayer (0,2%) durante 5 minutos, se realizó un viraje con agua de canilla corriente durante 10 minutos, se enjuagó con agua mRO, se coloreó con eosina (eosina Y alcohólica 0,5%) durante 5 min y se deshidrataron en alcoholes de concentración creciente (etanol 70% 5 min, etanol 90% 2 min, etanol 100% 2 min), se clarificaron en xilol durante 5 min y se montaron con bálsamo de Canadá sintético. El protocolo es una adaptación del descrito en Kiernan, 1999.

Hibridación *in situ* sobre cortes a congelación con ribosondas

Se utilizaron embriones fijados durante toda la noche con formaldehído 4% a partir de paraformaldehído, crioprottegidos como se describió, congelados en nitrógeno líquido y cortados en crióstato a 5 μ m. Los cortes fueron levantados sobre portaobjetos silanizados.

Se realizaron 3 lavados de 5 min con PTw (PBS-Tween 0,1%). Se digirieron con proteinasa K 20 μ g/mL en PTw durante 30 seg a temperatura ambiente, y se lavó la enzima con 3 lavados de Ptw de 5 min. Se volvieron a fijar los cortes con una mezcla de formaldehído 4% (a partir de paraformaldehído) y glutaraldehído 0,2% en PBS durante 10 min a temperatura ambiente. Se removió el fijador con 3 lavados de 5 min con PTw. Se realizó una prehibridación incubando con buffer HYB- (100 mM Tris pH=6,8, 1mM EDTA, 50% formamida, 10% SDS, 0,75M NaCl) durante 40 min a 63 °C. La hibridación se realizó durante toda la noche con 2 ng/mL de sonda a 63 °C en buffer de hibridación HYB+ (100 mM Tris pH=6,8, 1mM EDTA, 50% formamida, 0,1% Tween-20, 0,75M NaCl, 100 μ g/mL ARN de tórua, 0,05% heparina sódica). Se lavó la sonda no

hibridada con buffer de hibridación durante 30 min a 63 °C. Se realizaron dos lavados de 10 min con buffer de hibridación 66% a 50 °C, un lavado de 10 min con buffer de hibridación 33% a 50 °C, un lavado de 10 min con SSC 2X a 50 °C, un lavado de 5 min a 50 °C con SSC 0,2X, un lavado de 5 min a 50 °C con SSC 0,1X, un lavado de 5 min con SSC 0,2X 66% a temperatura ambiente, un lavado de 5 min con SSC 0,2X 33% a temperatura ambiente. Los ARNs de hebra simple (sonda no hibridada, etc) se digirieron con una incubación con RNasa A 10 µg/mL durante 30 minutos a 37 °C. Se realizaron dos lavados con PBS de 10 min a 50 °C.

Para la detección de la sonda se realizó una incubación con reactivo bloqueante Roche 1%, levamisol 2 mM (como inhibidor de la fosfatasa endógena) en buffer ácido maleico (MAB) durante 30 min a temperatura ambiente; se incubó luego con anticuerpo anti digoxigenina 1:5000 durante toda la noche a 4 °C. Se practicaron dos lavados de 5 minutos con buffer de lavado (MAB, 0,15M NaCl, 0,1% Tween-20), y tres lavados de 5 minutos con PTw . Se equilibró el pH a 9,5 con tres lavados de 5 min con buffer AP (100 mM Tris pH=9,5, 100 mM NaCl, 50 mM MgCl₂), y se reveló con NBT/BCIP en buffer AP. Se detuvo el revelado con 3 lavados de 5 min con PBS pH=3. Se deshidrataron los preparados con etanol 70% durante 15 seg y luego por otros 15 seg con etanol absoluto. Se clarificaron mediante una incubación de 5 min en xilol y se montó con bálsamo de Canadá sintético. El protocolo está modificado del de Thisse & Thisse, 2008.

Tinción de cartílagos con Alcian blue

La asociación de proteínas de la familia MARCKS con fenómenos de migración celular (Iioka *et al.*, 2004), nos planteó la pregunta de si el silenciamiento de MARCKSa o MARCKSb en el pez cebra estaría afectando la migración durante el desarrollo. Para evaluarlo, analizamos la formación del esqueleto craneofacial como indicador de migración del mesénquima craneofacial.

Se utilizaron embriones de 5 dpf tratados con PTU y fijados con formaldehído al 4% a partir de paraformaldehído en PBS. Se lavaron 5 veces con PTw (PBS/ 0,1% Tween-20) y se incubaron toda la noche en la solución de Alcian blue (0,1% Alcian blue en 70% etanol, 1% ácido clorhídrico). Se lavaron 4 veces con alcohol-ácido (70% etanol, 5% ácido clorhídrico) y se incubaron durante 20 min en alcohol-ácido a temperatura ambiente. Los embriones fueron rehidratados en soluciones decrecientes de alcohol-ácido/agua (3:1, 1:1, 1:3) y enjuagados finalmente con agua destilada. Luego se clarificaron y guardaron en una solución de 50% glicerol en KOH (0,5%), como se ha descrito en la literatura (Solomon *et al.*, 2003).

Procesamiento para cortes semifinos

Se fijaron embriones de 48 hpf en glutaraldehído al 2,5% en PBS. Luego de 10 min se disecaron las cabezas y fueron refijadas por 48 hs a 4°C. Se retiró el fijador con 5 lavados de 5 min en PBS con agitación. Se posfijaron con tetróxido de osmio, se deshidrataron, y se incluyeron en araldita (Durcupan, Fluka).

Se obtuvieron cortes semifinos (0,5 µm), se secaron a la llama y se colorearon con azul de metileno 1%.

Inmunolocalización *in toto* de marcadores de diferenciación celular en la retina

Se utilizaron embriones de 24, 48, 72 hpf y 5 dpf tratados con PTU y fijados con formaldehído al 4% a partir de paraformaldehído en PBS. Se permeabilizó a los embriones con 5 lavados de 30 min con PBS-T (PBS/0,2% Triton X-100) y mediante tripsinización en hielo durante 15 – 30 min dependiendo de la edad de los embriones. Se realizaron 3 lavados de 10 min en hielo con PBS-T y se procedió al bloqueo de sitios inespecíficos con solución de bloqueo (10% suero de cabra, 1% BSA, 10% glicina, 0,2% azida de sodio en PBS-T) a 37 °C durante 1 h. La incubación con anticuerpos primarios en solución de bloqueo se realizó a 4 °C durante 24 hs con constante agitación suave. Posteriormente, se realizaron 5 lavados con PBS-T de 30 minutos a 4 °C con agitación, y se incubó durante 48 hs con los anticuerpos secundarios correspondientes y con yoduro de propidio 0,1 µg/mL como tinción nuclear, en agitación a 4 °C. Se realizaron 5 lavados de 30 min con agitación y se montaron los embriones en cámaras con glicerol (50% glicerol en 20 mM Tris, pH=8,8), se cubrieron con cubreobjetos n° 0 y se zulacó con esmalte de uñas.

Los anticuerpos utilizados, las estructuras que reconocen y las diluciones utilizadas se detallan en la tabla MM-11.

Tabla MM-11. Anticuerpos utilizados para inmunofluorescencia *in situ*, diluciones y especificidades.

Nombre	Dilución	Inmunógeno
zn-5	1:100	Neurolina a
zpr-1	1:100	Conos dobles
Martin	1:1000	MARCKS pollo
Marisa	1:1000	MARCKS pollo
MCt	1:2000	MARCKS pollo C-terminal
3C3	7 µg/mL	S25p-MARCKS
Polo52	1:1000	MARCKS

RESULTADOS

I. Identificación y caracterización de la expresión del o los ortólogos de *marcks* y *mrp* mediante análisis *in silico*

1.- Análisis de secuencias

1.1. Identificación de secuencias proteicas

Con el fin de identificar posibles secuencias proteicas homólogas de MARCKS en el pez cebra, realizamos una búsqueda basada en alineamientos locales mediante *blastp* contra las bases de datos no redundantes (*refseq protein*) y utilizando como referencia la secuencia proteica de MARCKS de pollo (*G. gallus*). Obtuvimos dos secuencias candidatas que analizamos en detalle y que denominaremos en adelante MARCKSa y MARCKSb (figura 1). Ambas secuencias presentaron características diagnósticas de una proteína MARCKS: una región de miristilación en el N-terminal (Myr), un dominio MH2, y un dominio efector (ED) rico en lisinas como se señala en la figura.

A

MARCKSa	MGAQ FTKTAG KEETAAENPG EAAV SPSKAN GQVPNTENGH LKVNGDASPA	50
MARCKSa	AAEQ KKEVRT NGTAPAEDGE KNEEAPAEKE ATDGNTAIA PTEEEAVMDG	100
MARCKSa	ATPSTSN ETP KKKKKRFSFK KSFKLSGFSF KTKKE TGDN GEEAVAAGND	150
MARCKSa	EAKTDGAVEG VSEEKAQTTE EAAKTEQNPV EETKPTSPAT EESKTEPAVA	200
MARCKSa	TEPSPSQNEA AAAEESAPSA QEVECSPEAQ AEAATE	236

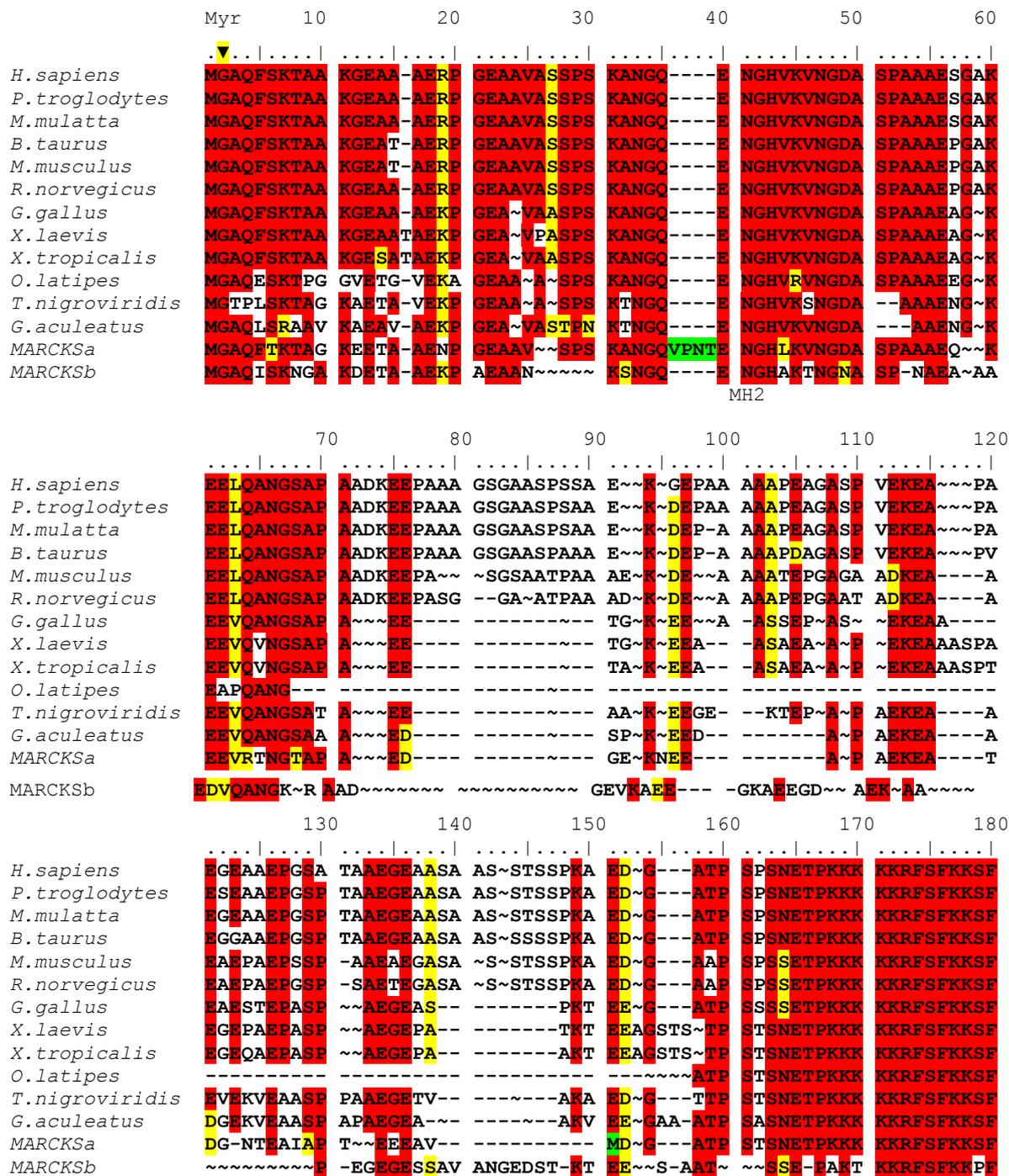
B

MARCKSb	MGAQ ISKNGA KETAEEKPA EAANK SNGQE NGHAKTNGNA SPNAEAAAED	50
MARCKSb	VQANGKRAAD GEVKAEKGKA EEGDAEKAAP EGECESSAVA NGEDSTKTEE	100
MARCKSb	SAATSSE PAK TKKRFSFKKP FKLSGFSFKK SAKKE AEGGE AAAATAENGE	150
MARCKSb	QKKDAEPEEA KPEASSEAK AETPAEEPNA EEPKAESSEE KPASEVAEEK	200
MARCKSb	PAEEKQEAAP QEPAAAESSE APAAATE	227

Figura 1. Secuencias de las dos proteínas MARCKS parálogas identificadas en el pez cebra. Se señalan las posibles regiones funcionales, dominio de miristilación, dominio MH2, y dominio efector, respectivamente. (A) MARCKSa; (B) MARCKSb.

Para analizarlas, realizamos un alineamiento múltiple con ClustalW2 y luego corregimos el alineamiento manualmente. Encontramos que MARCKSa posee en el dominio MH2 una serina en un consenso de fosforilación por *Cdks* (SPSK) al igual que las MARCKS de los demás vertebrados analizados. Sin embargo, MARCKSb posee algunas diferencias en las regiones más conservadas, en particular en el dominio MH2, no presentando la secuencia consenso de Cdk antes mencionada, y en el ED, siendo la única secuencia encontrada con alteraciones en este dominio (figura 2). Encontramos además que MARCKSa presenta una inserción de cuatro residuos (VPNT, señalado en verde en la figura) dentro del dominio MH2, en las posiciones 32 a 35, que es exclusiva del pez

cebra. MARCKSa también es la única de las secuencias analizadas que presenta un residuo de metionina interno (señalado en verde).



	190	200	210	220	230	240
<i>H.sapiens</i>	KLSGFSFKKN	~KKEAGEGGE	AEAPA----	EGGKDEAA	~	GGAAAA~E
<i>P.troglodytes</i>	KLSGFSFKKN	~KKEAGEGGE	AEAPA----	EGGKDEAA	~	GGAAAA~E
<i>M.mulatta</i>	KLSGFSFKKN	~KKEAGEGGE	AEAPA----	EGGKDEAA	~	GGAAAA~E
<i>B.taurus</i>	KLSGFSFKKN	~KKEAGEGGE	AEQA~AAGASA	EGGKDEAS	~	GGAAAA~GE
<i>M.musculus</i>	KLSGFSFKKS	~KKEAGEGAE	AEQAT----	EGAKDEAAAA	A~	GGEGAAAPGE
<i>R.norvegicus</i>	KLSGFSFKKS	~KKEAGEGAE	AEQAT----	DGAKDEAAAA	A~	GGDAAAAPGE
<i>G.gallus</i>	KLSGFSFKKN	~KKEAGEGAE	SEGGAAAA~A	EGGKEEAAAA	AP~EAA~	GGEE-----
<i>X.laervis</i>	KLSGFSFKKN	~KKENSEGAE	NEG~AV~AST	EEAKEDTAA	AP~EATNR~	~EE-----
<i>X.tropicalis</i>	KLSGFSFKKN	~KKENSEGAE	NEG~AA~AST	EEAKEDTAA	AP~EAANS~	~EE-----
<i>O.latipes</i>	KLSGFSFKKT	~KKEITGDGAE	NEEEAAGASA	EGTKTDNQEK	~PAED~KPAE	GGTEP~~~~
<i>T.nigroviridis</i>	KLSGFSFKKT	~KKEITGEGAE	SEEPAA~	EAT~E~A~A	APAEAKPSE	AMEETSAAAN
<i>G.acleatus</i>	KLSGFSFKKT	~KKEITGDGAK	GEE~VAAA~	~DDAVAA	A~	~TEEP~~~~
MARCKSa	KLSGFSFKKT	~KKEITGDNGE	~E~AVAA~	~	~	~G
MARCKSb	KLSGFSFKKS	AKKEA~EGGE	~	~	~	~AAAATAENG

ED

	250	260	270	280	290	300
<i>H.sapiens</i>	~AG--AASGE	QAAAPGEEAA	AGEEGAAGGD	~P~Q~EA	~KPOEAAV~	~
<i>P.troglodytes</i>	~AG--AASGE	QAAAPGEEAA	AGEEGAAGGD	~P~Q~EA	~KPOEAAV~	~
<i>M.mulatta</i>	~AG--AASGE	QAAAPGEEAA	AGEEGAAGGD	~P~Q~EA	~KPEEAAV~	~
<i>B.taurus</i>	~AG--AAPGE	PTAAPGEEAA	AGEEGAAGGD	~P~Q~EA	~KPEEAAV~	~
<i>M.musculus</i>	QAGG-----	AGA~	~EGAGGE	~PREA~EA	A~EPE~	~
<i>R.norvegicus</i>	QAGG-----	AGAE~G~	~EGEGE	~SREA~EA	A~EPE~	~
<i>G.gallus</i>	~G~KAAAE	AS-----	~AAAAGS-	~R~EA	~AK~EEAGDS	QEAK~SDE~
<i>X.laervis</i>	~AKPATEE	~AP----	~AASCT	EEKKEEPAAD	A~SPE~V	ET~K~AEE~
<i>X.tropicalis</i>	~AKPATEE	~AP----	~AASST	EEKKEEPAAD	~SPEA~V	ET~K~AEE~
<i>O.latipes</i>	~AK~EE	AA~E---	~	~	REKPADEP~	~ESEE~
<i>T.nigroviridis</i>	DE~AKP~AEE	VT~	~	~PATEQTEA	EAKP~EP~	~
<i>G.acleatus</i>	~K~AEG	~TDEA~	~	~Q~A~A	SEK~	~AKPAEEE~
MARCKSa	NDEAK~	~TD~GAVEGV	S-----	~	~	~EKA
MARCKSb	EQ~K~K~	~	~DA	EP~EEA	~KPEA~	~SSEEAKA

	310	320	330	340	350	360
<i>H.sapiens</i>	~APE~KP--	~PASDETK	AA~EE~P~S	KV~EE~KKA	EA~	ASAAACEAPS
<i>P.troglodytes</i>	~APE~KP--	~PASDETK	AA~EE~P~S	KV~EE~KKA	EA~	ASAAACEAPS
<i>M.mulatta</i>	~APE~KP--	~PASDETK	AA~EE~P~S	KV~EE~K~AE	EA~	ASAAACEAPS
<i>B.taurus</i>	~APE~KP~	~PASEEAK	AV~EE~P~S	K~AEE~K~AE	EA~	VSAAGCEAPS
<i>M.musculus</i>	~QPE~QPE~	~QPAAEE~P	QA~EEQ~SE	A~AGE~KA~E	E~	PAPG ATA~G~DASS
<i>R.norvegicus</i>	~QPE~QPE~	~QPAAEE~P	RA~EE~FSE	AV~GE~KA~E	E~	PAPG ATA~DDAPS
<i>G.gallus</i>	~AAPE~KATG	~EEAP	~AAEEQ~QQ	QQQQE~KAAE	EA~	A~AATS
<i>X.laervis</i>	~AAPE~KP~	~	~S	~V~EEAKPAE	E~QKPE---E	KPAEEAPAPS
<i>X.tropicalis</i>	~AAPE~KPA	~	~	~V~EEAKPAE	E~QKPE---E	KPAEEAPAPV
<i>O.latipes</i>	~AAPE~KRV	~EEAP	KA~EEA~F~	KV~EEAPKVE	EAPKAAEA~P	KV~EEAPKIE
<i>T.nigroviridis</i>	~E~KEA	~EE~V	K~EAAPP~	~AEE~PKAE	EKQTEE~E	PKTEEA~
<i>G.acleatus</i>	~AEP~AKXRV	VVKPEAGR--	KAR--	~	~	~
MARCKSa	QTTEEA~	~K	T~EQNF~	~V~EETKPTS	PA~TE~E	SK~TE~PAVA
MARCKSb	ET~PAEEN-	~AEEP	AESSEKPS	EVAAE~KPAE	EKQEA~	~

	370	380	390	400	410	420
<i>H.sapiens</i>	AAGPGAPP~E	QEAPPA~EE~	PAA~AAASSA	CAAPS~	Q~EAQPECS	EAPPAAAE-
<i>P.troglodytes</i>	AAGPGAPP~E	QEAPPA~EE~	PAA~AAASSA	CAAPS~	Q~EAQPECS	EAPPAAAE-
<i>M.mulatta</i>	AAGPGAPP~E	QEAPPA~EE~	PA~VAAASSA	CAAPS~	Q~EAQPECS	EAPPAAAE-
<i>B.taurus</i>	AAGPGCPRA~	G~GAPR~EE~	AAP~PRASSA	CSAPS~	Q~EAQPECS	EAPPAAAE-
<i>M.musculus</i>	AA~G~P~E	QEAPPAATDE	AAASAAPAAS	PEP~	QPECSPEAPP	~APTAE~
<i>R.norvegicus</i>	AA~G~P~E	QEAPPAATDE	PAASAAPSAS	PEP~	QPECSPEAPP	~APVAE~
<i>G.gallus</i>	EAGSG~E	QEAPPA~EE~	PAAARQE~	~APS~	~ESSPE	G~P~AEPAE-
<i>X.laervis</i>	AAPEAPAT~E	PEA~PKAEE	PA~V~	~PT~	Q~EATSESS	~AADSAE-
<i>X.tropicalis</i>	AAPEAPST~E	PEA~PKAEE	PA~V~	~PT~	Q~EATSESS	~AADSAE-
<i>O.latipes</i>	EAPKVEEAPK	VVEAPKVEE~	PKVEEGPKE	EEAPKAEPS	Q~EAASEA~P	ASVP~EADQ~
<i>T.nigroviridis</i>	~PAS	QEAP~EE	APAA--	~	~	~
<i>G.acleatus</i>	~	~	~	~	~	~
MARCKSa	TEPS---P~S	QNEAAAAEES	~	~APSA~	Q~EV~ECS	EA~QAEATE
MARCKSb	~APQ	~E~PAAAE~	~SSEA~PA~	~	~	AATE-----

Figura 2. Alineamiento múltiple de secuencias proteicas de MARCKS incluyendo las dos proteínas identificadas en pez cebra MARCKSa y MARCKSb. Con recuadros se señalan los principales dominios conservados, la región de miristilación (Myr) señalada con la punta de flecha, el dominio MH2, y el dominio efector (ED) se indican con recuadros. MARCKSa presenta una inserción de cuatro residuos en las posiciones 32-35. El sombreado rojo indica residuos idénticos, el amarillo residuos similares. El alineamiento se realizó mediante clustalW2 y corregido manualmente. Los gaps insertados manualmente se indican con ~.

Utilizamos la misma estrategia para identificar los posibles homólogos de MRP. En este caso se utilizó como referencia la secuencia proteica de MRP de pollo (*G. gallus*). Obtuvimos otras dos secuencias candidatas que analizamos en detalle y que denominaremos en adelante MRPa y MRPb (figura 3). Estas secuencias también presentan características diagnósticas de una proteína de la familia MARCKS como se señala en la figura 4.

El residuo de metionina inicial se elimina cotraduccionalmente en todas las MARCKS conocidas, aunque será incluido en los alineamientos, ya que como es común a todas las secuencias de MARCKS encontradas no introducirá desviaciones mayores en el análisis. Para analizarlas, hicimos un alineamiento múltiple con ClustalW2 y luego se corrigió el alineamiento manualmente.

MRPa	MGSQ AASKGGV	AVEGKAAAAD	PAAV K TNGQE	NGHVKTNGDV	SAK AEGDAAT	50
MRPa	TNGS AEEAAKE	SEAGAGDAIE	PAPAAEGEAA	KPEGEATKET	PKKKKK FSL	100
MRPa	KNSFK FKGIS	LKSKK NAEV	KEEAAAAAPA	TEEKPEENGA	ATEEK KEEEA	150
MRPa	KAEET PAAPV	ETPKAEEPAA	KAEPAAAKE	AAAAPAVEAT	KQTEET NSTP	200
MRPa	APSEQ KE					207
MRPb	MGAQ LTKGEA	TVEGKAVAD K	ANGQENGHV K	TNGDVST K PD	GEAVAADGNG	50
MRPb	TAEVAK DEAP	KTEEGDGIEA	APATEAEASK	SDGEAA K ETK	KKKK FSLKNS	100
MRPb	FKFKG ISLKK	NKKA SEEAEE	AVATPTTAED	KPEENGQAAT	ETKEE EPAAE	150
MRPb	TNETP APEAE	AEPKVEEAEP	KAEPAAQ Q TE	TAPTEET T KS	EESPA PVEET	200
MRPb	TPTESS DPEP	AAE				213

Figura 3. Secuencias de las dos proteínas MRP parálogas identificadas en el pez cebra. Se señalan las posibles regiones funcionales, dominio de miristilación, dominio MH2, y dominio efector, respectivamente. (A) MRPa; (B) MRPb.

Myr 10 20 30 40 50 60

H.sapiens MGSQS SSKAPR G---DVTAE E AAGASPAKAN GOENGHVKS N GDLSPKGE-G ESPPV--NGT

P.troglodytes -----MENGHVKS N GDLSPKGE-G ESPPV--NGT

M.mulatta MGSQS SSKAPR G---DVTAE E AAGASPAKAN GOENGHVKS N GDLSPKGE-G ESPPV--NGT

B.taurus MGSQS SSKAPR G---DVTAE E AAGASPAKVN GOENGHVKS N GDLSPKGE-G ESPPV--NGT

R.norvegicus MGSQS SSKAPR G---DVTAE E AAGASPAKAN GOENGHVKS N GDLTPKGE-G ESPPV--NGA

M.musculus MGSQS SSKAPR G---DVTAE E AAGASPAKAN GOENGHVRS N GDLTPKGE-G ESPPV--NGT

G.gallus MGSQGSKA A AEGSDPPGG N AAVTEPSKAN GOENGHVRLN GDMTPKAG-G DPTPL--NGA

X.laevis MGSIESKSKS V-----DISTANKOPE QOENGHVKTN GDAPTKQN-G EAAPT--NGS

X.tropicalis MGSIESKSKS A-----DIST-NKPAE QOENGHVKAN GDAPTKQN-G DAVES--NGS

T.nigroviridis MGNVSKTAG KEEAAVEKPG EGAAVAAKAN GOENGHAKTN GLASPAAENA SKAEVQVNGS

O.latipes MGSQS SSKGEV S--AEAGAAA AADAAAVKTN GOENGHVKTN GDVSSKAD-G DAAAT--NGS

MRPa MGSQASKGGV A--VEG-KAA AADPAAVKTN GOENGHVKTN GDVSAKAE-G DAATT--NGS

MRPb MGAQLTKGEA T--VEG---- --KAVADKAN GOENGHVKTN GDVSTKPD-G EAVAADGNGT

MH2

70 80 90 100 110 120

H.sapiens -----DEAAGATG DAIEPAPTSQ GAEAK---GE VPPKETP-KK KKKFSFKKP-

P.troglodytes -----DEAAGATG DAIEPAPPSQ GAEAK---GE VPPKETP-KK KKKFSFKKP-

M.mulatta -----DEAAGATG DAIEPAPPSQ GAEAK---GE VPPKETP-KK KKKFSFKKP-

B.taurus -----DEAAGATG DAIEPAPPSQ GAEAK---GE VPPKETP-KK KKKFSFKKP-

R.norvegicus -----DEAAGATG DAIEPAPPSQ EAEAK---GE VAPKETP-KK KKKFSFKKP-

M.musculus -----DEAAGATG DAIEPAPPSQ EAEAK---GE VAPKETP-KK KKKFSFKKP-

G.gallus GSAEPPRE-- DGTGGAGE DTIEPAPPAD GGEAKPE-GA AAPKDTF-KK KKKFSFKKS-

X.laevis AEP----- --PAEAAESG ETIESAPPAN GPKPED--- --PPGKQAKK KKRFSFKNL-

X.tropicalis AES----- --PAEAAESG EAIESAPPAN GSKPED--- --EPGKQAKK KKRFSFKNL-

T.nigroviridis TPTEEAPKEG GENVEGAEAN GEKEPAATNG EASAKPEEET PSTSEDKQK KKRFSFKKPS

O.latipes AEA AK----- EPEAGAG- DAIEPAPAAD GEATKPE-GE AA AKETPKKK KKKFSLKKS-

MRPa AEA AK----- ESEAGAG- DAIEPAPAAE GEAAKPE-GE -ATKETPKKK KKKFSLKNS-

MRPb AEA VAKD----- EAPKTEEG- DGT EAA PATE AEASKSD-GE -AAKET--KK KKKFSLKNS-

130 140 150 160 170 180

H.sapiens FKLSGLSFKR NRK-EGGGDS SASSPTEEEQ EQGEIGACSD EGTAQEGKAA --ATPESQE-

P.troglodytes FKLSGLSFKR NRK-EGGGDS SASSPTEEEQ EQGEIGACSD EGTAQEGKAA --ATPESQE-

M.mulatta FKLSGLSFKR NRK-EGGGDS SASSPTEEEQ EQGEIGACSD EGTAQEGKAA --ATPESQE-

B.taurus FKLSGLSFKR NRK-EGGGDS SASSPTEEEQ EQGEISACGE EGTAQEGKAA --ATPESQE-

R.norvegicus FKLSGLSFKR NRK-EGGGDS SASSPTEEEQ EQGEISACSD EGTAQEGKAA --ATPESQE-

M.musculus FKLSGLSFKR NRK-EGGGDS SASSPTEEEQ EQGEMSASSD EGTAQEGKAA --ATPESQE-

G.gallus FKLSGISFRK NKK-DDG-DS AASSPTEE-Q SKAEPKAEED PASGTAPQEE --RSGEQSG

X.laevis -KFGNPFERK TKK---EQAP EEETPVDESA TGSPQEPETK DGA AETSPEA APENGECNTA

X.tropicalis -KFGNPFERK TKK---DQAP GEETPADEGA TGSPQEPETK DGA VEAPEA TGENGECETA

T.nigroviridis FKLSGFSFKK TKK---ESE EGAAAAGETT AE G E KAPASE EAPADEKPAD SGEKEAEKAA

O.latipes ENIK-LNLKK SKKSEVVKEE GAAAAAPSEE KPAENGAAAP AE EKKEEVKE --EDAAAAAE

MRPa FKFKGISLKK SKKNAEVKEE AAAAAAPATEE KPEENGAAATE EKKEEAKAE --ETPAAPVE

MRPb FKFKGISLKK NKKASEEAAE AVATPTTAE D KPEENGQAAT ETKEEPAAE TNETPAPEAE

ED

190 200 210 220 230

H.sapiens PQA KGA EASA AS-----EEE AG----PQAT EPSTPSGPES GPTPASAEQN E--

P.troglodytes PQA KGA EASA AS-----EEE AG----PQAT EPSTPSGPES GPTPASAEQN E--

M.mulatta PQA KGA EASA AS-----EEE AG----PQAT EPSTPSGPES GPTPASAEQN E--

B.taurus PQA KGA EASA AAKGGD-TEE AG----PQAA EPSTPSGPES DPAPAS-EQN E--

R.norvegicus PQA KGA EASA VSKGGDAEEE AG----PQAA EPSTPSGPES GPASASAE NE ---

M.musculus PQA KGA EASA ASKEGDTEEE AG----PQAA EPSTPSGPES GPTPASAEQN E--

G.gallus AEPEGAAGGP GA EEEKPPAE NR----GDA A AQPPPEP-T AAEPAAAEQK EE-

X.laevis APSSDNTEEV QPEPAALPPT ED----SPK PVESEANTEA PSEPQKQEE ---

X.tropicalis APSSDTIEEV QPEAAALPPT ED----SPK PVESEASTE A PSEPQKQEE ---

T.nigroviridis SEEPKSEGEA KA QEEEEAEA AE----EKP AEASPTPET AASPEA---- ---

O.latipes A-PKAEEGPA KEETPKKEAK ---EAAAPA PEATKPAES SSTPASSEKK E--

MRPa T-PKAEEPA KA EEPAAQKE ---EAAAPA VEATKQTEET NSTPAPSEQK E--

MRPb AEPKVEEAEP KA EEPAAQTE TAPTEETTKS EESAPVEET TPTESSDPEP AAE

Figura 4. Alineamiento múltiple de secuencias proteicas de MRP incluyendo las dos proteínas identificadas en pez cebra MRPa y MRPb. Con recuadros se señalan los principales dominios conservados, la región de miristilación (Myr), el dominio MH2, y el dominio efector (ED). El sombreado rojo indica residuos idénticos, el amarillo residuos similares.

1.1.1. Análisis pareado de las secuencias de las MARCKS y MRP

Para determinar comparativamente su nivel de conservación, realizamos un alineamiento pareado de las secuencias proteicas de MARCKSa y MARCKSb utilizando el programa EMBOSS Stretcher. Ambas proteínas presentaron entre sí un 46,3% de identidad, y un 56,5% de similitud en la secuencia proteica (figura 5). Realizamos el mismo análisis para las secuencias de MRPa y MRPb. Ambas proteínas presentaron entre sí un 55,4% de identidad, y un 61,3% de similitud en la secuencia, todo lo cual se indica en la figura 6.

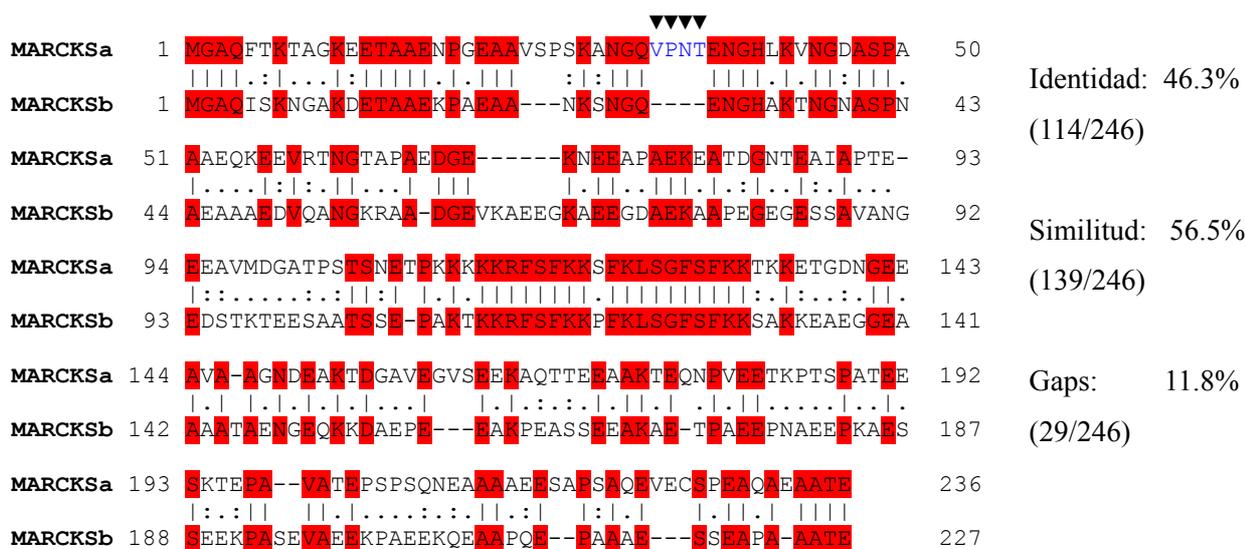
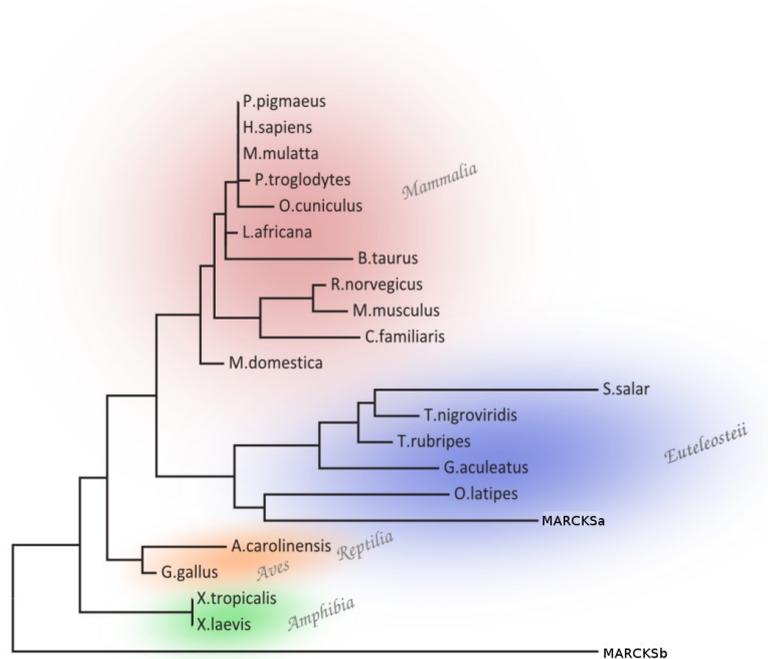


Figura 5. Alineamiento pareado de las secuencias de las MARCKS del pez cebra. En rojo se indican residuos idénticos. En azul se indican los cuatro residuos de la inserción de MARCKSa (puntas de flecha).

A



B

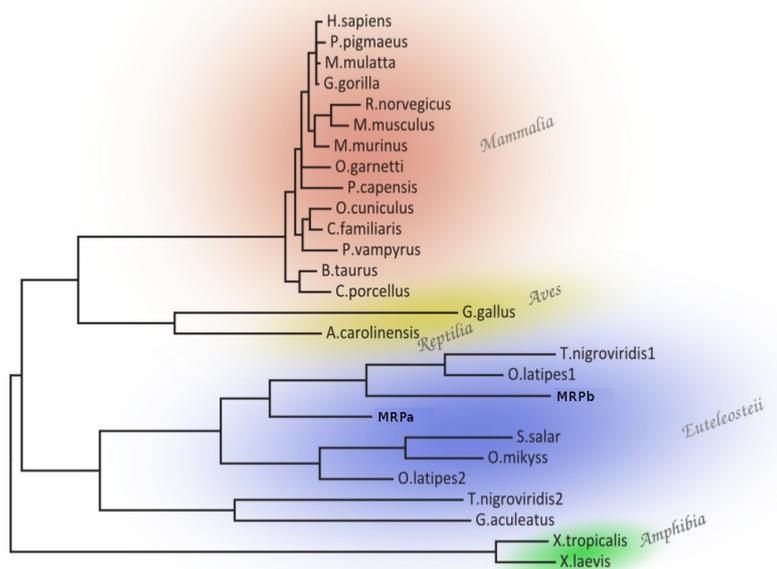


Figura 7. Filograma de máxima verosimilitud (phylogeny.fr) elaborado con las secuencias proteicas de las MARCKS de diversos grupos de vertebrados utilizando el algoritmo aRLT. La longitud de las ramas es proporcional a la divergencia entre las ramas de un nodo. La secuencia indicada como D. rerio 2, correspondiente a la traducción de *marcksb* no sólo queda excluida del clado de los peces teleósteos sino que queda como grupo externo (A). Filograma de máxima verosimilitud (phylogeny.fr) elaborado con las secuencias proteicas de las MRP de diversos grupos de vertebrados utilizando el algoritmo aRLT. La longitud de las ramas es proporcional a la divergencia entre las ramas de un nodo (B).

Realizamos además alineamientos locales pareados de las secuencias de MARCKSa, MARCKSb, MRPa y MRPb con sus correspondientes homólogos de especies pertenecientes a

diferentes grupos de vertebrados (mamíferos, aves, anfibios y peces) con el fin de determinar los porcentajes de identidad entre ellas (tabla R-1).

Tabla R-1. Porcentajes de identidad* entre las secuencias de proteínas de la familia MARCKS del pez cebra y sus correspondientes homólogas en otros vertebrados.

	MARCKSa	MARCKSb	MRPa	MRPb
<i>H. sapiens</i>	45,1	40,5	47,7	40,2
<i>G. gallus</i>	49,6	50,2	43,9	37,8
<i>X. tropicalis</i>	59,1	46,7	40,6	36,2
<i>T. nigroviridis</i>	51,8	46,7	44,0	39,2

* Obtenidos mediante alineamientos locales.

1.1.3. Análisis teórico de las propiedades de las proteínas de la familia MARCKS del pez cebra

Analizamos las secuencias proteicas con el fin de determinar algunos de sus parámetros fisicoquímicos.

1.1.3.1. MARCKSa

La proteína posee 236 residuos aminoacídicos, incluyendo la metionina inicial, y no posee residuos de triptófano ni de tirosina. En la figura 8A se muestra la composición porcentual en aminoácidos. Presenta un punto isoeléctrico (pI) teórico de 4,47 y un peso molecular calculado de 24,5 kDa. Si se hace una analogía con las MARCKS de otros vertebrados de los que existen datos bioquímicos, podría suponerse que la Met inicial se pierde, modificando estos parámetros.

Evaluamos los posibles sitios de fosforilación, identificando 14 residuos de serina, y 5 residuos de treonina fosforilables con una probabilidad mayor a 70%, como se muestra en la tabla R-2. De ellos 7 de serina y dos de treonina presentaron una probabilidad de más de 95% en la predicción (sombreados en gris en la tabla R-2). Es de destacar que el residuo de serina de la posición 25 que previamente hemos señalado como homólogo al de la proteína MARCKS de pollo en un consenso de fosforilación por Cdks presenta una probabilidad menor al 95%. Como referencia se realizó el mismo análisis a la secuencia de MARCKS de pollo y de la proteína recombinante de humano, de las que existen datos experimentales sobre la fosforilación del residuo S25, y la secuencia de pollo presentó una probabilidad de 77%, mientras que la de humano presentó un 87% de probabilidad de fosforilación.

Tabla R-2. Predicción de sitios de fosforilación de la proteína MARCKSa en función del contexto.

Posición	Contexto	Probabilidad*	Residuo
25	EAAVSPSKA	0,930	*S*
48	NGDASPAAA	0,925	*S*
106	TPSTSNETP	0,954	*S*
118	KKRFSFKKS	0,998	*S*
122	SFKKSFKLS	0,919	*S*
126	SFKLSGFSF	0,731	*S*
129	LSGFSFKKT	0,993	*S*
162	VEGVSEEKA	0,962	*S*
187	TKPTSPATE	0,985	*S*
193	ATEESKTEP	0,949	*S*
204	ATEPSQSN	0,854	*S*
206	EPSPSQNEA	0,992	*S*
219	ESAPSAQEV	0,955	*S*
226	EVECSPEAQ	0,929	*S*
105	ATPSTSNET	0,810	*T*
109	TSNETPKKK	0,869	*T*
133	SFKKTKKET	0,985	*T*
168	EKAQTTEEA	0,968	*T*
169	KAQTTEEAA	0,738	*T*

* Se reportan los sitios con $p < 0,3$.

Se sombrea en gris las secuencias con $p < 0,05$.

La predicción de sitios de miristilación indicó a la glicina de la posición 2 como la única miristilable con un valor p de $8,19 \times 10^{-5}$. Como valor de referencia se utilizó la predicción realizada sobre la secuencia de MARCKS de pollo que indicó el residuo homólogo con un valor p de 1.38×10^{-5} .

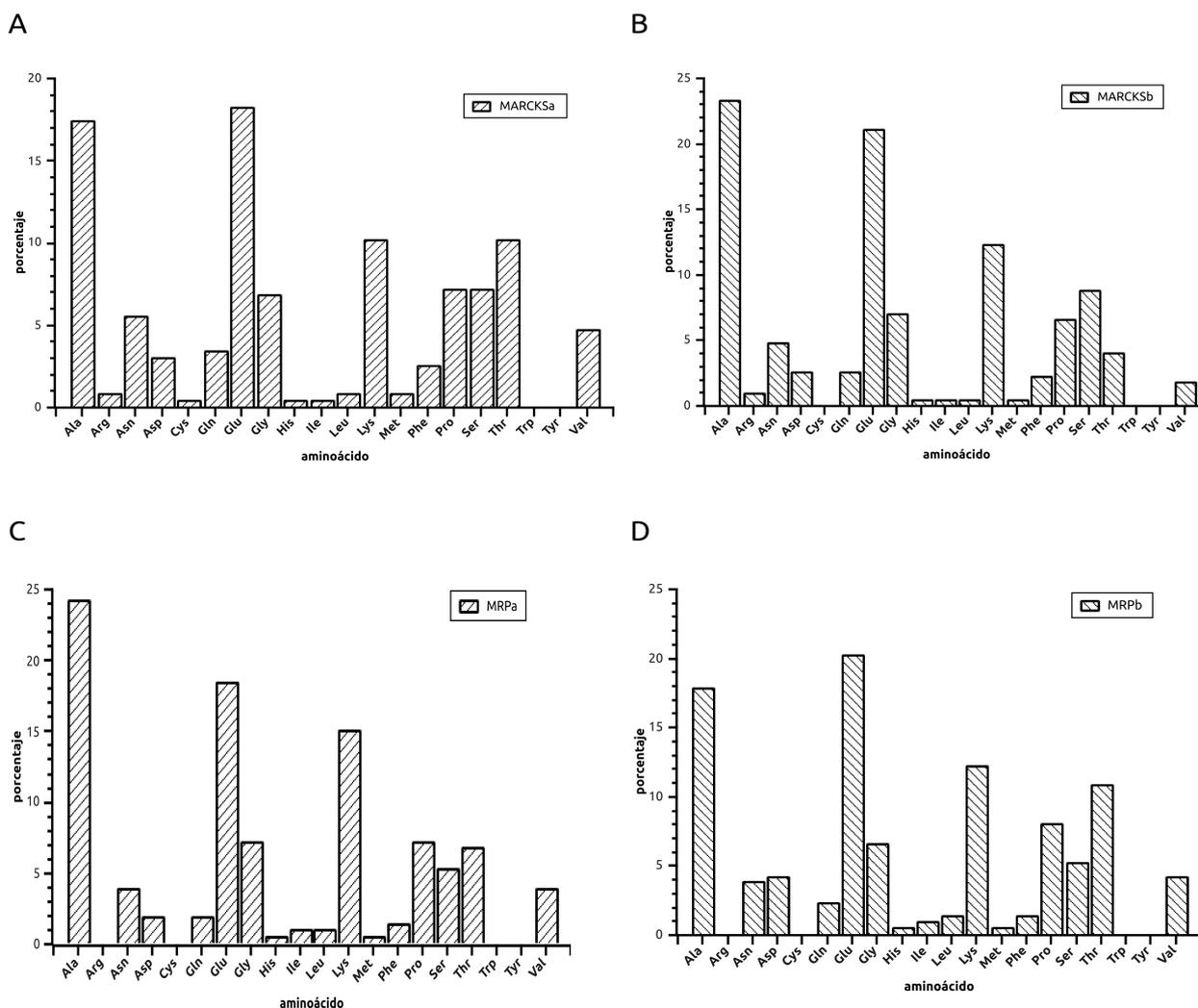


Figura 8. Composición aminoacídica porcentual de las proteínas de la familia MARCKS. MARCKSa (A), MARCKSb (B), MRPa (C), MRPb (D).

1.1.3.2. MARCKSb

La proteína posee 227 residuos aminoacídicos, y no posee residuos de cisteína, triptófano ni tirosina. En la figura 8B se muestra la composición porcentual de uso de aminoácidos. La proteína presenta un punto isoeléctrico (pI) teórico de 4,54 y un peso molecular calculado de 23,2 kDa.

La predicción de sitios de fosforilación arrojó doce sitios putativos de fosforilación en residuos de serina y cuatro en residuos de treonina con probabilidad mayor al 70%, de los cuales once de serina y dos de treonina superaron el 95% de probabilidad en la predicción, y se indican en la tabla R-3. La predicción de sitios de miristilación indicó a la glicina de la posición 2 como la única miristilable con un valor p de $1,43 \times 10^{-5}$.

Tabla R-3. Predicción de sitios de fosforilación de la proteína MARCKSb en función del contexto.

Posición	Contexto	Probabilidad*	Residuo
41	NGNASPNAE	0,97	*S*
95	NGEDSTKTE	0,992	*S*
105	SAATSSEPA	0,992	*S*
116	KKRFSFKKP	0,998	*S*
127	LSGFSFKKS	0,979	*S*
131	SFKKSAKKE	0,986	*S*
165	KPEASSEEA	0,997	*S*
166	PEASSEEA	0,986	*S*
187	PKAESSEEK	0,997	*S*
188	KAESSEK	0,984	*S*
194	EKPASEVAE	0,975	*S*
218	AAAESEAP	0,938	*S*
96	GEDSTKTEE	0,787	*T*
104	ESAATSSEP	0,858	*T*
111	EPAKTKKRF	0,976	*T*
173	AKAETPAEE	0,932	*T*

* Se reportan los sitios con $p < 0,3$.

Se somborean en gris las secuencias con $p < 0,05$.

1.1.3.3. MRPa

La proteína posee 207 residuos aminoacídicos, y no posee residuos de arginina, cisteína, triptófano ni tirosina. En la figura 8C se muestra la composición porcentual de uso de aminoácidos.

MRPa presenta un punto isoelectrico (pI) teórico de 4,92 y un peso molecular de 21,0 kDa, 7 residuos de serina y 3 de treonina en secuencias consenso de fosforilación con probabilidad mayor a 70% (tabla R-4). De estos, sólo cinco residuos de serina y dos de treonina superaron el 95% de probabilidad en la predicción.

El residuo de glicina de la posición 2 se encontraba en una secuencia consenso de miristilación y determinamos que era la única miristilable con un valor p de $5,74 \times 10^{-5}$.

Tabla R-4. Predicción de sitios de fosforilación de la proteína MRPa en función del contexto.

Posición	Contexto	Probabilidad*	Residuo
41	NGDVSAKAE	0,993	*S*
54	TTNGSAEAA	0,931	*S*
99	KKKFSLKNS	0,997	*S*
103	SLKNSFKFK	0,711	*S*
110	FKGISLKKS	0,98	*S*
114	SLKKSKKNA	0,997	*S*
198	EETNSTPAP	0,735	*S*
90	ATKETPKKK	0,951	*T*
155	KAEETPAAP	0,863	*T*
162	APVETPKAE	0,979	*T*

* Se reportan los sitios con $p < 0,3$.

Se sombrea en gris las secuencias con $p < 0,05$.

1.1.3.4. MRPb

La proteína posee 213 residuos aminoacídicos, y no posee residuos de arginina, cisteína, triptófano ni tirosina. En la figura 8D se muestra la composición porcentual de uso de aminoácidos.

MRPb presenta un punto isoeléctrico (pI) teórico de 4,42 y un peso molecular de 22,1 kDa. Once de sus residuos de serina y 8 de sus residuos de treonina se encuentran en secuencias consenso de fosforilación, con una probabilidad superior a 70%. Nueve de esos residuos de serina superaron el 95% de probabilidad, mientras que sólo dos de treonina superaron ese umbral (sombreados en la tabla R-5). La predicción de sitios miristilables indicó con un valor p de $1,42 \times 10^{-3}$ que la glicina de la posición 2 era la única miristilable.

Tabla R-5. Predicción de sitios de fosforilación de la proteína MRpb en función del contexto.

Posición	Contexto	Probabilidad*	Residuo
36	NGDVSTKPD	0,995	*S*
79	EAEASKSDG	0,997	*S*
81	EASKSDGEA	0,992	*S*
96	KKKFSLKNS	0,997	*S*
100	SLKNSFKFK	0,711	*S*
107	FKGISLKKN	0,971	*S*
115	NKKASEEAA	0,997	*S*
190	ETTKSEESP	0,985	*S*
193	KSEESPAPV	0,982	*S*
205	TPTESSDPE	0,879	*S*
206	PTTESSDPEP	0,966	*S*
6	GAQLTKGEA	0,926	*T*
89	AAKETKTKK	0,821	*T*
126	VATPTTAED	0,724	*T*
142	AATETKEEE	0,900	*T*
154	ETNETPAPE	0,717	*T*
187	PTEETTKSE	0,981	*T*
188	TEETTKSEE	0,958	*T*
201	VEETTPTES	0,985	*T*

* Se reportan los sitios con $p < 0,3$.

Se somborean en gris las secuencias con $p < 0,05$.

1.2. Identificación de secuencias de ARN mensajero

Obtuvimos las secuencias de ARNm que codifican estas secuencias proteicas mediante una búsqueda por alineamientos locales con las bases de datos de ADNcs derivados de transcritos no redundantes (refseq_ARNm) mediante tblastx a partir de las secuencias proteicas. Todos los mensajeros presentaban un contenido GC de alrededor de 43% a excepción de *mrpa*, que presentó el menor contenido GC del grupo no superando el 40%. Los detalles numéricos se muestran en la tabla R-6.

Tabla R-6. Características de los ADNcs de los genes de la familia *marcks* del pez cebra.

Gen	acceso en GenBank	Longitud (nt)	contenido GC
<i>marcksa</i>	BC095101	1674	43,1%
<i>marcksb</i>	BC092814	1873	43,8%
<i>mrpa</i>	NM_213223	1696	39,3%
<i>mrpb</i>	NM_213133	1690	43,4%

1.2.1. Análisis comparativo de las secuencias de ADNcs *marcksa* y *marcksb*.

1.2.1.1. Identidad entre *marcksa* y *marcksb* con secuencias ortólogas de vertebrados.

Realizamos alineamientos pareados de la secuencia de *marcksa* con secuencias homólogas disponibles de vertebrados representativos de diferentes grupos: peces, anfibios, reptiles, aves y mamíferos. Independientemente se realizó el mismo análisis para la secuencia de *marcksb*. En la tabla R-7 se muestran los datos. Nótese que los porcentajes de identidad más elevados (en el entorno del 50%) tienen lugar cuando se compara con el salmónido *S. salar* y con los anfibios *X. laevis* y *X. tropicalis*.

Tabla R-7. Análisis por alineamiento pareado de los porcentajes de identidad de *marcksa* y *marcksb* con las secuencias de ADNcs codificantes para las proteínas MARCKS de vertebrados representativos de diferentes grupos filogenéticos.

<i>marcksa</i>	identidad*	<i>marcksb</i>	identidad
<i>S. salar</i>	53,3%	<i>S. salar</i>	52,3%
<i>X. tropicalis</i>	50,3%	<i>X. laevis</i>	50,1%
<i>X. laevis</i>	49,7%	<i>X. tropicalis</i>	49,8%
<i>G. gallus</i>	48,1%	<i>B. taurus</i>	46,9%
<i>B. taurus</i>	46,4%	<i>G. gallus</i>	46,3%
<i>H. sapiens</i>	45,7%	<i>H. sapiens</i>	45,7%
<i>O. latipes</i>	38,7%	<i>O. latipes</i>	37,0%
<i>A. carolinensis</i>	35,3%	<i>M. musculus</i>	32,5%
<i>T. rubripes</i>	32,4%	<i>A. carolinensis</i>	31,6%
<i>M. musculus</i>	28,6%	<i>R. norvegicus</i>	30,5%
<i>R. norvegicus</i>	27,4%	<i>T. rubripes</i>	28,8%

* Según datos de alineamiento pareado.

Las relaciones entre las secuencias de ARNs de *marcks* de los diferentes grupos de vertebrados se ilustran de modo gráfico en la figura 9A.

Realizamos además alineamientos pareados de la secuencia de *mrpa* con secuencias disponibles de vertebrados representativos de diferentes grupos: peces, anfibios, reptiles, aves y mamíferos. Independientemente se realizó el mismo análisis para la secuencia de *mrpb*. En la tabla R-8 se muestran los datos. Nótese que los porcentajes de identidad con los roedores son más elevados que en el caso de las *marcks a* y *b*. Los niveles más elevados de identidad (en el entorno

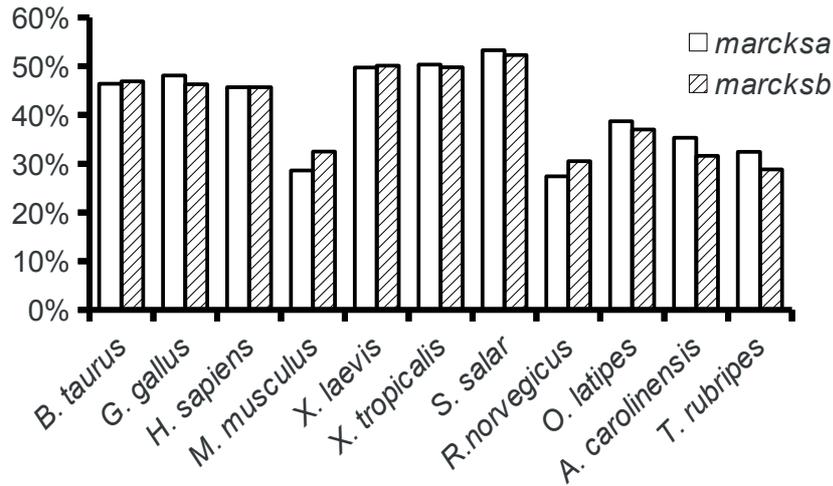
del 50%) se encuentran con la trucha arcoiris (*O. mykiss*).

Tabla R-8. Análisis por alineamiento pareado de los porcentajes de identidad de *mrpa* y *mrpb* con las secuencias de ADNcs codificantes para las proteínas MRPs de vertebrados representativos de diferentes grupos filogenéticos.

<i>mrpa</i>	identidad*	<i>mrpb</i>	identidad
<i>O. mykiss</i>	49,9%	<i>H. sapiens</i>	47,3%
<i>S. salar</i>	47,9%	<i>B. taurus</i>	46,9%
<i>B. taurus</i>	47,2%	<i>X. laevis</i>	46,8%
<i>R. norvegicus</i>	46,8%	<i>G. gallus</i>	46,4%
<i>X. laevis</i>	46,1%	<i>R. norvegicus</i>	46,1%
<i>H. sapiens</i>	46,0%	<i>M. musculus</i>	45,3%
<i>M. musculus</i>	45,8%	<i>O. mykiss</i>	44,2%
<i>G. gallus</i>	43,9%	<i>S. salar</i>	43,3%
<i>A. carolinensis</i>	29,0%	<i>A. carolinensis</i>	29,4%

* Según datos de alineamiento pareado.

A



B

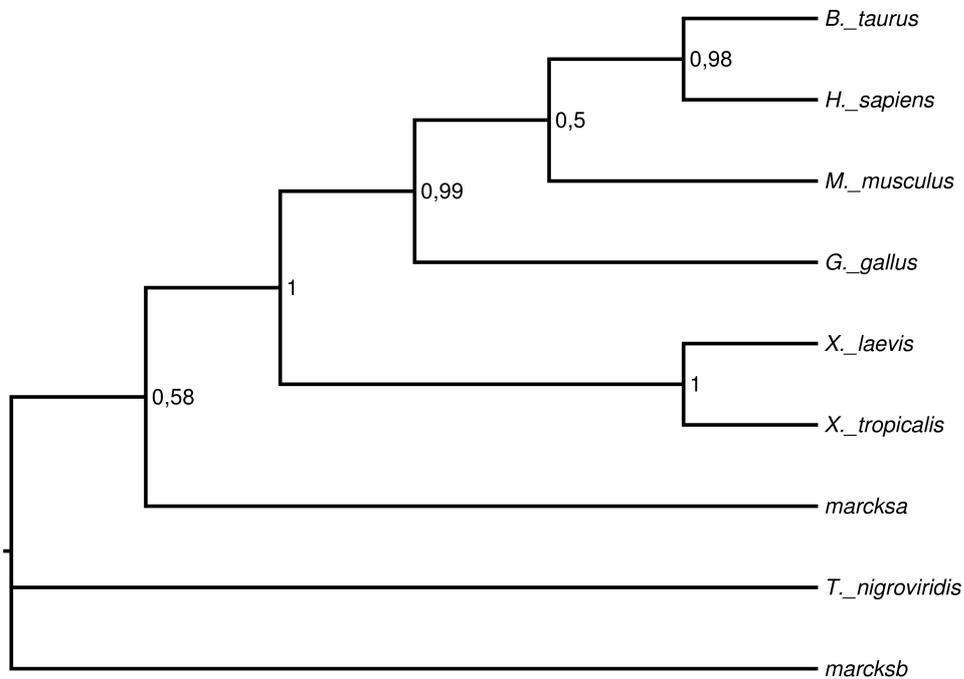


Figura 9. (A) Identidad porcentual de los ARNms marcks de diferentes especies respecto a los mensajeros de pez cebra marcksa y marcksb respectivamente. Datos de alineamientos pareados independientes.

(B) Árbol de máxima parsimonia de las secuencias de ADNcs de marcks de diferentes grupos de vertebrados. El soporte estadístico que se indica en los nodos se realizó mediante un análisis de bootstrap (1000 iteraciones). Se colapsaron los nodos con probabilidad menor a 0,5.

1.2.1.2. Relaciones filogenéticas entre secuencias de mensajeros homólogos de la familia *marcks*

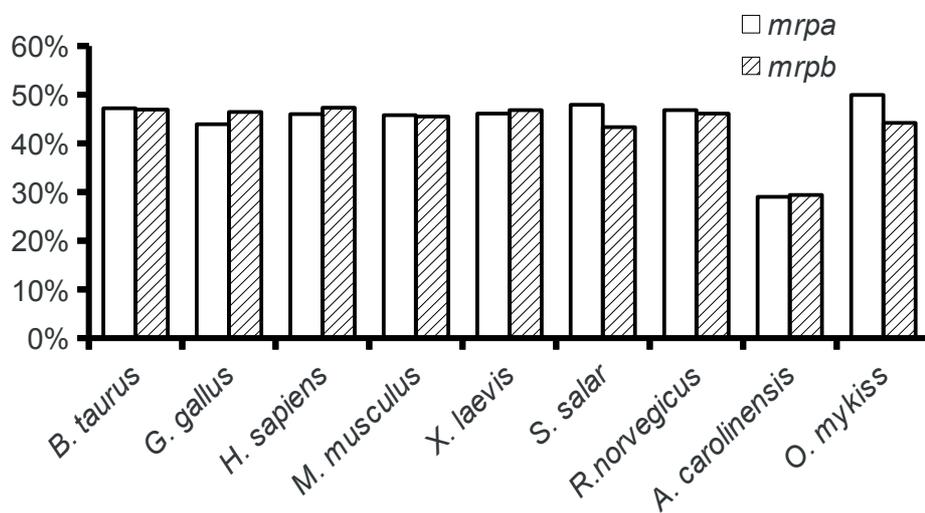
Las secuencias que revelaron mayor divergencia ante el análisis de bootstrap son las de los mensajeros *marcks* de *Tetraodon nigroviridis* (Tetraodontiformes) y *marcksb* (*D. rerio* 2) del pez

cebra. El análisis señala al mensajero de *marcksa* divergiendo de estas secuencias basales con un peso de bootstrap de 0,58, lo que aporta un dato que las secuencias proteicas no permitieron inferir.

Las relaciones entre las secuencias de ADNcs de *mrp* de los diferentes grupos de vertebrados se ilustran de modo gráfico en la figura 10A. Elaboramos para los *mrp* un árbol filogenético de Bootstrap (1000 iteraciones) con el algoritmo de máxima parsimonia. En la figura 10 B sólo se muestran las bifurcaciones que presentan un apoyo estadístico mayor a 0.5.

A diferencia de lo que ocurre con los ADNcs correspondientes a los genes *marcksa* y *marcksb*, *mrpa* y *mrpb* presentan mayor grado de similitud entre sí y ambas se agupan en un clado basal con un peso estadístico del análisis de bootstrap de 0,93.

A



B

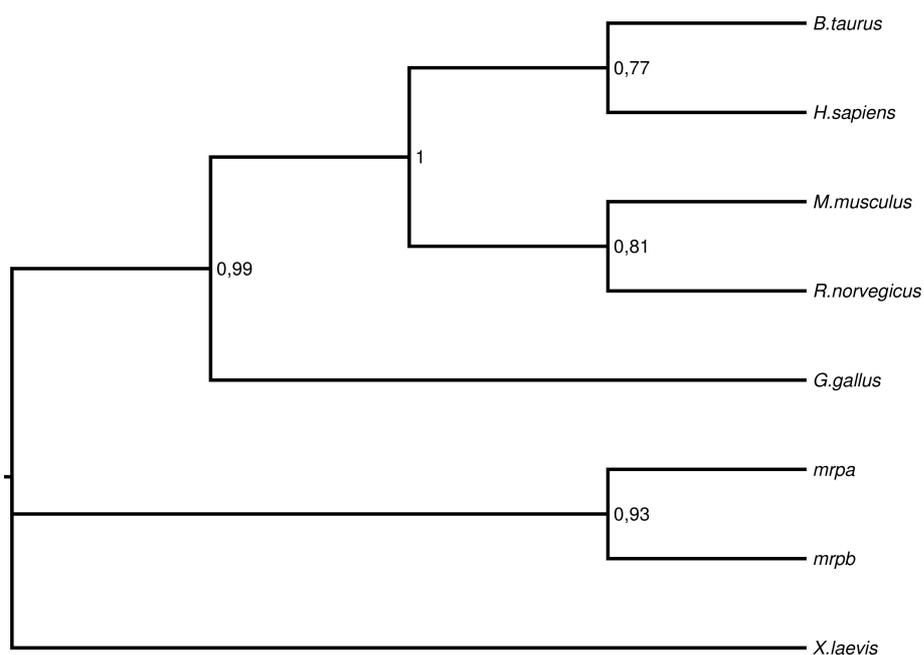


Figura 10. (A) Identidad porcentual de los ARNm de *mrp* de diferentes especies respecto a los mensajeros de pez cebra *mrpa* y *mrpb* respectivamente. Datos de alineamientos pareados independientes. (B) Árbol de máxima parsimonia de las secuencias de ADNc correspondientes a *mrp* de diferentes grupos de vertebrados. Los número en la base de los nodos representan el peso estadístico del análisis de bootstrap (1000 iteraciones) expresado porcentualmente. Se colapsaron los nodos con probabilidad menor a 0,5.

1.2.3. Análisis de los elementos regulatorios presentes en los ARNm

1.2.3.1. Sitios de unión a microARNs (miARNs)

Con el propósito de valorar los candidatos realizamos un tamizado de los microARNs con mayor puntaje en función de los patrones de expresión espaciales (hibridación *in situ*) y/o temporales (RNA-seq) conocidos (Chen *et al.*, 2005; Wienholds *et al.*, 2005), de los cuales seleccionamos los 2 candidatos mejor puntuados que además se expresaran durante el desarrollo en la ventana temporal de las 0 – 48 hpf.

La búsqueda de sitios putativos de unión a microARNs mostró la presencia de secuencias de unión de miARNs que podrían regular la expresión de *marcksa* y *marcksb* (tablas R9 y R10), así como de *mrpa* y *mrpb* (tablas R-11 y R-12 respectivamente).

Tabla R-9. microARNs con secuencias *seed* de unión putativa a los mensajeros de *marcksa* (Ensembl *id:ENSDARG00000004049*).

Rfam ID ¹	Score	Energía ²	Base P ³	Poisson P ⁴	Org P ⁵	Inicio	Fin	Alineamiento
dre-miR-30e*	17.257	-17.37	4.058680e-02	4.058680e-02	4.058680e-02	704	726	GAAG-GUCAGUCCUACAAUGU : : : : TTTCGCTGCTGAAGGTGTTACA
dre-miR-30d*	16.7404	-17.11	4.574790e-02	4.574790e-02	4.574790e-02	704	726	GAAG-GUCAGCCCUACAAUGU : : : : TTTCGCTGCTGAAGGTGTTACA
dre-miR-458	16.5337	-17.58	3.745300e-02	3.676030e-02	3.676030e-02	147	167	CGUCAUGGUAAGUUUCUGAUA : : : : : : : GTGGTGT-TTTATAGAGCTGT
dre-miR-459	16.1203	-15.01	4.923290e-02	4.804060e-02	9.440230e-03	374	395	UCCUACUUAGGAACAAUGAC : : : GGCGTTTAACTGTGTACTG
dre-miR-10d	15.6352	-26.8	4.169550e-02	4.169550e-02	4.169550e-02	438	462	UGUGUAAGCC--AAGAUGUCCCA : : : GCACGTTTGGATTCTACATGGT
dre-miR-29b	15.5003	-17.87	8.470790e-02	8.121940e-02	1.141870e-02	134	155	GUGACUAAAGUUUACCACGA : : CACTTGTCTCATGTGGTGT

1. <http://rfam.sanger.ac.uk/>

2. El parámetro Energy se computa con las rutinas del paquete Vienna RNA folding y es una medida de la estabilidad termodinámica de un dúplex.

3. P-base es el valor p base; se calcula con los parámetros de distribución derivados del background genómico de los scores de miRanda.

4. Poisson P es la probabilidad de que un transcripto dado posea más de un evento de apareamiento significativo (hit) asumiendo una distribución de tipo Poisson (aplicable a eventos raros).

5. Org P (P-ortólogo) representa la probabilidad estimada de que una misma familia de miARNs se aparee con múltiples transcriptos en más de una especie en un grupo ortólogo, computando el grado de conservación de secuencia en los extremos 3'-UTR.

*. Mejor candidato ponderando el puntaje de MicroCosm y los patrones de expresión espaciotemporales conocidos.

1.2.3.2 Búsqueda de otros elementos regulatorios

La búsqueda de secuencias consenso de regulación presentes en los ARN mensajeros de los genes de la familia *marcks* indicó que existían sitios de regulación por microARNs denominados cajas K en las ubicaciones señaladas en la tabla R-13. No identificamos regiones análogas al elemento tipo ARES rico en CU descrito en los mensajeros del gen homólogo de ratón: *macs* (Wein *et al.*, 2003). Como control, sometimos al mensajero de ratón al mismo tipo de análisis, identificando dos sitios caja K que hasta el momento no habían sido descritos y la región rica en CU antes mencionada.

Tabla R-13. Elementos regulatorios adicionales encontrados en las secuencias de cDNA de los genes *marcks* de pez cebra.

mensajero	elemento	secuencia	posición
<i>marcksa</i>	Caja K	CTGTTATA	1006-1013
<i>marcksb</i>	Caja K	CTGTGTTA	1313-1320
<i>macs*</i>	Caja K	CTGTGATA	2348-2355
	Caja K	CTGTGGTA	2378-2385

* Es el gen ortólogo en el ratón.

Encontramos además en los mensajeros de las *mrp* la presencia de regiones ricas en AC en el extremo 3'-UTR asociadas con elementos de regulación de la estabilidad del ARN tipo ARES. Su secuencia, localización y tamaño se indican en la tabla R-14.

Tabla R-14. Elementos regulatorios adicionales encontrados en las secuencias de cDNA de los genes *mrp* de pez cebra.

mensajero	elemento	secuencia	posición
<i>mrpa</i>	Caja K	CTGTGTTA	4487-4494
	ARE (rico en AU)	TATTTATAT	3568-3576
	ADH DRE‡	AAGGCTGA	3404-3411
<i>mrpb</i>	ARE (rico en AU)	TATTTATTT	2723-2731
	Caja K	CTGTGAAA	1451-1458
<i>mrp*</i>	-		

* Es el gen homólogo en el ratón.

‡ Elemento asociado a estabilidad

1.3. Secuencias genómicas

Con el propósito de caracterizar las secuencias genómicas de los genes de la familia *marcks* del pez cebra y determinar la presencia de intrones en la secuencia génica realizamos alineamientos con el software Spidey de las secuencias de bibliotecas de cDNA utilizando como base de datos el ensamble de genoma zv9 del pez cebra (tabla R-15).

1.3.1. Los genes *marcks* y *mrp*

La secuencia genómica de *marcksa* mapea en el cromosoma 20 y está interrumpida por dos intrones, mientras que la secuencia genómica de *marcksb* mapea en el cromosoma 17 y está interrumpida por un único intrón.

La secuencia genómica de *mrpa* mapea en el cromosoma 19, mientras que la de *mrpb* mapea en el cromosoma 13. Ambos genes presentan un único intrón interrumpiendo su secuencia.

Tabla R-15. Estructura de los genes de la familia *marcks* en el pez cebra obtenida mediante comparación de las secuencias de ARNm con el ensamble genómico Zv9.

	Cromosoma ¹	Exones	posición en el genoma	Posición en el mensajero	Longitud (pb)	Intrones	Posición en el genoma	Longitud (pb)
<i>marcksa</i>	20	3	6937-7218	1-282	282	2	6936-4782	2156
			3860-4781	283-1203	921			
			434-886	1204-1657	454			
<i>marcksb</i>	17	2	1543-1824	1-282	282	1	1825-2643	820
			2644-4217	283-1857	1575			
<i>mrpa</i>	19	2	3171-3432	1-262	262	1	2022-3170	1150
			726-2021	263-1558	1296			
<i>mrpb</i>	13	2	3261-3519	1-259	259	1	1922-3260	1340
			515-1921	260-1664	1405			

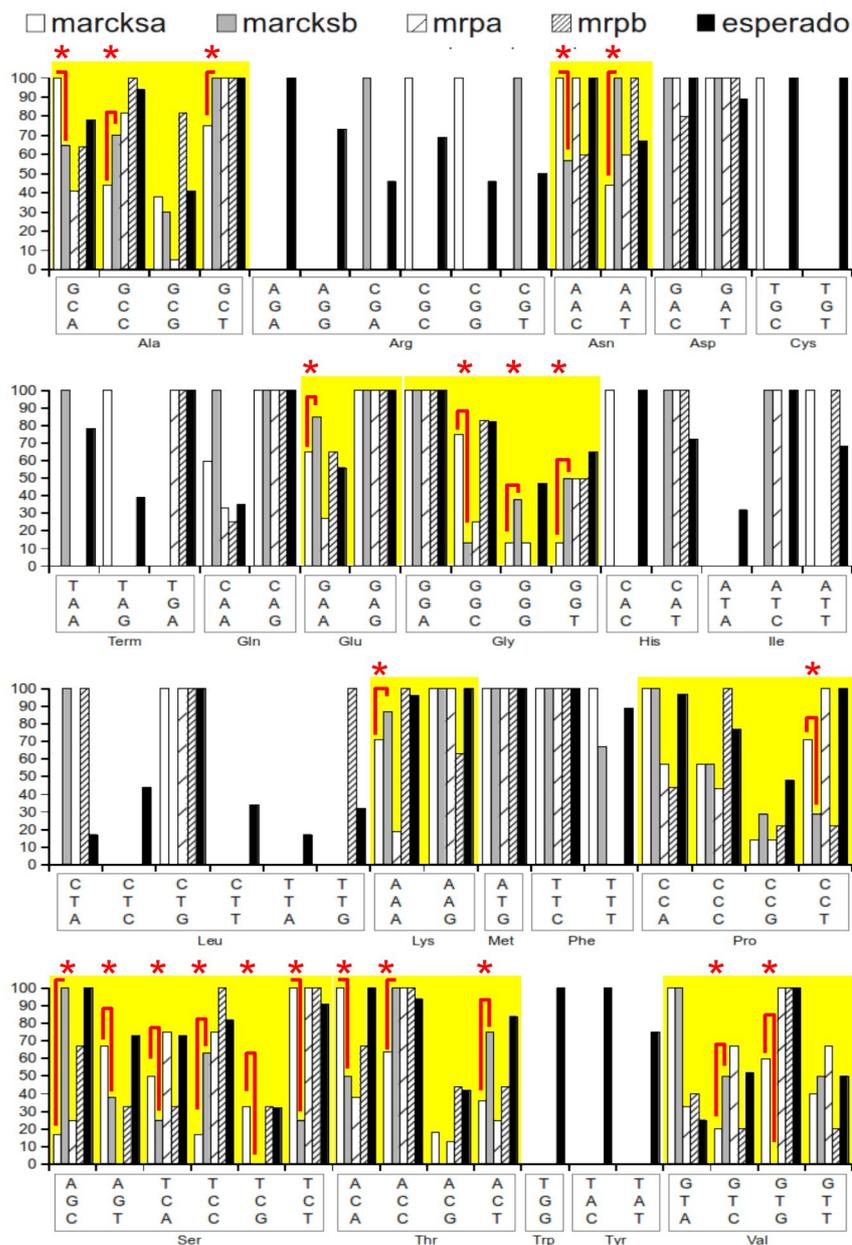
1.- Cromosoma del ensamble zv9 en el que mapea el alineamiento.

1.3.2. Uso de codones

A efectos de determinar la existencia de sesgos en el uso de codones analizamos las regiones codificantes de secuencias de cDNA correspondientes a ARNm de la familia *marcks* del pez cebra y las comparamos entre sí como se muestra en la figura 11.

Encontramos discrepancias en el uso de codones indicando sesgos diferentes entre los cuatro genes. También encontramos que los cuatro genes presentan diferencias con la tendencia general derivada de la tabla de uso de codones del pez cebra.

A



B

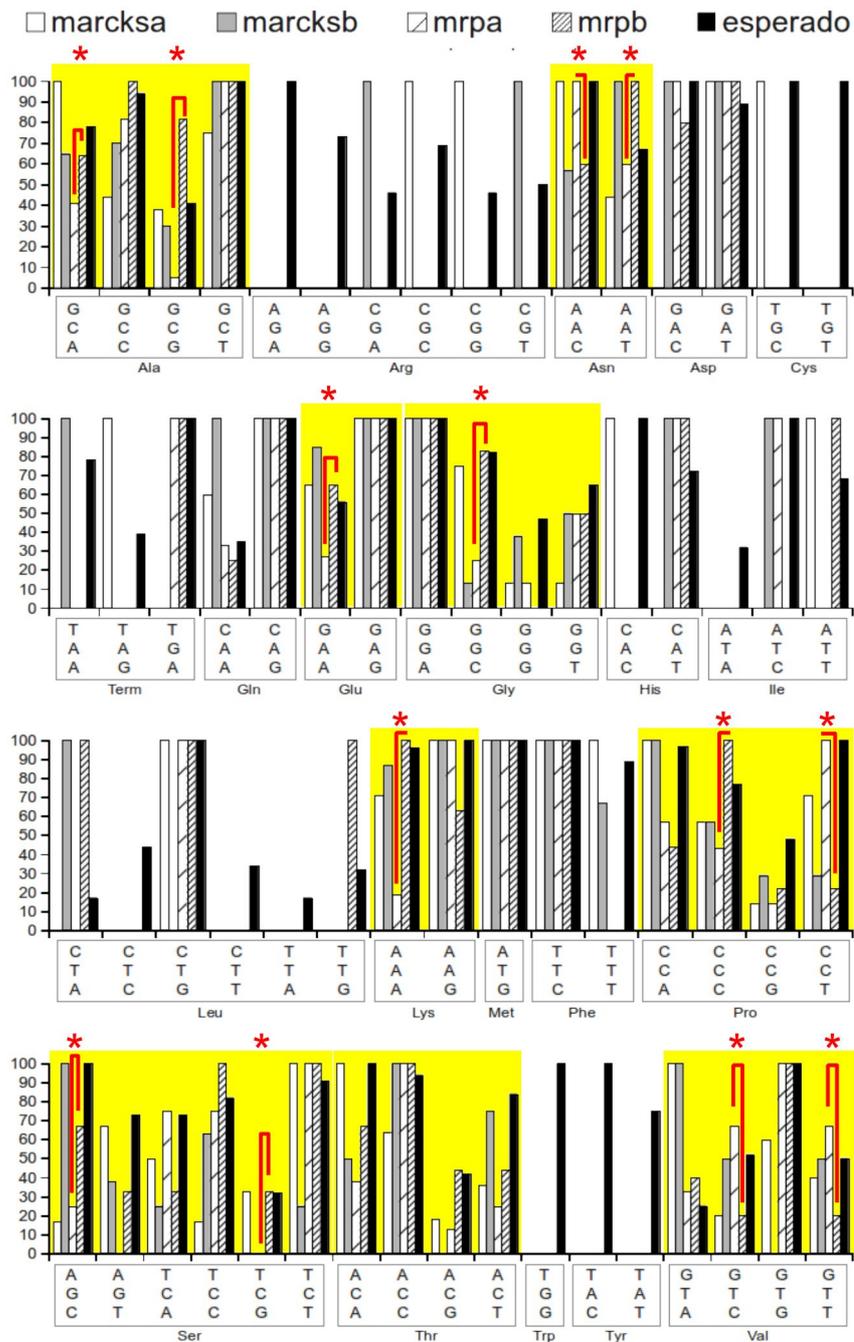


Figura 11. Adaptación relativa del uso de codones de los ADNcs de la familia *marcks* en el pez cebra. Se grafica con una adaptación igual a 100 el codón más usado para un determinado aminoácido, y se relativiza el nivel de los demás respecto al primero. Los cuatro genes presentan diferencias entre sí en el uso de codones en sus regiones codificantes. Además presentan discordancias (señaladas con asteriscos rojos) con la tabla de uso de codones del pez cebra (barras negras), que podrían ser propias de la composición aminoacídica particular de estas proteínas. En amarillo se señalan los codones correspondientes a los aminoácidos más frecuentes en la secuencia primaria de *marcks* (A); *mrp* (B).

1.3.3. Análisis de los elementos regulatorios presentes en la región 5' *upstream* a los genes de la familia *marcks*

Con el propósito de determinar la posible existencia de elementos regulatorios en *cis*, se tomó la región -1kb en el ensamblaje genómico (zv9) y se sometió a un análisis de predicción de islas CpG.

1.3.3.1. *marcksa* y *marcksb*

La secuencia -1kb del gen *marcksa* presenta un isla CpG de 125 pb entre -77 y -200 con un contenido GC de 49% frente al promedio del genoma que es de 36,5% (Han & Zhao, 2008); mientras que la secuencia -1kb del gen *marcksb* presenta dos islas CpG, la primera de 78 pb entre -58 y -135 con un contenido GC de 54%, y la segunda de 80 pb entre -276 y -355 con un contenido GC de 59%, como se ilustra en la figura 12.

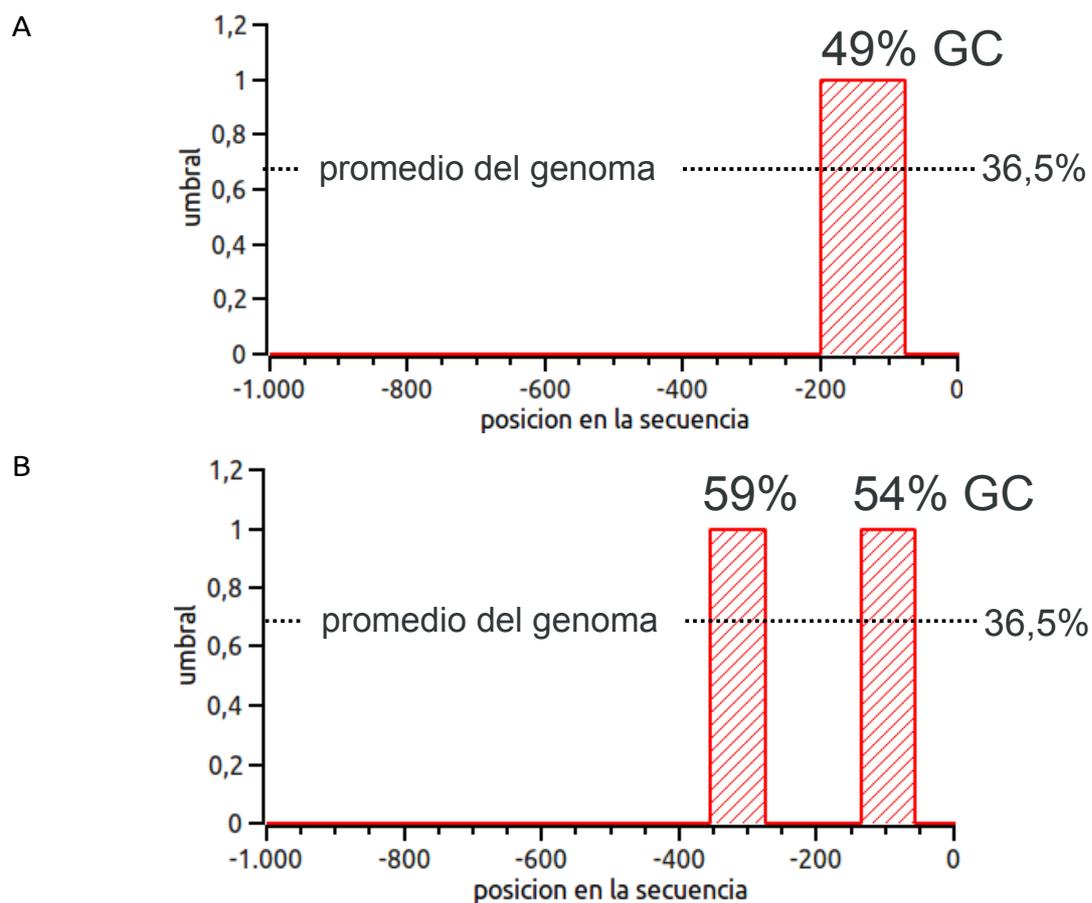


Figura 12. Ubicación de las islas CpG a lo largo de la secuencia de 1000 pb *upstream* a los genes *marcksa* (A) y *marcksb* (B) en el ensamblaje genómico zv9. La predicción se realizó con una ventana de 100 pb. El eje de las abscisas representa la secuencia 1 kb 5', desde -1kb hasta la posición 0. Se indican los porcentajes GC de las islas putativas en relación al promedio de contenido GC del genoma.

Con el propósito de analizar posibles relaciones evolutivas entre estas secuencias 5', realizamos el mismo análisis para los genes de otros organismos representativos de diferentes grupos de vertebrados cuyo ensamble genómico fuera robusto y alineamos los gráficos en la figura 13 para su comparación. Debe notarse que todas las secuencias analizadas presentan al menos una isla CpG en la secuencia -1kb. Los tres grupos de mamíferos presentan tres islas CpG cuya posición y extensión se encuentran conservadas.

La mayor variación referente a extensión y ubicación de las mismas se encuentra en los grupos de anamniotas. Sin embargo, todos los grupos presentan una isla que se extiende en el entorno de las posiciones -50 y -200.

Realizamos una búsqueda de secuencias consenso de unión a factores trans mediante el software proscan y obtuvimos una lista de candidatos. Sólo la secuencia -1kb correspondiente al gen *marcksa* presentó regiones identificables como promotores putativos. Depuramos manualmente la lista de candidatos y reconstruimos la región promotora 5' que mostramos en la figura 14 incluyendo las secuencias regulatorias cis y las de unión a factores trans identificadas. Ni *marcksa* ni *marcksb* presentaron cajas TATA, aunque ambos presentaron cajas CAAT y elementos de unión a CREB en su región 5', lo que se detalla en la tabla R-16.

Tabla R-16. Elementos regulatorios adicionales identificados en 5' de los genes *marcks* del pez cebra

gen	elemento	secuencia	centro en
<i>marcksa</i>	Caja CAAT	CCAAT	-250
	CREB	TGACGTCA	-170
<i>marcksb</i>	Caja CAAT	CCAAT	-150
	CREB	TGACGTCA	-130

La reconstrucción gráfica abreviada de la estructura de estos genes integrando los datos hasta ahora descritos, incluyendo como control el gen del ratón, se ilustra en la figura 15.

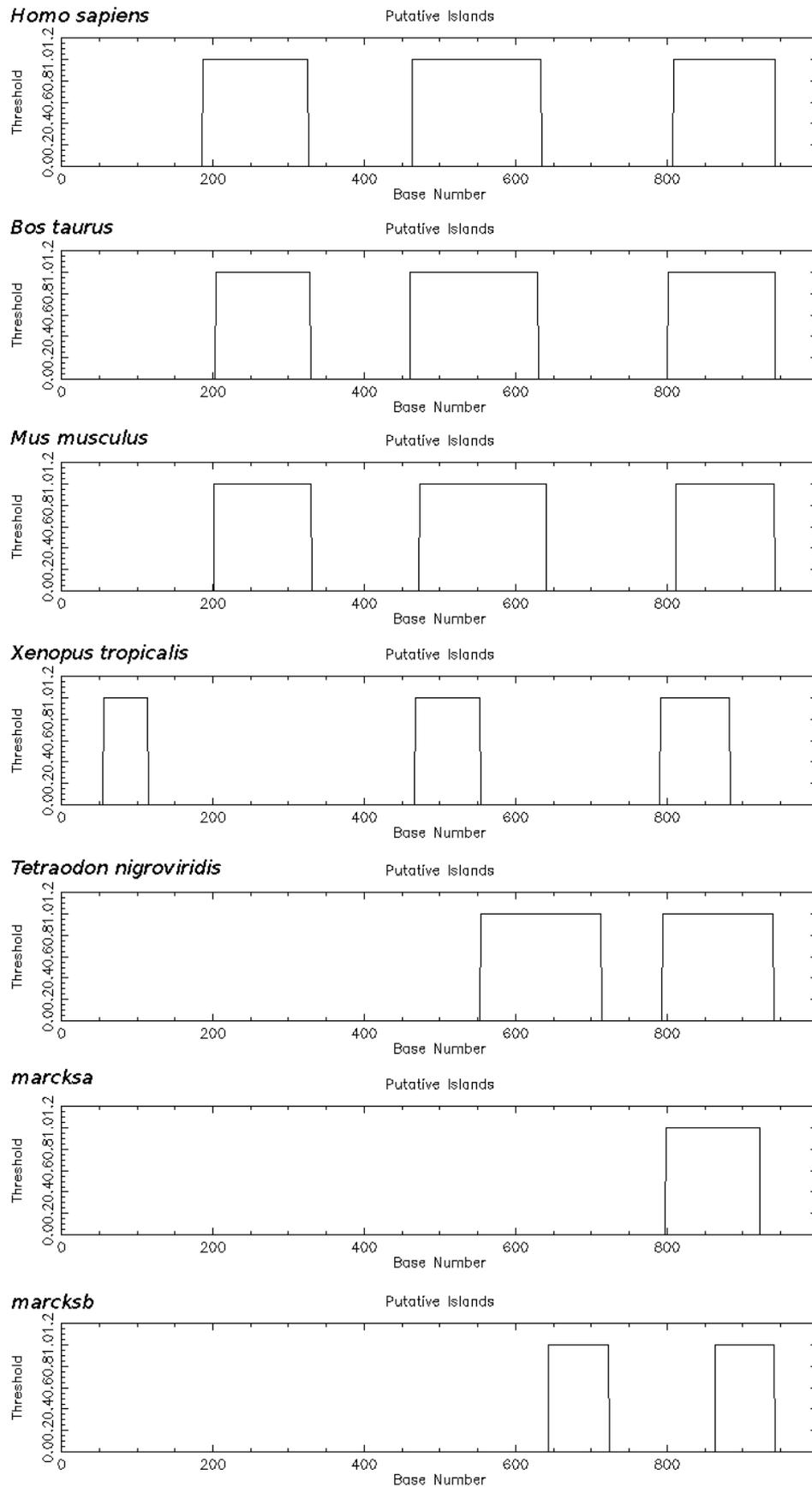


Figura 13. Ubicación de las islas CpG a lo largo de la secuencia de 1000 pb *upstream* a los genes *marcks* de vertebrados pertenecientes a diferentes clases en sus respectivos ensambles genómicos. Las predicciones se

realizaron con una ventana de 100 pb. La posición 0 en los gráficos corresponde a -1000 y la posición 1000 del gráfico corresponde a -1.

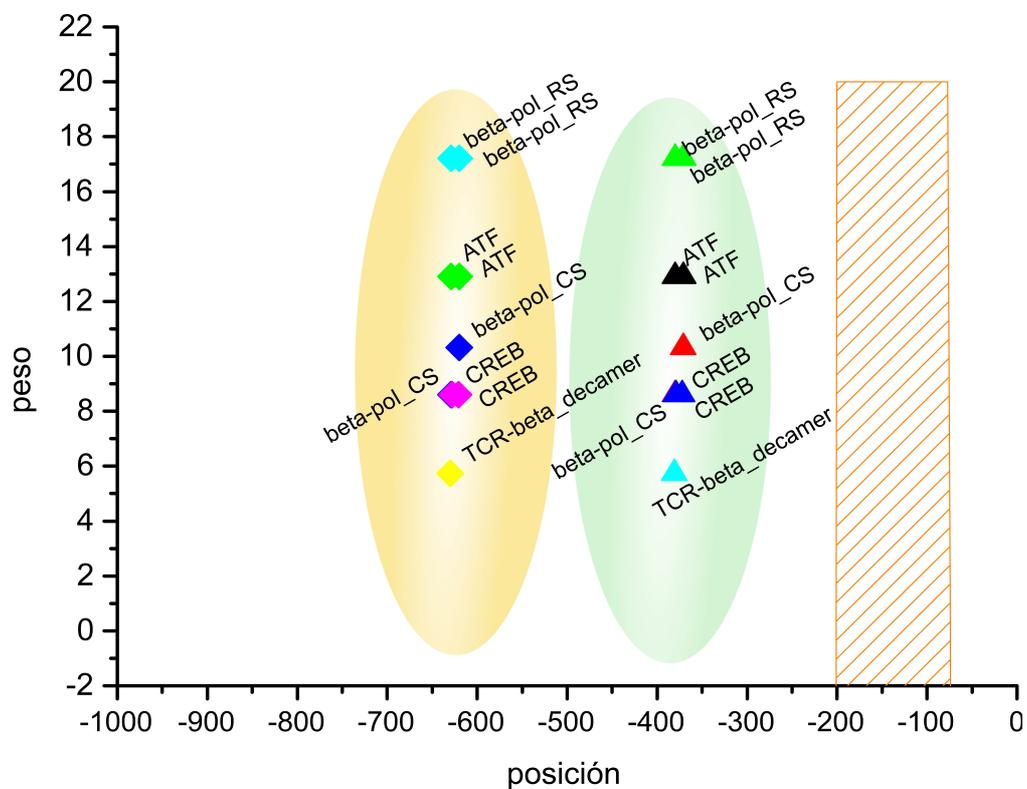


Figura 14. Reconstrucción de la región regulatoria ubicada dentro de 1 kb upstream al gen *marcksa*. En orden de proximidad a la región transcrita se muestra con una barra (líneas diagonales) la isla CpG, con un globo celeste la región promotora con las secuencias de unión de factores trans ubicadas en la hebra reversa, y con el globo anaranjado se identifica la región promotora con las secuencias trans localizadas en la hebra directa. En el eje de las ordenadas se grafica el peso estadístico (frecuencia de aparición de la secuencia particular en una región promotora vs. no promotora). ATF: *activating transcription factor*; TCR-beta: *T-cell receptor beta*; CREB: *c-AMP response element binding protein*; beta-pol: *RNA polymerase beta*.

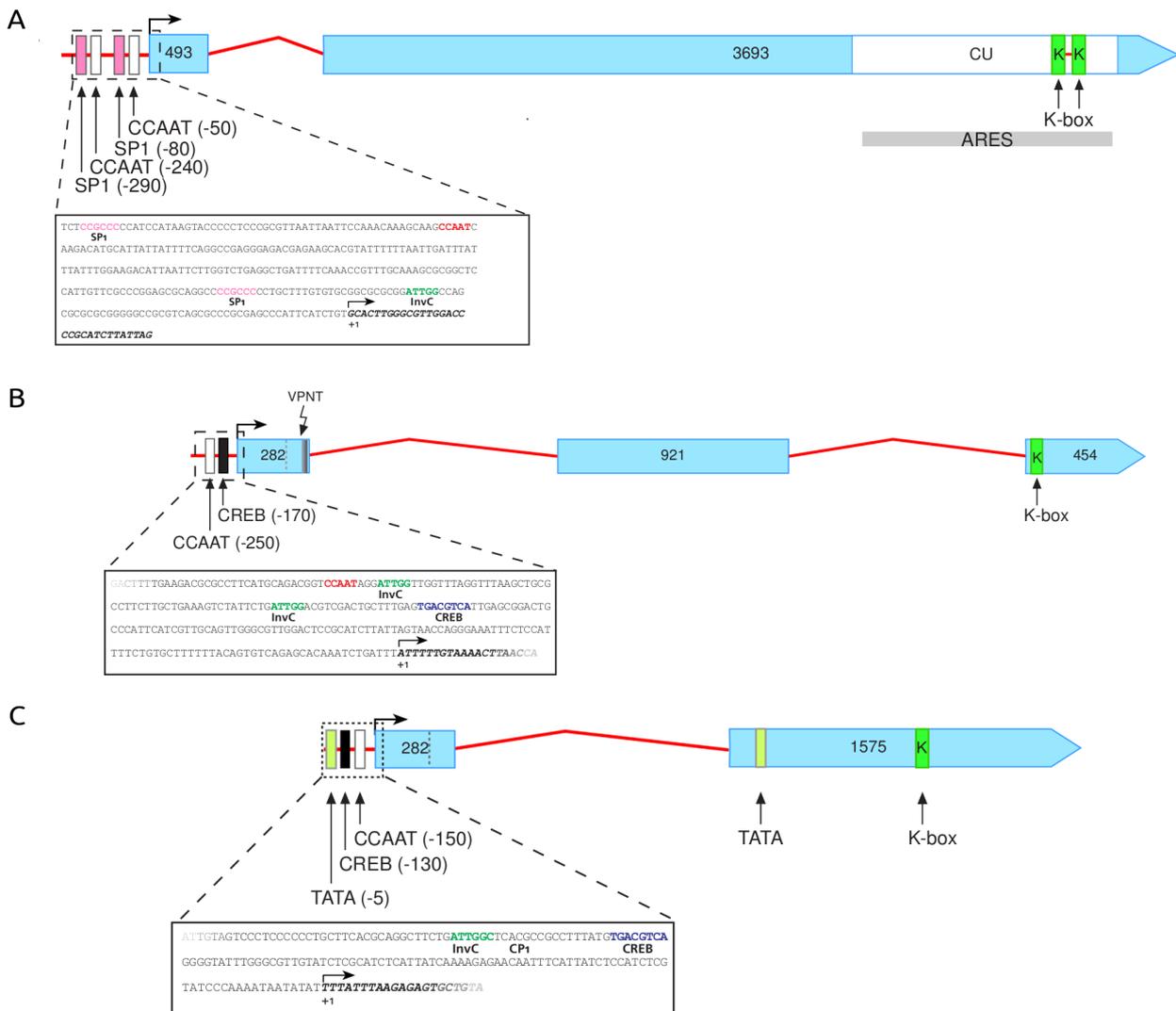


Figura 15. Reconstrucción de la estructura de los genes de ratón *macs* (A), y de sus ortólogos en el pez cebra *marcksA* (B) y *marcksB* (C). Se incluye la región 5' inmediata adyacente al gen. En celeste se indican las regiones exónicas con su extensión indicada en pares de bases, en rojo las regiones intrónicas. Con líneas punteadas verticales se indican los límites de la región codificante a efectos de facilitar la identificación de las regiones 5' y 3'-UTR de los transcritos. Consenso cajas CAAT: CCAAT; consenso unión a CREB: TGACGTCA.

1.3.3.2 *mrpa* y *mrpb*

La secuencia de 1 kb 5' al gen *mrpa* presenta una isla CpG de 225 pb ubicada entre -136 y -361, mientras que la secuencia correspondiente al gen *mrpb* no presenta islas CpG detectables por este método, como se muestra en la figura 16.

Mediante la búsqueda de secuencias consenso de unión a factores trans con el software proscan no obtuvimos candidatos. También realizamos una búsqueda de elementos regulatorios adicionales, y no encontramos cajas TATA, ni elementos de unión a CREB. Sólo encontramos regiones de cajas CAAT como se detalla en la tabla R-17.

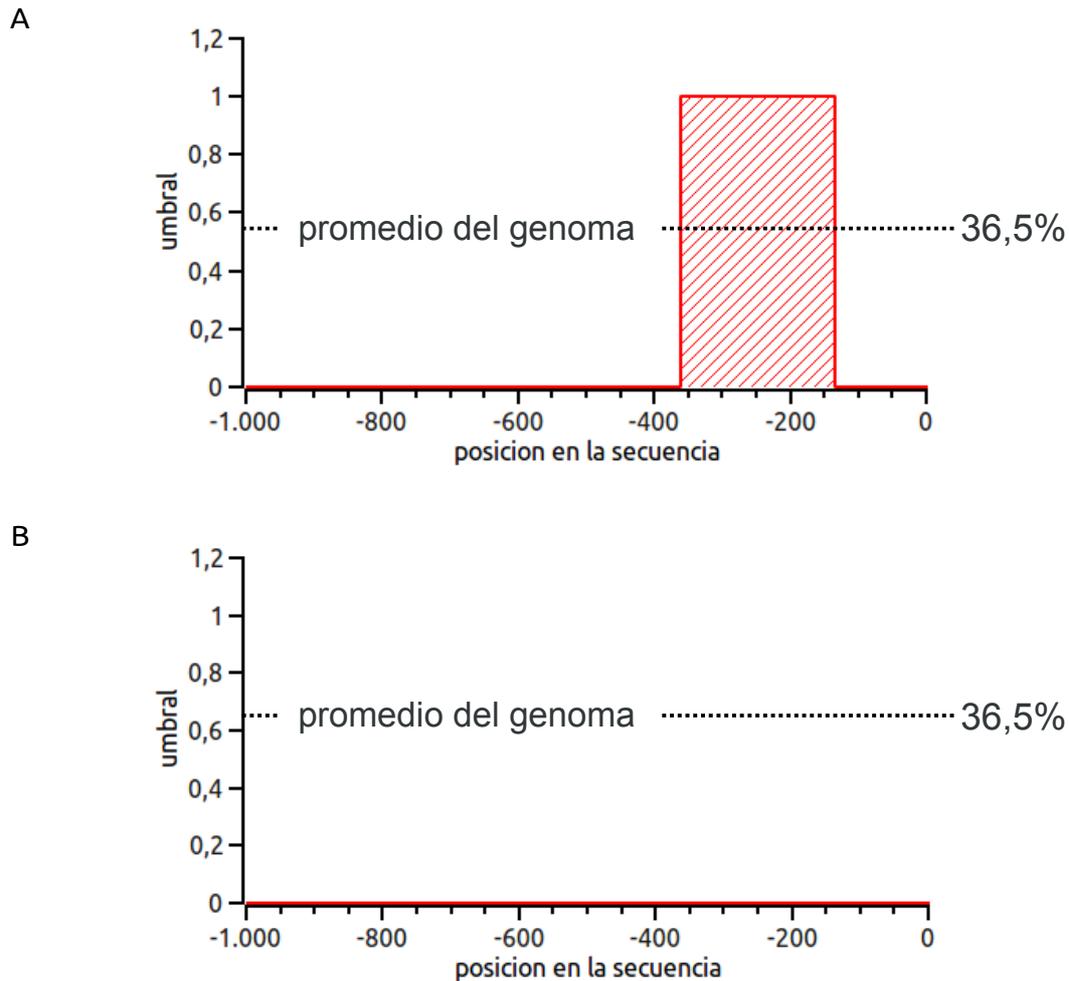


Figura 16. Ubicación de las islas CpG a lo largo de la secuencia de 1000 pb *upstream* a los genes *mrpa* (A) y *mrpb* (B) en el ensamble genómico *zv9*. La predicción se realizó con una ventana de 100 pb. El eje de las abscisas representa la secuencia 1 kb 5', desde -1kb hasta la posición 0. Se indican los porcentajes GC de las islas putativas en relación al promedio de contenido GC del genoma.

Con el propósito de analizar posibles relaciones evolutivas entre estas secuencias 5', realizamos el mismo análisis para los genes de otros organismos representativos de diferentes grupos de vertebrados y alineamos los gráficos en la figura 17 para su comparación. Entre las regiones 1 kb 5' de los genes *mrp* existe mayor divergencia entre los grupos analizados respecto a la estructura de islas CpG que lo que ocurre con los genes *marcks*. Sin embargo, podemos identificar un rasgo en común que es la existencia de al menos una región rica en el dinucleótido, de longitud y localización variable, que se ubica entre -50 y -400.

Tabla R-17. Elementos regulatorios identificados en 5' de los genes *mrp* del pez cebra

gen	elemento	secuencia	centro en
<i>mrpa</i>	Caja CAAT	CCAAT	-90
<i>mrpb</i>	Caja CAAT	CCAAT	-80

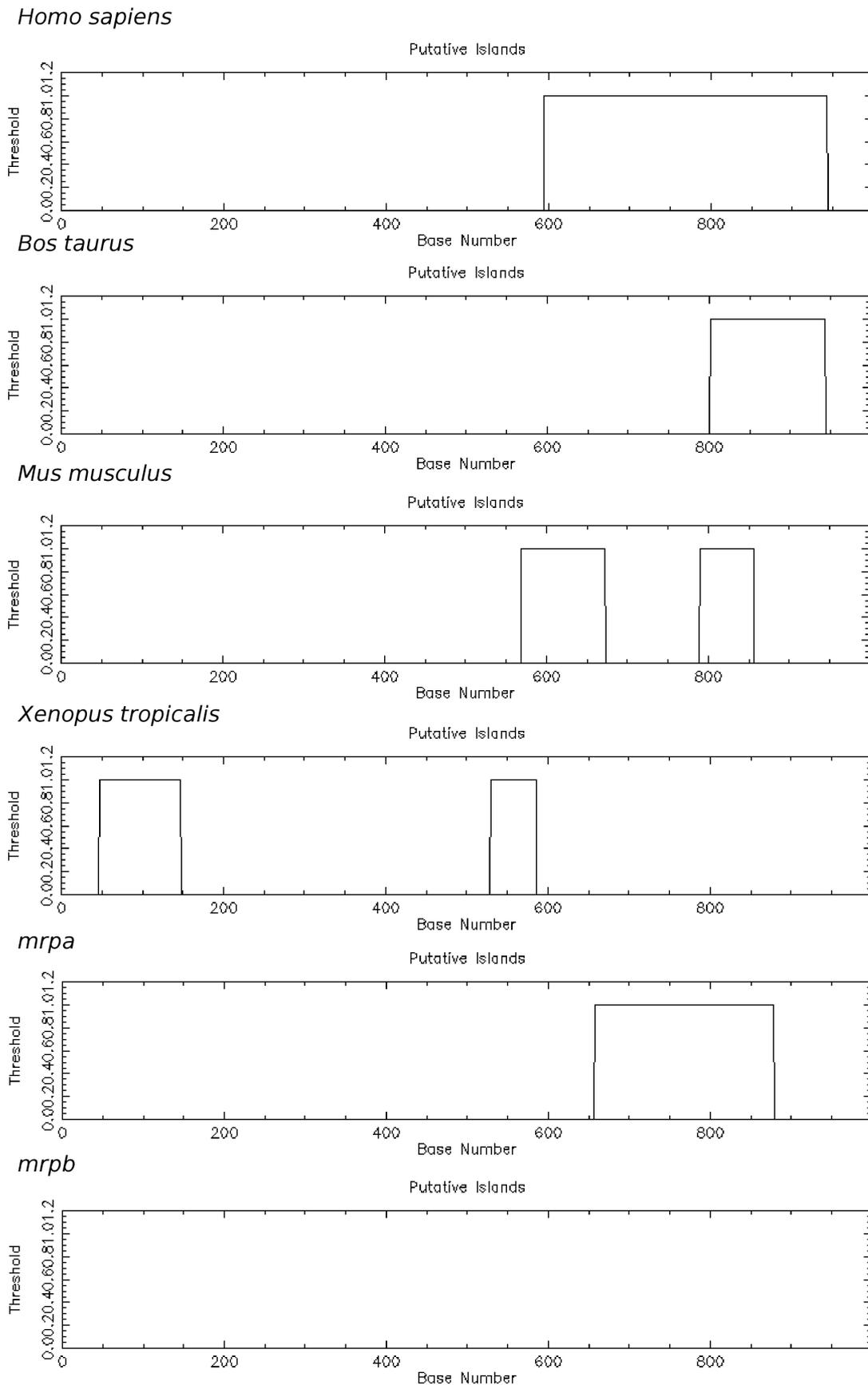


Figura 17. Ubicación de las islas CpG a lo largo de la secuencia de 1000 pb upstream a los genes *mrp* de vertebrados pertenecientes a diferentes clases en sus respectivos ensamblajes genómicos. Las predicciones se realizaron con una ventana de 100 pb. La posición 0 en los gráficos corresponde a -1000 y la posición 1000

del gráfico corresponde a -1.

La reconstrucción gráfica abreviada de la estructura de estos genes integrando los datos hasta ahora descritos incluyendo como control el gen del ratón se ilustra en la figura 18.

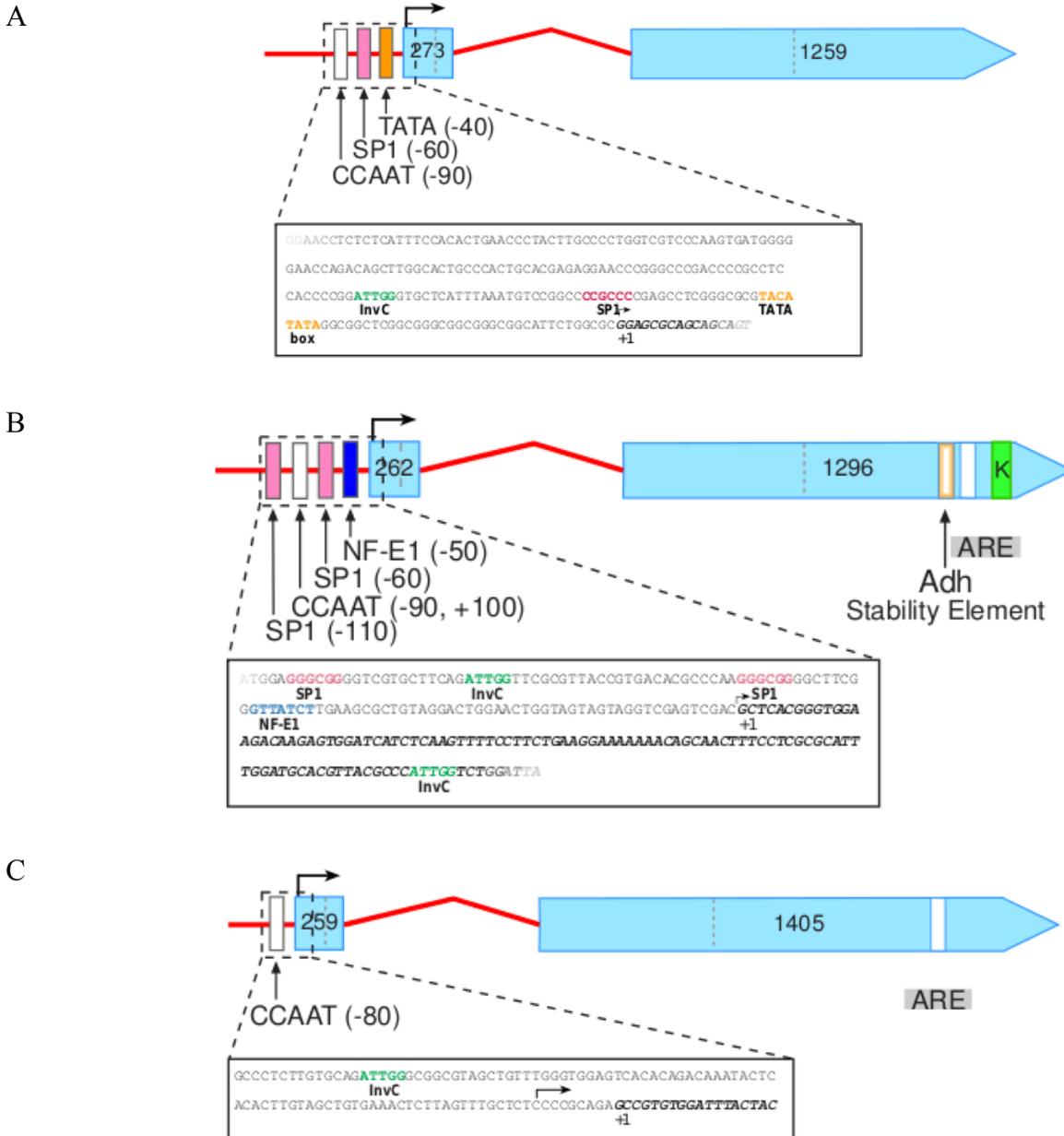


Figura 18. Reconstrucción de la estructura de los genes de ratón *mlp* (A), y de sus ortólogos en el pez cebra *mrpa* (B) y *mrpb* (C). Se incluye la región 5' inmediata adyacente al gen. En celeste se indican las regiones exónicas con su extensión indicada en pares de bases, en rojo las regiones intrónicas. Con líneas punteadas verticales se indican los límites de la región codificante a efectos de facilitar la identificación de las regiones 5' y 3'-UTR de los transcritos.

II. Caracterización del patrón de expresión de *marcks* en el embrión de pez cebra.

2. Análisis de los patrones de expresión de los genes de la familia *marcks* en el pez cebra

2.1. Generación de clones flanqueados por secuencias consenso de promotores virales para transcripción *in vitro*.

2.1.1 Subclonado de *marcksa* y *marcksb* en el plásmido pCS2+

Con la finalidad de generar moldes para transcripción *in vitro*, tanto de los ARNm como de ribosondas antisentido de longitud completa, subclonamos *marcksa* y *marcksb* en el vector pCS2+. La concentración de inserto *marcksa* purificado se estimó en 56 ng/μL, mientras que la concentración del inserto *marcksb* se estimó en 20,5 ng/μL (figura 19).

Realizamos las reacciones de ligación como se ha descrito y los introducimos en células de *E. coli* XL1-blue.

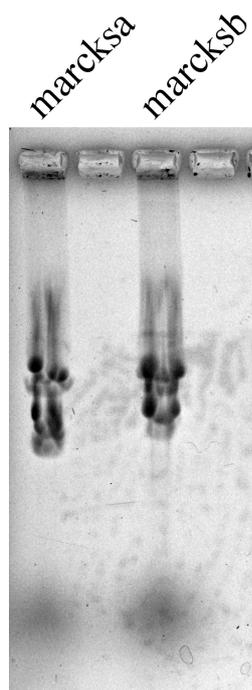
2.1.1.1. *marcksa*

Realizamos cultivos líquidos de cuatro colonias transformantes *marcksa* y de las transformantes pCS2+, purificamos el ADN plasmídico, que se corrió en un gel de agarosa (figura 20 A) y se cuantificó por densitometría.

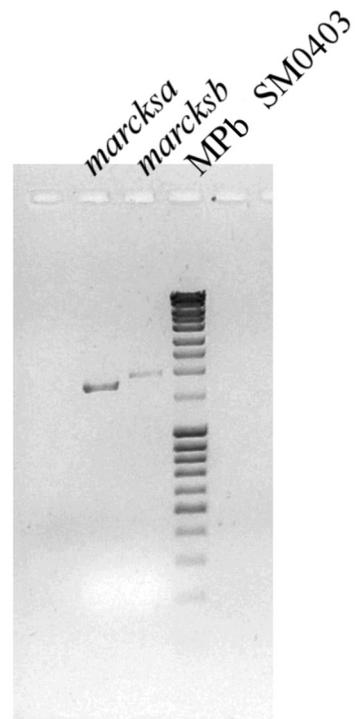
Para verificar que el ADN plasmídico purificado fuera de interés, realizamos dobles digestiones con las enzimas cuyos sitios de restricción esperábamos que flanquearan los insertos, *EcoRI* y *XhoI*, como se muestra en la figura 22 B. Determinamos el tamaño de los insertos liberados mediante densitometría. Las colonias 1, 2 y 4 liberaron un inserto de alrededor de 1900 pb (figura 20 B y C) que se correspondía con el tamaño esperado aproximado de *marcksa* (1673 pb).

Enviamos a secuenciar el ADNp correspondiente a las tres colonias señaladas a efectos de identificar el inserto y verificar la efectiva incorporación de *marcksa* al vector pCS2+ (Figura 21). Luego de corregir manualmente la secuencia en donde la secuenciación automática no pudo resolver las ambigüedades, realizamos una búsqueda por alineamientos locales de la secuencia obtenida para su identificación, obteniéndose un 96% de identidad con la secuencia BC095101 (*marcksa*). El plásmido resultante es el que se muestra en el mapa de la figura 22.

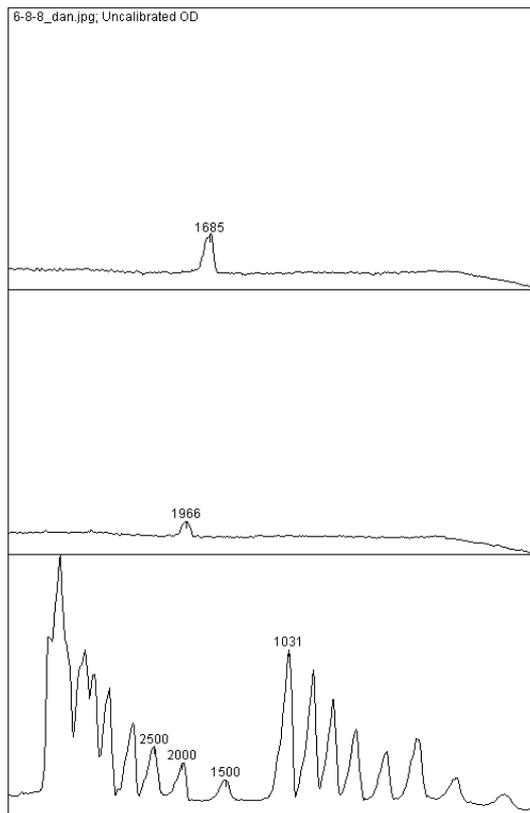
A



B



C



D

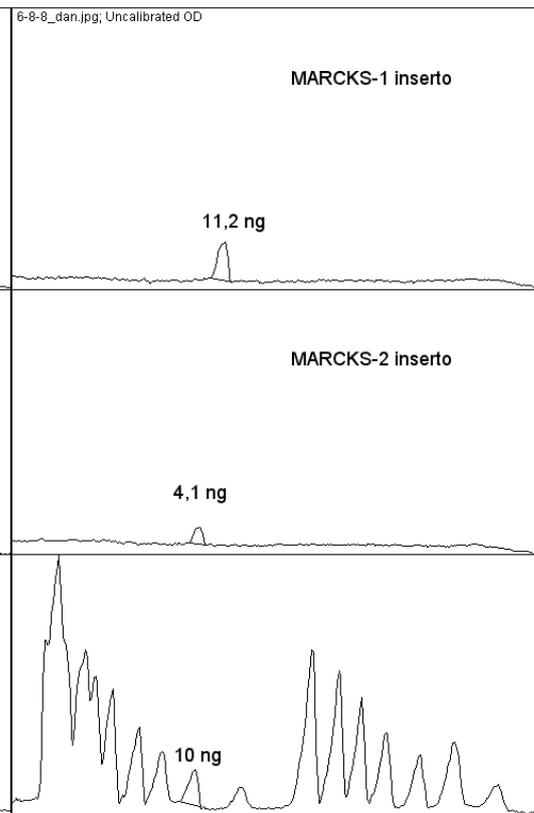
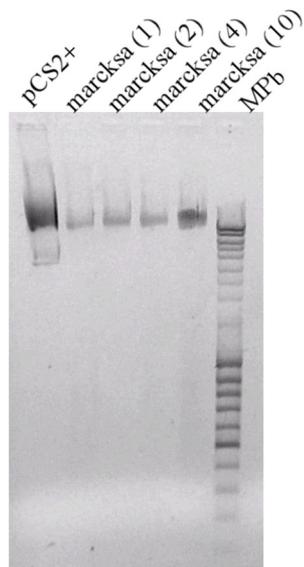


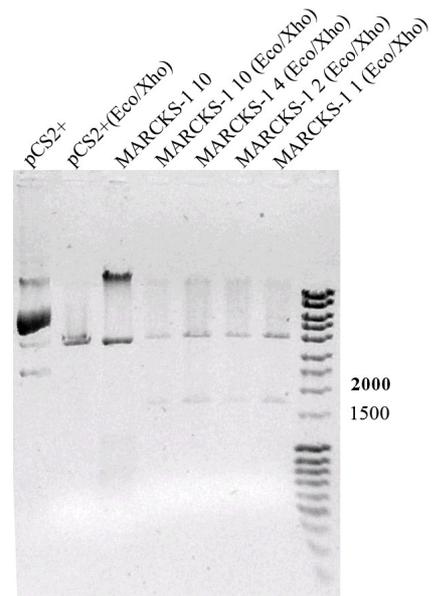
Figura 19. (A) Digestión de pME18S-*marcksa* y pME18S-*marcksb* con las enzimas *EcoRI* y *XhoI* para liberar los insertos. El gel de agarosa 1% se coloreó con azul de metileno y se iluminó con luz blanca para recortar las bandas. (B) Insertos *marcksa* y *marcksb* eluidos y purificados de las bandas recortadas en A. (C

y D) Densitogramas del gel del panel B en que se determinó el tamaño relativo de los productos purificados (C) y en que se cuantificó la cantidad obtenida (D) y se utilizó para determinar su concentración.
MARCKS-1: *marcksa*; MARCKS-2: *marcksb*; MPb: marcador de pares de bases (Fermentas SM0403)

A



B



C

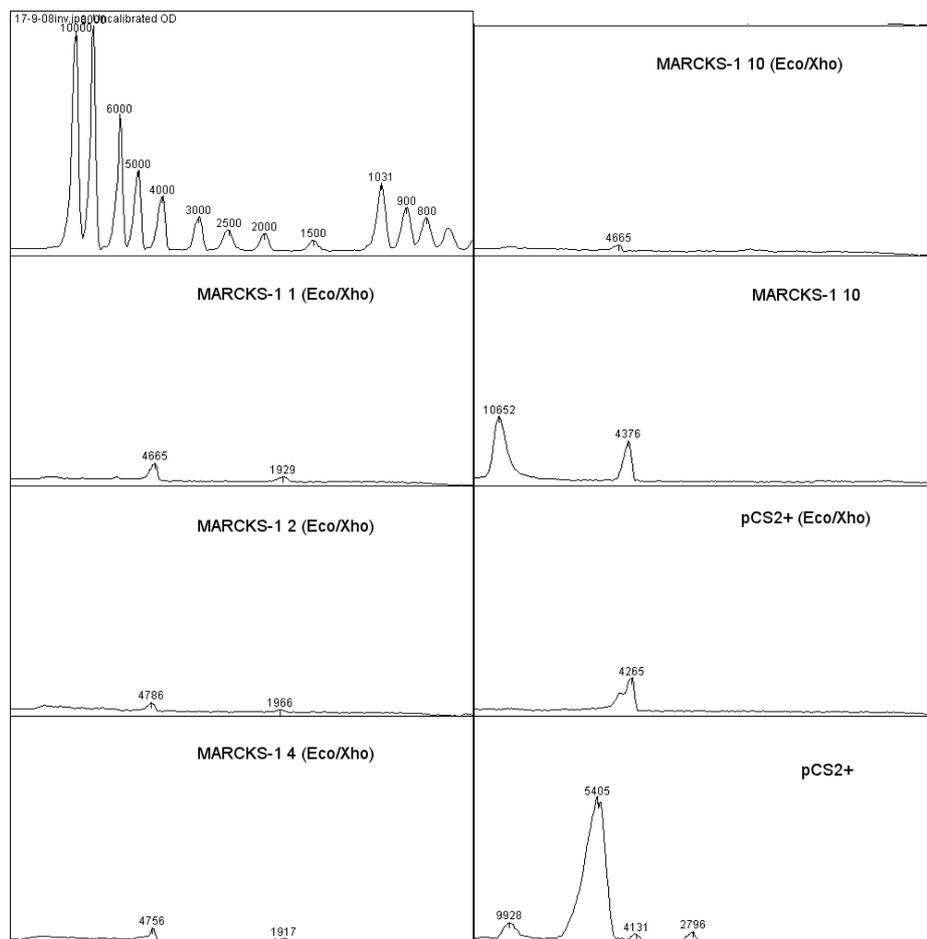


Figura 20. (A) ADNp de las colonias transformantes de pCS2+, pCS2+*marcksa*. (B) Digestiones con *EcoRI/XhoI*. Las colonias *marcksa* (MARCKS-1 en la figura) 1, 2 y 4 liberaron un inserto de ~1900 pb. (C) Determinación del tamaño aproximado de los productos de digestión por densitometría.

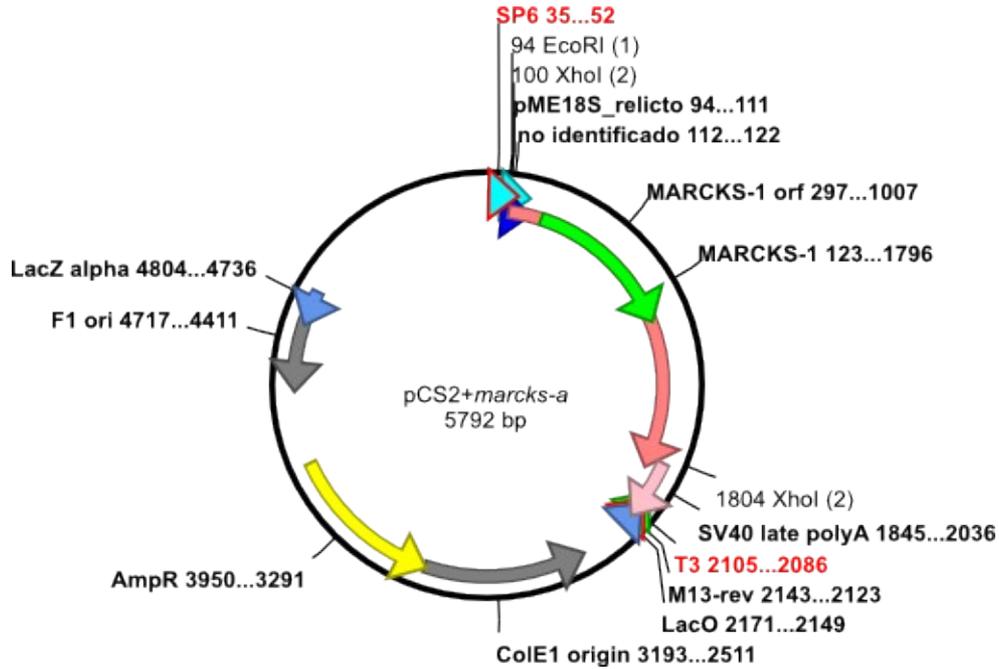


Figura 22. Mapa del plásmido obtenido pCS2+*marcks-a*. Se muestran los sitios de restricción de *EcoRI*, *XhoI*, la ubicación de los promotores virales y las principales características derivadas del vector pCS2+

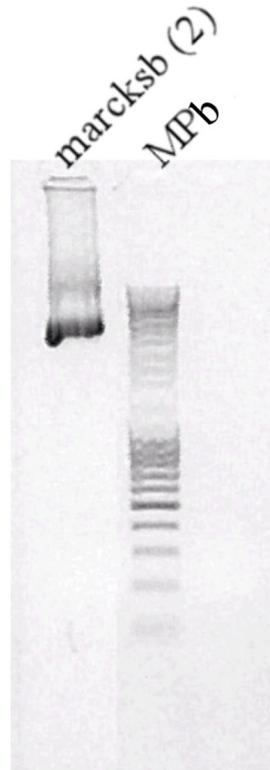
2.1.1.2. *marcksb*

Realizamos cultivos líquidos de 2 colonias transformantes *marcksb*, purificamos el ADN plasmídico, lo corrimos en un gel de agarosa 0,8% (figura 23 A) y cuantificamos por densitometría.

Para verificar que el ADN plasmídico purificado fuera de interés, realizamos dobles digestiones con las enzimas cuyos sitios de restricción se esperaba que flanquearan los insertos, *EcoRI* y *XhoI*, como se muestra en la figura 25 B. Determinamos el tamaño de los insertos liberados mediante densitometría. Las dos colonias liberaron un inserto de alrededor de 1700 pb (figura 23 B) que se correspondía con el tamaño esperado aproximado de *marcksb* (1870 pb). Enviamos a secuenciar el ADNp correspondiente a la colonia señalada a efectos de identificar el inserto y verificar la efectiva incorporación de *marcksb* al vector pCS2+ (Figura 24).

Luego de corregir manualmente la secuencia en donde la secuenciación automática no pudo resolver las ambigüedades, realizamos una búsqueda por alineamiento local de la secuencia obtenida para su identificación, obteniéndose un 94% de identidad con la secuencia BC092814 (*marcksb*). El plásmido resultante es el que se muestra en el mapa de la figura 25.

A



B

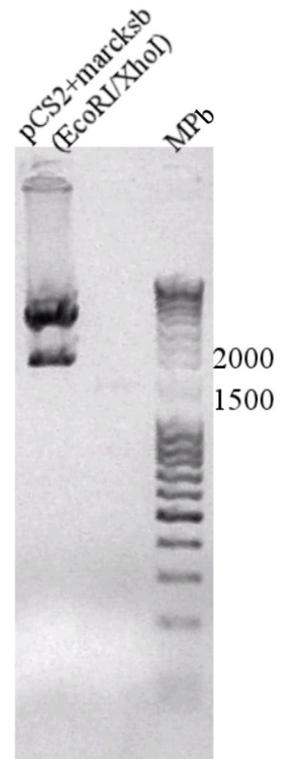


Figura 23. (A) ADNp del plásmido pCS2+*marcksb*; (B) digestión de pCS2+*marcksb* con las enzimas *EcoRI* y *XhoI*. La digestión resultó en dos bandas, una de ~4000 pb correspondiente al vector linealizado pCS2+, y una de ~1900 pb correspondiente al inserto *marcksb*.

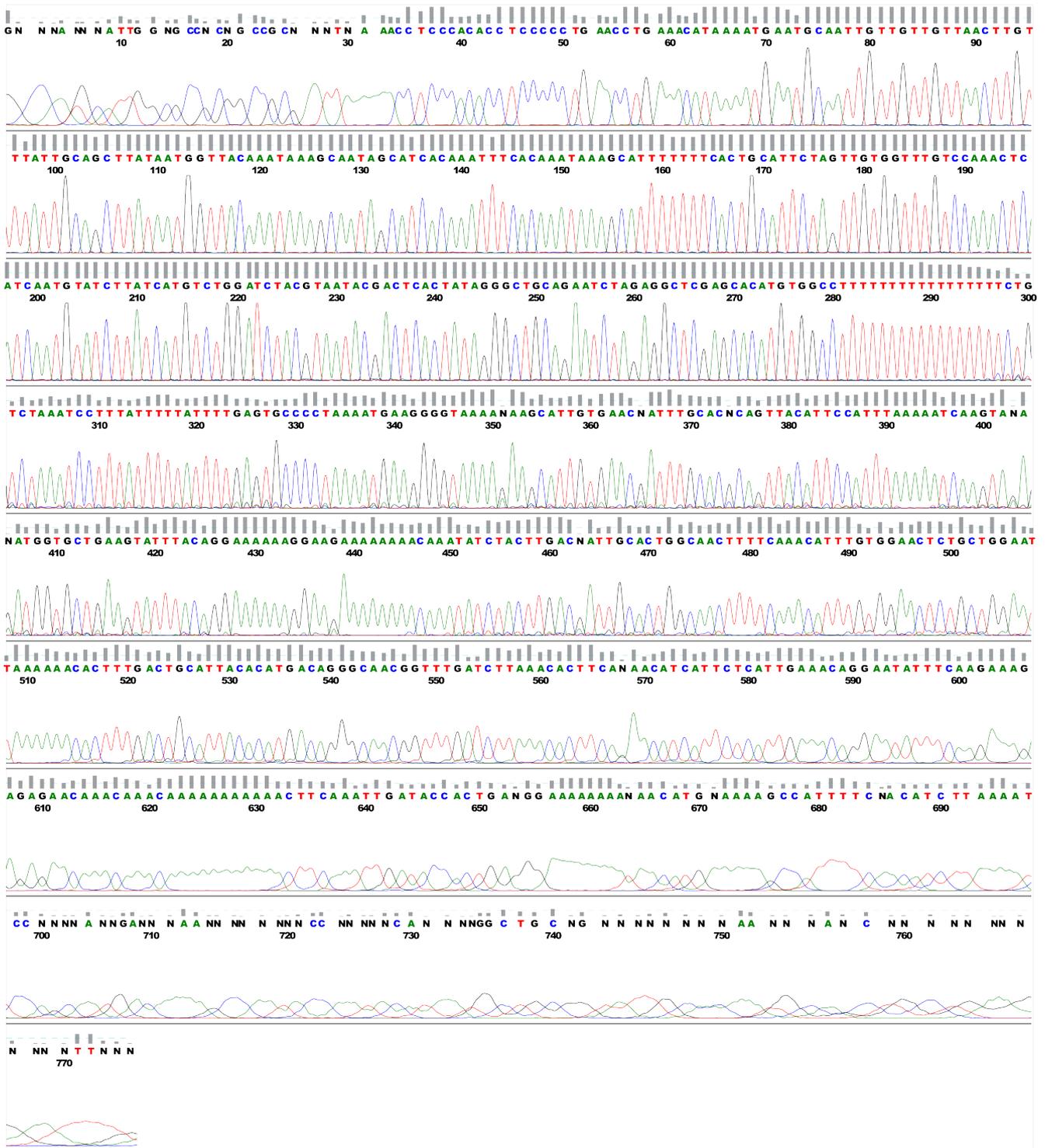


Figura 24. Cromatograma de secuenciación del clon pCS2+*marcksb* (1). Con N se indican las bases que presentaban ambigüedades para su identificación automática.

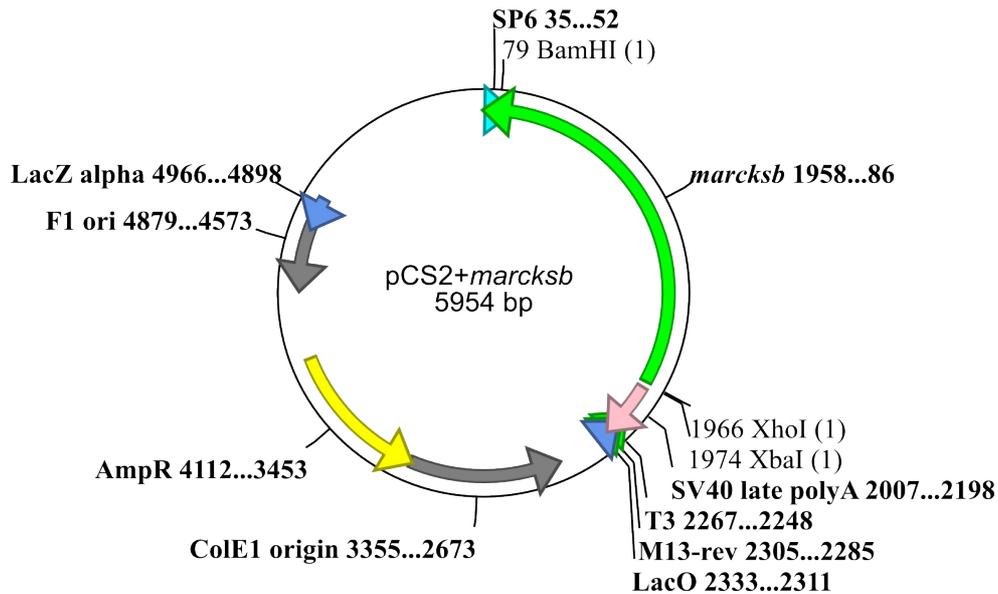


Figura 25. Mapa del plásmido obtenido pCS2+*marcksb*. Se muestran los sitios de restricción de *EcoRI*, *XhoI*, *XbaI* y *BamHI*, la ubicación de los promotores virales y las principales características derivadas del vector pCS2+.

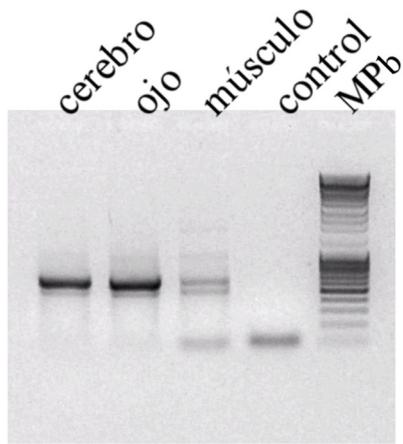
2.2. Clonado de *mrpa* y *mrpb* con extremos romos en el vector T pJET1.2

2.2.1. Amplificación de las secuencias codificantes de *mrpa* y *mrpb* mediante RT-PCR

Realizamos las reacciones de RT-PCR en condiciones estándar sobre moldes de ADNc derivados de ARNm de cerebro, ojos, y músculo de pez cebra adulto. Las parejas de cebadores de *mrpa* amplificaron el fragmento de 619 pb esperado para la región codificante de *mrpa* (figura 26 A), mientras que *mrpb* presentó una banda de 680 pb correspondiente a su tamaño esperado (figura 26 B). El ADN recuperado se evaluó en un gel de agarosa y se cuantificó densitométricamente (figura 27).

Realizamos las respectivas reacciones de ligación, y se transformaron *E. coli* XL1-blue competentes con las mezclas de ligación resultantes, purificamos las colonias transformantes mediante doble estría y seleccionamos dos para cultivo líquido. Purificamos el ADNp y lo enviamos a secuenciar. Luego de corregir manualmente las secuencias, determinamos que los clones correspondían a *mrpa* y *mrpb* en el vector pJET1.2 y elaboramos mapas de los plásmidos con las orientaciones de los insertos y los sitios de corte de las enzimas de interés con secuencias de corte flanqueándolos, como se muestra en la figura 28.

A



B

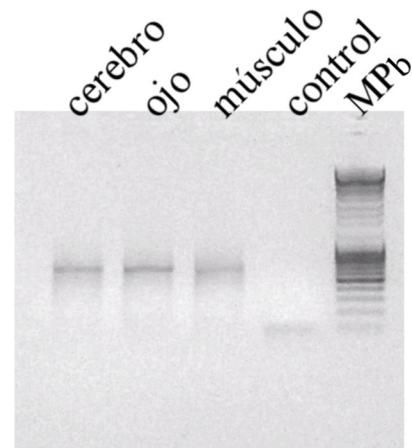


Figura 26. Amplificación por RT-PCR de *mrpa* (A) y *mrpb* (B) de diferentes tejidos de pez cebra adulto. Ambos mensajeros estaban presentes en extractos de cerebro, ojos y músculo. MPb: marcador de pares de bases.

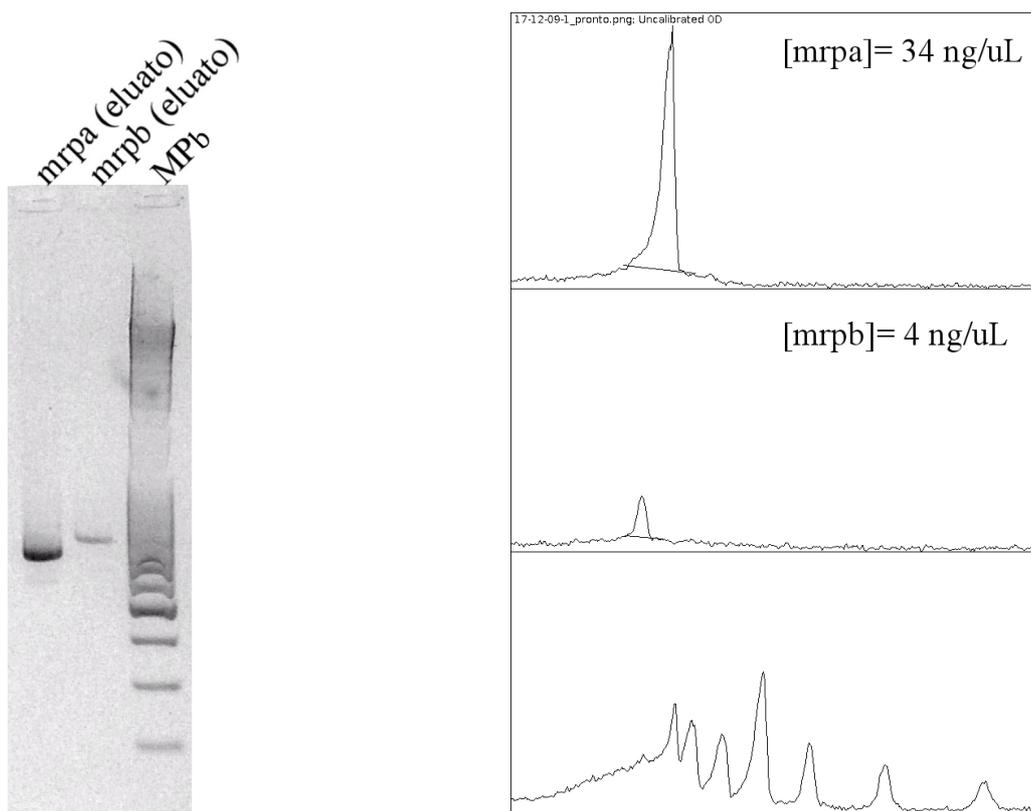


Figura 27. Bandas eluidas y precipitadas de amplificación de *mrpa* y *mrpb* (A), y su correspondiente cuantificación densitométrica para la reacción de ligación (B). MPb: marcador de pares de bases.

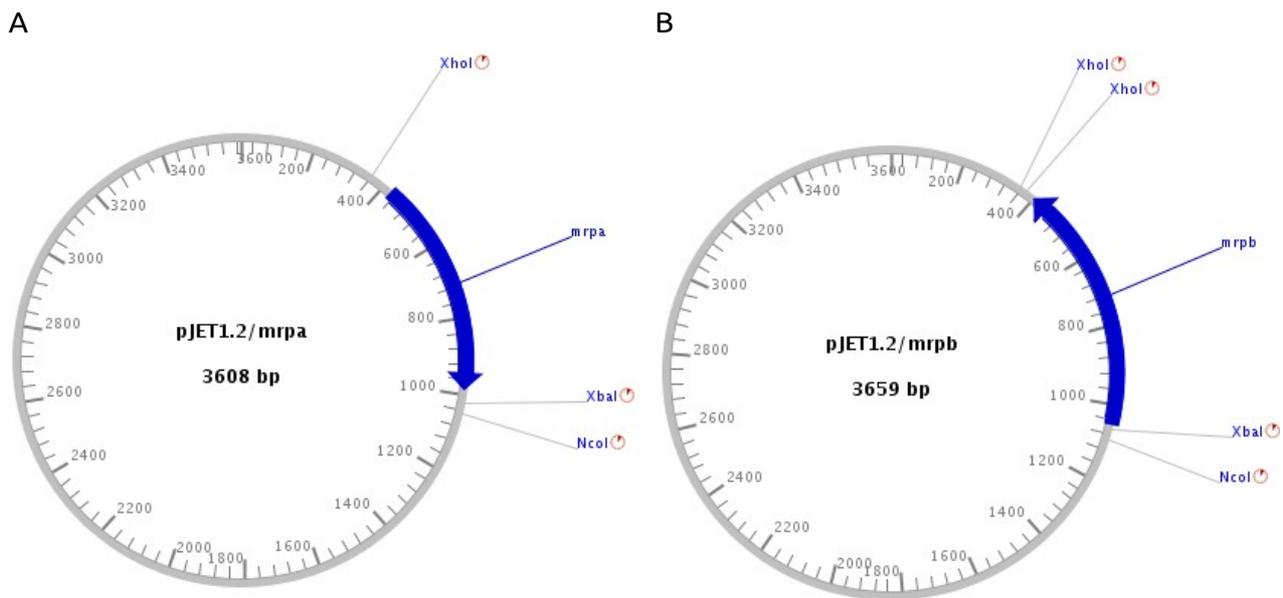


Figura 28. Mapa de los plásmidos con los clones *mrpa* (A) y *mrpb* (B). Se muestran las orientaciones en que se clonó y las principales enzimas de interés que flanquean los insertos.

2.4. Análisis del patrón espacial de expresión de *marcksa* y *marcksb* mediante hibridación *in situ*.

Para determinar el patrón espacial de expresión de los genes *marcks* en embriones de pez cebra realizamos hibridaciones *in situ* en embriones de 35 hpf con sondas *full-length*. Como control negativo utilizamos una sonda sentido generada con una secuencia de ARNr 28S.

Encontramos que la expresión de *marcksa* era ubicua en embriones de esta etapa, encontrándose presencia del mensajero en músculo, tejidos cutáneos y sistema nervioso. Además las células de la región medial del cerebro posterior presentaban en la región de citoplasma apical un enriquecimiento en los mensajeros de *marcksa* (figura 29 A) y *marcksb* (figura 30 A). Mientras encontramos que el mensajero *marcksa* es abundante en las células de la médula espinal, no encontramos señal de *marcksb* detectable en estas células (figuras 29 B y 30 B). Determinamos también que los mensajeros se encuentran en el ojo, presentando *marcksa* una mayor abundancia en las regiones apical y basal de la retina neural y en el cristalino (figura 29 C-E), mientras que *marcksb* sólo se encontró en niveles apreciables en la región apical de la retina neural (figura 30 C). En ningún caso encontramos señal detectable en los controles negativos (figura 31 A-D).

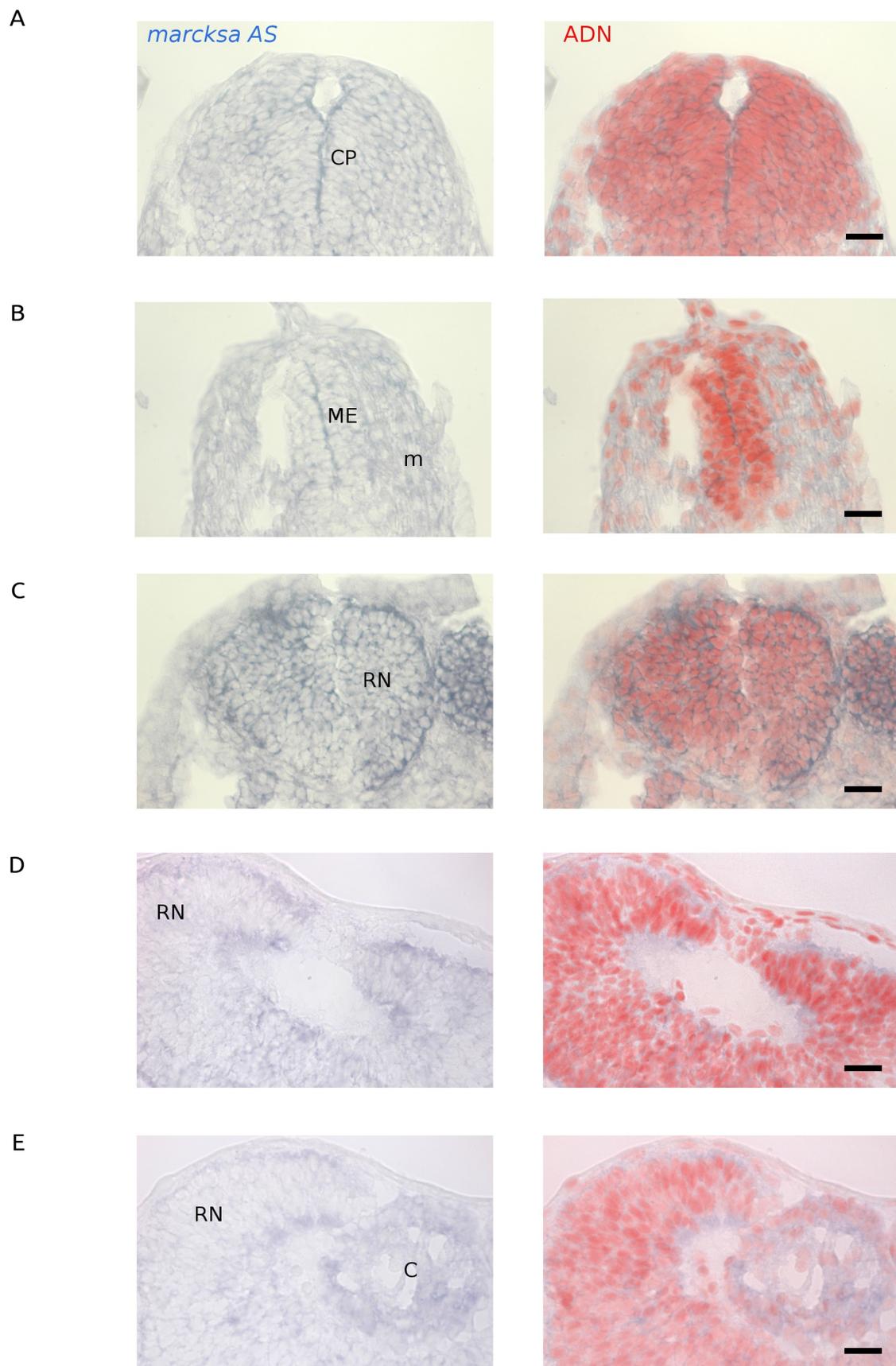


Figura 29. Patrón de expresión de *marcksa* en embriones de 35 hpf. En la columna de la izquierda se muestra la hibridación *in situ* con sonda *full-length*. En la columna de la derecha se superpone la coloración nuclear Hoechst 33342 en color rojo. La expresión es ubicua, aunque se observa un enriquecimiento en la región de citoplasma apical en las células de la región medial del cerebro posterior (CP) y la médula espinal (ME) (A y B). m: músculo; C: cristalino; RN: retina neural. Barra: 20 μ m

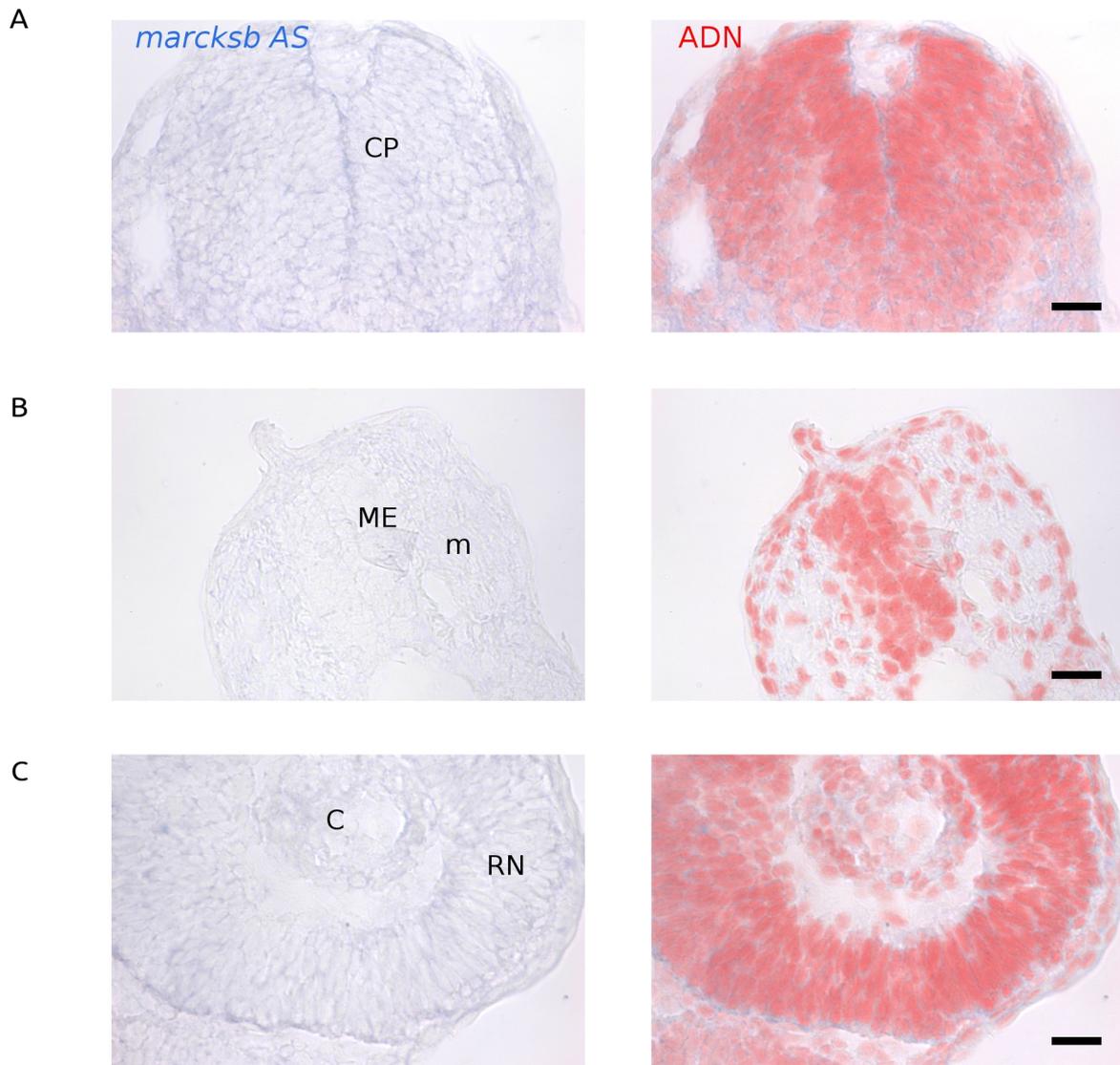


Figura 30. Patrón de expresión de *marcksb* en embriones de 35 hpf. En la columna de la izquierda se muestra la hibridación *in situ* con sonda *full-length*. En la columna de la derecha se superpone la coloración nuclear Hoechst 33342 en color rojo. La expresión es ubicua a nivel de la región cefálica posterior, aunque se observa un enriquecimiento en la región de citoplasma apical libre en las células de la región medial del cerebro posterior (A); a nivel del tronco no observamos señal detectable ni en los tejidos esqueléticos ni en la médula espinal (B). La expresión de *marcksb* parece encontrarse enriquecida en la región apical de la retina neural (C). Barra: 20 μ m. CP: cerebro posterior; ME: médula espinal; m: músculo; C: cristalino; RN: retina neural.

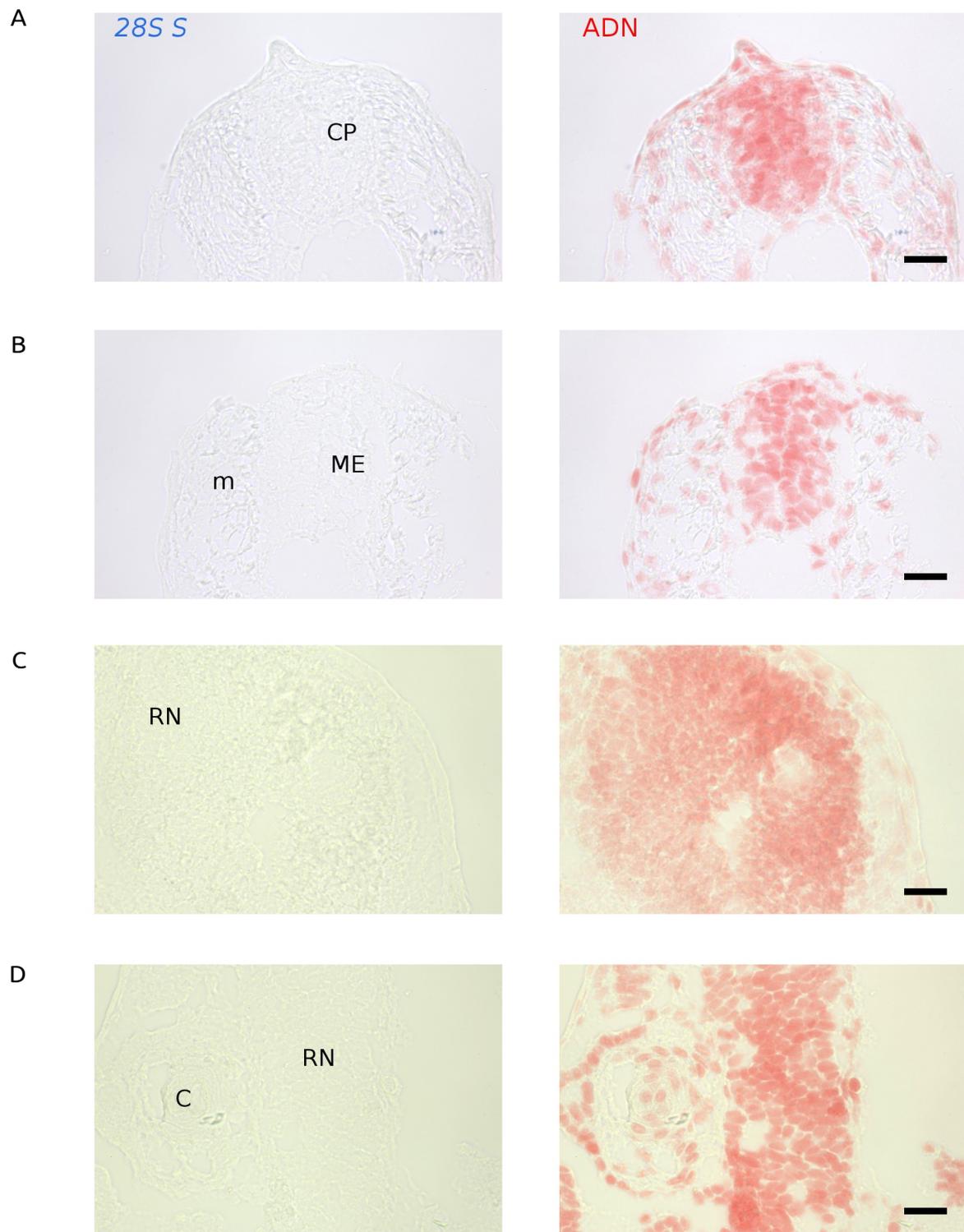


Figura 31. Controles negativos de hibridación *in situ* sobre cortes de embriones de 35 hpf. En la columna de la izquierda se muestra la hibridación con la sonda 28S sentido; en la columna de la derecha se muestra la superposición con la tinción nuclear Hoechst 33342 en color rojo. A y B, cortes transversales a nivel del tronco. C y D cortes de ojo. Barra: 20 μ m. CP: cerebro posterior; ME: médula espinal; m: músculo; C: cristalino; RN: retina neural.

2.5. Evaluación de los niveles relativos de expresión de los mensajeros de *marcks* en diferentes tejidos de individuos adultos mediante sqRT-PCR

Partimos de la hipótesis de que los genes de la familia *marcks* cumplían funciones en el sistema nervioso, y por lo tanto sus niveles de expresión debían ser diferentes en tejidos neurales y no neurales. Con la finalidad de determinar si existían diferencias cuantificables en los niveles de abundancia de mensajero de *marcksa* y *marcksb* en diferentes tejidos de pez cebra adulto, realizamos una cuantificación relativa mediante sqRT-PCR, que mostró que nuestra hipótesis de partida tenía sustento experimental (figura 32). Mediante este abordaje experimental determinamos que los niveles de abundancia de *marcksa* presentó un comportamiento diferente con niveles medios en el cerebro, superados en 1,5 veces por el músculo, pero resultó ser prácticamente indetectable en el ojo del pez cebra adulto. Por su parte, los niveles de *marcksb* presentes en el cerebro eran sobrepasados en 1,5 veces por los niveles presentes en tejido muscular y prácticamente duplicados en el ojo.

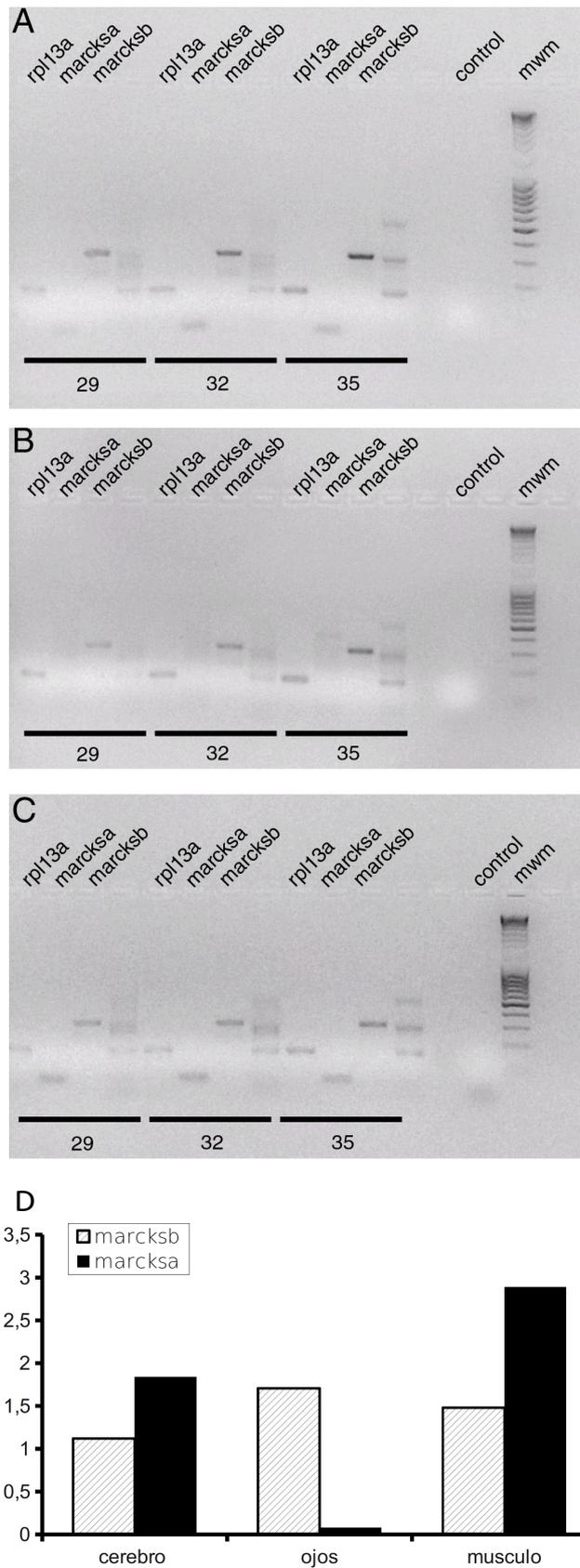


Figura 32. Expresión comparativa de *marcksa* y *marcksb* en tres tejidos de pez cebra adulto. sqRT-PCR de *marcksa* y *marcksb* en cerebro (A), ojo (B) y músculo (C). El gen de referencia utilizado para normalizar es el de la proteína ribosomal 113 α (*rpl13a*). (D) Niveles relativos de expresión. En el eje de las ordenadas cantidad en unidades arbitrarias.

3. Análisis del patrón temporal de expresión de *marcks* y *marcksb*

3.1. Expresión de *marcks* y *mrp* en las etapas de 24 y 48 hpf

Para dilucidar si *mrpa* y *mrpb* se expresaban en los embriones de 24 y 48 hpf realizamos un experimento de RT-PCR y determinamos que los ARNm de todos los genes eran expresados en esas etapas del desarrollo, como se muestra en la figura 33.

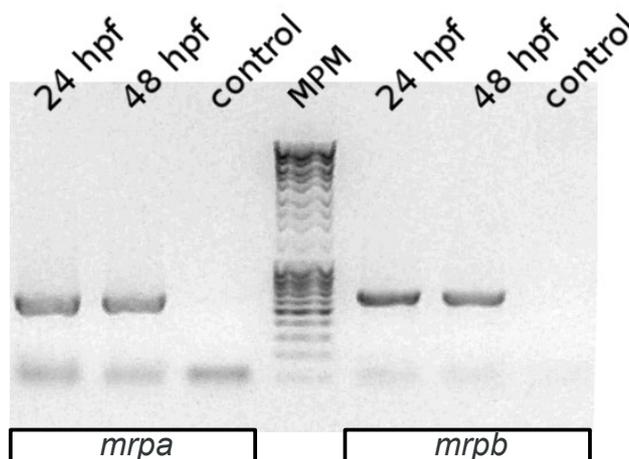


Figura 33. Expresión de *mrps* (B) en embriones de pez cebra de 24 y 48 hpf. RT-PCR.

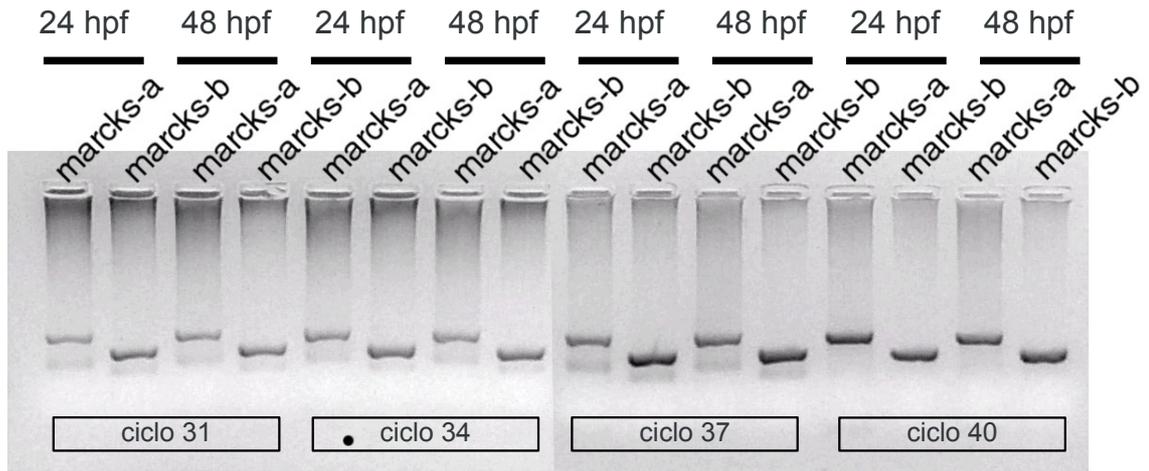
3.2. Diferencias relativas en los niveles expresión *marcks* y *mrp* en embriones de 24 y 48 hpf mediante sqRT-PCR.

Conociendo que tanto los genes *marcks*, como los *mrp* son expresados durante el desarrollo del pez cebra en las etapas de 24 y 48 hpf, exploramos la posible variación en sus niveles de expresión asumiendo como hipótesis que sus niveles variaban en estas etapas de manera diferente. Partiendo de esta premisa, realizamos ensayos de sqRT-PCR para los cuatro genes (figuras 34 y 35 A). Sabiendo que las curvas de amplificación deberían aproximarse a un comportamiento sigmoide (Liu & Saint, 2002; figuras 38 y 39 B y C), linealizamos las mismas en un gráfico logarítmico, aproximamos a la mejor recta mediante regresión lineal, y comparamos sus pendientes (figuras 34 y 35 D y E, tabla R-18). Las diferencias en las pendientes indicaron diferencias en las tasas de amplificación de *marcksb*, *mrpa* y *mrpb* entre las 24 y las 48 hpf, no permitiéndonos refutar la hipótesis nula e indicando que sus niveles de expresión variaban.

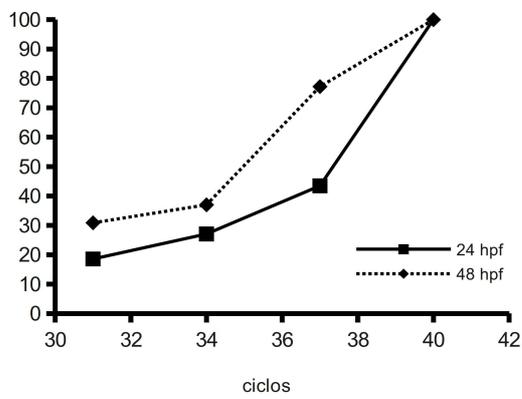
Tabla R-18. Coeficientes angulares de las ecuaciones de la recta mejor aproximada a las curvas logarítmicas de cuantificación por sq-RT-PCR de los genes de la familia marcks en etapas de 24-48 hpf.

gen	etapa	coeficiente angular
<i>marcksa</i>	24 hpf	0,06
	48 hpf	0,06
<i>marcksb</i>	24 hpf	0,07
	48 hpf	0,08
<i>mrpa</i>	24 hpf	0,02
	48 hpf	0,04
<i>mrpb</i>	24 hpf	0,06
	48 hpf	0,05

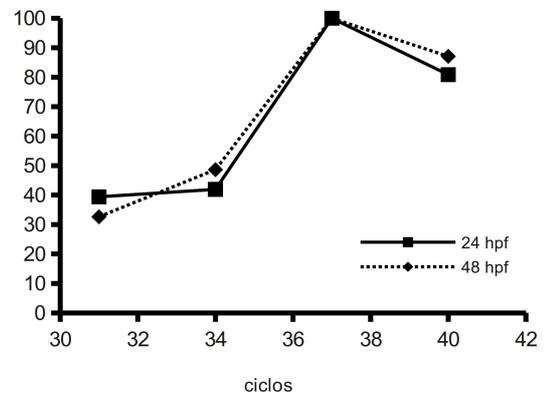
A



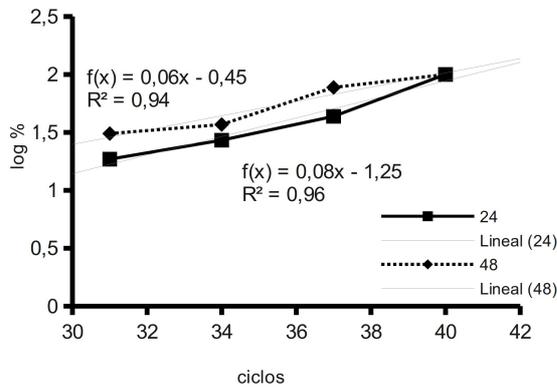
B



C



D



E

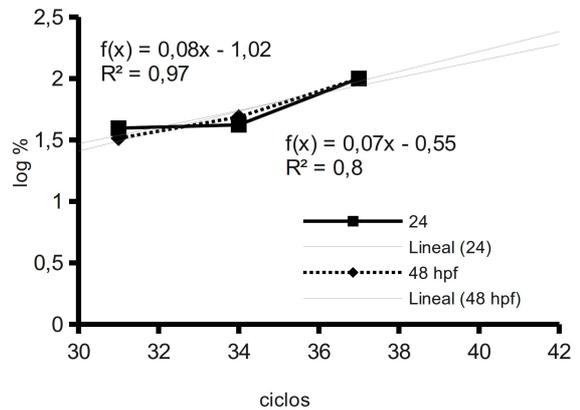
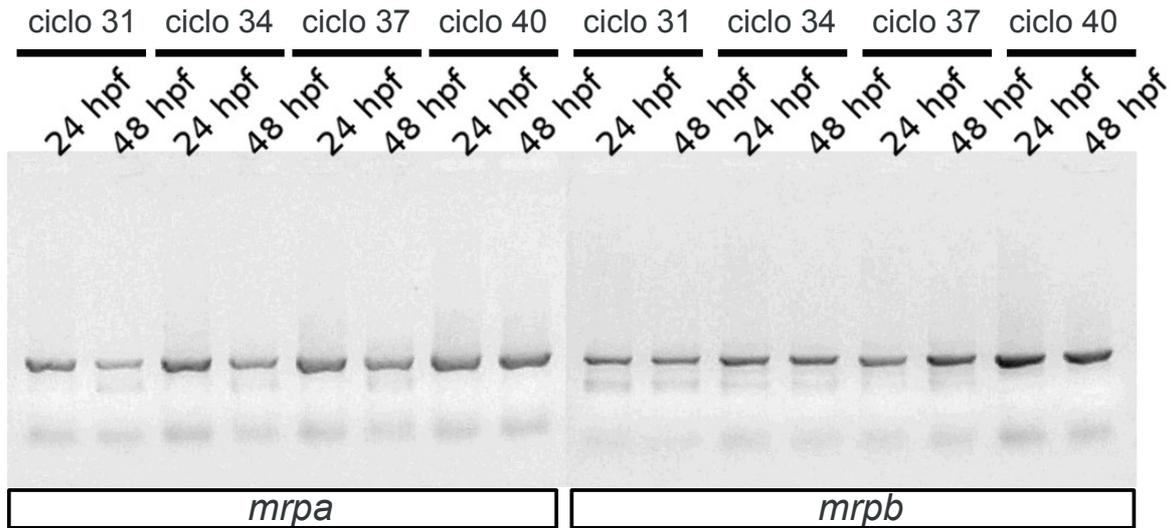
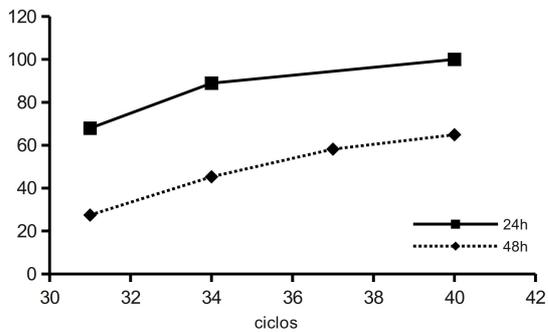


Figura 34. Variación en la amplificación de *marcksa* y *marcksb* en embriones de 24 y 48 hpf. (A) sqRT-PCR para *marcksa* y *marcksb*. Se tomaron muestras cada tres ciclos entre el 31 y el 40. Agarosa 1,5%. (B y C) curvas de cuantificación densitométrica de los niveles de amplificación porcentuales de *marcksa* (B) y *marcksb* (C). (D y E) Curvas logarítmicas y determinación de la función de regresión lineal con sus valores de R^2 para su comparación. El análisis muestra diferencias en las pendientes de las curvas.

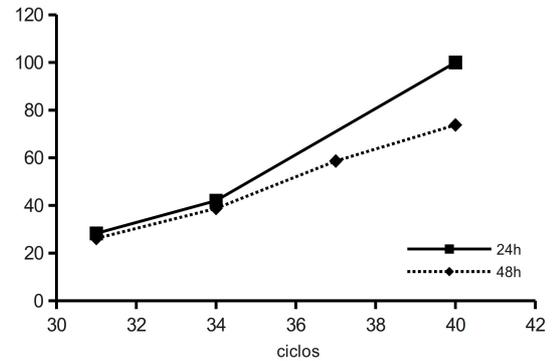
A



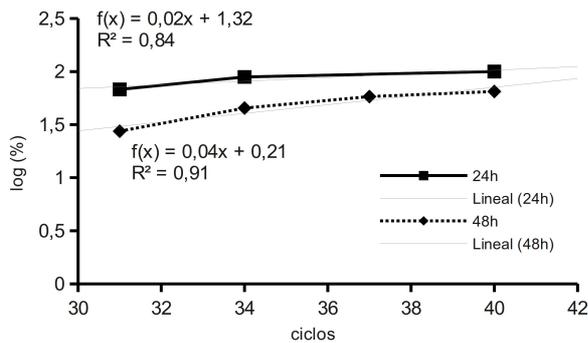
B



C



D



E

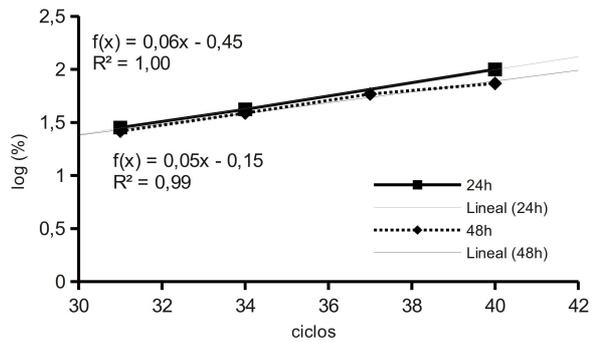


Figura 35. Variación en la amplificación de *mrpa* y *mrpb* en embriones de 24 y 48 hpf. (A) sqRT-PCR para *mrpa* y *mrpb*. Se tomaron muestras cada tres ciclos entre el 31 y el 40. Agarosa 1,5%. (B y C) curvas de cuantificación densitométrica de los niveles de amplificación porcentuales de *mrpa* (B) y *mrpb* (C). (D y E) Curvas logarítmicas y determinación de la función de regresión lineal con sus valores de R^2 para su comparación. El análisis muestra pequeñas diferencias en las pendientes de las curvas.

3.3. Cuantificación de los niveles de expresión de los genes de la familia *marcks* en el desarrollo del pez cebra mediante RT-PCR cuantitativa en tiempo real.

Debido a los indicios de que existían cambios en los niveles de expresión en estas etapas, y a que las limitaciones del método de sqRT-PCR no nos permitirían explorar en mayor detalle estos fenómenos, decidimos utilizar como abordaje experimental la RT-PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR). Evaluamos los niveles de expresión de las etapas 24, 48 y 72 hpf, de *marcksa*, *marcksb*, *mrpa*, *mrpb*, y los genes de referencia *ef1a* (factor de elongación) y *rpl13a* (proteína ribosomal), comparados con los niveles que detectamos en ovocitos, cuyo valor establecimos como 1 en nuestros análisis.

Para determinar si los juegos de cebadores presentaban más de un producto detectable (multímeros de cebadores, etc) realizamos curvas de *melting*, representando la variación de la fluorescencia detectable en función de la temperatura. En todos los casos obtuvimos un único producto de amplificación, como se muestra en la figura 36.

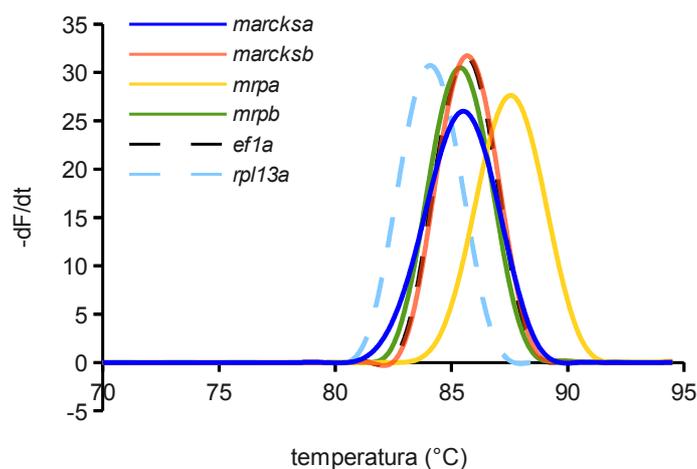


Figura 36. Curvas de *melting* de los productos de amplificación en tiempo real. Todos los juegos de cebadores presentaron un único amplicón como se observa en el gráfico. Se grafica el opuesto de la derivada primera de la fluorescencia respecto al tiempo en función de la temperatura. Los picos únicos indican que se trata de un producto de amplificación único.

Cuando cuantificamos los niveles de expresión en función del gen de referencia *ef1a*, encontramos que *marcksa* presentaba niveles similares a los del ovocito, y que luego decae de forma sostenida entre las 48 y las 72 hpf. En cambio *marcksb* presenta niveles más bajos que los del ovocito a las 24 hpf, y se mantienen bajos al menos hasta las 72 hpf.

Al comparar con la cuantificación realizada utilizando como gen de referencia el de la proteína ribosómica L13 α (*rpl13a*), observamos la misma tendencia (figura 37 A y B).

En el caso de *mrpa* y *mrpb*, al utilizar como gen de referencia *efla*, encontramos que los niveles de ambos se incrementan abruptamente entre el ovocito y las 24 hpf, con tendencia al aumento hacia las 72 hpf para *mrpb*, aunque sin soporte estadístico. Sin embargo, cuando comparamos con los datos obtenidos utilizando como referencia la expresión de *rpl13a*, encontramos un incremento en *mrpb* hacia las 72 hpf (figura 37 C y D).

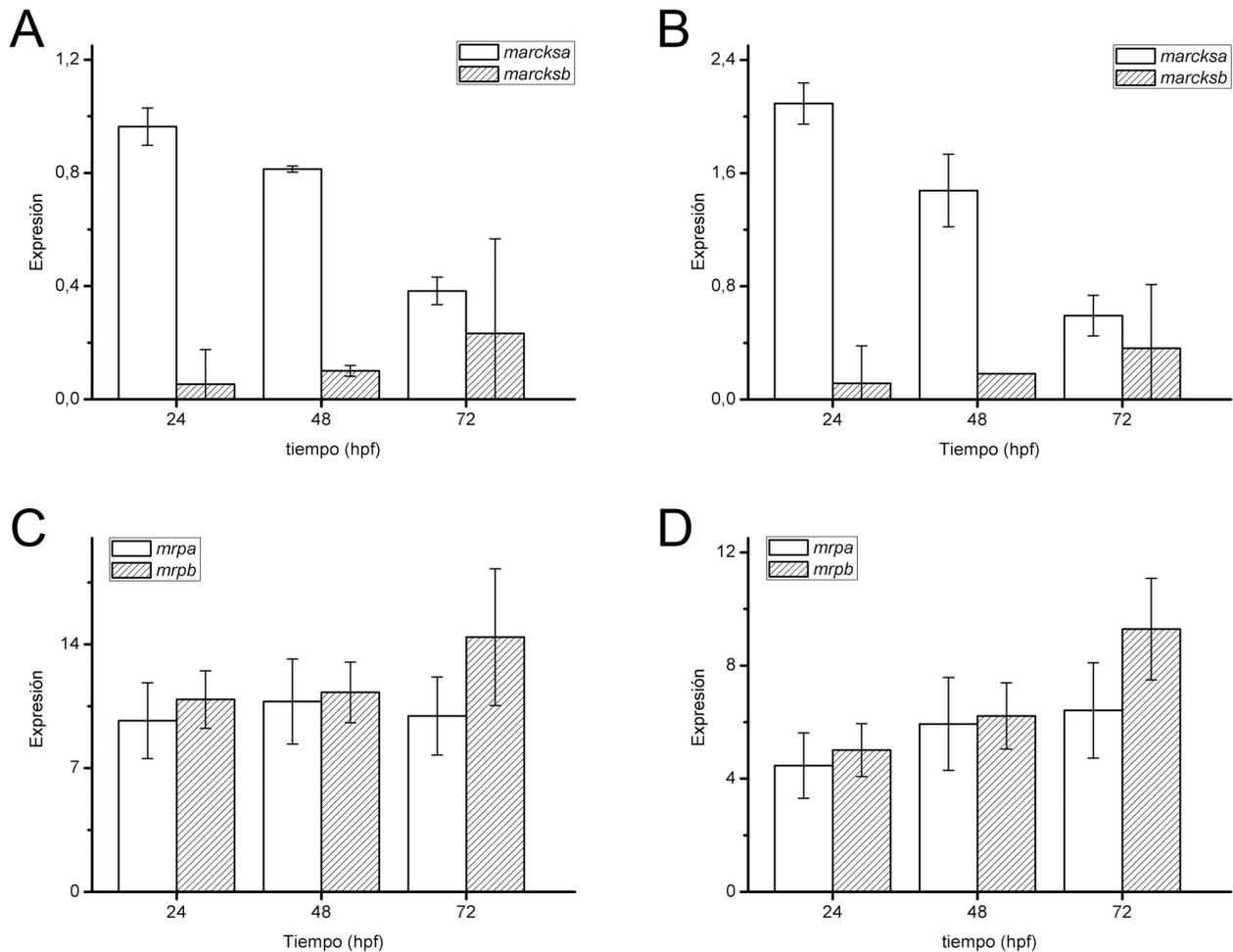


Figura 37. Niveles de expresión relativa de los genes *marcksa* y *marcksb* (A y B), y de *mrpa* y *mrpb* (C y D). Se utilizaron independientemente dos genes de referencia cuyos niveles se espera que no varíen durante el desarrollo: el del factor de elongación eucariota 1a (*efla*, A y C) y el de la proteína ribosómica L13 α (*rpl13a*, B y D). Las muestras control corresponden a ADNc de ovocitos, cuyo valor establecimos como 1. Los bigotes representan el error estándar.

Las diferencias encontradas entre las cuantificaciones realizadas utilizando los dos genes de referencia de manera independiente nos sugerían la posible existencia de variaciones en los niveles de expresión entre los genes de referencia. Para determinarlo realizamos una cuantificación de

ambos mensajeros, uno en función del otro, y encontramos cambios sutiles en sentidos opuestos entre ambos genes, como se muestra en la figura 38.

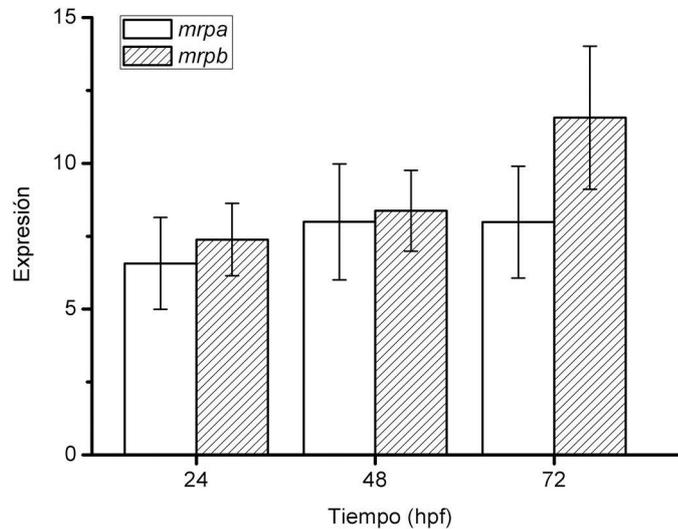


Figura 38. Niveles de expresión relativa de los genes de referencia *ef1a* y *rpl13a*. En cada caso se utilizó el otro gen de referencia. La abundancia de ambos mensajeros presentó diferencias entre las diferentes etapas analizadas. Las muestras control corresponden a ADNc de ovocitos. Los bigotes representan el error estándar.

Para minimizar las variaciones derivadas de las diferencias en los genes de referencia, realizamos una nueva cuantificación, esta vez considerando los dos genes de referencia simultáneamente. Con este tipo de análisis, determinamos que *marcksb* disminuye sostenidamente sus niveles de expresión entre las 24 y las 72 hpf, mientras que *marcksa* no varía significativamente, luego de una disminución importante de sus niveles previo a las 24 hpf (figura 39 A). En tanto, *mrpa* no parece variar sus niveles de expresión en la ventana temporal analizada, aunque sus valores son apreciablemente mayores que los del ovocito. Nuevamente, para *mrpb* aparece una tendencia al aumento hacia las 72 hpf estadísticamente no significativa (figura 39 B).

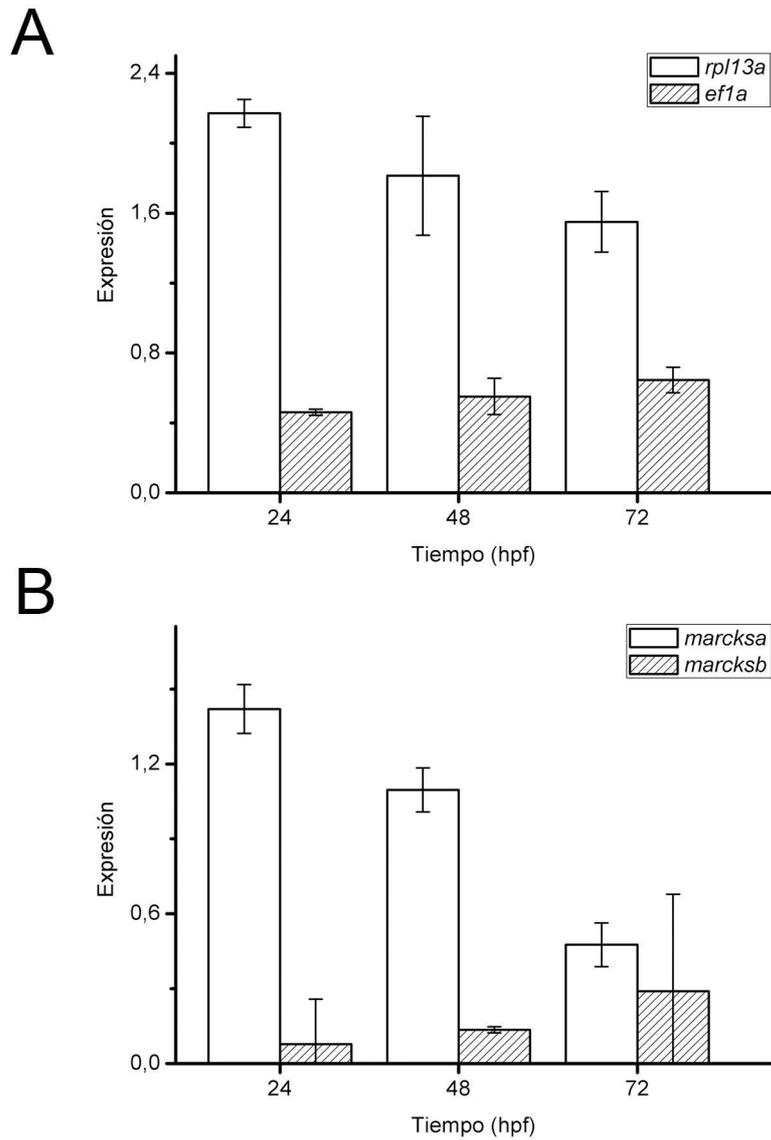


Figura 39. Niveles de expresión relativa de los genes *marcksa* y *marcksb* (A), y de *mrpa* y *mrpb* (B). Se utilizaron conjuntamente dos genes de referencia cuyos niveles se espera que no varíen durante el desarrollo: el del factor de elongación eucariota 1a (*ef1a*) y el de la proteína ribosómica L13a (*rpl13a*). Los niveles están expresados en abundancia relativa. El control corresponde a ADNc de ovocitos. Los bigotes indican el error estándar.

4.- Evaluación de un panel de anticuerpos anti-MARCKS para su uso en inmunodetección en pez cebra en western blots y en inmunodetección *in situ*

4.1. *Screening* de anticuerpos anti-MARCKS para su uso en inmunodetección en *western blots*

4.1.1. Anticuerpo monoclonal 3C3

Ensayamos el anticuerpo monoclonal 3C3, dirigido contra la isoforma de MARCKS de pollo fosforilada en S25. Utilizamos extractos de proteína embrionaria de pez cebra de 35, 48, y 72 hpf y, como control positivo, un carril con extracto de proteína de retina de embrión de pollo E12 (figura 40, carril 1).

El tratamiento con calor del extracto de proteínas nos permitió obtener una banda única con una migración relativa de 76 kDa (figura 40, punta de flecha blanca), ligeramente menor que la banda mayoritaria obtenida en el control positivo de 79 kDa (figura 40, punta de flecha negra) correspondiente a S25pMARCKS, sugiriendo que el tratamiento con calor de los extractos podría ser de utilidad también en las MARCKS de pez cebra.

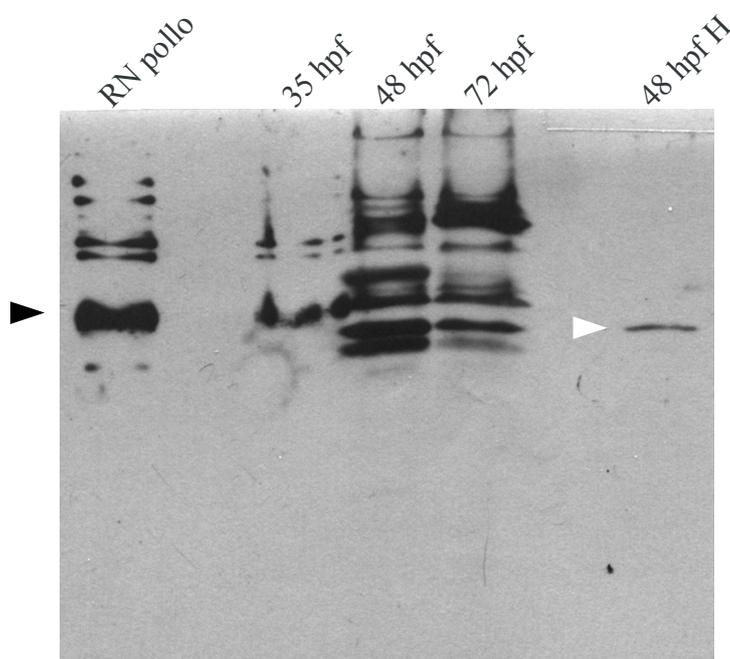


Figura 40. Inmunodetección con el anticuerpo anti-S25pMARCKS 3c3. Se utilizó como control positivo un extracto de retina embrionaria de pollo (carril 1; banda con movilidad relativa de 79 kDa, punta de flecha negra) y se sobreexpuso la membrana para evidenciar bandas tenues. El último carril fue cargado con un extracto de embriones de 48 hpf sometido a hervor para precipitar la mayor parte de las proteínas no-MARCKS. El tratamiento permitió obtener una única banda con una movilidad relativa de 76 kDa (punta de flecha blanca).

4.1.2. Anticuerpo policlonal Mct

Probamos el anticuerpo policlonal anti-MARCKS Mct utilizando extractos de proteína obtenidos en dos condiciones diferentes: sin tratamiento, y sometidas a calor, con el fin de enriquecer las muestras en MARCKS. Comparamos los resultados con el anticuerpo anti-S25pMARCKS 3C3.

Mct no parece reconocer más que unas bandas tenues en extractos obtenidos a partir de cabezas de pez cebra de 35 y 48 hpf sometidos a calor (figura 41 A). En tanto, 3C3 reconoce bandas mayoritarias en casi todas las muestras ensayadas (figura 41 B), teniendo éstas en todos los casos una movilidad relativa ligeramente menor a la del control positivo de retina de pollo, siendo ésta la única banda en la que observamos colocalización (figura 41 C).

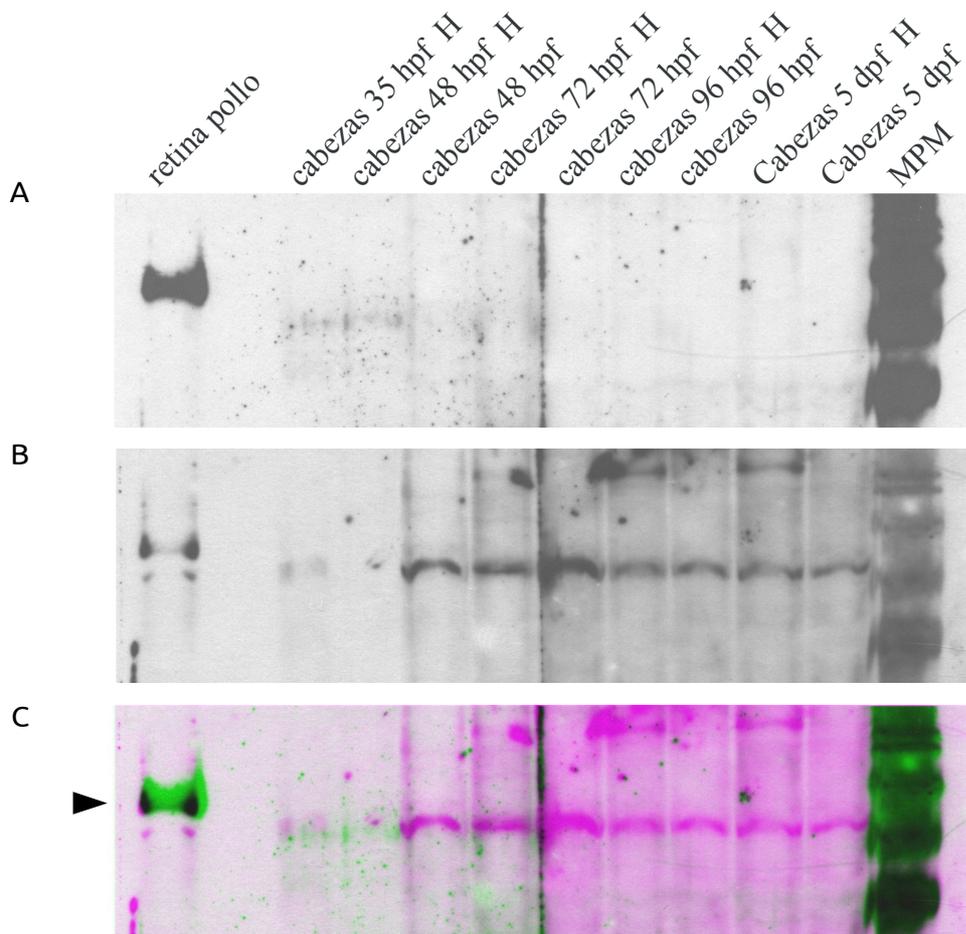


Figura 41. Inmunodetección con los anticuerpos anti-MARCKS Mct (A) y anti-S25pMARCKS 3c3 (B). En C se muestra la superposición de ambas inmunodetecciones con falso color; en verde Mct, en magenta 3C3, la colocalización aparece en negro. Se utilizó como control positivo un extracto de retina embrionaria de pollo (carril 1) y se sobreexpuso la membrana para evidenciar bandas tenues. La punta de flecha señala la banda correspondiente a MARCKS de pollo.

4.1.3. Anticuerpo policlonal 9300

Considerando el elevado grado de conservación en el dominio efector de las secuencias de las MARCKS de los diferentes vertebrados estudiados, especialmente en el caso de MARCKSa, ensayamos un anticuerpo comercial dirigido contra el dominio efector denominado 9300. Utilizamos como control positivo un extracto de proteínas de retina neural embrionaria de pollo, y como muestra problema un extracto de embriones de pez cebra de 48 hpf. Realizamos una primera inmunodetección control con el anticuerpo Mct para verificar su especificidad en el control positivo (figura 42 A).

La superposición de ambas inmunodetecciones nos permitió determinar que el anticuerpo 9300 reconoce una banda mayoritaria en las muestras de retina de pollo, que presenta la misma migración relativa que la banda mayoritaria de Mct (figura 42 B y C). Sin embargo, 9300 no parece reconocer bandas mayoritarias en las muestras de pez cebra, en el rango de movilidad relativa esperado.

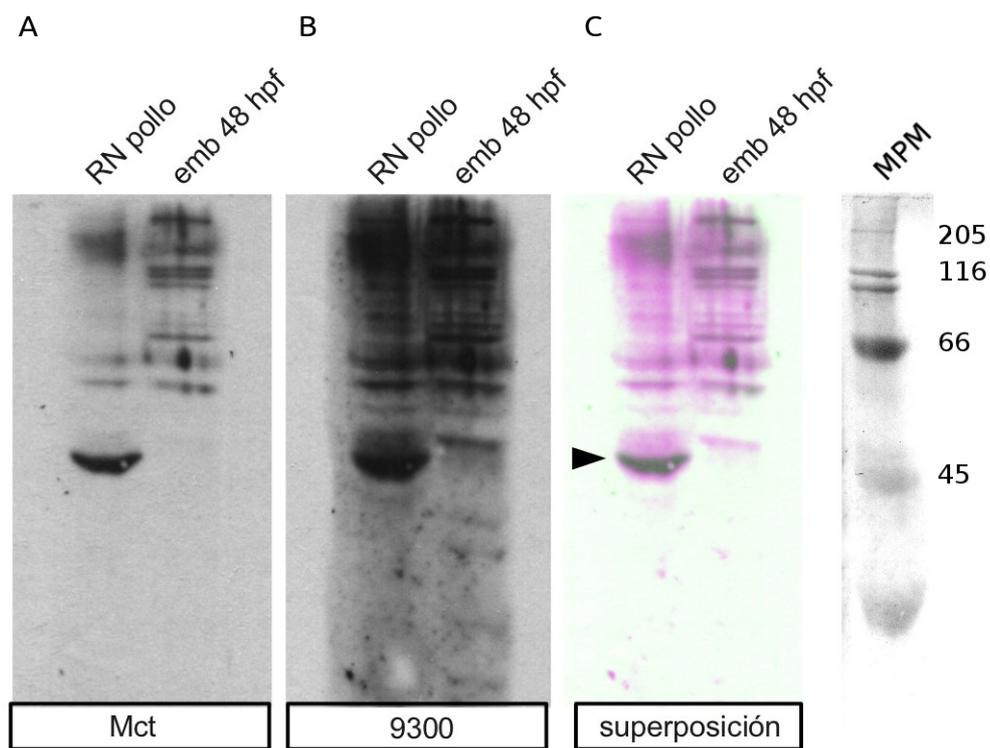


Figura 42. Inmunodetección con los anticuerpos anti-MARCKS Mct (A) y 9300 (B). Se utilizó como control positivo un extracto de retina embrionaria de pollo (carril 1) y se sobreexpuso la membrana para evidenciar bandas tenues. En C se muestra la superposición de ambas inmunodetecciones con falso color; en verde Mct, en magenta 9300, la colocalización aparece en negro. MPM: marcador de peso molecular.

4.1.4. Anticuerpo policlonal Martin

Intentamos determinar si el anticuerpo anti-MARCKS dirigido contra la proteína de pollo Martin podría reconocer las proteínas MARCKS del pez cebra. Para ello realizamos un western blot con muestras de retina y cerebro adultos de pez, y extractos de embriones enteros de 48 hpf. Como control positivo utilizamos un extracto de proteínas de retina neural embrionaria de pollo.

El anticuerpo reconoce al menos dos bandas próximas a la banda de MARCKS de pollo en las muestras de tejidos adultos de pez. Sin embargo, ambas presentan menor movilidad relativa en SDS-PAGE que la banda que corresponde a MARCKS en el pollo (figura 43 A). Cuando intentamos aumentar la sensibilidad incrementando las concentraciones de anticuerpo 5 y 10 veces, la relación señal/ruido disminuyó (figura 43 B y C). Para ensayar la eventual reactividad cruzada del anticuerpo con XMARCKS, la proteína MARCKS de *Xenopus*, incluimos en el ensayo de la figura 43 B un carril con un extracto de proteína embrionaria de esa especie. El incremento de la concentración de anticuerpo tampoco nos permitió detectar bandas que pudiéramos interpretar como posibles MARCKS de pez cebra.

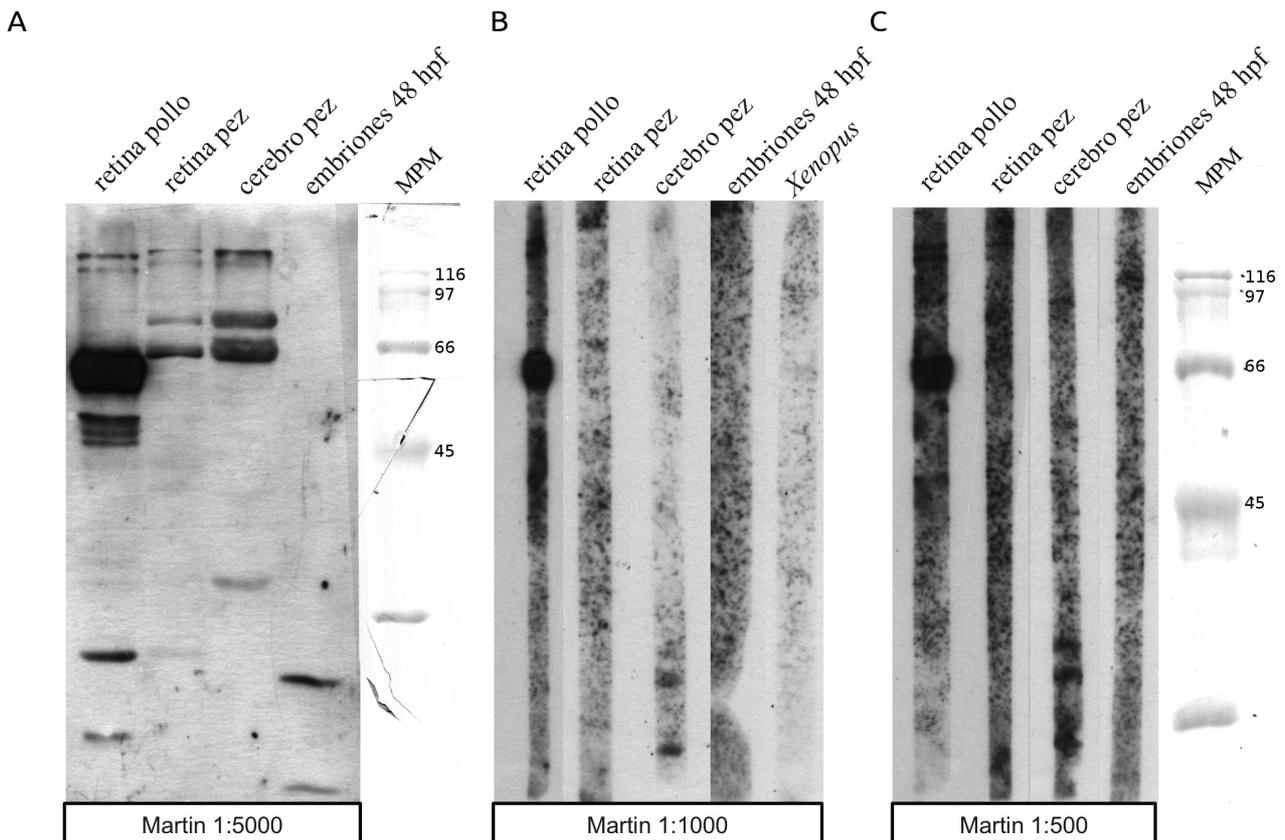


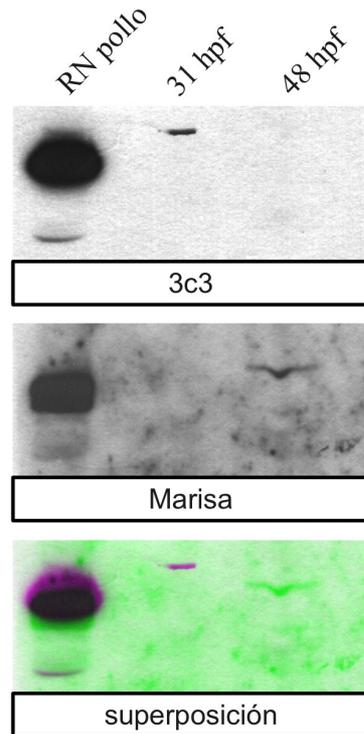
Figura 43. Inmunodetección con el anticuerpo anti-MARCKS Martin. Se utilizó como control positivo un extracto de retina embrionaria de pollo (carril 1) y se sobreexpuso la membrana para evidenciar bandas tenues. En el control, la banda mayoritaria corresponde a MARCKS, y las que se encuentran por debajo podrían corresponder a productos de degradación. El anticuerpo reconoce dos bandas mayoritarias con

menor movilidad relativa que la banda de MARCKS de pollo (A). Utilizando el anticuerpo en concentraciones más elevadas que 1:5000 no mejoró la señal, y se incrementó el ruido (B y C). La carga de proteína del carril de embriones corresponde a 6 embriones de pez cebra de 48 hpf. Tampoco fue posible obtener evidencias de una posible reactividad cruzada con la MARCKS de *Xenopus laevis* (B). MPM: marcador de peso molecular.

4.1.5. Anticuerpo policlonal Marisa

Ensayamos otro anticuerpo anti MARCKS dirigido contra la proteína de pollo, Marisa, utilizando como control positivo un extracto de proteína de retina embrionaria de pollo (E12). Comparamos muestras de embriones de pez cebra de 31 y 48 hpf con el anticuerpo 3C3 (figura 44 A). El anticuerpo Marisa reconoce en los extractos de retina de pollo una banda mayoritaria que se superpone con la banda reconocida por 3C3 (figura 44 A). Ensayamos además extractos proteicos obtenidos a partir de retina neural y cerebro adulto, y de embriones de 48 hpf de pez cebra (figura 44 B). Sólo en el extracto de retina neural de pez cebra adulto es posible identificar dos bandas que coinciden con la migración relativa de las bandas reconocidas por Marisa en muestras de pollo. No descartamos por este motivo la viabilidad del uso de este anticuerpo en el pez cebra, si bien esperaríamos que las MARCKS del pez cebra presentaran menor movilidad relativa que la proteína de pollo. Otorgamos el beneficio de la duda en virtud de la conocida migración aberrante de las proteínas MARCKS, acerca de la cual carecemos de información en el pez. Sin embargo, la relación señal/ruido resultó insatisfactoria, tomando en consideración que se sobreexpusieron las placas radiográficas para evidenciar bandas tenues reconocidas por el anticuerpo, no resultándonos posible afirmar la existencia de bandas mayoritarias.

A



B

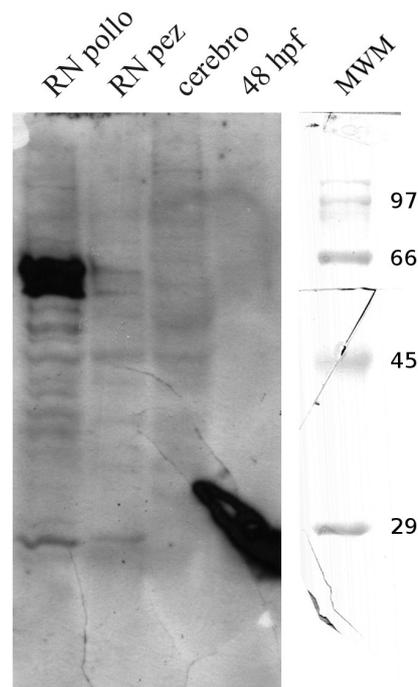


Figura 44. Inmunodetección con los anticuerpos anti S25p-MARCKS 3C3 y anti-MARCKS Marisa (A). Se utilizó como control positivo un extracto de retina embrionaria de pollo (carril 1) y se sobreexpuso la membrana para evidenciar bandas **Inmunodetección** con los anticuerpos anti-MARCKS Marisa y Polo sobre extractos de proteína de retina neural embrionaria de pollo (RN pollo, control positivo), retina neural adulta de pez cebra (RN pez), cerebro adulto de pez cebra (**cerebro pez**), **embriones de pez cebra (emb. pez)** y **embriones de rana *X. laevis* (*Xenopus*)**.  cada caso se indican las diluciones de los anticuerpos primarios utilizados. La carga de proteína embrionaria de pez corresponde a 20 embriones de pez cebra de 48 **hpf.enues**. Se muestra además la superposición de ambas inmunodetecciones con falso color; en verde Marisa, en magenta 3C3, la colocalización aparece en negro. En B se muestra la inmunodetección sobre extractos de tejidos adultos de pez cebra: retina neural (RN pez) y cerebro. MPM: marcador de peso molecular.

4.1.6. Anticuerpo policlonal Polo52

Ensayamos la inmunorreactividad del anticuerpo Polo52, dirigido contra la proteína recombinante de pollo, y la comparamos con la inmunorreactividad del anticuerpo anti-N-terminal Marisa. Utilizamos como control positivo un extracto de retina neural de embrión de pollo de estadio E12. Para revelar la presencia de posibles bandas tenues reconocidas por el anticuerpo se sobreexpusieron las membranas, saturándose la banda de MARCKS en los carriles correspondientes a las muestras de pollo. El anticuerpo Polo52 reconoce en el pollo una banda con la misma

migración relativa que Marisa, pero en ningún caso nos fue posible identificar bandas mayoritarias por encima del ruido de fondo en las muestras de pez cebra, ni en retina o cerebro adultos, o extractos de embriones enteros de 48 hpf. Polo52 tampoco reconoció en estas condiciones banda alguna en un extracto de embriones de *X. laevis*, como se muestra en la figura 45.

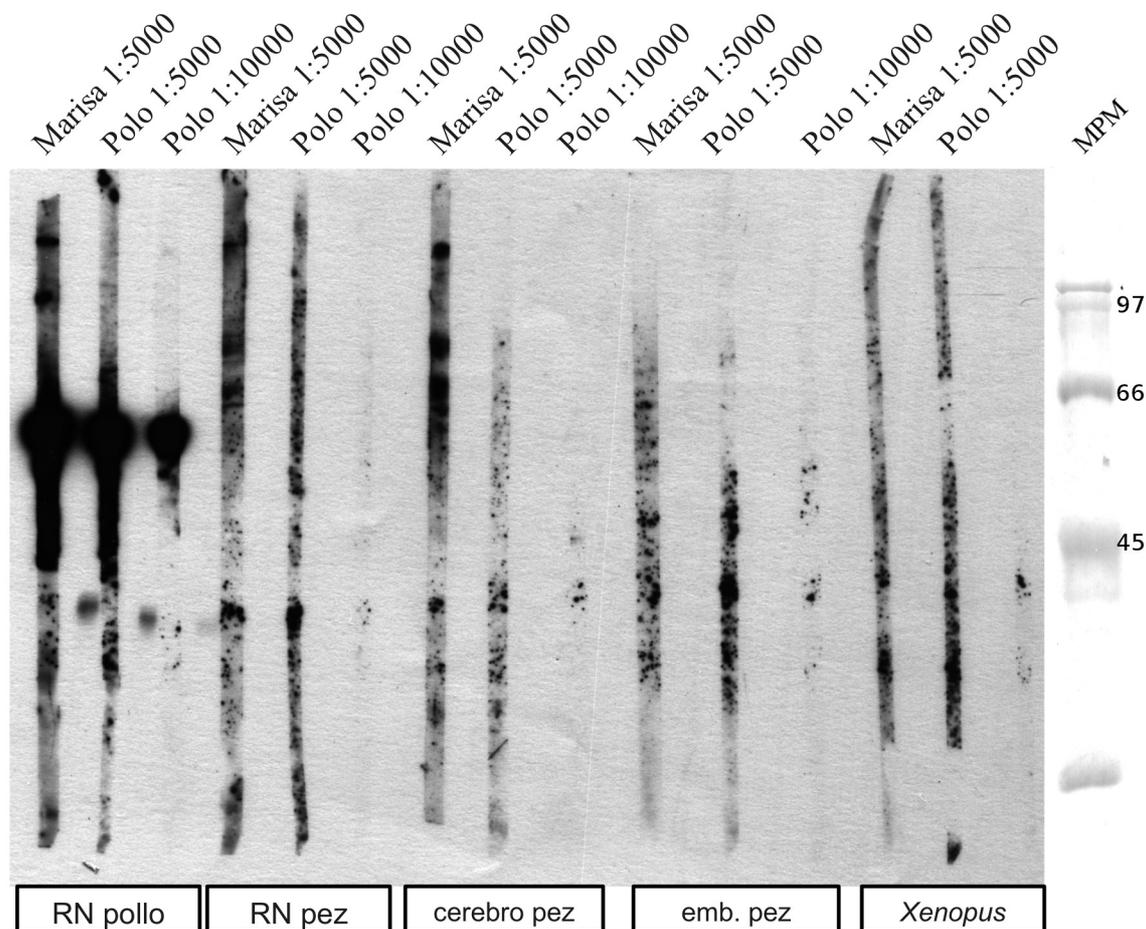


Figura 45. Inmunodetección con los anticuerpos anti-MARCKS Marisa y Polo sobre extractos de proteína de retina neural embrionaria de pollo (RN pollo, control positivo), retina neural adulta de pez cebra (RN pez), cerebro adulto de pez cebra (cerebro pez), embriones de pez cebra (emb. pez) y embriones de rana *X. laevis* (*Xenopus*). En cada caso se indican las diluciones de los anticuerpos primarios utilizados. La carga de proteína embrionaria de pez corresponde a 20 embriones de pez cebra de 48 hpf.

4.2. Screening de anticuerpos anti-MARCKS para su uso en inmunodetección mediante inmunofluorescencia *in situ*.

4.2.1 Anticuerpo policlonal MCT

Cuando lo utilizamos sobre cortes a congelación de embriones de pez cebra, el anticuerpo

MCT presentó un enriquecimiento en la inmunorreactividad en la región basal de la retina de 40 hpf, especialmente en la capa de fibras del nervio óptico, sugiriendo una similitud con las observaciones realizadas en retinas embrionarias de pollo, aunque no observamos señal en los cuerpos celulares. A las 48 hpf, la inmunorreactividad se encontró restringida principalmente a las capas sinápticas, sin encontrar enriquecimiento en los cuerpos celulares en ninguna de las láminas nucleares de la retina (figura 46), ya establecidas a las 48 hpf, presentando un patrón diferente del descrito para MARCKS en otros vertebrados, y sugiriéndonos que la señal era inespecífica, y que el anticuerpo no resultaba idóneo para inmunodetección *in situ* en embriones de pez cebra.

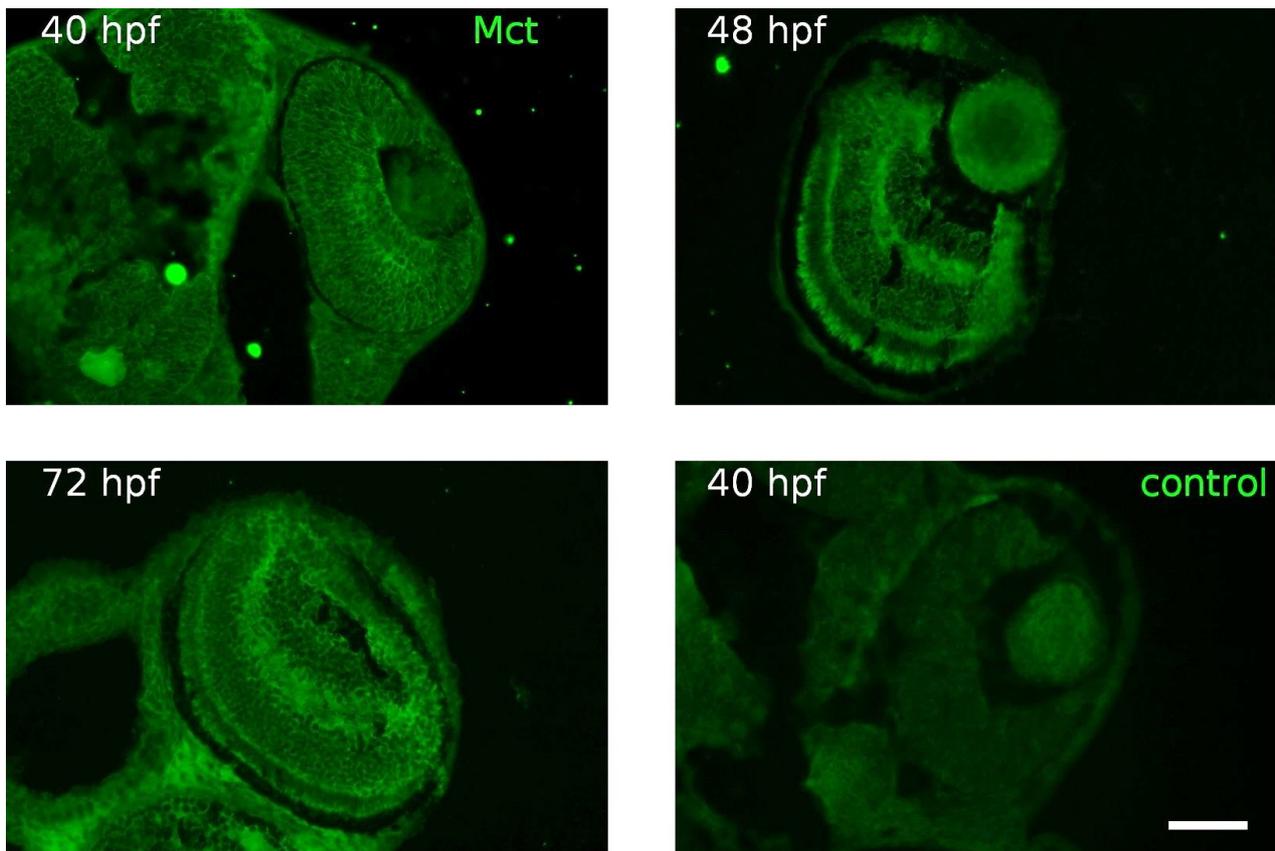


Figura 46. Inmunodetección con el anticuerpo anti MARCKS MCT sobre cortes de embriones de embriones de 40, 48 y 72 hpf. Se muestra como control negativo representativo un corte de 40 hpf sin anticuerpo primario. Barra: 50 μ m.

4.2.2 Anticuerpo monoclonal 3C3

El anticuerpo monoclonal 3C3 reconoce la isoforma fosforilada de MARCKS S25p-MARCKS en varios vertebrados. Sin embargo, el patrón de inmunorreactividad que observamos en cortes a congelación de embriones de pez cebra no presentaba similitudes con los

patrones descritos en el pollo, resultando en una señal débil y difusa, sin enriquecimiento en las capas plexiformes, ni en la capa de fibras del nervio óptico, y sin presentar mayores diferencias en tejidos neurales y no neurales (figura 47). Estos resultados sugieren que el anticuerpo 3C3, si bien podía resultar candidato para su utilización en *western blots*, no resultaría de mayor utilidad *in situ*.

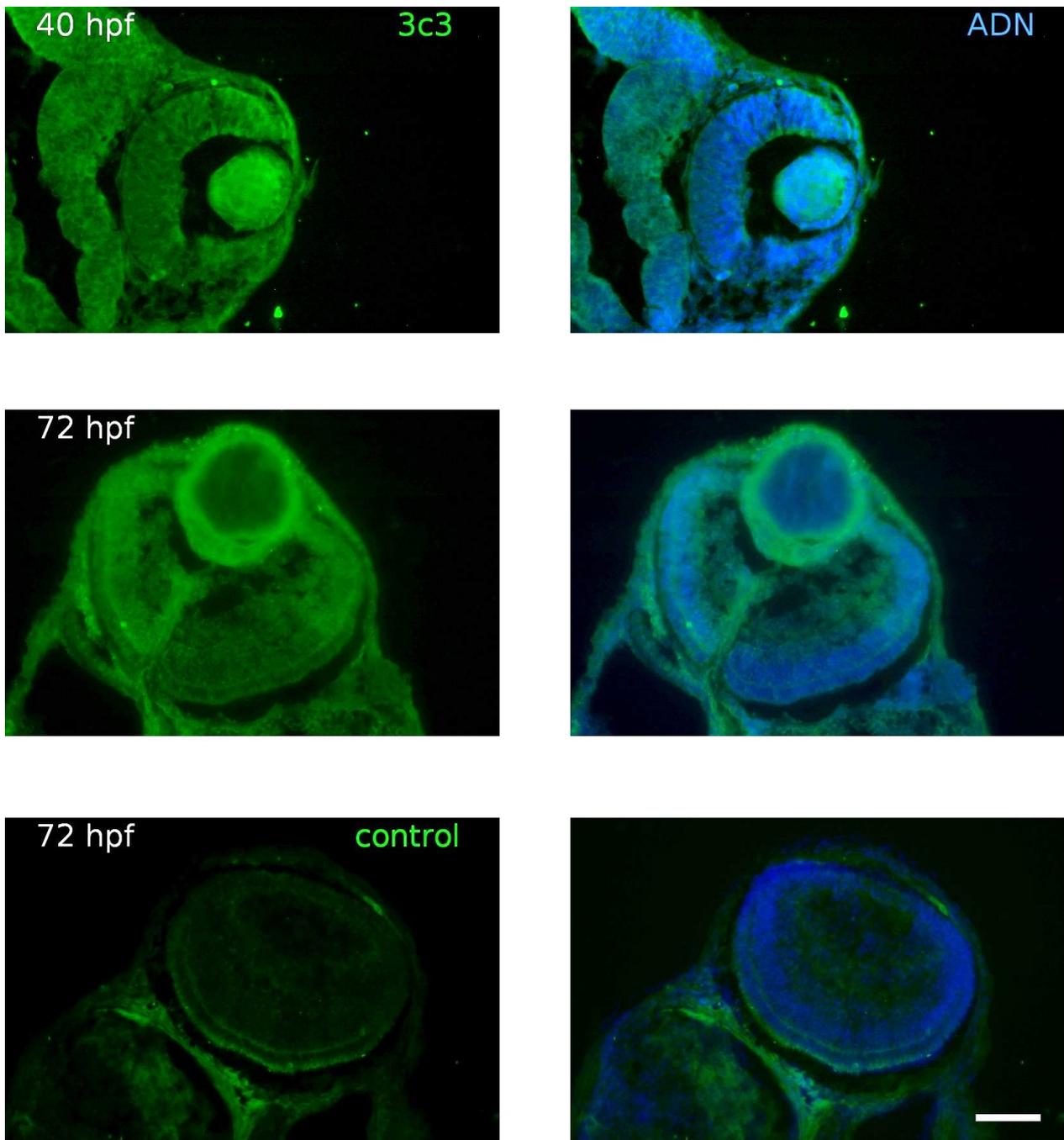


Figura 46. Inmunodetección con el anticuerpo anti S25pMARCKS 3C3 sobre cortes de embriones de embriones de 40 y 72 hpf. Se muestra como control negativo representativo un corte de 72 hpf sin anticuerpo primario. La inmunorreactividad es débil y difusa, presentando mayor intensidad en el cristalino, y no encontrando similitudes con el patrón de distribución de S25p-MARCKS conocido en otras especies. Barra: 50 μ m.

4.2.3 Anticuerpos policlonales Martin, Marisa y Polo52

Al realizar las inmunodetecciones *in situ* con los anticuerpo Martin y Marisa encontramos que ambos presentan una señal ubicua excluida de los territorios nucleares, pero que no presentaba las características ya mencionadas para el patrón de inmunoreactividad de MARCKS conocido en otras especies (figura 47 A y B).

El anticuerpo Polo52 no presentó inmunoreactividad apreciable en cortes a congelación de embriones de 48 hpf de pez cebra, aún siendo utilizado en concentraciones elevadas, indicando que tampoco resultaría adecuado para su uso *in situ* en embriones de pez cebra (figura 47 C).

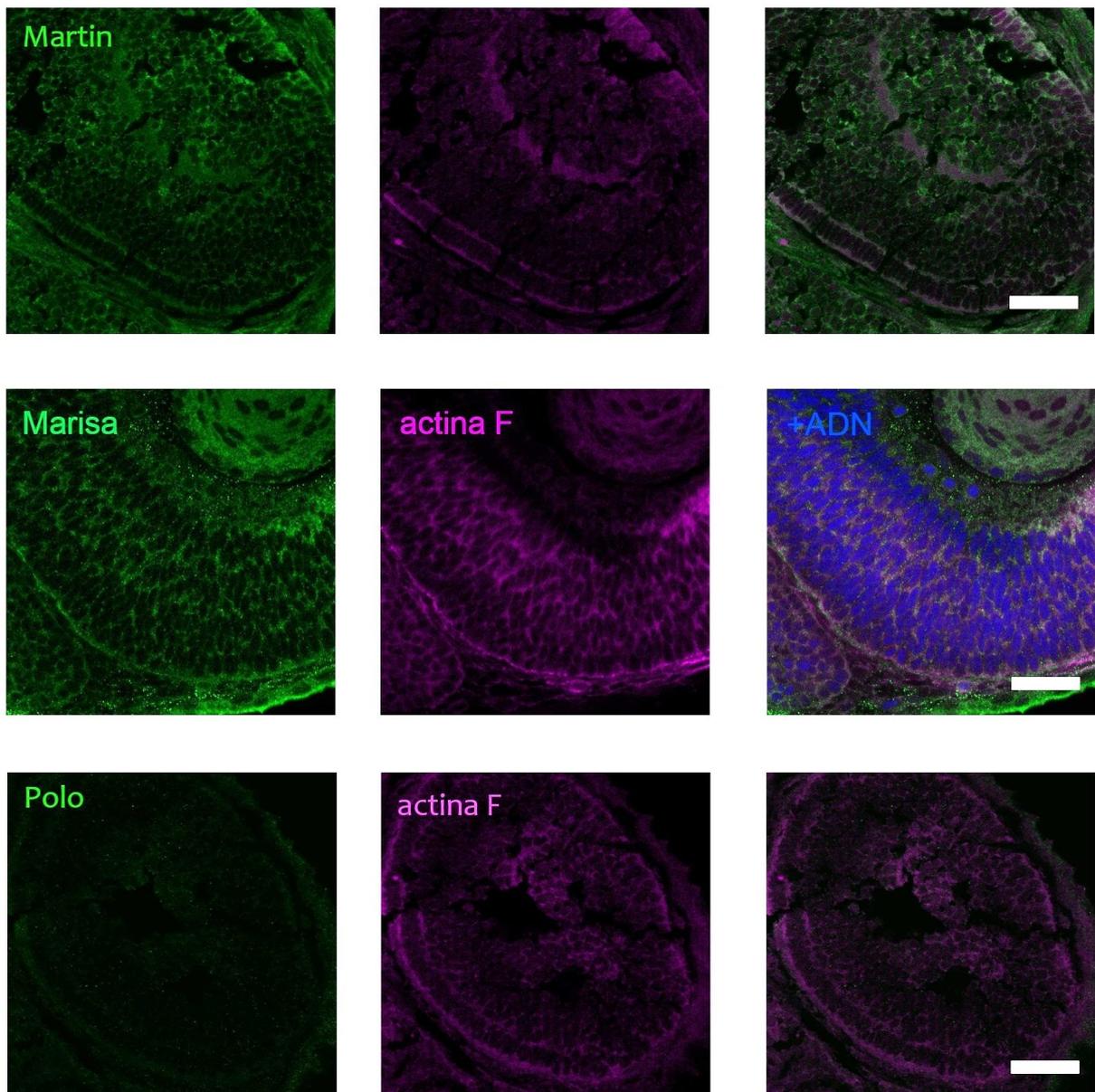


Figura 47. Inmunoreactividad de los anticuerpos anti-MARCKS Martin (A), Marisa (B) y Polo52 (C) en ojos de embriones de 48 hpf. Ninguno de los anticuerpos presentó un patrón análogo al conocido para la distribución de la inmunoreactividad de MARCKS en otros vertebrados. La barra corresponde a 20 μ m.

III. Estudio de los efectos del silenciamiento génico de los posibles ortólogos de *marcks* en el embrión de pez cebra

5.- Estudio de los efectos del silenciamiento génico de *marcksa* y *marcksb*

Exploramos las funciones de MARCKSa y MARCKSb mediante ensayos de pérdida de función por bloqueo de la traducción de sus ARNm microinyectando oligonucleótidos de morfolino antisentido. Evaluamos los fenotipos globales macro y microscópicamente, y analizamos la expresión de marcadores de diferenciación celular en la retina neural en los embriones morfantes. El rango de dosis efectivas de morfolino que encontramos óptimo estaba entre los 0,1 – 0,3 pmol por embrión. Por debajo de estas dosis, los fenotipos se presentaban débiles e inconsistentes; mientras que por encima de 0,6 p mol la muerte en etapas embrionarias tempranas, especialmente durante la epibolia (4,5 – 9 hpf), resultaba universal.

Realizamos además experimentos de silenciamiento simultáneo de *marcksa* y *marcksb* con el objeto de determinar si sus funciones podrían estar relacionadas, y en ese caso, si se trataría de funciones sinérgicas o antagónicas.

5.1. Análisis de los fenotipos morfantes

Validamos el morfolino control (control MO) inyectando las mismas dosis que de los morfolinos *marcksa* (*marcksa* MO) y *marcksb* (*marcksb* MO), y comparando con embriones control de la misma edad. Como se muestra en la figura 48, el morfolino control no provoca efectos fenotípicos detectables en las dosis inyectadas.

Los embriones morfantes *marcksa* tenían un tamaño menor que los controles en cuanto a longitud del cuerpo, presentaban además microcefalia, microftalmia, y edema leve del pericardio. La histología retiniana presentaba retrasos a las 48 hpf con regiones de muerte celular evaluada mediante la presencia de núcleos picnóticos, como se muestra en la figura 48 D y E.

Los embriones morfantes *marcksb* presentaban una alteración más severa de su morfología con un mayor retraso general del desarrollo, menor longitud del cuerpo, hipokinesia (datos no mostrados), edema del tercer y cuarto ventrículo cerebral (señalado con puntas de flecha en la figura 48 F) y malformaciones oculares (microftalmia y deformación del globo, asterisco). El análisis histológico mostró que estos embriones presentaban un retraso en la laminación de la retina, en comparación con los inyectados con morfolino control. Sin embargo, a diferencia de lo observado en los morfantes *marcksa*, no encontramos regiones de muerte celular masiva en este tejido (figura 48 G).

Alrededor del 20% de los embriones morfantes *marcksb* presentaron una malformación ocular que sugería la existencia de plegamientos. Con la finalidad de explorar en mayor detalle las

malformaciones encontradas en los morfantes severos de *marcksb*, realizamos cortes semifinos (0,5 μ m) de los embriones para su evaluación histológica.

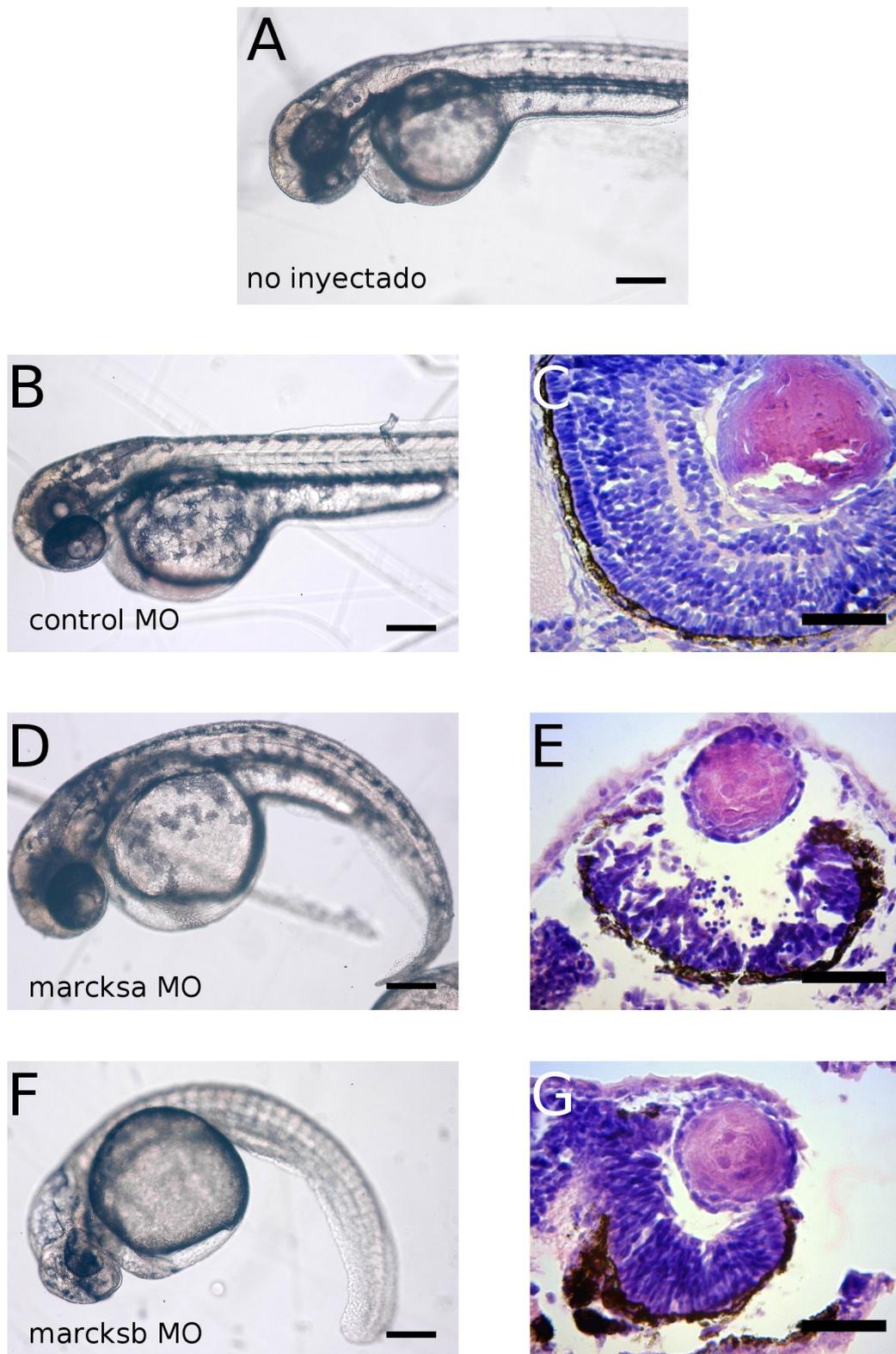


Figura 48. Fenotipos de los embriones morfantes *marcksa* y *marcksb*. Se valida el uso del morfolino control que presentó un fenotipo no diferenciable del de los embriones no inyectados (paneles superiores). Los

embriones morfantes *marcksa* presentan retraso del desarrollo, microcefalia y microftalmia. La histología retiniana aparece alterada con núcleos picnóticos en la región medial (paneles centrales). En tanto, los morfantes *marcksb* presentan además de la microcefalia y la microftalmia, edema ventricular, y malformaciones oculares. Las retinas de estos embriones presentan un aspecto inmaduro, pero no se reconocen regiones de muerte celular. Barra: 200 μ m.

Encontramos que los embriones de 48 hpf que macroscópicamente sugerían un plegamiento ocular, efectivamente presentaban plegamientos, sin muerte celular apreciable. Sus retinas tenían un aspecto inmaduro, sin láminas ni diferenciación celular evidentes, recordando el neuroepitelio de una copa óptica. En tanto, las retinas de los embriones inyectados con morfolino control presentaban láminas y capas plexiformes aún en desarrollo pero notoriamente distinguibles (figura 49). Concomitantemente, encontramos un adelgazamiento en el diámetro de las fibras musculares esqueléticas, que podría explicar la hipokinesia observada.

Con la intención de evaluar si el fenotipo retiniano revertía con el tiempo, a medida que el morfolino se diluía con las sucesivas divisiones celulares, cultivamos embriones morfantes *marcksb* hasta la edad de 5 dpf y realizamos el mismo procedimiento. Encontramos que las retinas, en lugar de corregir sus situación, empeoraban, presentando una desorganización de sus capas sinápticas, y ausencia general de laminación (figura 49). En su región apical, encontramos núcleos alineados que podrían corresponder a fotorreceptores, aunque no fuimos capaces de identificar segmentos externos.

Debido a la elevada muerte celular observada en los morfantes *marcksa*, decidimos aislar el fenotipo del efecto de la muerte relacionada a la vía de p53, silenciando concomitantemente la expresión de p53. Sin embargo, el fenotipo *marcksa* obtenido con el silenciamiento conjunto de *p53* no presentó diferencias apreciables con el ya descrito. En el caso de *marcksb*, observamos una atenuación del fenotipo, aunque conservando las características principales antes mencionadas. En los casos de doble silenciamiento de *marcksb* y *p53* no hemos observado los plegamientos oculares ya descritos (datos no mostrados).

Realizamos la inyección conjunta de ambos morfolinis en dosis inferiores a las utilizadas para el silenciamiento individual, asumiendo que si ambas poseían funciones sinérgicas, el fenotipo que obtendríamos sería más severo que la simple combinación de dos fenotipos débiles. En caso de que sus funciones fuesen antagónicas, esperaríamos observar una atenuación del fenotipo morfante. Los dobles morfantes *marcksa* y *marcksb* presentaron un fenotipo más severo que los fenotipos individuales, aún cuando las dosis de morfolino individual inyectadas fueron menores, de manera de lograr una dosis total de morfolino (*marcksa* + *marcksb*) igual a la inyectada en los morfantes simples (0,15+0,15 pmol). El efecto fue observable desde etapas tempranas del desarrollo, siendo

notable una alteración en el frente de epibolia de los embriones inyectados, señalado con líneas punteadas en la figura 50 D, con desprendimiento celular (indicado con puntas de flecha en la figura). En etapas posteriores, presentaron un acortamiento del tronco, microcefalia, microftalmia, ausencia parcial o total de pigmentación, edema del pericardio, plegamiento de la notocorda en la región caudal (figura 50 A, B, C), y ausencia total o parcial de movimiento tanto espontáneo como provocado por la estimulación por contacto con una aguja (datos no mostrados).

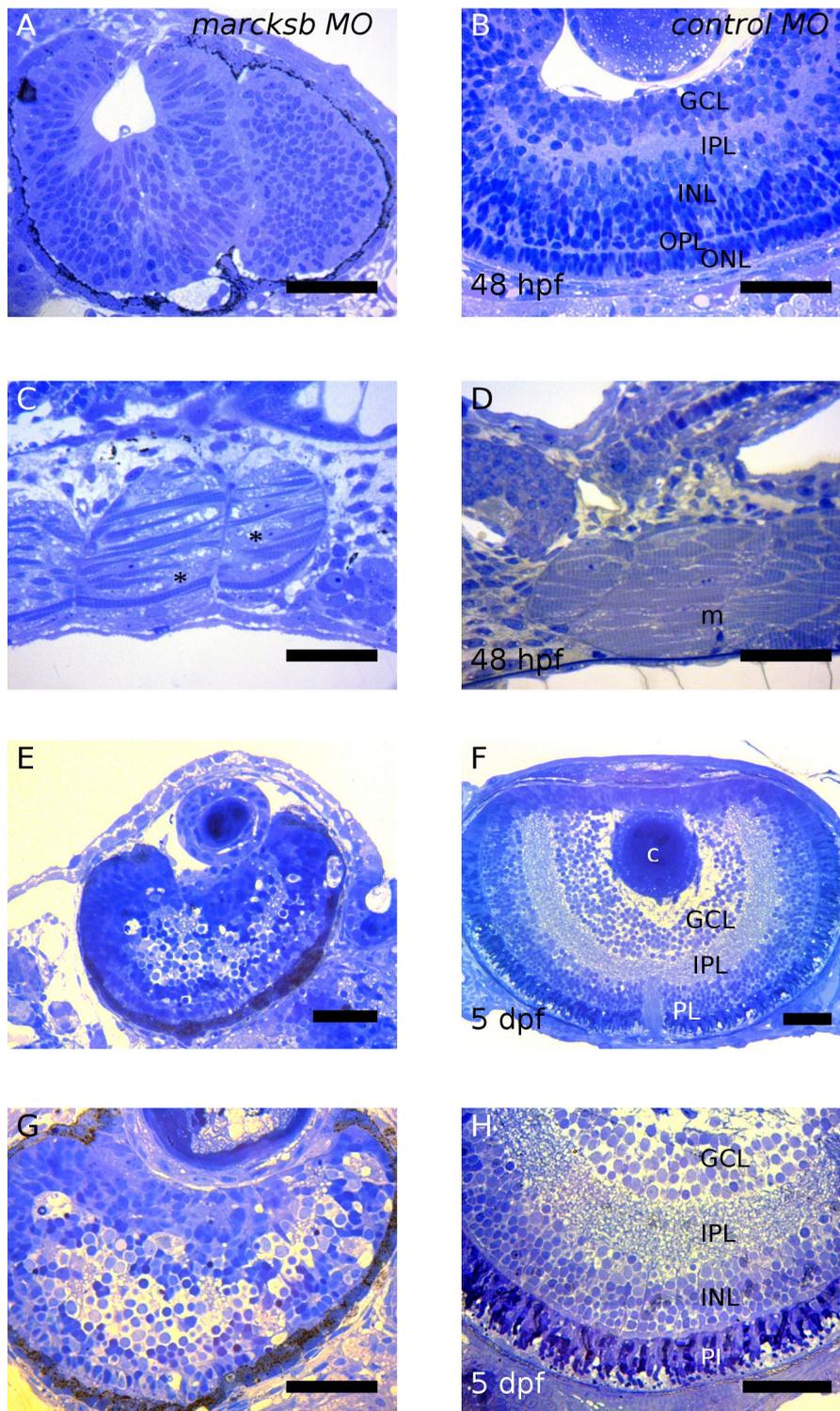


Figura 49. Alteraciones en la histogénesis de embriones morfantes *marcksb*. Tanto en la retina como en el músculo de los embriones morfantes de 48 hpf (mitad superior) encontramos alteraciones morfológicas. La retina de los embriones de 5 dpf presentaban defectos en la laminación y no se reconocen segmentos externos de los fotorreceptores. En la columna de la izquierda se muestran los embriones morfantes *marcksb*. En la columna de la derecha se muestran los embriones control. De arriba hacia abajo: cortes semifinos a la altura del ojo (48 hpf); cortes longitudinales de planos musculares dorsales (48 hpf); cortes a la altura del ojo panorámicos y a mayor aumento de embriones de 5 dpf. Barra: 20 μ m. IPL: capa plexiforme interna; c: cristalino; INL: capa nuclear interna; m: músculo; PL: capa de fotorreceptores

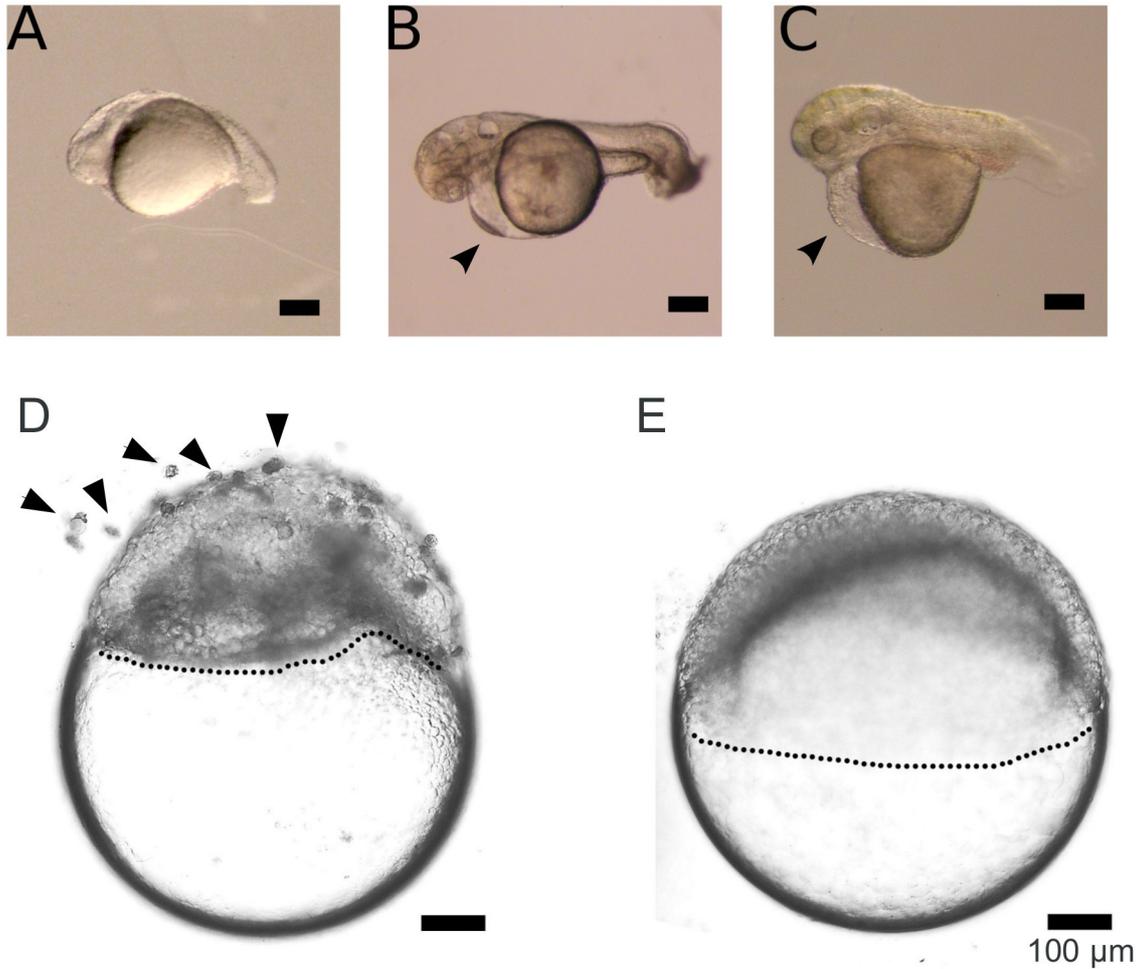


Figura 50. Fenotipo de los dobles morfantes *marcksa+b* (A) 24 hpf, (B) 48 hpf, (C) 72 hpf. Los embriones presentan retraso en el desarrollo, acortamiento severo del tronco, microcefalia, microftalmia, escasa o nula pigmentación, edema pericárdico, y un plegamiento de la notocorda en la región caudal. El movimiento de los embriones, tanto espontáneo como evocado por el reflejo de contacto se encuentra muy reducido o ausente. Barra: 200 μm . (D) Defectos en la epibolia de los morfantes dobles *marcksa+b*. Los embriones morfantes presentan retraso en la expansión del frente de epibolia, muerte celular con desprendimiento de blastómeras, e irregularidad en el frente de epibolia (línea punteada), respecto de los embriones control (E). Barra: 100 μm .

5.2. Formación del esqueleto craneofacial

Nos preguntamos si la microcefalia de los morfantes estaba vinculada a una reducción proporcional en el tamaño de la cabeza o si podía deberse a afectaciones en el patrón del esqueleto craneofacial. Para evaluarlo, observamos los cartílagos mandibulares de embriones morfantes de 5 dpf teñidos con alcian blue y encontramos que tanto los morfantes *marcksa* como los *marcksb*

presentaban defectos en la formación del esqueleto craniofacial.

Los morfantes *marcksa* presentan deficiencias en la convergencia de los cartílagos de Meckel hacia la línea media, reducción de la longitud de los cartílagos palatocuadrados, y rudimentos de los cartílagos basihiales y de los arcos ceratobranquiales 1 a 4 (figura 51 C y D).

En el caso de los morfantes *marcksb* encontramos que los cartílagos de Meckel se encontraban bien situados, pero los palatocuadrados presentaban una curvatura hacia la región anterior, los cartílagos ceratohiales presentaban una alteración en el ángulo que forman normalmente con el eje anteroposterior del embrión, y una severa reducción en los ceratobranquiales (figura 51 E y F).

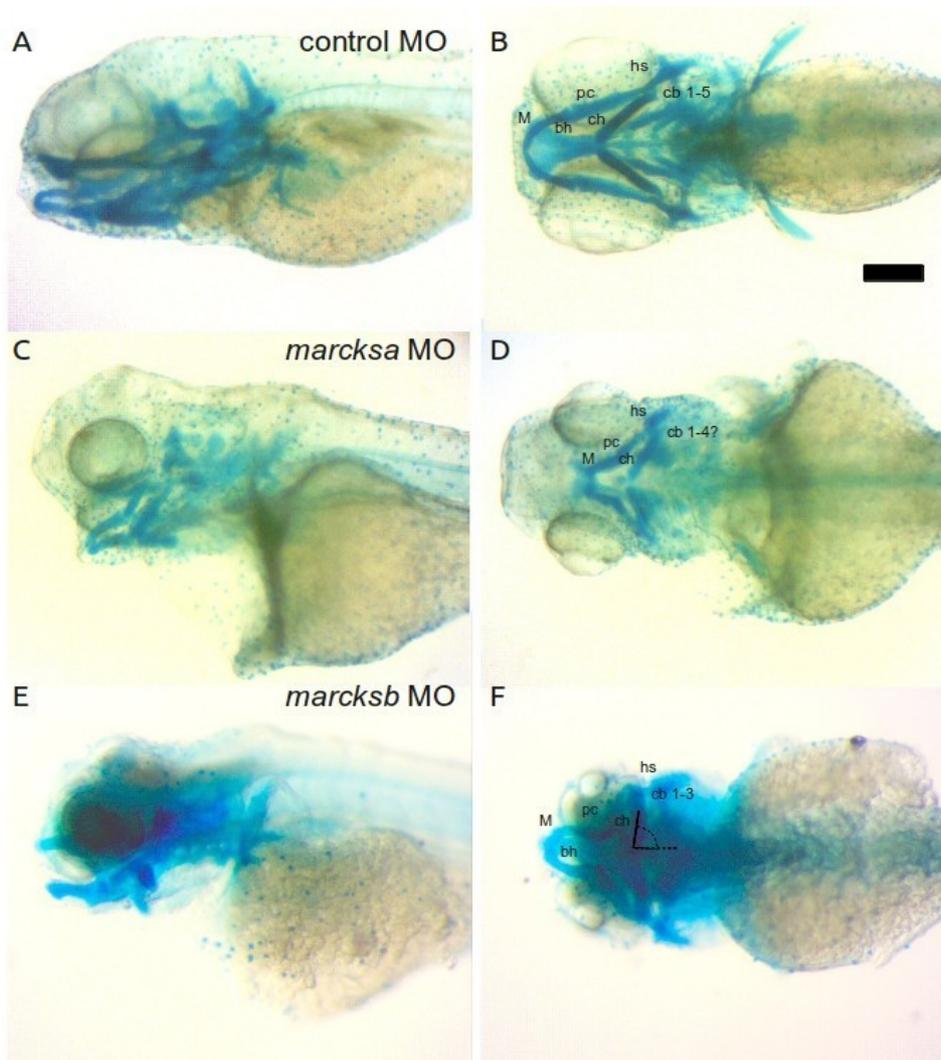


Figura 51. Alteraciones en el esqueleto craniofacial en los morfantes *marcksa* y *marcksb*. Coloración de los cartílagos con Alcian blue; A, C y E, vistas laterales; B, D y F, vistas ventrales. Embriones de 5 dpf inyectados con 0,3 pmol de morfolino control (A y B), morfolino *marcksa* (C y D) o morfolino *marcksb* (E y F). Abreviaturas: pc: palatocadrado; ch: ceratohial; M: cartílago de Meckel; cb: ceratobranquial; hs: hiosimpléctico; bh: basihial; hs: hiosimpléctico.

5.3. Expresión de marcadores de diferenciación celular en morfantes *marcksa* y *marcksb*

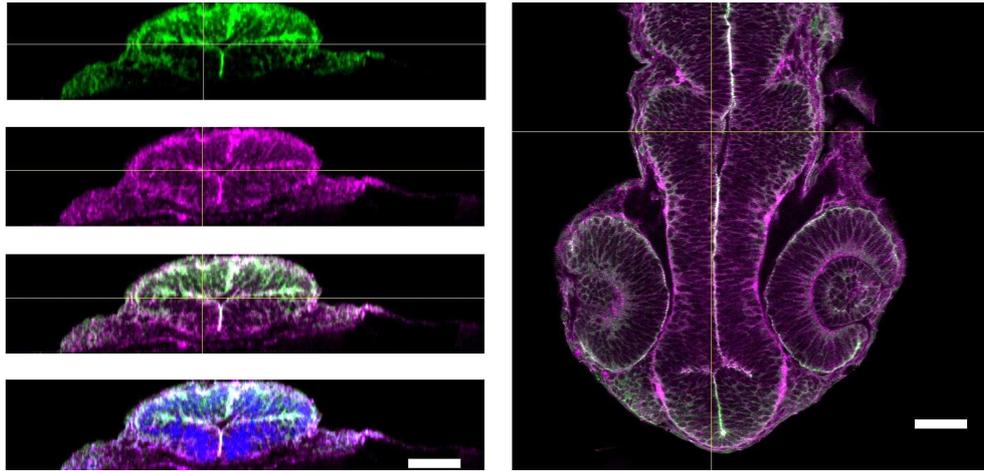
Evaluamos la posible afectación de la polaridad de las células neuroepiteliales observando el marcador apical aPKC en el mesencéfalo de embriones de 24 hpf, encontrando que ni el silenciamiento de *marcksa* ni el de *marcksb* afectaban la polaridad medida como la pérdida de la inmunorreactividad apical del marcador (figura 52).

Para evaluar el nivel de organización de la retina de los embriones morfantes utilizamos marcadores de diferenciación de las células ganglionares (CGR), y de conos dobles, además de faloidina como reportero del nivel de organización del citoesqueleto de actina filamentosa, y de estructuras ricas en este elemento como las capas plexiformes.

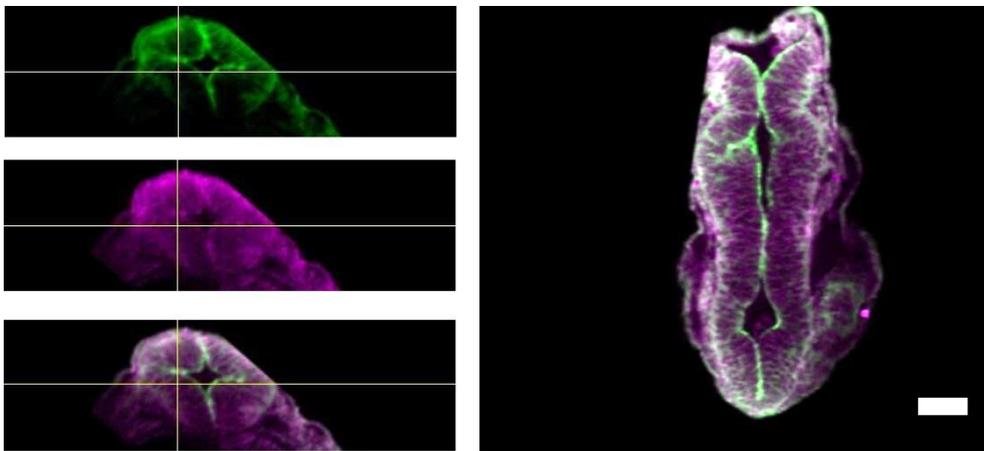
Encontramos que en los embriones morfantes de 48 hpf el nivel de organización de la retina neural era primario, sin láminas identificables ni células que expresaran el marcador de diferenciación de células ganglionares zn-5. En ambos morfantes (*marcksa* y *marcksb*) parecía encontrarse una disminución en la cantidad de actina filamentosa detectable mediante la unión de faloidina (figura 53).

Para dilucidar qué ocurría con las células decidimos realizar inyección de dosis menores de morfolino, coinyectando morfolino *p53* y observando diferentes parámetros en tres etapas diferentes. En embriones morfantes *marcksa* de 72 hpf encontramos células ganglionares aunque en menor cantidad que en los controles, lo que redundaba en una capa de ganglionares adelgazada. Sin embargo encontramos capas plexiformes, tanto interna como externa, aunque también reducidas en tamaño. En morfantes *marcksb* encontramos únicamente el parche central inicial tanto de células ganglionares como de plexiforme interna (figura 54). También encontramos que aún en presencia de morfolino *p53*, la muerte celular en la retina no era despreciable, como mostramos en la figura, en que aplicamos una escala de falso color a la tinción de ADN para evidenciar la condensación nuclear. En ninguno de los casos pudimos encontrar evidencias de la existencia de fotorreceptores diferenciados (conos dobles, FR en la figura 55).

A



B



C

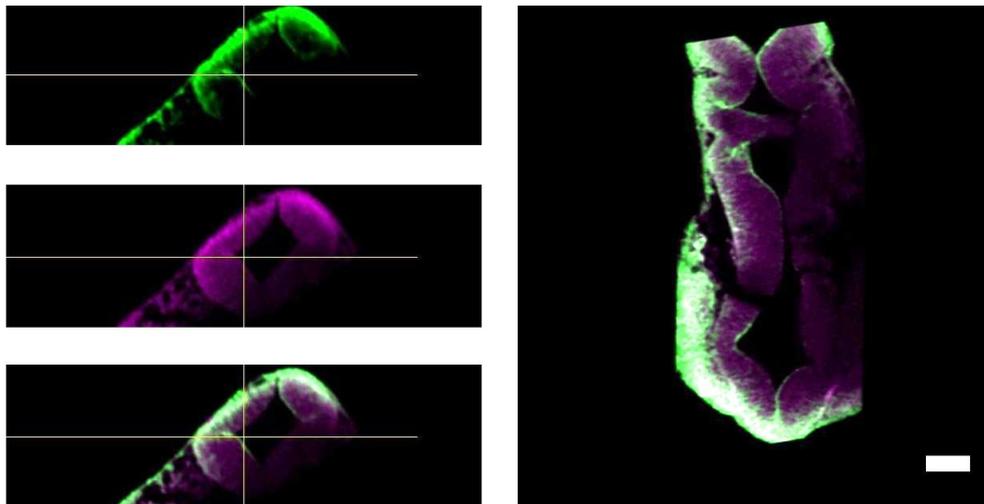


Figura 52. La polaridad celular del neuroepitelio medida como la inmunorreactividad de aPKC en embriones inyectados con morfolino control (A), morfolino *marcksa* (B) o morfolino *marcksb* (C). En los paneles de la izquierda se muestran cortes coronales virtuales a la altura del cerebro medio, y en el de la derecha, secciones confocales individuales. En verde se muestra aPKC, en magenta el citoesqueleto de actina filamentosa mediante faloidina. La superposición resulta en color blanco. Barra: 50 μm .

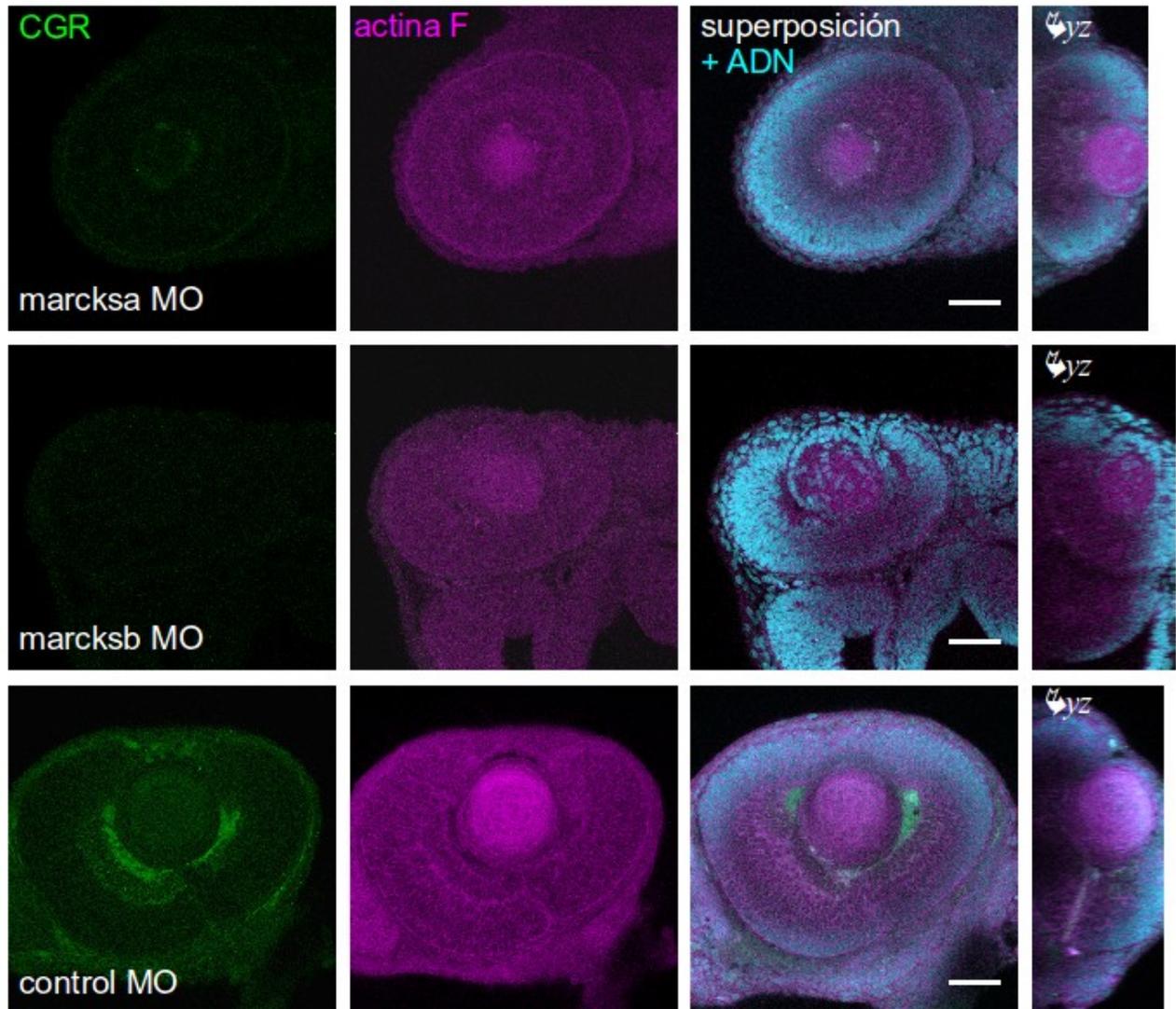


Figura 53. El patrón de tinción con faloidina, que preferencialmente se concentra en las capas nucleares interna y externa se ve afectado en los morfantes *marcksa* de forma moderada y en los *marcksb* de forma severa, en que se observa una reducción general de la tinción además de una alteración en la distribución enriquecida en la periferia celular en los controles, y difusa en los morfantes *marcksb*. En verde se muestra el marcador de células ganglionares zn5; en magenta se muestra la actina F mediante tinción con faloidina. En el panel de la derecha se muestra la superposición incluyendo en azul una tinción nuclear. El panel de la derecha muestra la reconstrucción de los planos yz. Barra: 50 μm .

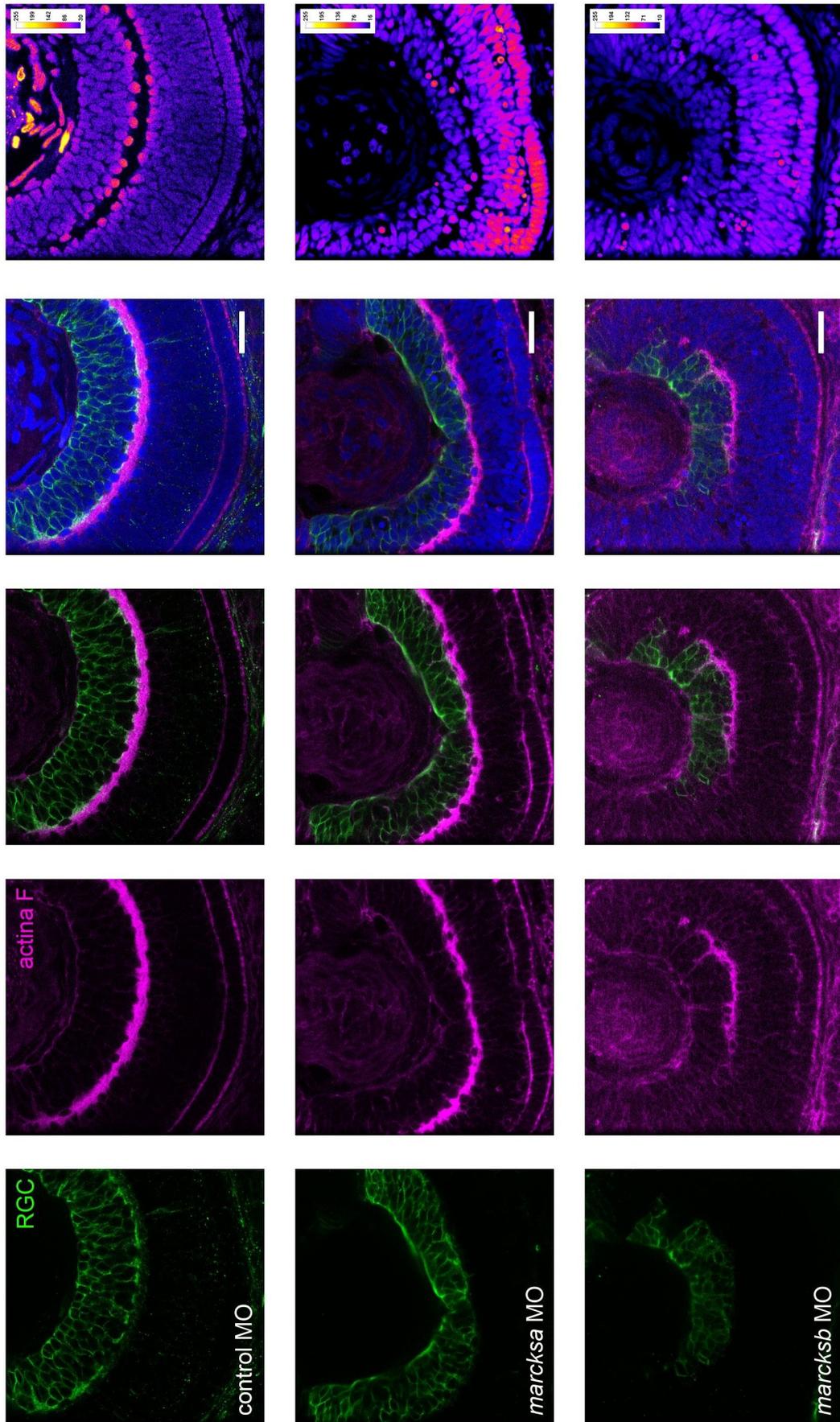


Figura 54. Aparición de células ganglionares diferenciadas en retinas de embriones morfantes de 72 hpf. La columna de la derecha muestra una rampa de falso color aplicada a la tinción nuclear para evidenciar condensación apoptótica del ADN. La diferenciación de las células ganglionares, medida como la

inmunorreactividad del marcador zn-5 ha sido comprometida, pero no eliminada por completo en los morfantes *marcksb*. Del mismo modo se distribuye la tinción con faloidina, indicando una reducción de las áreas sinápticas que acompaña el patrón de distribución de las células ganglionares. En todos los casos los embriones han sido coinyectados con morfolino anti *p53*. Barra: 20 μ m.

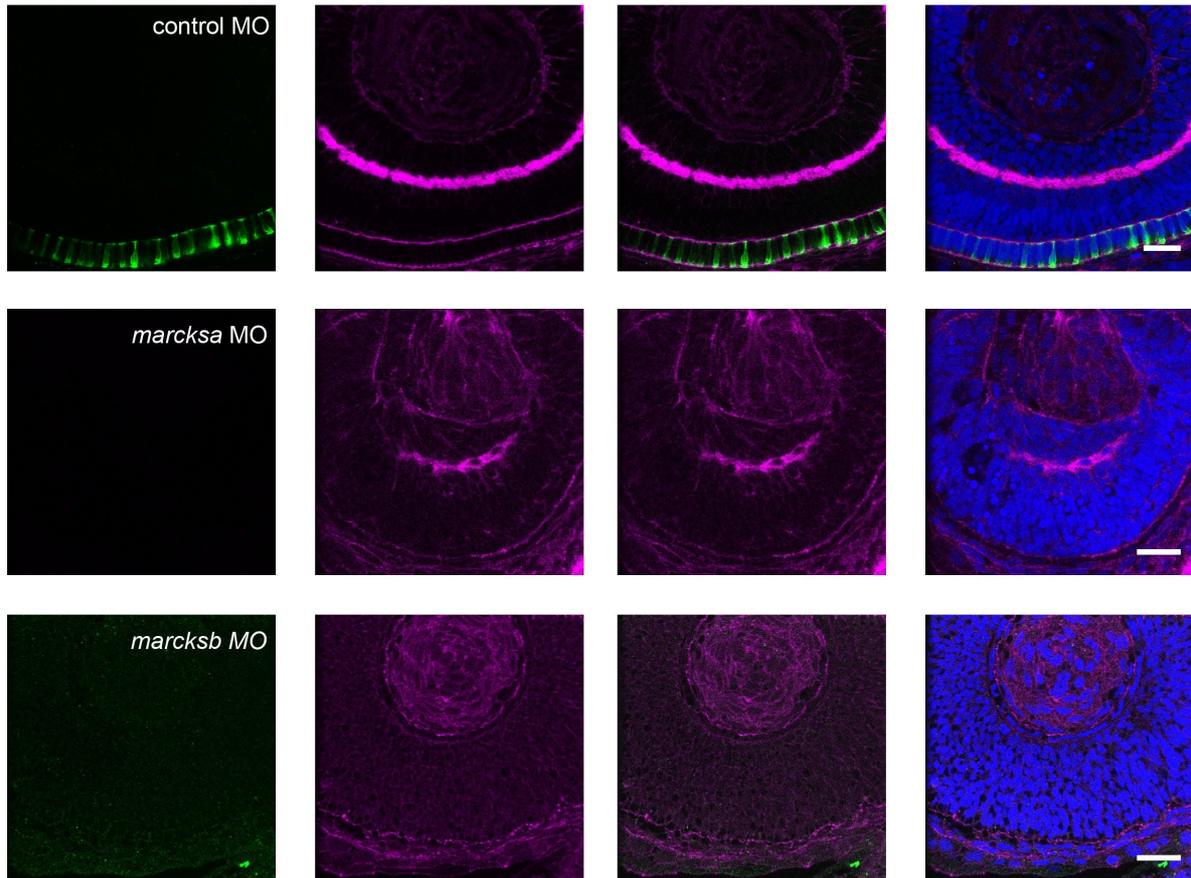


Figura 55. Ausencia de fotorreceptores (FR) diferenciados en retinas de embriones morfantes de 72 hpf coinyectados con morfolino anti *p53*. Los morfantes *marcksa* presentan solamente un esbozo de capa plexiforme. En verde se muestra el marcador de conos dobles *zpr1*, en magenta la actina F. El panel de la derecha muestra la superposición incluyendo una tinción nuclear que evidencia la presencia de núcleos picnóticos en el morfante *marcksa*. Barra: 20 μ m.

DISCUSIÓN y PERSPECTIVAS

Las proteínas MARCKS en el pez cebra

El genoma del pez cebra codifica dos proteínas MARCKS: MARCKSa y MARCKSb, y dos MRP, MRPa y MRPb, como indica nuestro análisis de las secuencias proteicas. Todas ellas poseen la estructura de las proteínas de la familia MARCKS, una glicina miristilable en el extremo amino terminal, un dominio MH2, un dominio efector rico en lisinas, y una secuencia altamente fosforilable.

Todas ellas son proteínas ácidas, con una composición aminoacídica peculiar, carente de triptófanos y tirosinas, lo que las vuelve complicadas para su cuantificación y detección mediante técnicas convencionales de la bioquímica experimental. Son, además, pequeñas, de alrededor de 200 aminoácidos, y con un peso molecular calculado de alrededor de 20 kDa. Sin embargo, su similitud con las secuencias de las MARCKS de otros vertebrados, de los que se poseen datos experimentales (Stumpo et al., 1989a), sugieren que su solubilidad en SDS podría ser baja, presentando entonces una migración anómala en geles de poliacrilamida en presencia del detergente, y sobreestimando así su peso molecular real.

MARCKSa y MARCKSb

Estas dos proteínas presentan diferencias interesantes entre sí. La primera posee un residuo S25 fosforilable por Cdks análogo al que está presente en las MARCKS únicas que presentan otros vertebrados. La probabilidad de fosforilación en este residuo, según nuestro análisis, es mayor a los de las proteína MARCKS de pollo, o la recombinante de humano, de las que existen evidencias experimentales de su fosforilación (Manenti *et al.*, 1999; Zolessi *et al.*, 2004b). La fosforilación en este residuo se ha vinculado a la diferenciación neuronal (Zolessi & Arruti, 2001b). Entre las MARCKS conocidas, MARCKSa es la única que posee residuos de cisteína en la posición 225 y una metionina interna en la posición 98, que podrían conferirle características funcionales únicas entre las MARCKS de los vertebrados como la asociación homóloga o heteróloga estabilizada a través de enlaces disulfuro. MARCKSb presenta divergencia en la secuencia del dominio efector, una característica única entre las secuencias de MARCKS conocidas. Asumiendo un escenario en que las MARCKS del pez cebra cumplan roles diferentes, cabría esperar que la función que cumple la proteína MARCKS en la diferenciación de neuronas de otros vertebrados, en el pez cebra sea cumplida por MARCKSa y no por su paróloga MARCKSb, que carece de un análogo a S25.

Al analizar las secuencias de sus ARN mensajeros a través de los clones de ADNc secuenciados, encontramos en las bases de datos que los *marcksa* y *marcksb* presentaban

porcentajes de identidad similares cuando se realizaban alineamientos pareados con las secuencias de otros vertebrados. El análisis de mensajeros resulta útil debido a que al incluir secuencias no codificantes, relaciona además los elementos regulatorios presentes en el ARN. En este análisis encontramos que *marcksa* y *marcksb* presentaban elevados índices de similitud con las secuencias de mensajeros clonados en vertebrados superiores y en peces salmónidos, y que presentaban porcentajes de identidad notoriamente menores con otros peces teleósteos, reptiles, y roedores, como hemos demostrado con nuestro análisis pareado. Resulta interesante la diferencia en identidad entre los mensajeros de *marcks* de pez cebra con los de pollo, que es cercana al 50%, y con el reptil *Anolis carolinensis* que apenas supera el 35%. Esto podría indicar que en los reptiles, los mensajeros de *marcks* han adquirido sistemas de regulación diferentes, aunque para poder asegurarlo deberemos esperar a que existan más secuencias de especies de este grupo taxonómico en los proyectos de secuenciación de genomas.

MRP

El análisis de las características de las MRPs mostró algunos hechos interesantes, como las similitudes entre MARCKSa y MRPb en cuanto a composición aminoacídica. Ambas son más ricas en residuos de ácido glutámico que de alanina, y ambas son más ricas en residuos de prolina y serina que sus parálogas.

El análisis de las secuencias de las cuatro proteínas indica que si bien existe un elevado grado de similitud entre ellas, y conservación de su estructura de dominios funcionales, las MARCKS se parecen mucho más entre sí que con las MRP, y recíprocamente las MRPs son más similares entre ellas que con las MARCKS, e incluso su grado de identidad y de similitud entre sí es mayor que el que existe entre las secuencias de las MARCKS. Estos datos sugieren que a partir de una MARCKS ancestral habrían derivado las dos MARCKS que existen actualmente por duplicación. También parece sugerir que MRP ha derivado a partir de una MARCKS ancestral, y más recientemente en el transcurso de la evolución se han originado por duplicación sus dos variantes actuales, lo que explicaría la menor distancia entre las secuencias de MRP.

Es un fenómeno conocido que en los peces teleósteos han ocurrido eventos de duplicación génica y genómica que han generado grupos de genes parálogos (Meyer & Van de Peer, 2005). Estos han adquirido funciones no redundantes, ya que en estas ocasiones alguno de los parálogos no está sujeto a la presión selectiva de conservar su función original (Amores *et al.*, 1998). Este parece ser el caso de *marcksb*, en que la liberación de presiones selectivas por la existencia de un parálogo que retiene las funciones ancestrales de la proteína, le ha permitido incorporar mutaciones no

sinónimas en regiones codificantes dentro de dominios funcionales que podrían haber provisto a MARCKSb de características novedosas.

Los genes *marcks* en el pez cebra y la regulación de su expresión

Los peces teleósteos son los organismos de divergencia más basal entre los metazoarios en que hemos podido identificar genes *marcks*, aunque nuestra búsqueda ha incluido sistemáticamente la escasa disponibilidad de secuencias de agnatos y cordados basales. Resulta difícil entender cómo una familia de proteínas, o acaso una única proteína ancestral, que cumple una función de articulación de sistemas de señalización celular con el citoesqueleto de actina sea una invención exclusiva de los vertebrados mandibulados, sin la menor traza de existencia de ancestros más simples en organismos más basales.

El análisis de sus ARNm mostró que los cuatro genes de la familia *marcks* del pez cebra podrían estar sujetos al menos a un sistema de regulación postranscripcional mediado por micro ARNs, bien a través de los dominios tipo caja K o de otras regiones internas del mensajero que controlarían sus niveles de expresión controlando la estabilidad de sus mensajeros. Este sistema, que está presente en organismos de divergencia temprana pero altamente derivados como los peces (Kumar & Hedges, 1998; Lai *et al.*, 2009), parece haber resultado exitoso en el control de la expresión de los genes de la familia *marcks*, ya que también está presente en el ratón, un mamífero altamente derivado con un tiempo de divergencia elevado respecto a los peces teleósteos en el clado de los gnatostomados. En esta tesis hemos descrito además la presencia de secuencias adicionales vinculadas a la regulación de la estabilidad de los mensajeros que parecen haber aparecido tempranamente en el curso de la evolución de los mandibulados, y que reaparecen por convergencia evolutiva como característica derivada en clados superiores como es el caso de los repetidos tipo ARES presentes en los *mrp* del pez cebra y en *macs* en el ratón (Wein *et al.*, 2003).

Los peces, sin embargo, presentan algunas singularidades cuando se analizan los genes *marcks*. En particular, en el pez cebra encontramos en la secuencia de la proteína MARCKSa la inserción novedosa de cuatro aminoácidos: VPNT, exclusiva de este grupo, que corresponde a un corrimiento en el sitio donador de splicing, incorporando los 12 nucleótidos, que originalmente correspondían a una secuencia intrónica eliminada durante el proceso y que hoy codifican esos cuatro aminoácidos. Curiosamente el gen *marcksa* posee 3 exones, característica única entre la familia *marcks* del pez cebra, lo que plantea como interrogante cuál sería la estructura del gen ancestral, y en qué momento de la evolución se habrá adquirido el intrón supernumerario. El gen original ¿habrá tenido como el resto de sus familiares un único intrón y adquirió secundariamente el

otro intrón? ¿Habría adquirido exclusivamente el pez cebra nuevos sistemas de control por ARNs pequeños codificados en la región intrónica?, o ¿habría sido secundaria la pérdida de este intrón ancestral en *marcksb* y las *mrps*, y nos encontramos frente a una estructura génica relictual que no encontramos en los mamíferos, pero que cuyo análisis nos podría servir de testigo de la historia evolutiva de estas elusivas proteínas?

El estudio de las regiones regulatorias de estos genes nos ha aportado datos acerca del posible derrotero evolutivo de sus secuencias promotoras, indicando que la isla CpG que encontramos localizada en -200 en la secuencia 1 kb 5' del gen *marcksa* sería representativa del sistema de regulación transcripcional ancestral, ya que su tamaño y localización en la secuencia aparece conservado en las especies analizadas, y sería análoga a la de los mamíferos, quienes adquirieron sistemas de regulación más sofisticados que incluyen otras dos islas, ausentes en el pez cebra, y de las cuales podríamos interpretar como incipientes las encontradas en el pez *T. nigroviridis*, y en los anfibios. Quizá las diferencias encontradas en *marcksb* indiquen la tendencia de las presiones evolutivas hacia la aparición de sistemas de control diferentes para las funciones que haya retenido diferencialmente MARCKSb, y que explicarían la complejidad de la estructura 1 kb 5' encontrada en vertebrados superiores en este trabajo y en la bibliografía precedente (Harlan *et al.*, 1991; Lobach *et al.*, 1993; Blackshear, 1993; Stumpo *et al.*, 1998). En todo caso, la duplicación que generó a *marcksa* y *marcksb* nos propone una escena tentadora de ser interpretada como un evento natural de disección molecular en que cada parálogo retiene una parte de las funciones ancestrales y por tanto, permite disecar los mecanismos de regulación propios de cada parte del sistema para su análisis por separado, ubicando a los teleósteos en una posición pivotal entre los vertebrados para el estudio de estos mecanismos.

El patrón de expresión de los genes de la familia *marcks* en el pez cebra

Mediante experimentos de RT-PCR encontramos que los cuatro genes de la familia *marcks* son expresados en embriones y al menos en algunos tejidos adultos de pez cebra. Los datos de ChIP-Seq disponibles (Aday *et al.*, 2011) muestran al menos que *marcksa* y *marcksb* presentan modificaciones en histona H3 en embriones de 24 hpf, donde se la ha encontrado mono y trimetilada en la lisina 4 (H3K4Me3 y H3K4Me1). La metilación en esta posición ha sido asociada a *enhancers* activos (Bernstein *et al.*, 2002) y por tanto indica activación génica, lo que concuerda con nuestros resultados y con la observación reciente de que tanto *marcksa* como *marcksb* son expresados en distintos momentos del desarrollo (Ott *et al.*, 2011).

Nuestros datos experimentales de hibridación *in situ* muestran diferencias en el patrón

espacial de expresión de *marcksa* y *marcksb* en embriones de pez cebra, a diferencia de lo que se ha descrito previamente en estudios de expresión masivos (Thisse & Thisse, 2004) que lo describen como ubicuo para ambos genes. Mientras *marcksa* aparece enriquecido en la retina inmadura de 35 hpf, *marcksb* está ausente, o al menos en niveles mucho más bajos que los de *marcksa*, y escasamente diferentes de los niveles encontrados en los tejidos circundantes. Por otra parte, *marcksa* aparece representada de forma ubicua por su mensajero a en cortes a nivel del cerebro posterior y de la médula espinal. En tanto, *marcksb* presenta ubicuidad en cortes a nivel del cerebro posterior, pero no en regiones más posteriores, lo que aporta una contraparte experimental a nuestra hipótesis de que se encuentran sujetas a sistemas de control de la expresión diferentes, sustentada por nuestro análisis. En el mismo sentido, nuestro análisis cuantitativo del cambio temporal diferencial en los niveles de abundancia de sus mensajeros reveló un sustento experimental adicional a la mencionada hipótesis. Este decaimiento en los niveles de mensajero de *marcksb* hacia regiones posteriores del tubo neural es similar al patrón de expresión descrito para *marcks* en el ratón posnatal (McNamara & Lenox, 1998).

Hemos demostrado la existencia de diferencias en el patrón de expresión en tejidos adultos con niveles diferentes de *marcksa* y *marcksb* en cerebro, ojos y músculo. Cuando superponemos nuestros datos de expresión por sqRT-PCR con los datos de expresión del microARN mir-183 (Wienholds *et al.*, 2005), el principal candidato que hemos identificado como posible regulador de los niveles de *marcksb* encontramos tendencias opuestas, lo que sustenta nuestra selección del mismo como candidato a regulador del *marcksb*. Recordemos que *marcksb* presenta un nivel muy bajo de mensajero detectable en el ojo del pez adulto, y es en este tejido en el que miR-183 presenta su nivel de expresión mayor entre los estudiados. En el mismo sentido hemos descubierto que *marcksb* presenta un nivel de abundancia de mensajero mayor en el cerebro que el encontrado en el ojo, y es precisamente en este tejido en que se encuentra una menor abundancia de miR-183 cuando se lo compara con el cerebro. Más aún, *marcksb* presenta su nivel máximo en el músculo, entre los tejidos que hemos estudiado, y es en este mismo en que miR-183 presenta la menor abundancia de estos tres tejidos, situándose en la mediana de los niveles de expresión de los tejidos en que ha sido estudiado. Mientras que sus menores niveles de expresión se han identificado en el intestino, corazón, branquias y ovario. Es por esto que consideramos que debería extenderse el análisis de los niveles de expresión de *marcksb* a estos últimos tejidos en que quizá tenga un papel importante. Hasta la fecha no contamos con datos de expresión específica de tejidos en individuos adultos de pez cebra del miR-30d ni del miR-30e, aunque sería interesante realizar esta caracterización en conjunto con una más extensiva del patrón de expresión de *marcksa* para determinar si nuestro juego de candidatos a reguladores de *marcksa* poseen una relación tan íntima como la de *marcksb* y miR-183.

La interpretación podría ser análoga en el análisis de las regiones regulatorias de los genes *mrp*. Según nuestros datos, los mamíferos presentan una región rica en CpG de tamaño y ubicación variable, pero restringida entre -50 y -400, y *mrpa* no se aleja de este concepto. Sin embargo, *mrpb* no presenta islas CpG ni mayor presencia de regiones consenso de unión a factores trans en la región -1 kb, lo que supone una complicación a la hora de esbozar una hipótesis sobre sus mecanismos de regulación. Según nuestros datos *mrpb* aumenta sensiblemente su transcripción antes de las 24 hpf y luego parece tener un leve aumento a las 72 hpf. El análisis en el uso de codones indica diferencias entre las *mrp*, especialmente en lo que respecta a los codones que codifican los aminoácidos más abundantes en estas proteínas. Este podría ser un indicio de que si bien sus niveles de expresión tienen un curso temporal semejante, podrían estar siendo expresadas en tejidos diferentes, con abundancias diferentes de ARNt (Sharp & Li, 1987), lo que explicaría las tendencias discrepantes en el uso de estos codones. El análisis del perfil temporal de expresión de los genes nos ha mostrado que *mrpa* y *mrpb* presentan perfiles semejantes, con un aumento importante antes de las 24 hpf. Esto sugiere que, sin perjuicio de poder tener algún rol en etapas tempranas del desarrollo, posiblemente cumplan una función importante en etapas posteriores, lo que justificaría el mantenimiento de elevados niveles de mensajero respecto al ovocito.

Concomitantemente, hemos mostrado la abundancia del mensajero *marcksa* mediante hibridación *in situ* en embriones de 35 hpf. Los miARN que hemos seleccionado como reguladores putativos de la abundancia del mensajero *marcksa* son expresados basalmente, al menos hasta las 48 hpf, que es la etapa hasta la que existen datos publicados (Chen *et al.*, 2005), por lo que no podemos aventurar correlaciones claras entre su abundancia y la del mensajero *marcksa*, más allá de suponer que si sus niveles no aumentan en las etapas mencionadas no estarían afectando en mayor medida la abundancia de *marcksa*. Por el contrario, *marcksb* presenta un perfil de expresión diferente en las etapas analizadas, no variando significativamente la abundancia de mensajero entre las 24 y las 72 hpf, aunque sus niveles de expresión a las 35 hpf resultaron bajos para la detección por hibridación *in situ*. Resulta interesante que este evento coincide con el hecho de que los niveles del microARN miR-183 aumenten sostenidamente en esta etapa, alcanzando un pico hacia las 96 hpf, para luego decaer significativamente (Wienholds *et al.*, 2005). Notablemente, este miARN es uno de los que encontramos en nuestro análisis con mayor puntuación como candidatos a reguladores postranscripcionales de *marcksb* por su secuencia *seed*, y estos datos soportan nuestra hipótesis de que podría estar mediando la degradación de sus mensajeros. Si consideramos en conjunto los datos, podríamos inferir que quizá *marcksb* posea un rol importante en etapas que excluyen la ventana temporal de las 20 a las 96 hpf, y que inversamente, el mantenimiento de sus niveles durante esta etapa sea importante para algún proceso morfogénico. Este hecho, también le aporta sentido a nuestra observación de que los embriones morfantes *marcksb* presentaran algún tipo de

afectación que provocaba un retraso en la epibolia y una alteración en el frente de migración celular. En conjunto, los resultados precedentes sugieren que podría resultar interesante estudiar el patrón de expresión de *marcksb* entre las 0 y las 20 hpf en que podría esperarse encontrar un rol para la proteína MARCKSb. El mencionado trabajo (Wienholds *et al.*, 2005) también muestra que miR-183 se encuentra en niveles elevados en cerebro, ojo e hígado del pez cebra adulto, haciéndonos pensar que quizá la proteína MARCKSb no esté presente, al menos en niveles elevados en estos tejidos en individuos adultos.

Por otra parte, *mrpa* no presenta variación apreciable de sus niveles de expresión en las etapas analizadas, aunque la cantidad absoluta de mensajero aumenta antes de las 24 hpf, al igual que *mrpb*. Curiosamente, el patrón temporal de expresión del miARN miR-206, el candidato que puntuamos mejor en nuestro análisis teórico como posible regulador de *mrpa*, presenta un pico de expresión entre las 16 y las 96 hpf. Esto podría indicar que o bien la proteína MRPa cumple funciones en etapas tempranas, y sus niveles aumentan desde el ovocito y decaen prontamente a partir hacia las 16 hpf (etapa de 14 somites), o bien que sus funciones tienen lugar en etapas posteriores. En todo caso, estos datos sugieren etapas en que podría resultar interesante explorar qué ocurre con *mrpa* mensajero o MRPa proteína.

Debemos hacer notar que de nuestra búsqueda de ARNs pequeños regulatorios relacionados con *mrpb* seleccionamos como mejor puntuados a miR-1 y miR-140, y los estudios existentes acerca de sus niveles de expresión (Chen *et al.*, 2005) indican que son expresados con patrones temporales diferentes, pero ambos se encuentran en niveles elevados en las etapas en que nosotros medimos la abundancia de mensajeros de *mrpb*. Sin embargo, debemos considerar que aún no tenemos completamente caracterizada la expresión de *mrpb*, aunque hemos generado las sondas y comenzado el trabajo experimental. Por lo tanto podría ocurrir que la desconexión entre los niveles de expresión del gen de interés y de sus posibles miARN regulatorios no coincidiera espacialmente en los mismos tipos celulares, y que en este caso se tratase de fenómenos independientes. Esta crítica podría aplicarse del mismo modo a los casos en que hemos correlacionado positivamente un decaimiento en los niveles de expresión con el aumento en un miARN determinado.

Durante nuestros experimentos de *real-time* RT-PCR hemos observado que aún utilizando genes de referencia cuya variabilidad durante el desarrollo ha sido reportada como mínima (Tang *et al.*, 2007), y asumiendo entonces que son idóneos para cuantificaciones durante estas etapas, encontrábamos variación en las medidas realizadas de forma independiente utilizando uno u otro gen de referencia. Este panorama nos llevó a utilizar una cuantificación combinada con los dos genes de referencia en conjunto para evaluar de forma fidedigna el comportamiento temporal de la expresión de los genes de la familia *marcks* en el desarrollo del pez cebra. Es por esto que consideramos indispensable para futuros experimentos de qPCR estandarizar el sistema de

referencia al uso de al menos dos genes que no presenten variabilidad en sus niveles de expresión durante las etapas del desarrollo estudiadas.

Existen datos parciales del transcriptoma durante el desarrollo temprano del pez cebra obtenidos mediante secuenciación masiva de ARN (TLDA, Vesterlund *et al.*, 2011) que incluyen a los transcriptos *marcksa* y *marcksb* hasta la etapa de 48 hpf, y los resultados de este grupo podrían considerarse para interpretar los puntos en que la variabilidad de nuestros datos no nos permite resolver. Es posible que las variaciones sean explicables, una vez más, por la tendencia que imprime la selección de los genes de referencia.

Hemos demostrado que los 4 genes de la familia *marcks* encontrados en el pez cebra se expresan en forma de ARN mensajeros, y caracterizado su patrón temporal de expresión entre las 24 y las 72 hpf. Sin embargo, nuestros intentos por abordar la detección de las proteínas *in situ* resultaron infructuosos, sea por las divergencia local en las regiones correspondientes a los epítopes utilizados para generar los anticuerpos, o sea por características bioquímicas propias de las MARCKS del pez cebra. El único anticuerpo que encontramos que podría ameritar más investigación para su uso en *western blots* es el monoclonal 3C3 el cual, debido a que reconoce la proteína MARCKS en su isoforma fosforilada en S25, hipotetizamos que podría ser útil para la detección de MARCKSa en el pez cebra. Esto se debe a que MARCKSa es la única de las MARCKS del pez cebra que presenta la secuencia de fosforilación en S25. Además, el análisis de la probabilidad de fosforilación en este residuo es análoga a la de las proteínas humana recombinante y de la nativa de pollo, de las que tenemos datos experimentales demostrando su efectiva fosforilación en ese residuo (Manenti *et al.*, 1999; Zolessi *et al.*, 2004). Si bien logramos encontrar las condiciones en que el anticuerpo reconoce una banda mayoritaria en el *western blot* utilizando extractos de proteína de embriones de pez cebra, la identidad del antígeno 3C3 en esta especie permanece siendo especulativa y seguramente será objeto de análisis en el futuro.

El silenciamiento de los genes *marcks* en embriones de pez cebra

El estudio del silenciamiento de los genes *marcks* del pez cebra nos ha permitido vincular a los genes *marcksa* y *marcksb* con algunos eventos del desarrollo de la especie. Por una parte, el análisis de los fenotipos anatómicos de los morfantes presentaba diferencias, indicando que los efectos que observamos a este nivel tenían un nivel de especificidad que permitía discriminarlos y sugería que no era debido a efectos pleiotrópicos de la inyección de moléculas de morfolino. Algunas de las características más notables que encontramos en los fenotipos morfantes se centran en la cabeza de los embriones, tanto en su tamaño como en su morfología, ya que en los

embriones morfantes de *marcksb* el edema ventricular representaba una característica consistente.

Nos preguntamos entonces si las cabezas pequeñas que encontrábamos en nuestros morfantes eran producto de una reducción proporcional de las estructuras, o si existían propensiones mayores en algunas estructuras esqueléticas a ser afectadas en mayor medida que otras por el silenciamiento. Estas posibles diferencias motivaron que enfocáramos nuestra atención en la morfogénesis del esqueleto craniofacial, en que encontramos resultados sorprendentes. En los morfantes, algunos de los cartílagos presentaban apariencia normal, otros presentaban defectos en su orientación, mientras otros presentaban su longitud reducida, y otros resultaron ausentes por completo. Estos datos nos sugerían que podíamos estar frente a dos fenómenos diferentes relacionados con el silenciamiento de los genes *marcks*. Por una parte, los embriones deficientes en *marcksa* presentaban una marcada retrognasia, explicada por una reducción en la longitud del cartílago basihial, y una deficiencia en la convergencia de las poblaciones celulares condrogénicas hacia la línea media que explicaría además la reducción en el cartílago de Meckel y la reducción total o parcial de los cartílagos ceratobranquiales. La reducción y disposición del esqueleto faríngeo recordaba el aspecto de los mutantes *round* (Neuhauss *et al.*, 1996). Estos fenómenos bien podrían encontrar una explicación en una afectación de los sistemas de migración celular evidenciado en estas estructuras formadas por células derivadas de la cresta neural, o bien en la especificación del destino celular en la línea media. Quizá el análisis de marcadores de cresta neural premigratoria como *crestin* (Rubinstein *et al.*, 2000; Luo *et al.*, 2001), nos permitiría entender el alcance de este fenómeno en etapas previas al *patterning* de la cabeza. Puede ser que MARCKSa esté involucrada indirectamente en la articulación de la respuesta celular de cascadas de señalización relacionadas con el establecimiento de estructuras de la línea media, como las vías de Shh o Nodal (Maurus & Harris, 2009), con miembros de expresión en el mesodermo de la línea media en la región anterior, lo cual podría explicar el hecho de que en embriones tratados con dosis elevadas de morfolino *marcksa* encontramos desplazamiento de la posición de los ojos desde lateral hacia central recordando de alguna manera los fenotipos mutantes de estas vías, que presentan ciclopia (Rebagliatti *et al.*, 1998; Nasevicius & Ekker, 2000).

Por otro lado, los morfantes *marcksb* presentaban un maxilar inferior de localización normal, explicada por una correcta localización y crecimiento del cartílago basihial, pero la alteración en el ángulo de los cartílagos ceratohiales y la agenesia de algunos de los cartílagos de los arcos branquiales sugerían que podríamos estar frente a un problema diferente, relacionado en este caso con un problema de proliferación local o con un problema de especificación del destino celular en esta región.

Otro elemento en el que centramos nuestra atención fue el ojo de los morfantes, que en todos los casos presentaba un tamaño menor que el de los embriones control. Nos preguntamos entonces

si la reducción en el tamaño se debería a una disminución en la cantidad de células manteniendo la estructura general, o si, por el contrario, existían alteraciones en la morfogénesis como nos sugería el plegamiento de los ojos observado en algunos morfantes *marcksb*, y si esto redundaba en alteraciones en la histogénesis de la retina neural. La aparición de defectos en la laminación de la retina ha sido descrita en los ratones *knockout*, en los que principalmente se observa una reducción de la capa sináptica de Chievitz (Stumpo *et al.*, 1995). Hasta el momento en que se realizaron estos experimentos no existían datos referentes a ninguna de las proteínas *marcks*, o sus genes, en peces.

Nuestro análisis histológico mostró que el *knockdown* de *marcksa* provoca un retraso en la histogénesis retiniana presentando un aspecto inmaduro sin capas establecidas aún a las 48 hpf, cuando la laminación debería haberse establecido. Esta observación es consistente con la realizada por Ott y colaboradores (2011), aunque la reducción en el tamaño de la retina también coincide con nuestra observación de la presencia muerte apoptótica de un elevado número de células en la región central de la retina, observable desde etapas tempranas de la histogénesis cuando el aspecto de la retina aún recuerda el de un neuroepitelio, y mantenido en el tiempo hasta etapas en que los tipos celulares se han diferenciado, establecido contactos sinápticos, y completado la histogénesis. Desconocemos si esta muerte es selectiva de células cuyo destino ya ha sido determinado, y la afectación de *marcksa* provoca algún tipo de incapacidad abortiva en ellas, o si se debe a un fenómeno de carácter más general, pero podría interpretarse como una de las causas de la reducción del volumen ocular. El análisis de marcadores de diferenciación celular nos indica que en fenotipos severos la afectación retiniana es tal que no se reconocen células ganglionares, el primer tipo neuronal en diferenciarse en la retina, ni laminación alguna, medida como la aparición de capas nucleares o plexiformes diferenciables. En fenotipos hipomorfos, en cambio, podemos encontrar células ganglionares diferenciadas y capas sinápticas, pero no fotorreceptores completamente diferenciados, y encontramos un elevado porcentaje de células apoptóticas. Existe en ellos laminación identificable, y la capa de fotorreceptores es reconocible por la distribución de sus núcleos (orientados ortogonalmente al plano de la retina). Sin embargo, ni sus segmentos externos, ni la expresión del marcador de conos dobles *zpr-1* es identificable aún en embriones de 72 hpf, etapa en que la retina neural se encuentra en avanzado estado de diferenciación (Easter & Nicola, 1996 y 1997). Este fenotipo, tomado en conjunto con nuestras observaciones anteriores acerca del *patterning* maxilofacial nos vuelve a poner sobre la mesa la pregunta de si MARCKSa podrá tener algún papel como efector en algún nivel de respuesta a la vía de Shh, ya que se conoce que *tiggywinkle hedgehog* se expresa en la capa de células ganglionares, y que algunos mutantes de esta vía presentan alteraciones en el *patterning* de la retina que recuerdan a nuestros resultados (Neumann & Nüsslein-Volhard, 2000). Si confiamos en que el silenciamiento conjunto de p53, que hemos utilizado como se ha descrito en la literatura, es eficiente, cabría esperar que la muerte de

estas células de la retina discurra por otra vía ajena a la de p53. Este hecho por sí solo puede ameritar su estudio para entender cómo la caída de la proteína MARCKSa provoca un estado de inestabilidad en las células que las desvía hacia la muerte, y qué ocurriría con esas retinas si esa muerte pudiera ser suprimida.

Para comprender en profundidad cuál es efectivamente el proceso celular directamente afectado por el silenciamiento de *marcksa* que provoca estos fenotipos retinianos deberíamos estudiar las etapas tempranas de la morfogénesis ocular, desde el comienzo de la elongación de la copa óptica a las 12 hpf en que una compleja serie de movimientos morfogenéticos coordinados comienzan a modelar el futuro ojo (Kwan *et al.*, 2012).

El silenciamiento de *marcksb* también provoca fenotipos oculares, aunque bien diferenciables de los de su parólogo. Si bien los ojos son de menor tamaño que los de embriones normales, el análisis histológico reveló que no había islas de células apoptóticas como ocurre en los fenotipos de *marcksa*. Las retinas presentan un aspecto inmaduro a las 48 hpf, sin células ganglionares diferenciadas, indicando que la morfogénesis no ha llegado mucho más allá de formar una copa óptica, aunque el neuroepitelio de la retina presenta un aspecto saludable. Quizá sea por esto que encontramos, en algunos embriones, un llamativo plegamiento de las retinas acompañando plegamientos del ojo entero como efecto de una reducción en el tamaño de los tejidos circundantes. Esto podría provocar una reducción de las cavidades orbitarias sin ver proporcionalmente menguada la cantidad de células de la retina, provocando este impedimento estérico un plegamiento del tejido permitido por la arquitectura ocular. Aunque con nuestros experimentos no podemos descartar que se trate de un sobrecrecimiento de la retina como ocurre en algunos fenotipos mutantes. Se ha descrito la existencia de plegamientos retinianos en ratones *knockout* para *marcks* (Scarlett & Blackshear, 2003), y en mutantes que sobreexpresan una forma no miristilable y pseudofosforilada de MARCKS (Kim *et al.*, 1998), por lo que podríamos suponer que el efecto de MARCKS en la morfogénesis del ojo está conservado entre los peces teleósteos y los mamíferos. En etapas posteriores, las retinas de los morfantes *marcksb* presentan un aspecto desorganizado, con parches de capas plexiformes dispersos, indicando defectos en la laminación, y células que presentan aspecto y localización correspondiente a fotorreceptores, pero aún a los 5 dpf no es posible reconocer sus segmentos externos. El estudio de los hipomorfos nos indica que en alguna medida las células ganglionares pueden llegar a diferenciarse y establecer contactos sinápticos con otros tipos celulares, como evidencia la aparición de una región plexiforme que acompaña la región que presenta células ganglionares diferenciadas. Sin embargo, no es posible identificar en estos embriones fotorreceptores diferenciados a las 72 hpf.

Otra característica sobresaliente de los embriones deficientes en *marcksb*, es que sus fibras musculares se encuentran adelgazadas y curvadas, observación consistente con las realizadas por

Ott y colaboradores (2011), y presentan además material circundante con aspecto vacuolizado, lo que podría explicar por qué estos embriones presentan escasa motilidad, aún al ser estimulados por contacto. Tomado en conjunto con el fenotipo ocular, el fenotipo *marcksb* de los embriones que presentan plegamiento ocular presenta similitudes con el mutante de la misma especie, *mask* (Fadool *et al.*, 1997), aunque no hemos demostrado que exista discontinuidad del epitelio pigmentario como ocurre en el mencionado mutante. Nuestros experimentos iniciales han mostrado que al menos a las 72 hpf no es posible identificar células diferenciadas en el epitelio pigmentario de los morfantes utilizando el marcador de diferenciación celular *zpr-2*. Debemos extender nuestros experimentos a larvas de 5 dpf para intentar realizar una reconstrucción tridimensional del epitelio pigmentario y determinar si efectivamente existen discontinuidades que aproximen más el fenotipo *marcksb* al observado en el mutante *mask*. Por otra parte, el fenotipo observado en los morfantes en que no había plegamiento ocular evidente, y en que observamos una distribución aleatoria de parches de capas plexiformes, recordaba más el aspecto de los mutantes de pez cebra para N-cadherina *pac* (Erdmann *et al.*, 2003) en que la laminación se ve severamente afectada y es posible observar este tipo de alteraciones. La similitud aparente del fenotipo *marcksb* con los fenotipos de los mutantes de la proteína de polaridad apical *pard3* en la misma especie (Hong *et al.*, 2010), nos ha llevado a mostrar también que ni el silenciamiento de *marcksa* ni el de *marcksb* tiene consecuencias en la polaridad del neuroepitelio, por lo que no podría esperarse una explicación de los fenotipos vinculada a este aspecto. Sin embargo, futuros experimentos deberán analizar si el alterar la expresión de MARCKSb, redundaría en una afectación de las uniones intercelulares, en particular mediadas por N-cadherina. Si MARCKSb efectivamente modula el citoesqueleto de actina filamentosa, su afectación puede provocar deficiencias en los sistemas de adhesión celular, ya que la vinculación entre los sistemas de adhesión celular y el citoesqueleto han sido ampliamente estudiados (revisados en Arbusova *et al.*, 2002; Iioka *et al.*, 2004).

Además de estudiar sus efectos individuales, nos preguntamos si las funciones de estas dos proteínas podrían estar relacionadas entre sí, directa o indirectamente. El silenciamiento simultáneo de los parálogos *marcksa* y *marcksb* nos ha llevado a la observación de que el frente de epibolia se ve alterado, por lo que el fenotipo del doble morfante - más severo que una simple combinación de los fenotipos individuales - podría explicarse por un fenotipo de alteración en la gastrulación. La alteración en el frente de migración presenta similitudes con las alteraciones provocadas por el tratamiento con el agente quelante de Ca^{++} DBB (5, 5'-dibromo BAPTA), e incluso con las provocadas por el tratamiento con citocalasina B (Cheng *et al.*, 2004), por lo que no podemos descartar que el efecto se deba a un desacoplamiento mecánico de las células de la capa celular envolvente, o de éstas con la capa sincicial externa. Un escenario plausible sería que a través de la afectación de las MARCKSa y b ocurra una pérdida de la articulación del citoesqueleto de actina

filamentosa con los sistemas de señalización intracelulares. Entre los sistemas de señalización afectados por MARCKS, se encuentran los dependientes de calcio (Hartwig *et al.*, 1992), que actuarían uniéndose a calmodulina, y modularían el citoesqueleto de actina a través de las MARCKS del pez cebra. Se sabe que durante la epibolia tardía (65% en adelante) ocurren una serie de oleadas de calcio, que se han vinculado a la contracción rítmica del anillo de actomiosina que se ensambla en el frente de epibolia luego de que ésta ha alcanzado el 50% del embrión de pez cebra (Cheng *et al.*, 2004). Es posible que la afectación de este sistema pueda explicar las alteraciones morfogénicas que observamos en los dobles morfantes, ya que en etapas más avanzadas (hasta 72 hpf) hemos observado que el fenotipo del morfante doble presenta similitudes con algunos mutantes con defectos de gastrulación en el pez cebra, como el acortamiento general del cuerpo y el plegamiento caudal de la notocorda en el caso de *trilobite* y *knypek* (Solnica-Krezel *et al.*, 1996), además de la reducción del tamaño de la cabeza y los ojos que se observa en los morfantes de *gravin* (Weiser & Kimelman, 2007). En esos casos, el acortamiento del cuerpo se atribuye al acortamiento axial y a la ocurrencia de defectos durante la gastrulación, que tendrían un efecto sobre la extensión de los mesodermos somítico y cordal, lo cual lleva a la reducción de la longitud corporal. En embriones de *Xenopus* morfantes de *xmarcks* se ha descrito la existencia de defectos en la gastrulación, debido a una alteración en la polarización, adhesión, y migración celular que afectan tanto la extensión convergencia, como la extensión del mesendodermo (Iioka *et al.*, 2004). Tomadas en conjunto, estas observaciones nos plantean preguntas importantes que podrían responderse con experimentos sencillos, como ¿qué ocurre con las uniones intercelulares durante la epibolia en los dobles morfantes?, o ¿podrá rescatarse el fenotipo doble tratando a los embriones con jasplakinolida, un estabilizador de la actina filamentosa? Esperamos poder tener estas respuestas pronto.

Uno de los efectos más sobresalientes del silenciamiento de *marcks* en ratones es la aparición de defectos en el cierre del tubo neural y en la fusión de los hemisferios cerebrales (Stumpo *et al.*, 1995; Scarlett & Blackshear, 2003). Aunque se ha descrito la existencia de defectos en el cierre del tubo neural en el pez cebra, mediante la afectación de algunas vías de señalización que provocan fenotipos análogos a los observados en ratón (Aquilina-Beck *et al.*, 2007), en nuestros experimentos no hemos observado defectos aparentes de formación del tubo neural, tal vez debido a diferencias tanto en la neurulación en sí, como en la morfogénesis e histogénesis ulterior del cerebro del pez cebra.

Durante el curso de esta tesis ha aparecido una publicación que refiere a experimentos de silenciamiento génico análogos a los aquí presentados (Ott *et al.*, 2011). Sin embargo, no podemos compartir que los fenotipos de los morfantes *marcksa* y *marcksb* sean análogos, y mucho menos en lo que respecta a la morfología e histología ocular como hemos discutido *in extenso* en párrafos

anteriores. En lo que sí podemos coincidir ampliamente con este trabajo es en su espíritu, y en la profunda convicción de que el pez cebra provee un modelo para estudiar la función de las proteínas de la familia MARCKS *in vivo*, que nos permitirá en el corto y mediano plazo comprender cómo es que MARCKS actúa mediando una plétora de procesos celulares y morfogenéticos, lo que hasta ahora es pobremente comprendido.

En suma, con nuestros resultados hemos aportado al entendimiento de las proteínas de la familia MARCKS en el pez cebra y a algunos aspectos evolutivos de las mismas. Asimismo, hemos determinado la estructura de sus genes, explorado algunos de sus mecanismos de regulación de la expresión pre y postranscripcionales, realizado una caracterización de sus perfiles de expresión durante el desarrollo del pez cebra y encontrado algunas correlaciones interesantes con los sistemas de regulación descritos. Finalmente hemos analizado mediante experimentos de pérdida parcial de función varios aspectos del desarrollo del pez cebra con especial énfasis en los procesos morfogenéticos y de diferenciación celular involucrados en la formación de elementos esqueléticos y del sistema nervioso central. Esperamos que nuestra contribución al conocimiento de estas proteínas se convierta en nuestro humilde aporte al conocimiento científico básico, y que sirva como punto de partida para futuras investigaciones vinculadas a la exploración del desarrollo del sistema nervioso de los vertebrados y la evolución de los mecanismos involucrados.

Aún resta mucho por entender de cómo las proteínas de la familia MARCKS actúan en estos procesos y en muchos otros. Si continúa el trabajo de investigación en estos genes, quizá se podrá alcanzar un nivel de entendimiento que permita despejar interrogantes acerca del elusivo surgimiento de estas proteínas en la historia evolutiva de los metazoos y, en el otro extremo de nuestras expectativas, permitirá a largo plazo desarrollar terapias para los múltiples procesos patológicos a los que se las ha vinculado. Ese es nuestro anhelo y será el desafío para futuras investigaciones.

BIBLIOGRAFÍA

- Abramoff M.D., Magelhaes P.J., Ram S.J. (2004), *Image Processing with ImageJ*, Biophotonics International 11(7):36 – 42
- Aderem A. & Cohn Z.A. (1988), *Calcium ionophore synergizes with bacterial lipopolysaccharides in activating macrophage arachidonic acid metabolism*, Journal of Experimental Medicine 167:623-631
- Allawi H.T. & SantaLucia J. Jr. (1997), *Thermodynamics and NMR of Internal G-T Mismatches in DNA*, Biochemistry 36:10581 – 10594
- Aquilina-Beck A., Ilagan K., Liu Q. & Liang J.O. (2007), *Nodal signaling is required for closure of the anterior neural tube in zebrafish*, BMC Developmental Biology 7:126-146
- Arbuzova A, Schmitz AA, Vergères G (2002), Cross-talk unfolded: MARCKS proteins, Biochemical Journal 362(1):1-12
- Ausubel F.M., Brent R., Kingston R.E., Moore D.D., Seidman J.G., Smith J.A. & Struhl K. (eds.), *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons., 2006
- Bally-Cuif L. & Vernier P., *Organization and Physiology of the Zebrafish Nervous System* en Perry SF, Ekker M, Farrell AP & Brauner CJ (eds.), Fish Physiology vol 29, Academic Press, USA, 2010
- Bernstein B.E., Humphrey E.L., Erlich R.L., Schneider R., Bouman P., Liu J.S., Kouzarides T. & Schreiber S.L. (2002), *Methylation of histone H3 Lys 4 in coding regions of active genes*, Proceedings of the National Academy of Sciences 99(13):8695-8700
- Blackshear P.J. (1993), *The MARCKS family of cellular protein kinase C substrates*, Journal of Biological Chemistry 268(3):1501-1504
- Blackshear P.J., Lai W.S., Tuttle J.S., Stumpo D.J., Kennington E., Nairn A.C. & Sulik K.K. (1996), *Developmental expression of MARCKS and protein kinase C in mice in relation to the exencephaly resulting from MARCKS deficiency*, Developmental Brain Research 96:62-75

- Blackshear P.J., Wen L., Glynn B.P. & Witters L.A. (1986), *Protein kinase C-stimulated phosphorylation in vitro of a Mr 80,000 protein phosphorylated in response to phorbol esters and growth factors in intact fibroblasts. Distinction from protein kinase C and prominence in brain*, Journal of Biological Chemistry 261(3):1459-69
- Blom, N., Gammeltoft, S. & Brunak, S. (1999), *Sequence- and structure-based prediction of eukaryotic protein phosphorylation sites*, Journal of Molecular Biology: 294(5): 1351-1362
- Chen P.Y., Manninga H., Slanchev K., Chien M., Russo J.J., Ju J., Sheridan R., John B., Marks D.S., Gaidatzis D., Sander C., Zavolan M. & Tuschl T. (2005), *The developmental miRNA profiles of zebrafish as determined by small RNA cloning*, Genes & Development 19:1288-1293.
- Cheng J.C., Miller A.L. & Webb S.E. (2004), *Organization and Function of Microfilaments During Late Epiboly in Zebrafish Embryos*, Developmental Dynamics 231:313–323
- Chung C.T., Niemela S.L. & Miller R.H. (1989), *One-step preparation of competent Escherichia coli: Transformation and storage of bacterial cells in the same solution*, Proceedings of the National Academy of Sciences 86:2172 – 2175
- Easter S.S. Jr. & Nicola G.N. (1996), *The development of vision in the zebrafish (Danio rerio)*, Developmental Biology 180:646–663
- Easter S.S. Jr. & Nicola G.N. (1997), *The Development of Eye Movements in the Zebrafish (Danio rerio)*, Developmental Psychobiology 31: 267– 276
- Erdmann B., Kirsch F-P., Rathjen F.G. & Moré M.I. (2003), *N-Cadherin Is Essential for Retinal Lamination in the Zebrafish*, Developmental Dynamics 226:570 –577
- Fadool J.M., Brockerhoff S.E., Hyatt G.A. & Dowling J.E. (1997), *Mutations affecting eye morphology in the developing zebrafish (Danio rerio)*, Developmental Genetics 20:288–295
- Fuhrmann M., Hausherr A., Ferbitz L., Schödl T., Heitzer M. & Hegemann P. (2004), *Monitoring dynamic expression of nuclear genes in Chlamydomonas reinhardtii by using a synthetic luciferase reporter gene*, Plant Molecular Biology 55(6):869-81.

- Gasteiger E., Hoogland C., Gattiker A., Duvaud S., Wilkins M.R., Appel R.D. & Bairoch A. (2005) *Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server* en John M. Walker (ed): The Proteomics Protocols Handbook, Humana Press
- Green M.R., Sambrook J. & MacCallum P. (eds) (2007), *Molecular Cloning: A laboratory manual*, CSHL Press, USA.
- Grush J., Noakes D.L.G. & Moccia R.D. (2004), *The Efficacy of Clove Oil As An Anesthetic for the Zebrafish, Danio rerio (Hamilton)*, *Zebrafish* 1(1):46 – 53
- Han L. & Zhao Z. (2008), *Comparative Analysis of CpG Islands in Four Fish Genomes*, *Comparative Functional Genomics* 2008:565631
- Hanahan D. (1983), *Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids*, *Journal of Molecular Biology* 166(4):557-580
- Harlan D.M., Graff J.M., Stumpo D.J., Eddy R.L. Jr, Shows T.B., Boyle J.M. & Blackshear P.J. (1991), *The human myristoylated alanine-rich C kinase substrate (MARCKS) gene (MACS). Analysis of its gene product, promoter, and chromosomal localization*, *Journal of Biological Chemistry* 266(22):14399-405
- Hartwig J.H., Thelen M., Rosen A., Janmey P.A., Nairn A.C. & Aderem A. (1992), *MARCKS is an actin filament crosslinking protein regulated by protein kinase C and calcium-calmodulin*, *Nature* 356:618-622
- Heery D.M., Gannon F. & Powell R. (1990), *A simple method for subcloning DNA fragments from gel slices*, *Trends in Genetics* 6(6):173
- Hong E., Jayachandran P. & Brewster R. (2010), *The polarity protein Pard3 is required for centrosome positioning during neurulation*, *Developmental Biology* 341:335–345
- Iioka H., Ueno N. & Kinoshita N. (2004), *Essential role of MARCKS in cortical actin dynamics during gastrulation movements*, *Journal of Cell Biology* 164(2):169-74
- Jacobs G. H., Stockwell P. A., Tate W. P. & Brown C. M. (2006), *Transterm-extended search facilities and improved integration with other databases*, *Nucleic Acids Research* 34:D37-D40.

- Kalendar R., Lee D., Schulman A.H. (2009), *FastPCR Software for PCR Primer and Probe Design and Repeat Search*, *Genes, Genomes and Genomics* 3(1):1 – 14
- Kawakami K., Takeda H., Kawakami N., Kobayashi M., Matsuda N. & Mishina M. (2004), A transposon-mediated gene trap approach identifies developmentally regulated genes in zebrafish, *Developmental Cell* 7:133-144
- Kiernan J.A., *Histological and Histochemical Methods. Theory and Practice*, 3rd ed., Butterworth-Heinemann, UK, 1999
- Kim H.S., Swierczynski S.L., Tuttle J.S., La W.S. & Blackshear P.J. (1998), *Transgenic Complementation of MARCKS Deficiency with a Nonmyristoylatable, Pseudo- Phosphorylated Form of MARCKS: Evidence for Simultaneous Positive and Dominant-Negative Effects on Central Nervous System Development* , *Developmental Biology* 200:146 –157
- Kimmel C.B., Ballard W.W., Kimmel S.R., Ullman B. & Schilling T.F. (1995), *Stages of Embryonic Development of the Zebrafish*, *Developmental Dynamics* 203:253-310
- Klee E.W., Shim K.J., Pickart M.A., Ekker S.C. & Ellis L.B. (2005), *AMOD: a morpholino oligonucleotide selection tool*, *Nucleic Acids Research* 33:W506–W511
- Kumar S. & Hedges S.B. (1998), *A molecular timescale for vertebrate evolution* , *Nature* 392:917-920
- Kwan KM, Otsuna H, Kidokoro H, Carney KR, Saijoh Y & Chien C-B (2012), *A complex choreography of cell movements shapes the vertebrate eye*, *Development* 139:359-372
- Laemmli U.K. (1970), *Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T 4*, *Nature* 227:680-685
- Larkin M.A., Blackshields G., Brown N.P., Chenna R., McGettigan P.A., McWilliam H., Valentin F., Wallace I.M., Wilm A., Lopez R., Thompson J.D., Gibson T.J., Higgins D.G. (2007), *Clustal W and Clustal X version 2.0*, *Bioinformatics*, 23, 2947-2948.
- Larsen F., Gundersen G., Lopez R. & Prydz H. (1992), *CpG islands as gene markers in the human genome*, *Genomics* 13(4):1095-107

- Li H., Chen G., Zhou B. & Duan S. (2008), *Actin filament assembly by myristoylated alanine-rich C kinase substrate-phosphatidylinositol-4,5-diphosphate signaling is critical for dendrite branching*, *Molecular Biology of the Cell* 19(11):4804-13
- Li H.Y., Park C.-K, Jung S.J., Choi S.-Y., Lee S.J., Park K., Kim J.S. & Oh S.B. (2007), *Eugenol Inhibits K⁺ Currents in Trigeminal Ganglion Neurons*, *Journal of Dental Research* 86(9):898-902
- Li J. & Aderem A. (1992), *MacMARCKS, a novel member of the MARCKS family of protein kinase C substrates*, *Cell* 70(5):791-801
- Li Z., Joseph N.M. & Easter S.S. Jr (2000), *The Morphogenesis of the Zebrafish Eye, Including a Fate Map of the Optic Vesicle*, *Developmental Dynamics* 218:175-188
- Liu W. & Saint D.A. (2002), *A New Quantitative Method of Real Time Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction Assay Based on Simulation of Polymerase Chain Reaction Kinetics*, *Analytical Biochemistry* 302:52–59
- Lobach D.F., Rochelle J.M., Watson M.L., Seldin M.F. & Blackshear P.J. (1993), *Nucleotide sequence, expression, and chromosomal mapping of Mrp and mapping of five related sequences*, *Genomics* 17(1):194-204
- Lu D., Yang H., Lenox R.H. & Raizada M.K. (1998), *Regulation of angiotensin II-induced neuromodulation by MARCKS in brain neurons*, *Journal of Cell Biology* 142(1):217-27
- Luo R., An M., Arduini B.L. & Henion P.D. (2001), *Specific pan-neural crest expression of zebrafish Crestin throughout embryonic development*, *Developmental Dynamics* 220(2):169-74
- Maurer-Stroh S., Eisenhaber B. & Eisenhaber F. (2002), *N-terminal N-Myristoylation of Proteins: Prediction of Substrate Proteins from Amino Acid Sequence*, *Journal of Molecular Biology* 317:541-557
- Manenti S., Yamauchi E., Sorokine O., Knibiehler M., van Dorsselaer A., Taniguchi H., Ducommun B. & Darbon J-M (1999), *Phosphorylation of the myristoylated protein kinase C substrate MARCKS by the cyclin E–cyclin-dependent kinase 2 complex in vitro*, *Biochemical Journal* 340: 775–782

- Maurus D. & Harris W.A. (2009), *Zic-associated holoprosencephaly: zebrafish Zic1 controls midline formation and forebrain patterning by regulating Nodal, Hedgehog, and retinoic acid signaling*, *Genes & Development* 23:1461–1473
- McNamara R.K. & Lenox R.H. (1998), *Distribution of the Protein Kinase C Substrates MARCKS and MRP in the Postnatal Developing Rat Brain*, *The Journal of Comparative Neurology* 397:337–356
- Meyer A. & Van de Peer Y. (2005), *From 2R to 3R: evidence for a fish-specific genome duplication (FSGD)*, *BioEssays* 27:937–945
- Michelsen B.K. (1995), *Transformation of Escherichia coli Increases 260-Fold upon Inactivation of T4 DNA Ligase*, *Analytical Biochemistry* 225:172 – 174
- Myers E. & Miller W. (1988), *Optimal Alignments in Linear Space*, *CABIOS* 4, 1:11-17
- Nakatani M., Miya M., Mabuchi K., Saitoh K. & Nishida M., *Evolutionary history of Otophysi (Teleostei), a major clade of the modern freshwater fishes: Pangaean origin and Mesozoic radiation*, *BMC Evolutionary Biology* 11:177
- Nasevicius A & Ekker S.C. (2000), *Effective targeted gene 'knockdown' in zebrafish*, *Nature Genetics* 26:216-220
- Neuhauss S.C. (2003), *Behavioral genetic approaches to visual system development and function in zebrafish*, *J. Neurobiol.* 54:148–160
- Neuhauss S.C.F., Solnica-Krezel L., Schier A.F., Zwartkruis F., Stemple D.L., Malicki J., Abdelilah S, Stainier D.Y.R. & Driever W. (1996), *Mutations affecting craniofacial development in zebrafish*, *Development* 123, 357-367
- Neumann C.J. & Nüsslein-Volhard C. (2000), *Patterning of the Zebrafish Retina by a Wave of Sonic Hedgehog Activity*, *Science* 289:2137-2139
- Ott L.E., McDowell Z.T., Turner P.M., McHugh Law J., Adler K.B., Yoder J.A. & Jones S.L. (2011), *Two Myristoylated Alanine-Rich C-Kinase Substrate (MARCKS) paralogs are required for normal development in zebrafish*, *The Anatomical Record* 294:1511–1524

- Ouimet C.C., Wang J.K., Walaas S.I., Albert K.A. & Greengard P. (1990), *Localization of the MARCKS (87 kDa) protein, a major specific substrate for protein kinase C, in rat brain*, Journal of Neuroscience 10(5):1683-98
- Park C.-K., Li H.Y., Yeon K.-Y., Jung S.J., Choi S.-Y., Lee S.J., Lee S., Park K., Kim J.S., & Oh S.B. (2006), *Eugenol Inhibits Sodium Currents in Dental Afferent Neurons*, Journal of Dental Research 85(10):900-904
- Patel J. & Kligman D. (1987), *Purification and Characterization of an Mr 87,000 Protein Kinase C Substrate from Rat Brain*, Journal of Biological Chemistry 262(34):16686-16691
- Pesole G., Liuni S., Grillo G., Liciulli F., Mignone F., Gissi C. & Saccone C. (2002), *UTRdb and UTRsite: specialized databases of sequences and functional elements of 5' and 3' untranslated regions of eukaryotic mRNAs. Update 2002*, Nucleic Acids Research 30(1):335-340
- Pfaffl M. (2001), *A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR*, Nucleic Acids Research 29(9): 2003-2007 .
- Pfaffl M. (2004), *Quantification strategies in real-time PCR* , en Bustin S.A. (ed.), *A-Z of quantitative PCR*, International University Line (IUL) , La Jolla, CA, USA .
- Prestridge, D.S. (1995), *Predicting Pol II Promoter Sequences Using Transcription Factor Binding Sites*, Journal of Molecular Biology 249:923-32
- Rebagliati M.R., Toyama R, Haffter P. & Dawid I.B. (1998), *cyclops encodes a nodal-related factor involved in midline signaling* , Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A. 95:9932-9937
- Rubinstein A.L., Lee D., Luo R., Henion P.D. & Halpern M.E. (2000), *Genes dependent on zebrafish cyclops function identified by AFLP differential gene expression screen*, Genesis 26(1):86-97
- Scarlett C.O. & Blackshear P.J. (2003), *Neuroanatomical development in the absence of PKC phosphorylation of the myristoylated alanine-rich C-kinase substrate (MARCKS)* , Developmental Brain Research 144:25-42

- Schmidt J.T. (2004), *Activity-driven sharpening of the retinotectal projection: The search for retrograde synaptic signaling pathways*, *Journal of Neurobiology* 59:114–133
- Schmitt A.E. & Dowling J.E. (1994), *Early Eye Morphogenesis in the Zebrafish*, *Brachydanio rerio*, *Journal of Comparative Neurology* 344:532-542
- Sharp P.M. & Li W-H. (1987), *The codon adaptation index - a measure of directional synonymous codon usage bias, and its potential applications*, *Nucleic Acids Research* 15(3):1281-1295
- Shi Y., Sullivan S.K., Pitterle D.M., Kennington E.A., Graff J.M. & Blackshear P.J. (1997), *Mechanisms of MARCKS gene activation during Xenopus development*, *Journal of Biological Chemistry* 272(46):29290-29300
- Solnica-Krezel L., Stemple D.L., Mountcastle-Shah E., Rangini Z., Neuhauss S.C.F., Malicki J., Schier A.F., Stainier D.Y.R., Zwartkruis F., Abdelilah S & Driever W. (1996), *Mutations affecting cell fates and cellular rearrangements during gastrulation in zebrafish*, *Development* 123:67-80 .
- Solomon K.S., Kudoh T., Dawid I.B. & Fritz A. (2003), *Zebrafish foxi1 mediates otic placode formation and jaw development*, *Development* 130:929-940
- Stumpo D.J., Bock C.B., Tuttle J.S. & Blackshear P.J. (1995), *MARCKS deficiency in mice leads to abnormal brain development and perinatal death*, *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.* 92(4):944-8
- Stumpo D.J., Eddy R.L. Jr, Haley L.L., Sait S., Shows T.B., Lai W.S., Young W.S. 3rd, Speer M.C., Dehejia A., Polymeropoulos M. & Blackshear P.J. (1998), *Promoter sequence, expression, and fine chromosomal mapping of the human gene (MLP) encoding the MARCKS-like protein: identification of neighboring and linked polymorphic loci for MLP and MACS and use in the evaluation of human neural tube defects*, *Genomics* 49(2):253-64
- Stumpo D.J., Graff J.M., Albert K.A., Greengard P. & Blackshear P.J. (1989a), *Molecular cloning, characterization, and expression of a cDNA encoding the "80- to 87-kDa" myristoylated alanine-rich C kinase substrate: a major cellular substrate for protein kinase C*, *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.* 86(11):4012-6

- Stumpo D.J., Graff J.M., Albert K.A., Greengard P. & Blackshear P.J. (1989b), *Nucleotide sequence of a cDNA for the bovine myristoylated alanine-rich C kinase substrate (MARCKS)*, *Nucleic Acids Research* 17(10):3987-8
- Sundaram M., Cook H.W. & Byers D.M. (2004), *The MARCKS family of phospholipid binding proteins: regulation of phospholipase D and other cellular components*, *Biochemistry and Cell Biology* 82(1):191-200
- Tamura K., Dudley J., Nei M. & Kumar S. (2007), *MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0*, *Molecular Biology and Evolution* 24: 1596-1599.
- Tang R., Dodd A., Lai D., McNabb W.C. & Love D. (2007), *Validation of zebrafish (Danio rerio) reference genes for quantitative real-time RT-PCR normalization*, *Acta Biochimica et Biophysica Sinica* 39(5): 384–390 .
- Tapp H., Al-Naggar I.M., Yarmola E.G., Harrison A., Shaw G., Edison A.S. & Bubb M.R. (2005), *MARCKS is a natively unfolded protein with an inaccessible actin-binding site: evidence for long-range intramolecular interactions*, *Journal of Biological Chemistry* 280(11):9946-9956
- Thisse, B., Thisse, C. (2004) Fast Release Clones: A High Throughput Expression Analysis. ZFIN Direct Data Submission (<http://zfin.org>).
- Thisse C. & Thisse B. (2008), *High-resolution in situ hybridization to whole-mount zebrafish embryos* , *Nature Protocols* 3(1):59-69
- Toledo A & Arruti C (2009), *Actin modulation of a MARCKS phosphorylation site located outside the effector domain*, *Biochemical and Biophysical Research Communications* 383(3):353-7
- Towbin H., Theophil S. & Gordon J. (1979), *Electrophoretic transfer from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications*, *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 76(9):4350-4354
- Umekage T & Kato K (1991), *A mouse brain cDNA encodes a novel protein with the protein kinase C phosphorylation site domain common to MARCKS*, *FEBS Lett.* 286(1-2):147-51

- Vesterlund L., Jiao H., Unneberg P., Hovatta O. & Kere J. (2011), *The zebrafish transcriptome during early development*, BMC Developmental Biology, 11:30
- Weimer J.M., Yokota Y., Stanco A., Stumpo D.J., Blackshear P.J. & Anton E.S. (2009), *MARCKS modulates radial progenitor placement, proliferation and organization in the developing cerebral cortex*, Development 136(17):2965-75
- Wein G., Rössler M., Klug R. & Herget T. (2003), *The 3'-UTR of the mRNA coding for the major protein kinase C substrate MARCKS contains a novel CU-rich element interacting with the mRNA stabilizing factors HuD and HuR*, European Journal of Biochemistry 270(2):350-65.
- Weiser D.C., Pyati U.J. & Kimelman D. (2007), *Gravin regulates mesodermal cell behavior changes required for axis elongation during zebrafish gastrulation*, Genes & Development 21: 1559-1571
- Wienholds E., Kloosterman W.P., Miska E., Alvarez-Saavedra E., Berezikov E., de Bruijn E., Horvitz H.R., Kauppinen S. & Plasterk R.H.A. (2005), *MicroRNA Expression in Zebrafish Embryonic Development*, Science 309:310-311
- Wu M., Chen D.F., Sasaoka T. & Tonegawa S. (1996), *Neural tube defects and abnormal brain development in F52-deficient mice*, Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A. 93(5):2110-5
- Wu W.C., Walaas S.I., Nairn A.C. & Greengard P. (1982), *Calcium/phospholipid regulates phosphorylation of a Mr "87k" substrate protein in brain synaptosomes*, Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A. 79(17):5249-5253
- Zolessi F.R. & Arruti C. (2001a), *Apical accumulation of MARCKS in neural plate cells during neurulation in the chick embryo*, BMC Developmental Biology 1:7
- Zolessi F.R. & Arruti C. (2001b), *Sustained phosphorylation of MARCKS in differentiating neurogenic regions during chick embryo development*, Developmental Brain Research 130:257-267
- Zolessi F.R. & Arruti C. (2004a), *MARCKS in Advanced Stages of Neural Retina Histogenesis*, Developmental Neuroscience 26:371-379

Zolessi F.R., Durán R., Engström U., Cerveñansky C., Hellman U. & Arruti C. (2004b) *Identification of the chicken MARCKS phosphorylation site specific for differentiating neurons as Ser 25 using a monoclonal antibody and mass spectrometry*, Journal of Proteome Research 3:84-90.

Zolessi F.R., Hellman U., Baz A., Arruti C. (1999), *Characterization of MARCKS (Myristoylated Alanine-Rich C Kinase Substrate) Identified by a Monoclonal Antibody Generated against Chick Embryo Neural Retina*, Biochemical and Biophysical Research Communications 257:480-487

Zolessi F.R., *Transducción intracelular de señales durante el desarrollo del sistema nervioso: rol de la proteína MARCKS*, Tesis de Doctorado PEDECIBA, Uruguay, 2003