

084857

UNIVERSIDAD NACIONAL  
ANDRÉS BELLO



35613000168126

574.192  
M97  
2010  
c.1



UNIVERSIDAD  
**ANDRÉS BELLO**

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
ESCUELA DE BIOQUÍMICA

TESIS PARA OPTAR AL TÍTULO DE BIOQUÍMICO Y GRADO DE MAGÍSTER EN  
BIOQUÍMICA

**ESTUDIO DEL PATRÓN DE EXPRESIÓN Y EFECTO FENOTÍPICO  
DE LA FALTA DE FUNCIÓN DE LA VARIANTE DE HISTONA  
Macroh2a2 DURANTE EL DESARROLLO EMBRIONARIO DEL PEZ  
CEBRA**

**VALENTINA JAVIERA MUÑOZ VIO**



SANTIAGO – CHILE

2010



UNIVERSIDAD  
**ANDRÉS BELLO**

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
ESCUELA DE BIOQUÍMICA

**ESTUDIO DEL PATRÓN DE EXPRESIÓN Y EFECTO FENOTÍPICO  
DE LA FALTA DE FUNCIÓN DE LA VARIANTE DE HISTONA  
Macroh2a2 DURANTE EL DESARROLLO EMBRIONARIO DEL PEZ  
CEBRA**

TRABAJO DE TITULACIÓN ENTREGADO A LA UNIVERSIDAD ANDRÉS BELLO  
COMO PARTE DE LOS REQUISITOS PARA OPTAR AL TÍTULO PROFESIONAL  
DE BIOQUÍMICO Y AL GRADO DE MAGÍSTER EN BIOQUÍMICA

**VALENTINA JAVIERA MUÑOZ VIO**

DIRECTOR DE TESIS: DR. MARCO ÁLVAREZ

SANTIAGO – CHILE  
ENERO 2010



UNIVERSIDAD  
**ANDRÉS BELLO**

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
ESCUELA DE BIOQUÍMICA

**ESTUDIO DEL PATRÓN DE EXPRESIÓN Y EFECTO FENOTÍPICO  
DE LA FALTA DE FUNCIÓN DE LA VARIANTE DE HISTONA  
Macroh2a2 DURANTE EL DESARROLLO EMBRIONARIO DEL PEZ  
CEBRA**

TRABAJO DE TITULACIÓN ENTREGADO A LA UNIVERSIDAD ANDRÉS BELLO  
COMO PARTE DE LOS REQUISITOS PARA OPTAR AL TÍTULO PROFESIONAL  
DE BIOQUÍMICO Y AL GRADO DE MAGÍSTER EN BIOQUÍMICA

**VALENTINA JAVIERA MUÑOZ VIO**

Dr. Marco Álvarez Santana  
**Director de tesis**

Dr. Gabriel León  
**Comisión evaluadora**

Dr. Ariel E. Reyes  
**Co-Director de tesis**

Dr. Alfredo Molina S.  
**Comisión evaluadora**

## AGRADECIMIENTOS

Esta tesis está dedicada a todas aquellas personas que estuvieron presentes durante su realización. Es por esto que quiero agradecer especialmente a mi madre Elizabeth Vio, por su constante apoyo y cariño incondicional, a mi abuela Lucía Boisset por todo su amor y preocupación, y a mi padre Marco Antonio Muñoz, que aun a la distancia siempre ha tenido un consejo sabio. A toda mi maravillosa familia por su constante preocupación en mis logros y progresos.

Agradezco también a mis amigas eternas por su amistad sin límites, sus consejos, su apoyo, su cariño, su ternura y su paciencia. Gracias Michelle, Victoria, Francisca, Natalia, Paula, María José, Laura, Lorena y María Paz.

A mis compañeros de universidad, con los que recorrimos juntos este difícil camino del conocimiento, especialmente aquellos que se convirtieron en amigos, gracias totales a Camilo, Ingrid, Miriam, Simón, Fernanda, Juan Ignacio, Jorge, Patricio, Macarena, Nicolás, Juan y Roberto.

A mis compañeros de laboratorio Elías, Laura, Juan Alberto y Eduardo, por enseñarme los límites de mi paciencia y como desarrollarla aun más.

Por supuesto agradezco también a mis tutores por recibirme en sus laboratorios y compartir su experiencia profesional. Gracias por haberme formado como científica, por su paciencia y cariño.

## **FINANCIAMIENTO**

- Proyecto FONDECYT 1070358
- ECOS-CONICYT C06B03

## 1.1 ÍNDICE DE CONTENIDOS

	Páginas
<b>2. Introducción.....</b>	<b>1</b>
<b>Hipótesis.....</b>	<b>14</b>
<b>Objetivo General.....</b>	<b>14</b>
<b>Objetivos Específicos.....</b>	<b>14</b>
<b>3. Materiales y Métodos.....</b>	<b>15</b>
<b>3.1 Material Biológico.....</b>	<b>15</b>
<b>3.2 Microinyección de embriones del pez cebra.....</b>	<b>15</b>
<b>3.3 Falta de función de Macroh2a2.....</b>	<b>16</b>
<b>3.4 Clonamiento de macroh2a2-myc.....</b>	<b>16</b>
<b>3.4.1 Amplificación de secuencia por PCR.....</b>	<b>16</b>
<b>3.4.2 Clonamiento del producto de PCR.....</b>	<b>17</b>
<b>3.4.2.1 Reacción de ligación.....</b>	<b>17</b>
<b>3.4.2.2 Transformación de bacterias competentes.....</b>	<b>17</b>
<b>3.4.2.2.1 Cepas bacterianas.....</b>	<b>18</b>
<b>3.4.2.2.3 Preparación de DNA plasmidial en pequeña escala (miniprep).....</b>	<b>18</b>

3.4.2.4 Liberación del inserto del vector de clonamiento.....	19
3.5 Purificación de banda para subclonamiento en vector de expresión.....	20
3.5.1 Preparación de DNA plasmidial en mediana escala	
(Midiprep) Clon B16.....	20
3.5.2 Purificación de la banda mh2a2BamHI.....	20
3.6 Sub-clonamiento de macroh2a2BamHI en vector de	
expresión pCS2+MT.....	20
3.6.1 Preparación de vector de expresión pCS2+MT.....	20
3.6.1.1 Amplificación pCS2+MT.....	20
3.6.1.2 Digestión y desfosforilación pCS2+MT.....	21
3.6.2 Ligación inserto mh2a2 en plasmidio pCS2+MT.....	21
3.6.3 Transformación de bacterias competentes.....	21
3.6.4 Comprobación de la orientación del inserto mediante	
digestión enzimática.....	22
3.6.5 Preparación de DNA plasmidial en mediana escala	
(Midiprep) clon M2myc.....	22

<b>3.7 Síntesis del mRNA de macroh2a2 fusionado con epítoto myc.....</b>	<b>23</b>
<b>3.7.1 Digestión del clon M2myc con la enzima de restricción</b>	
<i>XbaI</i> .....	23
<b>3.7.2 Obtención de mRNA <i>in vitro</i> con CAP.....</b>	<b>23</b>
<b>3.8 Rescate del fenotipo silvestre.....</b>	<b>24</b>
<b>3.9 Inmunohistoquímica de embrión completo.....</b>	<b>24</b>
<b>3.9.1 Almacenaje y tratamiento de embriones para</b>	
Inmunohistoquímica.....	24
<b>3. 9.2 Inmunohistoquímica embrión completo.....</b>	<b>25</b>
<b>3.10 Tinción de núcleo con DAPI.....</b>	<b>26</b>
<b>3.11. Visualización de embriones y registro.....</b>	<b>26</b>
<b>4. Resultados.....</b>	<b>28</b>
<b>4.1. Determinación del patrón de expresión de Macroh2a2</b>	
durante la embriogénesis del pez cebra.....	28
<b>4.2. Localización subcelular de Macroh2a2.....</b>	<b>30</b>
<b>4.3. Caracterización del fenotipo de falta de función de Macroh2a2.....</b>	<b>32</b>



<b>4.4. La inyección de MOATGmacroh2a2 induce la disminución de la proteína Macroh2a2.....</b>	<b>35</b>
<b>4.5. Experimento de rescate en embriones morfantes para Macroh2a2.....</b>	<b>37</b>
<b>5. Discusión.....</b>	<b>41</b>
<b>6. Conclusión.....</b>	<b>50</b>
<b>7. Bibliografía.....</b>	<b>51</b>

## 1.2 ÍNDICE DE FIGURAS

Páginas

<b><u>Figura 1.</u></b> Ensamblaje y estructura de la partícula nucleosomal.....	3
<b><u>Figura 2.</u></b> A: Representación del dominio Histónico.....	8
B: Representación esquemática de la familia de variantes de la histona canónica H2A.....	8
<b><u>Figura 3.</u></b> Patrón de expresión de Macroh2a2 por inmunohistoquímica.....	29
<b><u>Figura 4.</u></b> Distribución celular de Macroh2a2, co-localización nuclear.....	31
<b><u>Figura 5.</u></b> Efecto de la falta de función de Macroh2a2 sobre la morfología de embriones del pez cebra.....	33
<b><u>Figura 6.</u></b> Inmunodetección de Macroh2a2 en embriones morfantes.....	36
<b><u>Figura 7.</u></b> Secuencia parcial del constructo que contiene el mRNA de <i>macroh2a2-myc</i> .....	37
<b><u>Figura 8.</u></b> Rescate de la falta de función de Macroh2a2.....	40

### 1.3 ÍNDICE DE GRÁFICOS

Páginas

**Gráfico 1. Porcentaje de fenotipos observados ante la falta de función**

**de Macroh2a2.....34**

**Gráfico 2. Tasa de rescate fenotipo silvestre.....39**

## RESUMEN

En células eucariontes el DNA está asociado a histonas formando un complejo nucleoproteico denominado cromatina. La unidad básica de la cromatina es el nucleosoma y a partir de este comienza el super enrollamiento de la hebra de ADN para su empaquetamiento en el reducido espacio provisto por el núcleo. La incorporación de variantes de histonas es un mecanismo de regulación epigenético, y por lo tanto tiene implicancia en la regulación de la expresión génica. Particularmente la familia de H2A corresponde a la histona canónica que posee mayor cantidad y diversidad de variantes descritas.

Macroh2a es una variante específica de los vertebrados y se distingue por sobre las demás variantes de la familia H2A ya que posee una masa molecular aproximada de 42 kDa siendo casi tres veces mayor que el tamaño de la histona convencional. Macroh2a posee un dominio histónico con 65% de homología con la histona canónica y un amplio dominio no histónico en el extremo C-terminal, denominado dominio Macro.

Se conocen dos isotipos no alélicos de esta variante, que estarían altamente relacionadas entre sí, denominados Macroh2a1 y Macroh2a2.

La función de la familia Macroh2a se asocia a la represión de genes como un mecanismo fino de regulación y a la mantención de regiones heterocromáticas. Sin embargo, se desconoce su mecanismo de acción.

Durante el desarrollo embrionario existe una expresión dinámica y coordinada de genes la cual es regulada en varios niveles y su activación gradual permite la distinción de patrones específicos de expresión génica.

Evidencias bibliográficas y resultados experimentales obtenidos en nuestro laboratorio, demuestran la expresión mayoritaria del subtipo Macroh2a2 a nivel de mRNA y proteína durante la embriogénesis del pez cebra (*Danio rerio*).

Este trabajo se enmarca en el estudio del patrón de expresión de la proteína Macroh2a2 mediante inmunohistoquímica y la determinación de los efectos de la falta de función de Macroh2a2 mediante la microinyección de oligonucleótido antisentido (morfolino) y sus implicancias durante el desarrollo embrionario del pez cebra.

Como resultado de la falta de función de Macroh2a2 se demostró que participa activamente en el correcto desarrollo embrionario del pez cebra.

## SUMMARY

In eukaryotic organisms, DNA is found associated with histone proteins constituting a nucleoprotein complex called chromatin. The basic subunit of chromatin is the nucleosome complex which allows for the high extent of compaction of genomic DNA within the cell nucleus. The incorporation of histone variants is a mechanism of epigenetic regulation of the chromatin structure. Of the five histone families, the histone H2A family show the most diversity of isoforms that have a range of dedicated functions in many cellular processes including organization of chromatin structure in somatic and germinal cells, gene transcription, DNA replication, and DNA repair.

The most extensive histone modification is the complete exchange of canonical histones for variant ones. Of all the known histone variants, macroH2A is the most divergent from its canonical histone and whose function is the least understood. The macroH2A family is specific to vertebrates and distinguishes itself from the other variants of the H2A family by having an approximate molecular mass of 42KDa, being almost three times the size of the conventional histone. In addition to a homologous histone domain, macroH2A possesses a large C-terminal domain of unknown function - the macro domain. The H2A domain of macroH2A histones is ~65% identical to that of the conventional H2A. There exist two nonallelic isotopes of macroH2A that are highly related to each other - macroH2A1 and macroH2A2 which despite mapping to different chromosomes have nearly identical genomic organization.

Embryonic development is based on a dynamic and coordinated expression of genes, the regulation of which is orchestrated at several levels throughout development permitting the identification of specific key 'conductors' of gene expression.

Our laboratory has used the targeted knock-down of Macroh2a2 by morpholino antisense technology, and mRNA and protein expression studies of *in situ* hybridization and immunohistochemistry to investigate the functional importance of macroH2A2 during embryogenesis of the zebrafish (*Danio rerio*).

Our result show that the presence of Macroh2a2 is require for the correct embryonic development of the zebrafish.

## ÍNDICE DE ABREVIATURAS

<b>% p/v:</b>	Porcentaje peso/volumen
<b>% v/v:</b>	Porcentaje volumen/volumen
<b>°C:</b>	Grados Celsius.
<b>µg:</b>	Micro gramos
<b>µL:</b>	Micro Litro
<b>µm:</b>	Micro Metro
<b>CIAP:</b>	<i>Alkaline Phosphatase, Calf Intestinal.</i>
<b>d:</b>	Diencéfalo.
<b>DAPI:</b>	Diamidina-2-fenilindol.
<b>dNTP:</b>	desoxinucleotido trifosfato
<b>EDTA:</b>	Ácido etilen diamino tetraacético
<b>g:</b>	Fuerza gravitacional
<b>g:</b>	Gramos
<b>GFP:</b>	<i>Green Fluorecent Protein</i>
<b>h:</b>	Horas
<b>hpf:</b>	Horas post-fertilización.
<b>IPTG:</b>	Isopropil-β-D-tiogalactosido galactopiranosido.
<b>kDa:</b>	Kilo Daltons.
<b>L:</b>	Litro
<b>LB:</b>	Medio de cultivo bacteriano Luria Bertani
<b>m:</b>	Mesencéfalo.
<b>Macroh2a:</b>	Proteína de pez cebra
<b>MacroH2A:</b>	Proteína de ratón y humano
<b>mg:</b>	Mili gramos
<b>min:</b>	Minutos
<b>mM:</b>	Mili Molar



<b>mm:</b>	Mili Metro
<b>MO:</b>	Morfolino
<b>MOATG:</b>	Morfolino diseñado para bloquear el sitio de inicio de la traducción
<b>MPT:</b>	Modificaciones post-traduccionales.
<b>mRNA:</b>	Acido ribonucleico mensajero
<b>ng:</b>	Nano gramos
<b>nL:</b>	Nano Litro
<b>PFA:</b>	Paraformaldehído
<b>pmol:</b>	Pico molar
<b>po:</b>	Placoda olfatoria, nariz.
<b>r:</b>	Retina.
<b>RT-PCR:</b>	PCR por transcriptasa reversa.
<b>s:</b>	Mesodermo somítico posterior, somitos.
<b>seg:</b>	Segundos
<b>t:</b>	Telencéfalo.
<b>Tris:</b>	Tris (hidroximetil) aminometano
<b>U:</b>	Unidad enzimática.
<b>VeD:</b>	Ventrículo del diencéfalo.
<b>X-Gal:</b>	5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-galactopiranosido.

## INTRODUCCIÓN

El desarrollo embrionario está basado en la expresión dinámica y coordinada de genes que conducen a la generación de cientos de tipos celulares a partir de tres capas germinales primarias. El desarrollo embrionario cumple dos objetivos fundamentales: generar diversidad celular y mantener el orden específico dentro de cada generación, a través del proceso que se denomina morfogénesis (Gilbert Scott, 2005). La Biología del Desarrollo es la disciplina que estudia cómo los genes regulan procesos morfológicos que culminan con la formación de un organismo multicelular complejo. Para llevar a cabo este proceso es necesaria una expresión génica diferencial espacial y temporal, que a partir de un repertorio de material genético nuclear común en todas las células de un individuo, genere los diferentes tipos celulares que formarán los órganos y tejidos del individuo adulto. (Holley, 2007).

Primeramente, la regulación de la expresión génica fue atribuida mayoritariamente a la secuencia del gen y la presencia en ésta de elementos reguladores tales como promotores, elementos *enhancer*, elementos silenciadores o secuencias de *splicing* alternativo, entre otros. La función de estos elementos permite explicar la acción de factores de transcripción que podían explicar el fenómeno de expresión génica diferencial en tejidos específicos durante el proceso como el desarrollo embrionario. Actualmente, este concepto ha sido ampliado debido a la acción de mecanismos de regulación de la expresión génica asociados a fenómenos independientes del código genético inscrito en la molécula de DNA (Beato y Eisfeld, 1997).

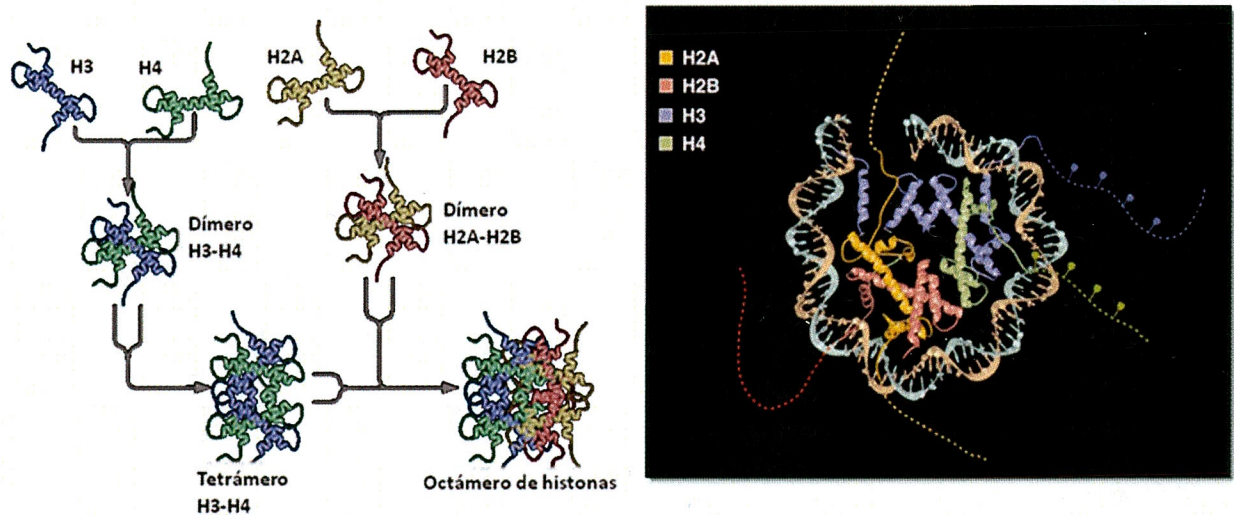
La expresión génica durante el desarrollo embrionario es regulada en varios niveles, en las primeras etapas es regulada por la expresión de genes maternos, los que son necesarios para la posterior expresión de los genes cigóticos. Estas expresiones de genes diferenciales son controlados por un estado de represión basal de la cromatina, que permite su expresión espacio-temporal necesaria para la correcta determinación de los territorios en el embrión, lo que se denomina patrón de expresión génica (Kelly y cols., 2000; Schier y Talbot, 2005).

En células eucariontes el DNA es empaquetado en forma de cromatina para adecuarlo al pequeño espacio físico provisto por el núcleo. Esta cromatina se organiza a partir de la asociación de DNA y proteínas denominadas histonas, formando una estructura llamada nucleosoma, constituyendo el primer estado de control de la expresión génica en un organismo que regula la accesibilidad de los complejos transcripcionales al DNA.

El nucleosoma es la unidad básica de la cromatina y está conformado por un octámero de histonas (H2A, H2B, H3 y H4) sobre el cual se enrolla la hebra de DNA 1,75 veces; las dimensiones de la partícula resultante presenta un diámetro de 110 Angstroms (Å) y un grosor aproximado de 55Å (Mitchell Smith, 1991; Luger y cols., 1997). Esta estructura debe ser moldeable para permitir el funcionamiento de la cromatina, razón por la que presenta una gran flexibilidad permitiendo la disrupción en su estructura según los requerimientos celulares. La interacción con la histona H1 depositada sobre la secuencia de DNA entre nucleosomas, produce un estado de compactación mayor, regulado por mecanismos vagamente descritos (Raghuram y cols., 2009).

La formación del nucleosoma requiere factores específicos de ensamblaje y proteínas chaperonas que interactúan coordinadamente en este proceso. El modelo de

ensamblaje propone que en una primera etapa es conformado un tetrámero de  $(H3-H4)_2$ , el cual sufre modificaciones específicas en la cola de las histonas (extremo N-terminal) y se deposita cercano al DNA, para que en un segundo éste tetrámero sea rodeado por dos heterodímeros constituidos por H2A y H2B (Akey y Luger, 2003). La cristalografía del nucleosoma muestra que el DNA es enrollado alrededor del octámero de histonas en una superhélice dextrógira, plana y de forma variable. Esta interacción presenta múltiples contactos con las histonas (Luger y cols., 1997). Debido a la gran cantidad de contactos DNA-proteína alrededor del octámero de histonas, la partícula nucleosomal una vez ensamblada es un complejo histona-DNA altamente estable (Ehrenhofer-Murray, 2004) (Figura 1, izquierda).



**Figura 1. Ensamblaje y estructura de la partícula nucleosomal.** El proceso de ensamblaje del nucleosoma comienza con un tetrámero formado por  $(H3-H4)_2$  que es rodeado por heterodímeros H2A-H2B (izquierda) (Alberts y cols., 2001). Estructura en rayos X del nucleosoma. Las líneas punteadas muestran los extremos N y C- terminales de las histonas además en estas, H4 y H3 muestran un diagrama de acetilaciones. H2A extremo C-terminal se ubica en el sitio de entrada y salida del DNA (arriba) (derecha) (Kornberg y cols., 1999).

Los dos heterodímeros de H2A-H2B interactúa con el tetrámero conformado por  $(H3-H4)_2$ , mediante la asociación de H2B con H4 para estabilizar el ensamblaje, mientras que H2A en cambio se posiciona en el sitio de entrada y salida de la hebra de DNA en el nucleosoma. Exponiendo una localización clave en la estabilidad estructural del nucleosoma (Mariño-Ramírez y cols., 2005; Akey y cols., 2003) (Figura 1. Derecha).

Las histonas clásicas, llamadas también convencionales o canónicas, se caracterizan por ser proteínas altamente conservadas en vertebrados, poseer una baja masa molecular que va entre los 11 y 15kDa y además presentan una carga neta positiva ya que son ricas en residuos aminoacídicos básicos, lo que les facilita la asociación por carga con el DNA. Estructuralmente las cuatro histonas canónicas presentan un dominio central que es común y reciben el nombre de *histone fold* o “plegamiento de histonas” y se refiere a un dominio estructural altamente conservado que se piensa fue duplicado en varias proteínas. Este dominio está formado por tres  $\alpha$ -hélices unidas por dos *loops* ( $\alpha 1$ -L1-  $\alpha 2$ - L2-  $\alpha 3$ , HSH *hélix-strand-helix*) y permite la interacción entre heterodímeros y a su vez con el DNA (Ramakrishnan, 1997) (Figura 2, A). Por otra parte, el dominio N-terminal de las histonas clásicas, llamado cola de histonas, es rico en aminoácidos básicos (lisina y arginina) y sobresale del nucleosoma conformando el 25-30% de la masa individual de cada histona. La presencia de este dominio las faculta como potencial superficie de interacción con otras proteínas y les confiere a su vez la capacidad de sufrir modificaciones post-traduccionales. Éstas modificaciones son capaces de determinar en parte el nivel de accesibilidad a la cromatina de la maquinaria transcripcional (Strahl y Allis, 2000). El octámero de histonas juega un rol importante en la estabilidad del nucleosoma y contribuye directamente en el estado de compactación de la fibra de cromatina de 30 nm y en otros estados superiores de

compactación, interviniendo en el ensamblaje o des-ensamblaje del nucleosoma (Mariño-Ramírez y cols., 2005).

En el núcleo la cromatina se encuentra en dos estados de compactación distintos: la heterocromatina que corresponde al estado condensado de la cromatina y por lo tanto transcripcionalmente reprimido, y la eucromatina que es su forma relajada que facilita la transcripción activa de genes (Polo y Almouzni, 2006).

El fenómeno epigenético se define como cualquier actividad de regulación génica que no tenga relación con cambios en la secuencia de DNA y que a su vez puede ser heredable (Pennisi y cols., 2001). Los mecanismos epigenéticos se caracterizan por mantener cambios hereditarios en las pautas de expresión génica que permiten la fluidez de los estados de compactación de la cromatina (Fei y Yang, 2009). Dentro de los mecanismos epigenéticos actualmente conocidos se encuentran las modificaciones post-traduccionales de la histonas (Strahl y cols., 2000; Cosgrove y cols., 2004), los complejos remodeladores de la cromatina dependientes de ATP (Li y cols., 2005), la metilación del DNA en islotes CpG (Vaissière y cols., 2008), la acción de RNA no codificantes (Gilbert y cols., 2000; Costa y cols., 2008) y el intercambio de histonas canónicas por sus formas variantes (Boulard y cols., 2007).

En este contexto las modificaciones post-traduccionales de las histonas han sido ampliamente caracterizadas, aunque no completamente comprendidas. Entre éstas se encuentran modificaciones como la metilación, acetilación, ubiquitinación, sumoilación, y la ADP-ribosilación, descritas principalmente en los extremos N- y C-terminal de la cola de las histonas (Cosgrove y cols., 2004). La hipótesis del código de histonas ha sido propuesta para dar explicación a este patrón complejo de modificaciones y sus implicancias

biológicas. En general, esta teoría postula un mecanismo por el que éstas modificaciones podrían ejercer su función modificando la estructura de la cromatina mediante contactos inter-nucleosoma, conocidos como mecanismos *cis* (Strahl y cols., 2000).

Un segundo mecanismo de modificaciones en la estructura de la cromatina son los llamados mecanismos en *trans*, el que postula que el intercambio de variantes de histonas modifica su estructura de manera específica en ciertos dominios, alterando directamente la estabilidad del nucleosoma o mediante la interacción con moléculas efectoras específicas que inician distintos procesos biológicos (Ausió y Abbott, 2002). Actualmente, se conocen variantes para todas las histonas canónicas descritas mientras que sus funciones biológicas continúan siendo estudiadas (Kamakaka y Biggins, 2005; Wu y cols., 2009). En este contexto, se han descrito variantes de histonas presentes en una gran diversidad de funciones celulares, desde la activación y silenciamiento de genes hasta el marcaje de DNA dañado para su posterior reparación (Choo y cols., 2007; Srivastava y cols., 2008; Sporn y cols., 2009).

La expresión de las histonas convencionales es mayoritariamente requerida en la fase S del ciclo celular para el empaquetamiento del DNA recién sintetizado. Los genes que se codifican para las histonas convencionales están agrupados en *clusters* que contienen múltiples copias de los genes que se codifican para las cinco histonas canónicas, ya que se requiere la expresión coordinada de estos genes y además carecen de intrones, para una mayor velocidad de traducción (Marzluff y cols., 2008). En cambio las variantes de histonas son formas no alélicas de las histonas canónicas y están codificadas en genes únicos posicionados a lo largo del genoma. Los RNAs mensajeros de estas variantes, a diferencia de las histonas convencionales, son procesados por *splicing* y son poliadenilados,

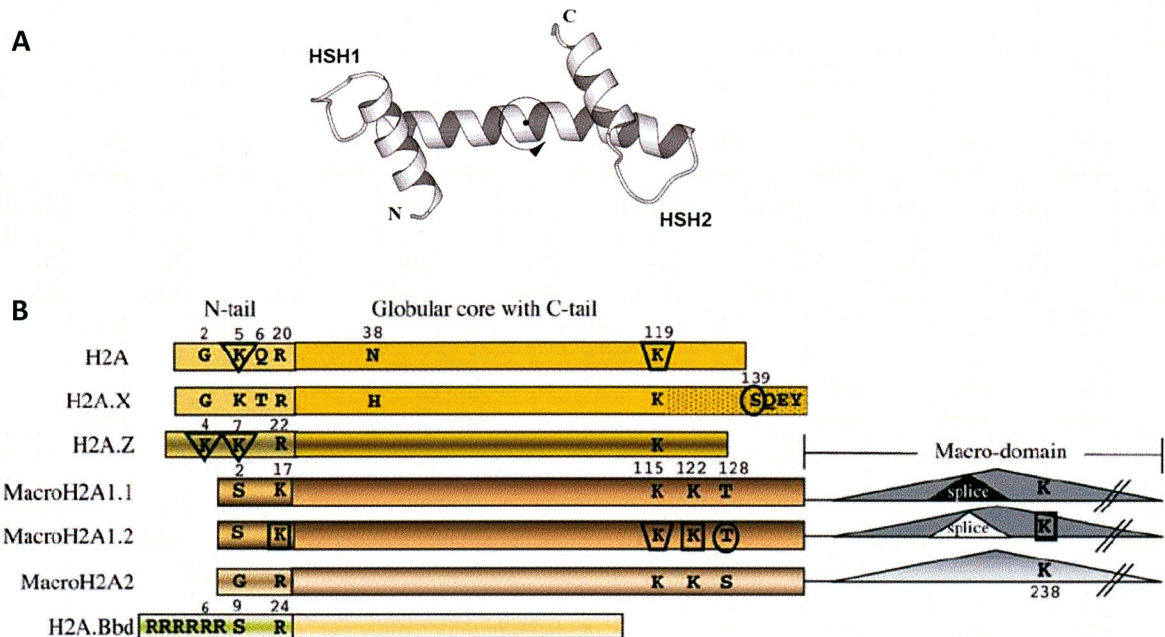
lo que les confiere una alta estabilidad al mensajero (Doenecke y cols., 1997). Asimismo, las variantes de histonas presentan patrones de expresión diferenciales, siendo capaces de depositarse en regiones específicas del genoma durante eventos celulares, sugiriendo que el intercambio de variantes de histonas es un proceso activo, reversible y que ocurre durante todo el ciclo celular, sugiriendo que cumpliría funciones específicas de regulación, más allá del empaquetamiento del DNA recién sintetizado (Costanzi y cols., 2000).

Las variantes de histonas pueden ser clasificadas en dos grupos: homomorfas y heteromorfas, dependiendo de la extensión y homología de la secuencia de aminoácidos. Las variantes homomorfas involucran pequeñas diferencias de aminoácidos respecto a la secuencia en su homólogo canónico: H2A.1 y H2A.2; H3.1, H3.2 y H3.3. Mientras que las variantes heteromorfas involucran cambios que afectan grandes porciones de la secuencia aminoacídica y que por lo tanto involucran diferencias significativas con su histona homóloga: H2A.X, H2A.Z, macroH2A, H2ABbd y CENP-A. Las variantes heteromorfas poseen un enorme potencial en la alteración de las características del nucleosoma debido en gran parte a las diferencias de secuencia y/o a efectos sobre de las modificaciones post-traduccionales (Ausió, 2006).

El análisis filogenéticos de las secuencias codificantes de variantes de histonas sugieren que su aparición fue un evento temprano en la evolución y a su vez estarían íntimamente relacionadas entre sí (inter-especies), más que a las histonas canónicas de su propia especie, por lo que se sugiere que las variantes de histonas estarían cumpliendo un rol importante a nivel funcional y estructural en la cromatina (Thatcher y Gorovsky, 1993). La histona canónica H2A es la que presenta mayor número de variantes descritas en la literatura. En mamíferos han sido descritas al menos 4 variantes heteromorfas, incluyendo:



H2A.X, H2A.Bbd (*Barr body deficient*), H2A.Z y MacroH2A. Todas éstas difieren significativamente en sus secuencia aminoacídica y son significativamente divergentes de su forma convencional que las variantes heteromorfas conocidas para H3 (Bernstein y Hake, 2006) (Figura 2, B).



**Figura 2. Representación del dominio Histónico (A).** Dominio estructural común en las histonas, reciben el nombre de *histone fold* o “plegamiento de histonas”, formado por tres  $\alpha$ -hélices unidas por dos *loops* ( $\alpha 1$ -L1-  $\alpha 2$ - L2-  $\alpha 3$ , HSH, *hélix-strand-hélix*), muestran el extremo N y C-terminal (Ramakrishnan, 1997). **Representación esquemática de la familia de variantes de la histona canónica H2A (B).** La región central se muestra en distintos colores mientras más divergentes son con respecto a la secuencia de la histona canónica. Residuos que reciben modificaciones post-traduccionales están marcados con: círculo, fosforilaciones; cuadrado, metilaciones; triángulo, acetilaciones; trapezoides, ubiquitinaciones. El dominio macro está representado en escala. Macroh2a1.1 y Macroh2a1.2 son isoformas por *splicing* alternativo en el exón 6 (Bernstein y Hake, 2006).

Las funciones descritas para las variantes de la histona H2A son diversas y se piensan estarían íntimamente relacionadas con la estructura y estabilidad del nucleosoma, ya que su posición en el nucleosoma coincide con el sitio de entrada y salida de la hebra de DNA. De este modo podrían promover o interrumpir el contacto con el DNA modulando la accesibilidad de la cromatina para la transcripción (Kornberg y Lorch, 1999) (Figura 1, derecha). En este contexto, varios estudios han demostrado que cualquier evento que desestabilice la interacción histona-DNA puede potencialmente aumentar la eficiencia de la transcripción de los genes dependientes de la RNA polimerasa II, la replicación del DNA y la reparación de daño en el DNA (Ehrenhofer-Murray, 2004).

En 1992 se describió por primera vez la presencia de la variante macroH2A como componente del nucleosoma en hígado de rata, la que es intercambiada por la forma canónica de la histona H2A (Pehrson y Fried, 1992). Esta variante se caracteriza por presentar un extenso dominio no histónico de aproximadamente de 42kDa, casi tres veces el tamaño de la histona convencional. MacroH2A presenta una estructura híbrida que consta de un extenso dominio no histónico en el extremo C-terminal del cual recibe su nombre (dominio macro), fusionado con un dominio histónico que presenta ~65% de identidad con su histona canónica. El análisis de la estructura del dominio macro muestra que presenta homología con proteínas encontradas en diversos tipos de virus RNAs de simple (*ssRNA*), conteniendo tres regiones conservadas: una región enriquecida en aminoácidos básicos, un dominio putativo de cierre de leucina y un dominio putativo de ADP-ribosa fosfoesterasa con una posible actividad catalítica (Pehrson y Fuji, 1998). En mamíferos se ha descrito la presencia de dos isotipos de la variante de histona macroH2A, que estarían altamente relacionadas entre sí pero codificadas en genes distintos:

macroH2A1 y macroH2A2 (Chadwick y Willard, 2001; Chadwick y cols., 2001). El isotipo macroH2A1 presenta dos isoformas producto de *splicing* alternativo del exón 6 del mismo gen denominadas llamadas macroH2A1.1 y macroH2A1.2, las que potencialmente tendrían funciones distintas (Rasmussen y cols., 1999).

Se ha postulado que la presencia de macroH2A en el nucleosoma impediría la acción de los complejos remodeladores de la cromatina tales como: SWI/SNF y ACF, involucrado en silenciamiento y activación de genes, respectivamente (Angelov y cols., 2003; Racki y Narlikar, 2008). Sin embargo, actualmente se ha demostrado que la presencia de macroH2A en el nucleosoma no impediría la acción de los complejos remodeladores (Chang y cols., 2008). Adicionalmente, estudios *in vitro* muestran que macroH2A reprime el inicio de la transcripción, aunque no afecta la elongación durante la transcripción de genes por la RNA polimerasa II (Doyen y cols. 2006), estableciendo que esta característica se deben al dominio macro y no al dominio histona. Por otra parte, se demostró que macroH2A también interferiría con la acetilación de las histonas dependiente de p300 en el nucleosoma. Este evento de represión puede ser explicado debido al impedimento estérico causado por el gran tamaño del dominio macro, que impide el ensamblaje de la maquinaria de inicio de la transcripción (Abbott y cols., 2004).

Todos estos antecedentes nos sugieren que la variante de histona macroH2A tendría una función represora de la transcripción, aunque el mecanismo por el cual estaría cumpliendo esta función es aún desconocido.

Estudios sobre la expresión de las isoformas de macroH2A1 (macroH2A1.1 y MacroH2A1.2) en diferentes tejidos, mostraron que macroH2A1 no es un componente constitutivo de la cromatina, ya que sus niveles variaron en tejidos diferenciados. Estudios

*in vitro* con células troncales de ratón, mantenidas en estado totipotencial, mostraron que no era posible detectar la expresión proteica de ambas isoformas de MacroH2A1, lo que indica una participación activa de tejido específico y no así en el proceso del desarrollo celular (Pehrson y cols., 1997).

Ambos isotipos de la variante macroH2A están asociadas con heterocromatina facultativa en el cromosoma X inactivo (Xi), lo que sugiere un papel en la represión de la transcripción de la cromatina (Mietton y cols., 2009; Rasmussen y cols., 2000; Costanzi y cols., 1998 y 2000). Sin embargo, MacroH2A presenta niveles de expresión similares en tejidos de hembras y machos, sugiriendo que su función no se restringe únicamente a la inactivación de Xi.

MacroH2A está presente en focos de heterocromatina asociado a senescencias y se postula como un marcador para ésta, (Zhang y cols., 2005; Sporn y cols., 2009). También se ha visto asociadas a regiones CpG metiladas del DNA incluyendo varios *locis* que se encuentran tanto en genes autosómicos como en Xi (Choo y cols., 2006). Mediante estudios de inmunofluorescencia *in vivo* realizados en glándulas adrenales de ratón para la detección de los dos isotipos de macroH2A, se mostró que existe expresión diferencial y tejido específica en que macroH2A2 se expresa en células externas de la cápsula a diferencia de macroH2A1 que se expresa en células del cortex y la médula de la glándula (Costanzi y Pherson, 2001). Estos mismos autores demostraron que en tejidos en los que ambos isotipos se expresan, como las células epiteliales de riñón, se observa co-localización en el cromosoma X inactivo pero que a su vez se ubicaban diferencialmente en territorios heterocromatínicos distintos, indicando una distribución diferenciada en el núcleo de la célula.

Estudios realizados en ratones *knockdown* para macroH2A1, demostraron que la inactivación total de la variante de histona no mostró cambios drásticos en la expresión transcripcional de genes improntados en los que se había detectado enriquecimiento de macroH2A1 en los promotores de los alelos inactivos. Este comportamiento fue explicado por los autores producto de que la acción represora de macroH2A1 estaría involucrada en mecanismos finos de regulación y no como regulador transcripcional global (Choo y cols., 2007).

Datos aportados recientemente demostraron que macroH2A está presente en promotores de genes que necesitan mantener un estado reprimido de transcripción, pero que a su vez requieren sensibilidad a señales de activación para revertir el proceso. También fue demostrado el enriquecimiento de macroH2A2 en numerosos promotores de genes involucrados en desarrollo, morfogénesis y organogénesis (Buschbeck y cols., 2009).

Todos estos estudios sugieren un papel regulatorio, con funciones específicas y programadas en distintas etapas del desarrollo para cada isotipo macroH2A1 y macroH2A2. Estos antecedentes nos llevan a especular en la importancia de la expresión de éstas durante la embriogénesis y a su vez en tejidos diferenciados.

Evidencias bibliográficas *in vivo* y resultados experimentales obtenidos en nuestro laboratorio muestran una expresión mayoritaria a nivel de mRNA del isotipo Macroh2a2 durante la embriogénesis del pez cebra (*Danio Rerio*).

Esto nos lleva a plantearnos la pregunta ¿participa la variante de histona Macroh2a2 en el desarrollo embrionario del pez cebra?

Para comprobar el rol de Macroh2a2 en el desarrollo se utilizará como modelo de estudio *in vivo* el pez cebra. Este modelo biológico ha sido ampliamente utilizado en

estudios de biología del desarrollo debido a sus numerosas ventajas tales como: poseer un tiempo generacional corto (ya que alcanzan la madurez sexual a los 3 meses de vida), ser altamente prolíficos (aproximadamente 100 a 200 huevos por hembra); y poseer embriones transparentes durante los primeros estadios embrionarios lo que permite observar la morfogénesis temprana. Además, el elevado grado de conservación de sus genes con otros vertebrados y con humano lo ha convertido en una importante herramienta de investigación y debido a la secuenciación completa de su genoma permite la rapidez en el rastreo genético (Lieschke y Currie, 2007).

## **HIPÓTESIS**

Nuestro trabajo postula que “La variante de histona Macroh2a2 está involucrada en el desarrollo embrionario del pez cebra”.

## **OBJETIVO GENERAL**

Determinar el efecto de la falta de función de Macroh2a2 durante el desarrollo embrionario del pez cebra.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Determinar el patrón de expresión de la proteína Macroh2a2 durante el desarrollo embrionario.
- Caracterizar el fenotipo producto de la falta de función para Macroh2a2 mediante la microinyección de morfolino.
- Rescatar el fenotipo silvestre usando la microinyección de mRNA de Macroh2a2-myc.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### 1. Material Biológico.

En esta tesis se trabajó con embriones del pez cebra (*Danio rerio*) obtenidos por cruza naturales de peces adultos. Se utilizaron líneas silvestres del pez cebra (AB). Estos fueron mantenidos en un vivero en condiciones de temperatura controlada (28° C) y con un fotoperiodo de 12 h de luz y 12 h de oscuridad de acuerdo a lo descrito por Westerfield (1995). Para realizar los cruzamientos se separaron los machos de las hembras - sexualmente maduros- el día anterior de la crusa y se juntaron en la mañana del día siguiente en cajas especiales para colectar los embriones. Los embriones obtenidos son mantenidos en una estufa a 28° C en placas Petri en medio E3 (E3 1X: NaCl 5 mM, KCl 0,17 mM, CaCl<sub>2</sub> 0,33 mM, MgSO<sub>4</sub> 0,33 mM, azul de metileno 5-10 % v/v).

### 2. Microinyección de embriones del pez cebra

La microinyección se utilizó para introducir morfolinós y RNA mensajero en los embriones del pez cebra. Los embriones que se microinyectaron se tomaron en el estadio de una a dos células en medio E3 para depositarlos en una placa petri alineados con ayuda de un vidrio portaobjeto y eliminando todo el medio posible. Los embriones fueron microinyectados utilizando un microinyector Pneumatic Picopump PV 820 (WPI) utilizando como agujas de microinyección capilares de 10 µl elongados en un Puller PC-10 (Narishige, Japón). Posteriormente a su microinyección, los embriones se mantuvieron en medio E3 en una estufa a 28° C en placas Petri de plástico. El medio fue removido transcurrido 8 horas y cambiado por E3 fresco. Los embriones microinyectados fueron mantenidos en estas condiciones hasta los estadios necesarios para los estudios a realizar.



### 3. Falta de función de Macroh2a2

Para generar la falta de función de la proteína Macroh2a2, se utilizó un morfolino específico, análogo de oligonucleótido antisentido que son modificados químicamente, reemplazando la ribosa por un grupo morfol ( $C_4H_9NO$ ) y el enlace fosfodiéster por un fosforodiamidato (Nasevicius y Ekker, 2000). En este trabajo se utilizaron dos tipos de morfolino MOATGmh2a2, secuencia 5'-TTTCTTTCCTCCTCTGGCTGACATC-3' que fue diseñado para unirse específicamente al sitio de inicio de la traducción AUG, inhibiendo la expresión cigótica y materna. Como control, se inyectó MO Control que corresponde a un morfolino estándar con fluoreceína, secuencia 5'-CCTCTTACCTCAGTTACAATTTATA-3'. Ambos morfolinos fueron diseñados y sintetizados por la empresa Gene-Tools, LLC (USA). Cada embrión fue microinyectado con 5 nL de morfolino conteniendo 4,1 ng. Luego de microinyectar los morfolinos, los embriones crecieron en placas Petri de plástico a 28° C en medio E3.

### 4. Clonamiento de macroh2a2myc

#### 4.1 Amplificación de secuencia por PCR

A partir de la secuencia completa de cDNA para Macroh2a2 del pez cebra, se diseñaron partidores específicos que flanquean Macroh2a2 y eliminaran el codón de término con la siguiente secuencia: MH2A2rescF, Sentido 5'-**GGA TCC** ATG TCA GCC AGA GGA -3' y MH2A2rescR, Antisentido 5'- **GGA TCC** CTT GGC GTC CAT CTT -3'. Ambos partidores contienen un sitio de restricción para la enzima *BamHI*, sitio de restricción 5'-G<sup>^</sup>GATCC -3'. Se utilizó como templado el clon C2.2 que contiene la secuencia completa de cDNA de Macroh2a2 del pez cebra. La mezcla utilizada para el PCR

consistió en: 10  $\mu\text{L}$  de tampón sin color de GoTaq polimerasa 5X con una concentración final de  $\text{MgCl}_2$  1,5 mM (Promega); 1  $\mu\text{L}$  de dNTP's 10 mM; 1  $\mu\text{L}$  de partidor sentido (MH2A2rescF) 10 pmol/ $\mu\text{L}$  y 1  $\mu\text{L}$  de partidor antisentido (MH2A2rescR) 10 pmol/ $\mu\text{L}$ , 35,8  $\mu\text{L}$  agua libre de nucleasas y 0,2  $\mu\text{L}$  de enzima GoTaq DNA polimerasa (5 U/ $\mu\text{L}$ ) (Promega).

La reacción de PCR se realizó bajo las siguientes condiciones: desnaturalización inicial a 95° C por 2 min, hibridación inicial de partidores a 59° C por 1 min y 20 seg, elongación inicial a 72° C por 1 min y 30 seg, seguidos por 45 ciclos de desnaturalización a 95° C por 1 min, hibridación de partidores a 59° C por 1 min, elongación a 72° C por 1 min y 30 seg.

## **4.2 Clonamiento del producto de PCR**

### **4.2.1 Reacción de ligación**

El producto de amplificación obtenido por PCR fue ligado en el vector plasmidial pGEM®-T Easy (Promega). La reacción de ligación se realizó agregando 5  $\mu\text{L}$  de tampón de ligación rápida 2X (Tris-HCl 60 mM pH=7,8;  $\text{MgCl}_2$  20 mM; DTT 20 mM; ATP 2 mM y polietilen glicol 10% v/v); 1,4  $\mu\text{L}$  de agua libre de nucleasa; 1  $\mu\text{L}$  del vector pGEM®-T Easy (50 ng/ $\mu\text{L}$ ); 100 ng del producto de amplificación y 1  $\mu\text{L}$  de T4 DNA ligasa (3 U/uL). La reacción se incubó toda la noche a 4° C.

### **4.2.2 Transformación de bacterias competentes**

Se transformaron células competentes de la cepa *E. coli* JM109 (Promega) con el producto de ligación obtenido previamente. Para ello, se mezcló una alícuota de 50  $\mu\text{L}$  de

células competentes con 10  $\mu$ L de la reacción de ligación y se incubó en hielo durante 20 min. Luego las células se incubaron a 42° C por 45 seg, posteriormente se colocaron en hielo por 2 min. A continuación se adicionó 1 mL de medio Luria Bertani LB-Broth ® (extracto levadura 5 g/L; peptona 10 g/L y NaCl 5 g/L) y se incubó a 37° C por una hora con agitación constante. Las bacterias fueron sembradas en placas LB-Ampicilina (50  $\mu$ g/mL) que contenía 7  $\mu$ L de IPTG 20 mg/mL y 40  $\mu$ L de X-Gal 20 mg/mL se incubó a 37° C durante 16 h. Las colonias se seleccionaron mediante la presencia de resistencia a la Ampicilina y se reconocieron mediante la identificación de colonias azules o blancas al interrumpir la secuencia codificante de  $\beta$ -galactosidasa.

#### 4.2.2.1 Cepas bacterianas

Se utilizó la cepa de *E. coli* JM109 (Promega), genotipo *endA1, recA1, gyrA96, thi, hsdR17* ( $r_k^-$ ,  $m_k^+$ ), *relA1, supE44,  $\Delta$ (lac-proAB)*, [*F' traD36, proAB, laqI<sup>q</sup>Z $\Delta$ M15*].

#### 4.2.3 Preparación de DNA plasmidial en pequeña escala (miniprep)

Se inocularon 5 mL de medio de cultivo LB-Ampicilina (50  $\mu$ g/ $\mu$ L) con una colonia aislada de bacterias transformadas y se incubó a 37° C durante 16 h con agitación constante. Se tomaron 3 mL de cultivo y se centrifugaron a 13.000 x g por 5 min a temperatura ambiente. El sedimento de bacterias se resuspendió en 300  $\mu$ L de la solución de lisis alcalina I (Tris-HCl 50 mM pH=8.0; EDTA 10 mM pH=8.0) y se incubó a temperatura ambiente por 5 min. Luego se agregaron 300  $\mu$ L de la solución de lisis alcalina II (NaOH 200 mM, SDS 1 % v/v) y se incubó por 5 min a temperatura ambiente. A ésta mezcla se le adicionaron 300  $\mu$ L de la solución de lisis alcalina III fría (Acetato de Amonio 8 M), se mezcló suavemente invirtiendo los tubos durante 5 min y se incubó por 15 min en hielo.

Posteriormente se centrifugó a 13.000 x g por 20 min a temperatura ambiente. El sobrenadante se trasladó a un nuevo tubo y se le agregaron 450 µL de fenol y 450 µL de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1). Se centrifugó a 13.000 x g durante 5 min a temperatura ambiente. Se recuperó la fase acuosa en un nuevo tubo y se agregaron 900 µL de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1). Se centrifugó a 13.000 x g durante 5 min a temperatura ambiente y se recuperó el sobrenadante conteniendo el DNA plasmidial que se precipitó con 900 µL de isopropanol. Se centrifugó por 20 min a 13.000 x g, el precipitado se lavó con 200 µL de etanol 70% v/v y se centrifugó a 5.000 x g por 3 min. Se eliminó el etanol y se secó el sedimento, el que finalmente se resuspendió en 20 µL de agua libre de nucleasa conteniendo 1 µL de RNAsa (10 mg/mL), se incubó esta reacción a 37° C durante 15 min y finalmente el DNA se almacenó a -20° C.

#### **4.2.4 Liberación del inserto del vector de clonamiento**

Se digirieron los clones obtenidos de la ligación para corroborar la incorporación del inserto esperado. La reacción contiene 1 µL de buffer REACT 3 10X (Tris-HCl 50 mM pH=8.0; MgCl<sub>2</sub> 10 mM; NaCl 100 mM), 1 µL DNA proveniente de la mini preparación, 7,5 µL de H<sub>2</sub>O libre de nucleasa y 0,5 µL de la enzima *Bam*HI (10 U/µL) (Invitrogen). Se incubaron por 4 h. a 37° C. Los fragmentos obtenidos fueron analizados por electroforesis en un gel de agarosa 1% para comprobar la liberación del inserto.

## **5. Purificación de banda para subclonamiento en vector de expresión**

### **5.1 Preparación de DNA plasmidial en mediana escala (Midiprep) Clon B16**

Se inocularon 100 mL de medio de cultivo LB-Ampicilina (50  $\mu\text{L}/\mu\text{g}$ ) con 1 mL del cultivo para miniprep del clon B16, se dejó crecer toda la noche a 37° C durante 16 hrs con agitación constante. Se aisló el DNA plasmidial en mediana escala utilizando el kit de purificación plasmidial Wizard® *Plus* Midipreps DNA Purification System (Promega), según las indicaciones del fabricante.

### **5.2 Purificación de la banda mh2a2BamHI**

Para la purificación de la banda se digirieron 9  $\mu\text{g}$  de DNA plasmidial obtenidos de la midiprep con la enzima de restricción *BamHI* (4.2.4). El producto de la digestión se fraccionó en un gel de agarosa 0,5%. La banda de interés se extrajo del gel y se purificó mediante FavorPrep Gel/PCR Purification KIT (Favorgen) según las instrucciones del fabricante. El producto de la purificación se fracciono en un gel de agarosa 1% p/v.

## **6. Sub-clonamiento de macroh2a2BamHI en vector de expresión pCS2+MT**

### **6.1 Preparación de vector de expresión pCS2+MT**

#### **6.1.1 Amplificación pCS2+MT**

Se transformaron bacterias competentes de la cepa *E. coli* JM109 (Promega) con el vector de expresión pCS2+MT, (sección 4.2.2). Una de las colonias fue inoculada en 100 mL de medio de cultivo LB/Amp (50  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) (sección 5.1).

### **6.1.2 Digestión y desfosforilación pCS2+MT**

Para linealizar el plasmidio pCS2+MT se utilizaron 10 µg del DNA plasmidial obtenido de la extracción a mediana escala y se digirió con la enzima *BamHI* (Invitrogen) (sección 4.2.4). Para evitar la re ligación del plasmidio linealizado, se trata con fosfatasa alcalina para hidrolizar el grupo fosfato en el extremo 5' del DNA. Para la reacción de desfosforilación se utilizaron 3 µL (1 µg/µL) de la digestión del plasmidio junto con 3 µL de CIAP (1 U/µL) (Promega). Se incubó por 3 h a 37° C, la reacción se detuvo con 300 µL de CIAP Stop buffer (Tris-HCl 10 mM pH=7,5; EDTA 1 mM pH=7,5; NaCl 200 mM y SDS 0;5% v/v) durante 15 min a 60° C. El plasmidio linealizado y desfosforilado se purificó mediante el kit AxyPrep PCR Clean-up (Axygen) según las instrucciones del fabricante.

### **6.2 Ligación inserto mh2a2 en plasmidio pCS2+MT**

El inserto macroh2a2BamHI se subclona en el vector de expresión pCS2+MT. Para la reacción de ligación se utilizó: 1 µL Buffer de ligación 10X (Tris-HCl 300 mM pH=7,8; MgCl<sub>2</sub> 100 mM; DTT 100 mM y ATP 10 mM), 5 µL (20 ng/µL) del inserto purificado, 2 µL (1 µg/µL) vector pCS2+MT y 2 µL de agua libre de nucleasa. Se dejó incubar a 4° C durante 16 h.

### **6.3 Transformación de bacterias competentes**

Se transformaron células competentes de la cepa *E. coli* JM109 (Promega), con el producto de ligación obtenido previamente siguiendo el mismo protocolo que la sección 4.2.2.

## **6.4 Comprobación de la orientación del inserto mediante digestión enzimática**

Se realizaron preparaciones de DNA en pequeña escala de las colonias obtenidas de la transformación con el vector de expresión pCS2+MT con el inserto mh2a2, siguiendo el protocolo de la sección 4.2.3. Con el DNA obtenido de cada clon se realizaron digestiones enzimáticas para constatar la incorporación y la orientación del inserto. La presencia del inserto se determinó mediante la digestión con la enzima endonucleasa *BamHI* (sección 4.2.4). La comprobación de la orientación se realizó mediante la digestión con la enzima endonucleasa *XhoI* (10 U/ $\mu$ L) (Promega). La reacción contiene 2  $\mu$ L de buffer D 10X (Tris-HCl 6 mM pH=7,9; MgCl<sub>2</sub> 6 mM; NaCl 150 mM y DTT 1 mM), 1  $\mu$ L DNA proveniente de la mini preparación, 0,2  $\mu$ L BSA acetilada 10  $\mu$ g/ $\mu$ L, 16,3  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O libre de nucleasa y 0,5  $\mu$ L de la enzima *XhoI* (Invitrogen) se incubó por 4 h a 37° C. El producto de las mini preparaciones y las digestiones se fraccionó en un gel de agarosa 0.5% p/v. Se verificó la presencia del clon M2myc.

## **6.5 Preparación de DNA plasmidial en mediana escala (Midiprep) clon M2myc**

Se inocularon 100 mL de medio de cultivo LB-Ampicilina (50  $\mu$ L/ $\mu$ g) con 1 mL del cultivo para miniprep del clon M2myc, se dejó crecer a 37° C durante 16 h con agitación constante. Se aisló el DNA plasmidial en mediana escala utilizando el kit de purificación plasmidial Wizard® Plus Midipreps DNA Purification System (Promega), según las indicaciones del fabricante.

## **7. Síntesis del mRNA de macroh2a2 fusionado con epítoto myc**

### **7.1 Digestión del clon M2myc con la enzima de restricción *XbaI***

Se linearizaron 4  $\mu\text{g}$  del clon M2myc con la enzima de restricción *XbaI* (Fermentas). La reacción contiene 2  $\mu\text{L}$  de buffer Tango 10X (Tris-acetato 33 mM pH=7,9; acetato de magnesio 10 mM; acetato de potasio 66 mM; BSA 0.1 mg/mL), 1  $\mu\text{L}$  DNA proveniente de la midipreparación, 11,5  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}$  libre de nucleasa y 2,5  $\mu\text{L}$  de la enzima *XbaI* (10 U/ $\mu\text{L}$ ) (Fermentas). Para utilizarlos como molde en la transcripción *in vitro* del mRNA. La correcta linearización del clon M2myc se comprobó migrando 1  $\mu\text{L}$  de la digestión en un gel de agarosa al 1% p/v teñido con bromuro de etidio (0,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). El DNA digerido y linearizado se purificó eliminando enzimas y sales mediante el kit FavorPrep Gel/PCR Purification KIT (Favorgen), según las instrucciones del fabricante. Posteriormente se cuantificó 1  $\mu\text{L}$  del DNA linearizado y purificado mediante electroforesis en gel de agarosa 1,5% p/v.

### **7.2 Obtención de mRNA *in vitro* con CAP**

Se utilizó el kit comercial mMMESSAGE mMACHINE (Ambion) para la síntesis *in vitro* de grandes cantidades de RNA modificado en su extremo 5' (CAP). El clon M2myc linealizado se transcribió utilizando la RNA polimerasa SP6 para obtener el RNA mensajero sentido. La reacción consiste en 3  $\mu\text{L}$  DNA linealizado (1  $\mu\text{g}$ ) junto con 2  $\mu\text{L}$  buffer 10X de la RNA polimerasa, 10  $\mu\text{L}$  ribonucleótidos y análogo de CAP 2X, 2  $\mu\text{L}$  enzima SP6 y 3  $\mu\text{L}$  de agua libre de nucleasas, se incubaron a 37° C durante 2 h. Al terminar la transcripción el producto es tratado con 1  $\mu\text{L}$  DNAsas Turbo (2 U/ $\mu\text{L}$ ) libres de RNAsas durante 15 min a 37° C. 2  $\mu\text{L}$  del producto fueron visualizados en un gel de



agarosa 1,5% p/v. El mRNA fue precipitado con 30  $\mu$ L de la solución LiCl 5 M y 30  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O libre de nucleasa para remover nucleótidos no incorporados y proteínas, se enfrió durante 30 min a -20°C, se centrifugó a 13.000 x g por 30 min a 4°C y se eliminó el sobrenadante. El precipitado fue lavado con 1 mL de etanol 70% y se centrifugó nuevamente por 30 min a 13.000 x g. Se dejó secar el precipitado a temperatura ambiente y se resuspendió en 15  $\mu$ L de agua libre de RNAsas. Se determinó la concentración del mRNA mediante espectroscopia.

## **8. Rescate del fenotipo silvestre**

Para la comprobación de la especificidad del morfolino MOATGmh2a2, se realizó el rescate del fenotipo silvestre mediante la microinyección de 10 nL conjunta de: 4,1 ng de MOATGmh2a2 y distintas cantidades del mRNA *macroh2a2myc*. Las cantidades utilizadas de mRNA *macroh2a2myc* fueron 50 pg y 200 pg. El tratamiento posterior de los embriones se describe en la sección 2.

## **9. Inmunohistoquímica de embrión completo**

### **9.1 Almacenaje y tratamiento de embriones para inmunohistoquímica**

Los embriones decorionados se depositaron en un tubo eppendorf de 2 mL retirando todo el medio, se agregó 1,5 mL de paraformaldehído 4% en PBS 1X (NaCl 0,14 M; KCl 2,7 mM; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10 mM; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,4 mM pH=7,4) y se fijaron durante 16 h a 4° C. Para almacenar los embriones una vez fijados se lavaron los embriones con metanol 25% en agua, metanol 50%, metanol 75% y metanol 100% durante 10 min cada uno, se almacenaron en metanol 100% a -20° C.

## 9.2 Inmunohistoquímica embrión completo

Para la rehidratación se realizaron lavados sucesivos en metanol 75% en PBS-T (PBS/Tween-20 0.1% v/v), metanol 50% en PBS-T, metanol 25% PBS-T, durante 5 min cada uno. Finalmente fueron lavados 4 veces en PBS-T por 5 min. Los embriones rehidratados fueron lavados por 5 min con H<sub>2</sub>O destilada; luego se incubaron en acetona fría a -20° C por 7 min, se lavaron por 5 min con H<sub>2</sub>O destilada y a continuación se lavaron por 5 min en PBS. Los embriones se incubaron durante una hora a temperatura ambiente en solución de bloqueo 10% (10% Suero de Cabra) (Goat Serum SIGMA), 1% DMSO, 0,1% Tween-20 en PBS 1X). Se incubó con anticuerpo primario en solución de bloqueo a 4° C durante 16 h. Los anticuerpos primarios utilizados fueron: anti MacroH2A2 humana policlonal hecho en conejo (1:500, gentilmente cedido por el Dr. Stefan Dimitrov, ENS, Lyon, Francia), anti MacroH2A2 humana policlonal hecho en conejo (1:500, ABCAM), anti Myc monoclonal hecho en ratón (1:50, Santa Cruz Biotechnology). Al siguiente día se realizaron 5 lavados con PBS-T por 20 min cada uno con agitación constante para eliminar el exceso de anticuerpo. Luego se incubó con anticuerpo secundario en solución de bloqueo a 4° C durante 4 h. Los anticuerpos secundarios utilizados fueron anti IgG de conejo hecho en cabra acoplado a fosfatasa alcalina (1:500, PIERCE), anti IgG de ratón hecho en cabra acoplado a fosfatasa alcalina (1:500, SIGMA) y anti IgG de conejo hecho en burro acoplado a Alexa Fluor 647 (1:500, ABCAM). Al cabo de este tiempo se realizaron 4 lavados durante 20 min con PBS-T para eliminar el exceso de anticuerpo. Los embriones con anticuerpos secundarios acoplados a fosfatasa alcalina fueron incubados durante 15 min en buffer AP (Tris-HCl 100 mM pH= 9,5; MgCl<sub>2</sub> 50 mM; NaCl 100 mM; Tween-20 0,2% v/v; Tritón X-100 0.2% v/v y se lleva a volumen en H<sub>2</sub>O destilada). A continuación

se reemplazó el buffer AP por solución de revelado (4,5  $\mu$ L NBT de almacenaje, (50 mg Nitro Blue Tetrazolium en 0,7 mL de dimetilsulfoamida anhidro y 0,3 mL de H<sub>2</sub>O destilada) 3,5  $\mu$ L BCIP de almacenaje (50 mg de 5-bromo-4-cloro- 3 indolil fosfato en 1 mL de dimetilsulfoamida anhidro), 100  $\mu$ L de levamizol 10 mM (Sigma) y se llevó a 2 mL de volumen con buffer AP. Una vez que se detectó la reacción se detuvo con 5 lavados con PBS y luego se fijó en paraformaldehído 4% en PBS 1X. Los embriones tratados con anticuerpo secundario asociado a Alexa Fluor 647 fueron guardados en PBS y oscuridad.

#### **10. Tinción de núcleo con DAPI**

Para la co-localización de la proteína Macroh2a2 detectada por inmunofluorescencia con DAPI (Diamidina-2-fenilindol), los embriones se incuban durante 20 min a temperatura ambiente con solución *stock* DAPI (100 mg/mL) en oscuridad, luego se realizaron 3 lavados con PBS durante 10 min. Observar entre 310- 430 nm.

#### **11. Visualización de embriones y registro.**

El montaje para la toma de imágenes de los embriones se realizó en una placa petri con metilcelulosa 4% p/v (SIGMA).

Los embriones del pez cebra silvestres y microinyectados fueron observados en microscopio estereoscópico con sistema de fluorescencia (Leica MZ12.1). El registro fotográfico se realizó en cámara digital Leica DC300F.

Para la inmunohistoquímica de fluorescencia los embriones silvestres fueron montados en portaobjetos con agarosa 1% p/v en E3. Se observaron en un microscopio

confocal (Olympus Fluoview 1000), siendo las fotos analizadas y modificadas mediante el software Olympus Fluoview versión 2.0 para el color artificial.

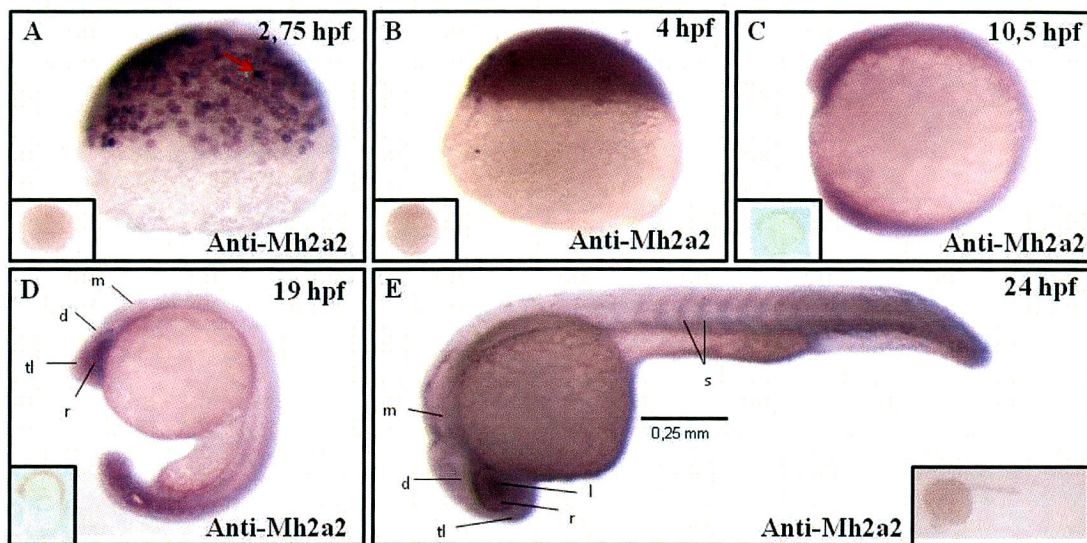
## RESULTADOS

En este trabajo se estudió la participación de la variante de histona Macroh2a2 en el desarrollo embrionario del pez cebra (*Danio rerio*). Para esto se determinó el patrón de expresión temporal, espacial y localización celular de esta proteína durante la embriogénesis. Posteriormente se realizó el estudio de la falta de función de Macroh2a2 utilizando oligonucleótidos antisentido (morfolinos). Para comprobar que los defectos observados se debían efectivamente a la falta de función de Macroh2a2, se realizó un experimento de rescate fenotípico que consistió en co-inyectar el mRNA *macroh2a2myc* junto con el morfolino específico.

### **1. Determinación del patrón de expresión de Macroh2a2 durante la embriogénesis del pez cebra.**

Para determinar la expresión de la proteína Macroh2a2 durante el desarrollo embrionario del pez cebra, se realizó inmunohistoquímica de embrión completo en distintos estadios del desarrollo utilizando un anticuerpo anti MacroH2A2 humana y análisis por RT-PCR. El análisis por inmunohistoquímica reveló expresión a las 2,75 horas post-fertilización (hpf), indicando la contribución materna en la expresión de la proteína (Fig. 3A). Ésta expresión detectada en el embrión completo fue corroborada por la detección en extractos de RNA total por RT-PCR (datos no mostrados). La expresión de la proteína mostró un patrón punteado, sugiriendo expresión nuclear de la proteína (flecha roja). Posteriormente en el estadio de 4 hpf se observó expresión ubicua de la proteína (Fig. 3B). A 10,5 hpf se observa una marca más intensa en las regiones anterior y posterior del embrión (Fig. 3C). A 19 hpf la expresión está restringida a las regiones anterior y posterior,

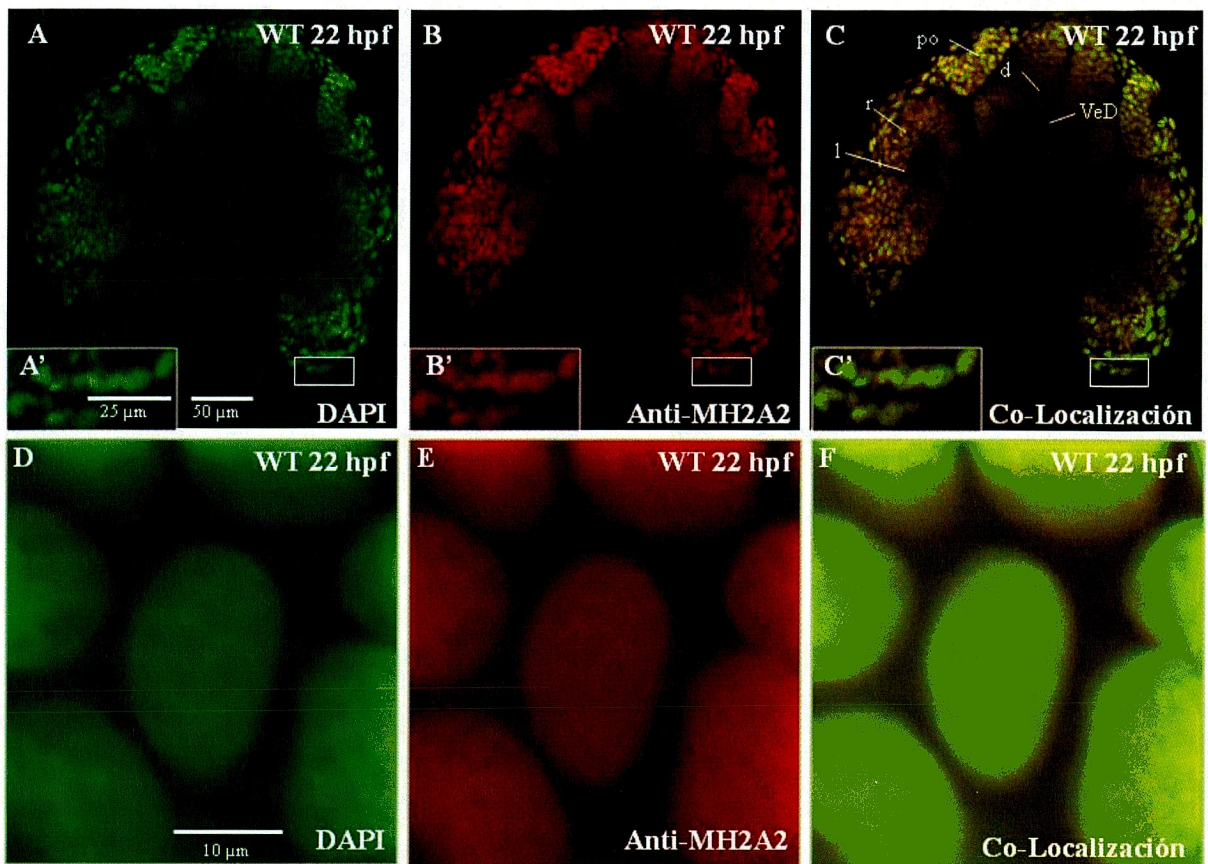
observándose expresión en la cabeza, específicamente en la retina (r), telencéfalo (t), diencéfalo (d), mesencéfalo (m), y en la región posterior de la cola en mesodermo somítico posterior (s) (Fig. 3D). A 24 hpf la expresión de la proteína Macroh2a2 continúa restringida a estructuras anteriores y en la región posterior del embrión se observa señal en el territorio de los somitos (s) (Fig. 3E). Como control negativo se realizó la inmunohistoquímica sin el anticuerpo primario (Figura 1, insertos).



**Figura 3. Patrón de expresión de Macroh2a2 por inmunohistoquímica.** Se determinó la distribución espacial y temporal de Macroh2a2 mediante inmunohistoquímica de embrión completo. Macroh2a2 presenta expresión materna ubicua en el estadio de 2,75 horas post-fertilización (hpf) (A) con aparente expresión nuclear (flecha roja). En estadios de 4 hpf se observó expresión ubicua (B). En estadio de 10,5 hpf se observó una marca más intensa en territorio anterior y posterior del embrión (C). A las 19 hpf el patrón se restringe a estructuras anteriores, observándose expresión en la cabeza específicamente en la retina (r) telencéfalo (tl), diencéfalo (d), mesencéfalo (m) y en la región posterior (D). A las 24 hpf la expresión se mantiene en los territorios anteriores previamente descritos y en la región posterior específicamente en mesodermo somítico (s) (E). En el recuadro inferior se muestra el control negativo de inmunohistoquímica sin anticuerpo primario. Barra = 0,25 mm

## **2. Localización subcelular de Macroh2a2.**

Para determinar la localización subcelular de la proteína Macroh2a2 se realizó inmunodetección usando un anticuerpo primario policlonal anti MacroH2A2 humana y un segundo anticuerpo acoplado a Alexa 647 (pseudocolor rojo), junto con DAPI (pseudocolor verde) en embriones de 22 hpf. Las muestras observadas en microscopía confocal revelan que Macroh2a2 se localiza en el núcleo de las células de la retina (r), diencéfalo (d) y nariz (po) (Figura 4C). Se observó co-localización de Macroh2a2 con DAPI en todas las células analizadas (Figura 4B). A mayor aumento de la capa más externa de la retina se observó con detalle la co-localización de Macroh2a2 en el núcleo en un patrón punteado no homogéneo (insertos en Fig. 4A', 4B' y 4C'). Como control de especificidad del anticuerpo, se realizó la misma técnica en donde se utilizó un anticuerpo comercial anti MacroH2A2 humana (ABCAM). Se observa con mayor aumento la co-localización nuclear de DAPI y el anticuerpo anti MacroH2A2, muestra en la cual desaparece el patrón punteado co-localizando totalmente Macroh2a2 con el DNA (Figura 4 D, E y F).

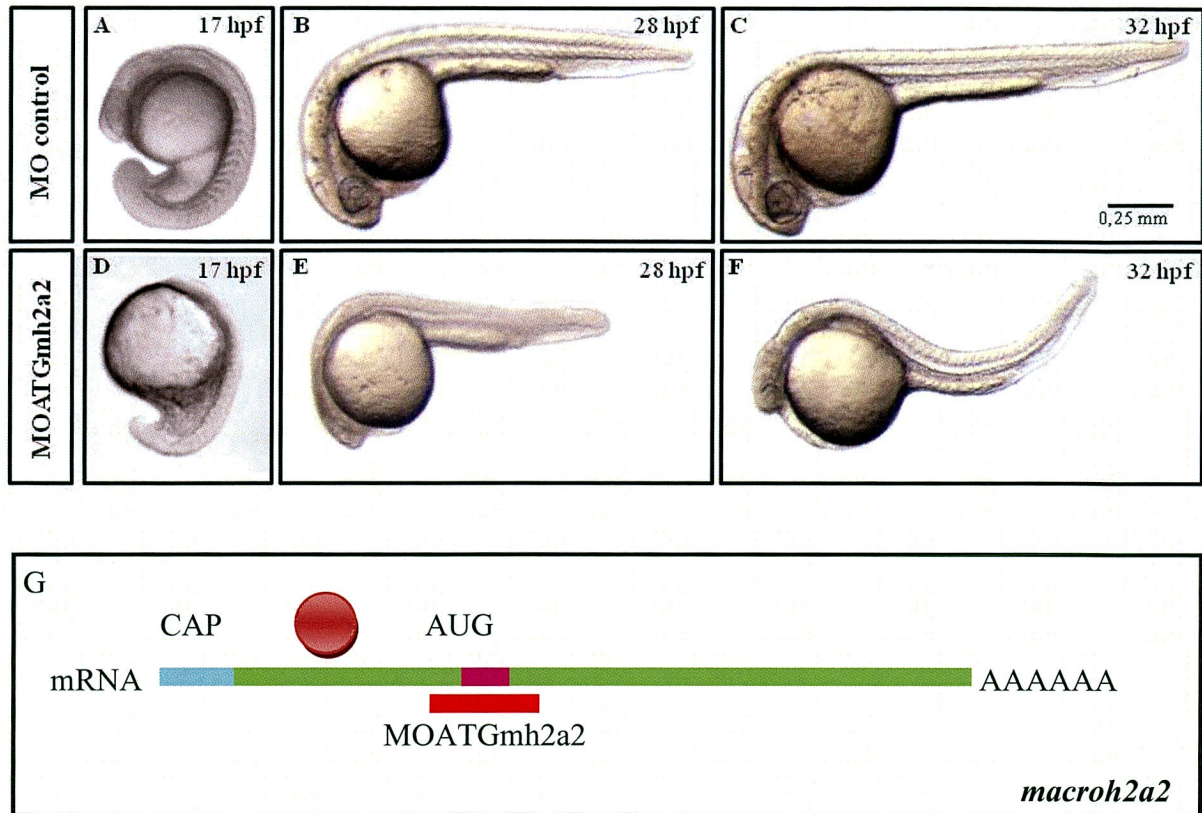


**Figura 4. Distribución celular de Macroh2a2, co-localización nuclear.** Usando inmunofluorescencia se detectó Macroh2a2 empleando un anticuerpo secundario acoplado a Alexa647 en embriones de 22 hpf. A: vista dorsal, núcleos visualizados con tinción DAPI (pseudocolor verde) Barra = 50  $\mu\text{m}$ . B: inmunodetección de Macroh2a2 revelado usando segundo anticuerpo acoplado a Alexa647, (pseudocolor rojo). C: sobreposición de B y C. La figura muestra la localización celular de Macroh2a2 en el núcleo de células de tejido anterior del embrión. Los insertos muestran capas de la retina a mayor aumento (A', B' y C') Barra = 25  $\mu\text{m}$ . A mayor aumento se observa la co-localización nuclear de DAPI y el anticuerpo anti MacroH2A2 humana (ABCAM) (D, E y F) Barra = 10  $\mu\text{m}$ . Vista dorsal anterior, anterior hacia arriba.



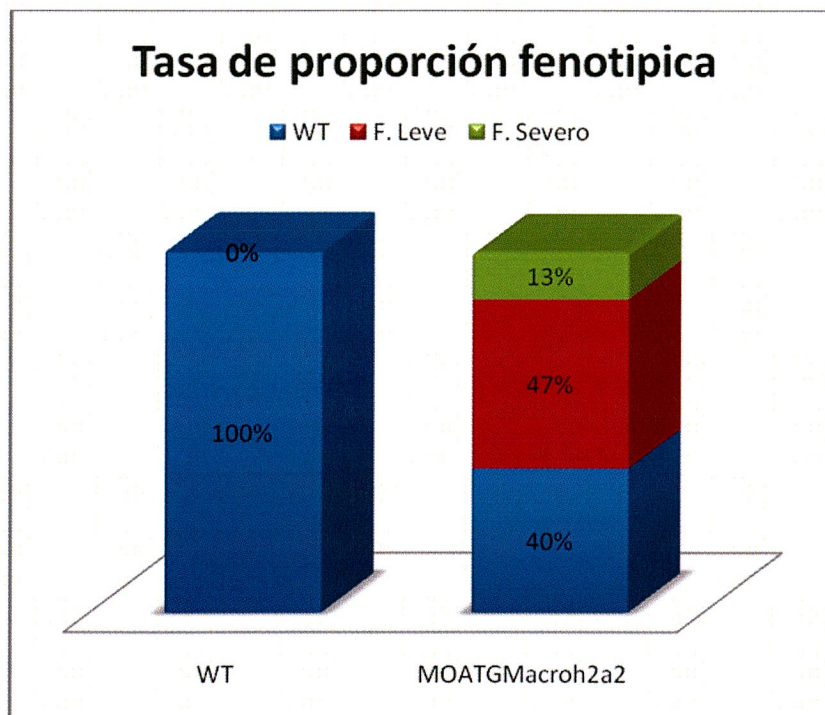
### 3. Caracterización del fenotipo de falta de función de *Macroh2a2*

Para realizar la caracterización del fenotipo de falta de función de *Macroh2a2* se microinyectaron embriones con un oligonucleótido antisentido morfolino que hibrida en la región del AUG del mRNA de *macroh2a2* (MOATGmh2a2) (Fig. 5G). El análisis del efecto en embriones de 17 hpf, 28 hpf y 32 hpf mostró dos fenotipos reproducibles: el primero denominado fenotipo severo, se caracterizó por acefalia o microcefalia y microftalmia, también se observó un acortamiento de la región posterior del embrión y deficiencia en formación de los somitos (Fig. 5C) al compararlo con el control inyectado con morfolino control (MOcontrol) (Fig. 5A) o con un embrión silvestre. Los embriones con fenotipo severo mueren antes de las 17 hpf. El segundo fenotipo observado, fenotipo leve, presenta microcefalia y microftalmia leves, alcanzando estadios del desarrollo embrionario más tardíos hasta 32 hpf, último estadio analizado. Estos embriones presentan a las 28 hpf un acortamiento en el eje dorso-ventral como antero-posterior junto con defecto en la formación de la cola; estos embriones también presentaron aparición tardía de la pigmentación en la totalidad del embrión (Fig. 5B y 5E). Más tarde en el desarrollo embrionario a 32 hpf se mantuvo la microcefalia y microftalmia (Fig. 5C y 5F).



**Figura 5. Efecto de la falta de función de Macroh2a2 sobre la morfología de embriones del pez cebra.** Embriones en estadio de 0 hpf fueron inyectados con 4,1 ng de MOcontrol y 4,1 ng de MOATGmh2a2. Los embriones inyectados con morfolino control presentan fenotipo silvestre (A, B y C) Barra = 0,25 mm. Los embriones morfantes presentan dos fenotipos característicos: Fenotipo Severo 17 hpf (D) y Fenotipo Leve 28 y 32 hpf (E y F). En ambos fenotipos se pueden observar defectos en la formación de la región anterior del embrión exhibiendo microcefalia y microftalmia en diferentes intensidades en correlación con el acortamiento de eje dorso-ventral. En la región posterior se observó acortamiento de la cola, déficit en la formación de los somitos, paralelo a la disminución del eje antero-posterior. Esquema del posicionamiento del morfolino específico diseñado contra el AUG del mRNA *macroh2a2* y que bloquea la traducción de la proteína.

Los embriones morfantes (fenotipos producido por la inyección del morfolino) fueron clasificados y cuantificados de tres experimentos separados. De una inyección de 4,1 ng/embrión del morfolino MOATGmh2a2 (n= 122) el 60% de los embriones presentaron fenotipo morfante. De éstos el 13% de los embriones presentaron fenotipo severo (n=24), el 47% de los embriones presentaron el fenotipo leve (n=51) y el 40% de los embriones presentaron fenotipo silvestre (WT) (n=47).

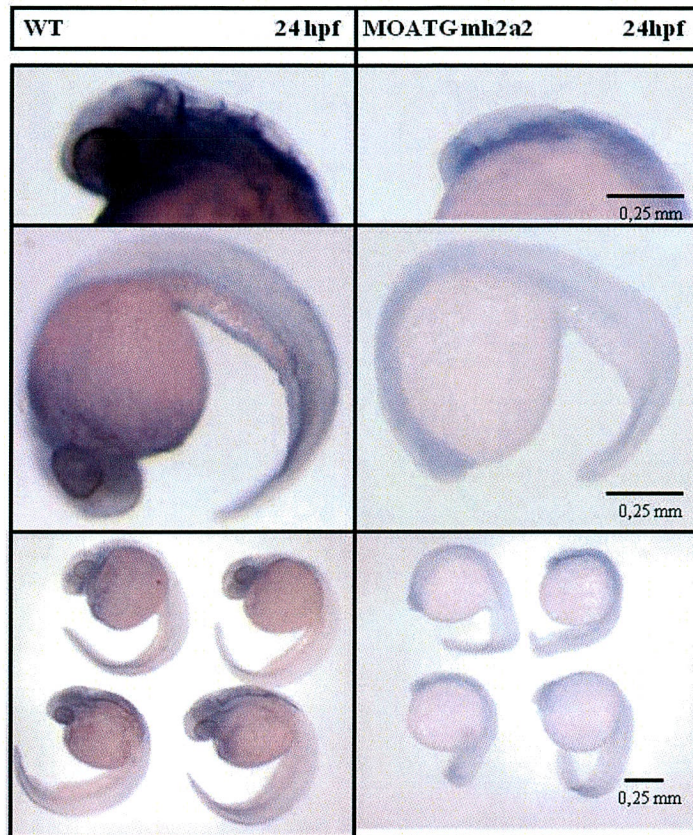


**Gráfico 1. Porcentaje de fenotipos observados ante la falta de función de Macroh2a2.**

El gráfico muestra el porcentaje de embriones con fenotipo morfante. Embriones microinyectados con 4,1 ng de MOATGmh2a2 (n= 122). En rojo se muestran los embriones morfantes que presentan fenotipo leve (47%) y en verde se muestran embriones morfantes con fenotipo severo (13%).

#### **4. La inyección de MOATGmacroh2a2 induce la disminución de la proteína Macroh2a2.**

Para confirmar que el morfolino MOATGmacroh2a2 induce la reducción de la expresión de la proteína Macroh2a2 se realizó una inmunohistoquímica contra la proteína en embriones inyectados con 4.1ng del morfolino/embrión. El análisis de los embriones morfantes a las 24 hpf muestra una disminución de la inmunodetección de Macroh2a2 en los embriones inyectados con el morfolino específico (Fig. 6 columna izquierda), comparado con la expresión revelada en embriones silvestres sin inyectar (Fig. 6 columna derecha). Para comparar ambos tratamientos las tinciones se realizaron en paralelo y se revelaron el mismo tiempo. Adicionalmente, se observa que la inyección de 4,1 ng/embrión del morfolino Macroh2a2 induce un fenotipo leve en embriones morfantes.



**Figura 6. Inmunodetección de Macroh2a2 en embriones morfantes.** Embriones inyectados con 4.1 ng. MOATGmh2a2 en estadio de 24 hpf fueron sometidos a inmunohistoquímica de embrión completo utilizando un anticuerpo contra Macroh2a2. Columna derecha embriones silvestres. Columna izquierda, embriones con fenotipo leve. Se observa disminución de la marca de inmunodetección de Macroh2a2 en embriones morfantes lo que demuestra la disminución de la expresión de la proteína. Barra = 0,25 mm.

## 5. Experimento de rescate en embriones morfantos para Macroh2a2.

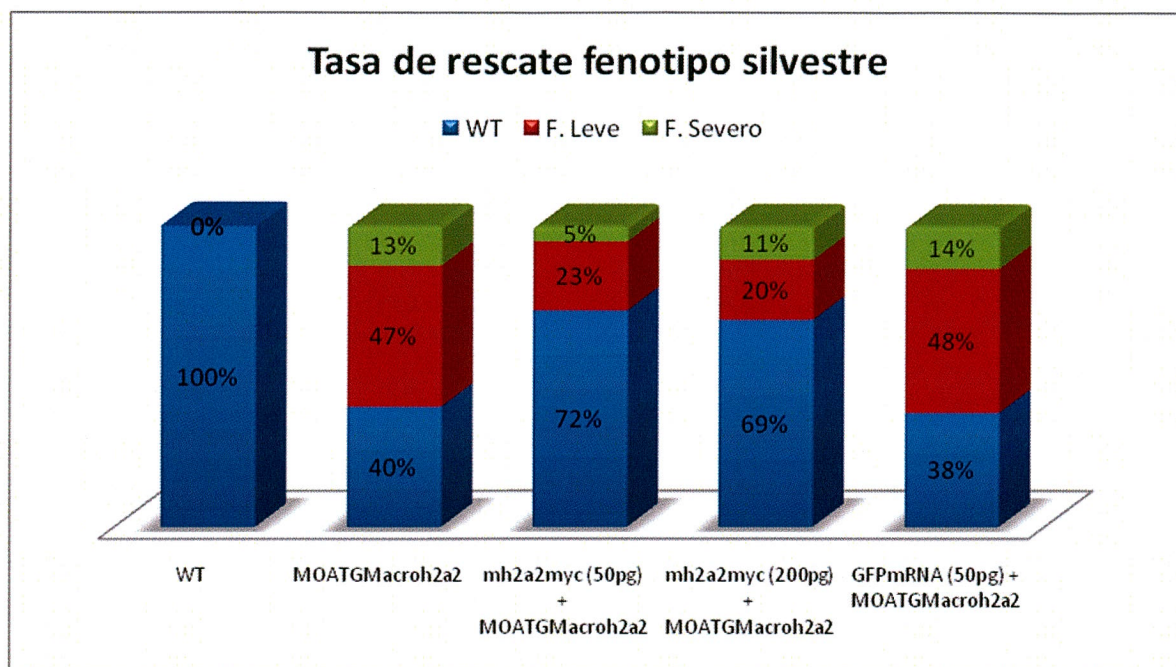
Para la síntesis del RNA mensajero de Macroh2a2 (Fig. 7) se transcribió *in vitro* desde la construcción M2myc en el vector pCS2+mt.

1 -	ATG	TCA	GCC	AGA	GGA	GGA	AAG	AAA	AAG	ATC	ACC	AAG	CTG	TCC	CGT	TCC	GCC	CGG	GCG	GGA	-	60
1 -	M	S	A	R	G	G	K	K	K	I	T	K	L	S	R	S	A	R	A	G	-	20
61 -	GTC	ATT	TTT	CCT	GTG	GGG	GGA	ATG	ATG	CGT	TAC	TTG	CGC	ACA	GGA	ACC	CAT	AAG	TAT	CGT	-	120
21 -	V	I	F	P	V	G	G	M	M	R	Y	L	R	T	G	T	H	K	Y	R	-	40
121 -	ATT	GGC	ATG	GGC	GCC	GTC	TAC	ATG	GCA	GCT	GTC	ATT	GAG	TAC	TTA	GCA	GCT	GAG	ATT	-	180	
41 -	I	G	M	G	A	P	V	Y	M	A	A	V	I	E	Y	L	A	A	E	I	-	60
181 -	TTG	GAG	TTG	GCT	GGA	AAT	GCA	GCA	AGA	GAC	AAC	AAA	AAA	GGG	AGA	ATT	ACT	CCA	CGA	CAC	-	240
61 -	L	E	L	A	G	N	A	A	R	D	N	K	K	G	R	I	T	P	R	H	-	80
241 -	ATC	AAG	CTG	GCA	GTG	GCC	AAT	GAT	GAA	GAA	CTC	AAC	CAG	CTT	CTC	AGA	GGA	GTG	ACC	ATA	-	300
81 -	I	K	L	A	V	A	N	D	E	E	L	N	Q	L	L	R	G	V	T	I	-	100
301 -	TCG	AAT	GGT	GGA	GTT	CTG	CCT	CGC	ATT	CAC	CCT	GAG	CTG	CTC	TCC	AAG	AAG	AGA	GGA	GGC	-	360
101 -	S	N	G	G	V	L	P	R	I	H	P	E	L	L	S	K	K	R	G	G	-	120
361 -	AAG	GTG	AAG	GTG	GAG	TCT	CAG	GTC	GCC	GTT	CCG	GAG	AAG	AGC	GCC	AAA	CGG	AAA	CCC	GTC	-	420
121 -	K	V	K	V	E	S	Q	V	A	V	P	E	K	S	A	K	R	K	P	V	-	140
421 -	AAG	AAA	CCC	TAC	AAA	AAG	AGC	AAA	GGA	AAA	CCA	GGC	CGC	AAA	CCC	AAA	AAA	AGC	ACA	GAG	-	480
141 -	K	K	P	Y	K	K	S	K	G	K	P	G	R	K	P	K	K	S	T	E	-	160
481 -	AAC	GAC	AAA	GAA	GCA	GAT	GCC	AAC	GCG	ATG	GAA	GAC	GGA	CCA	GGA	GAG	GGA	TTT	ACT	ATC	-	540
161 -	N	D	K	E	A	D	A	N	A	M	E	D	G	P	G	E	G	F	T	I	-	180
541 -	CTC	TCA	GCG	AAA	AGC	TTG	TTC	CTT	GGA	CAG	AAG	CTG	TCC	CTC	ACA	GAG	AGT	GAA	ATC	AGC	-	600
181 -	L	S	A	K	S	L	F	L	G	Q	K	L	S	L	T	E	S	E	I	S	-	200
601 -	AAA	ATC	GGG	ACG	ATC	AAA	GTG	GAG	GGA	ATC	ATC	AAT	CCC	ACA	AAC	GCA	GAG	ATT	GAT	CTG	-	660
201 -	K	I	G	T	I	K	V	E	G	I	I	N	P	T	N	A	E	I	D	L	-	220
661 -	AAA	GAG	GGA	ATC	GGA	AAC	GCT	CTG	GAG	AAA	ACA	GGA	GGA	AAA	GAT	TTC	CTA	GAG	ACT	GTC	-	720
221 -	K	E	G	I	G	N	A	L	E	K	T	G	G	K	D	F	L	E	T	V	-	240
721 -	AAG	GAG	CTG	AGG	AAA	AGC	CAG	GGC	CCT	TTG	GAG	GTC	GCA	TCA	GTG	GCT	GTG	AGT	CAG	GCC	-	780
241 -	K	E	L	R	K	S	Q	G	P	L	E	V	A	S	V	A	V	S	Q	A	-	260
781 -	AAT	GGG	ATG	GCA	GCG	CGT	TTC	ATC	ATC	CAT	TGT	CAC	GTC	CCA	CAG	TGG	GGC	TCC	GAT	AAG	-	840
261 -	N	G	M	A	A	R	F	I	I	H	C	H	V	P	Q	W	G	S	D	K	-	280
841 -	TGC	GAG	GAT	CAG	CTC	GAG	AAA	ACA	GTC	AAG	AAC	TGC	CTG	TCT	GCG	GCC	GAG	GAG	AAG	AAG	-	900
281 -	C	E	D	Q	L	E	K	T	V	K	N	C	L	S	A	A	E	E	K	K	-	300
901 -	CTC	AAA	TCA	GTG	GCT	TTC	CCT	TCA	CTA	CCC	GCT	GGA	CGA	AAC	GGT	TTT	CCA	AAG	CAG	ACG	-	960
301 -	L	K	S	V	A	F	P	S	L	P	A	G	R	N	G	F	P	K	Q	T	-	320
961 -	GCA	GCC	CAG	CTC	ATA	CTG	AAG	GCC	ATT	TCA	AAC	CAT	TTT	GTG	TCA	GCA	ACC	ACC	TCG	TCC	-	1020
321 -	A	A	Q	L	I	L	K	A	I	S	N	H	F	V	S	A	T	T	S	S	-	340
1021 -	CTG	AAG	AAC	ATT	TAC	TTT	GTT	CTG	TTT	GAC	AGC	GAG	AGC	ATT	GGG	ATT	TAC	CTG	CAG	GAG	-	1080
341 -	L	K	N	I	Y	F	V	L	F	D	S	E	S	I	G	I	Y	L	Q	E	-	360
1081 -	ATG	GCC	AAG	ATG	GAC	GCC	AAG	GGA	TCC	CAT	CGA	TTT	AAA	GCT	ATG	GAG	CAA	AAG	CTC	ATT	-	1140
361 -	M	A	K	M	D	A	K	G	S	H	R	F	K	A	M	E	Q	K	L	I	-	380
1141 -	TCT	GAA	GAG	GAC	TTG	AAT	GAA	ATG	GAG	CAA	AAG	CTC	ATT	TCT	GAA	GAG	GAC	TTG	AAT	GAA	-	1200
381 -	S	E	E	D	L	N	E	M	E	Q	K	L	I	S	E	E	D	L	N	E	-	400
1201 -	ATG	GAG	CAA	AAG	CTC	ATT	TCT	GAA	GAG	GAC	TTG	AAT	GAA	ATG	GAG	CAA	AAG	CTC	ATT	TCT	-	1260
401 -	M	E	Q	K	L	I	S	E	E	D	L	N	E	M	E	Q	K	L	I	S	-	420
1261 -	GAA	GAG	GAC	TTG	AAT	GAA	ATG	GAG	CAA	AAG	CTC	ATT	TCT	GAA	GAG	GAC	TTG	AAT	GAA	ATG	-	1320
421 -	E	E	D	L	N	E	M	E	Q	K	L	I	S	E	E	D	L	N	E	M	-	440
1321 -	GAG	AGC	TTG	GGC	GAC	CTC	ACC	ATG	GAG	CAA	AAG	CTC	ATT	TCT	GAA	GAG	GAC	TGA	ATC	AGC	-	1380
441 -	E	S	L	G	D	L	T	M	E	Q	K	L	I	S	E	E	D	*	I	S	-	460

**Figura 7. Secuencia parcial del constructo que contiene el mRNA de *mh2a2myc*.** En rojo se muestra el dominio histónico de *macroh2a2* altamente conservado (65% de homología a la histona canónica). En negro se muestra dominio no histónico (NHD); en verde se muestra el epítoto *myc* fusionado a la variante de histona en el extremo C-terminal. Además se indica el sitio de inicio de la traducción destacado en color amarillo y el codón de término destacado en color celeste.

Para comprobar si el fenotipo observado por la inhibición de la traducción de *Macroh2a2* era específico se realizó la co-inyección del mRNA de la proteína *mh2a2myc* en dos concentraciones (50 y 100 pg/embrión) con 4.1 ng/embrión MOATGmh2a2. Los embriones inyectados en estadio de 0 hpf fueron analizados a las 24 hpf. El Gráfico 2 muestra el porcentaje de embriones con fenotipo morfante de tres experimentos separados.

Como resultados se observa que al co-inyectar el MOATGmh2a2 con el mRNA de *Macroh2a2* aumenta el número de embriones con fenotipo silvestre (azul) y disminuye el número de embriones morfante (rojo y verde). Existe un alto rescate fenotípico muy similar entre las distintas concentraciones de mRNA microinyectado. Además se incluye un experimento de co-inyección de MOATGmh2a2 con mRNA no específico (GFP) en el cual no se observó rescate fenotípico. Embriones inyectados con MOATGMacroh2a2 (n=122), embriones inyectados con mRNA *mh2a2myc* (50 pg/embrión) + MOATGMacroh2a2 (n=133), embriones inyectados con mRNA *mh2a2myc* (200 pg/embrión) + MOATGMacroh2a2 (n=101), embriones inyectados con mRNA GFP (50 pg/embrión) + MOATGMacroh2a2 (n=124).

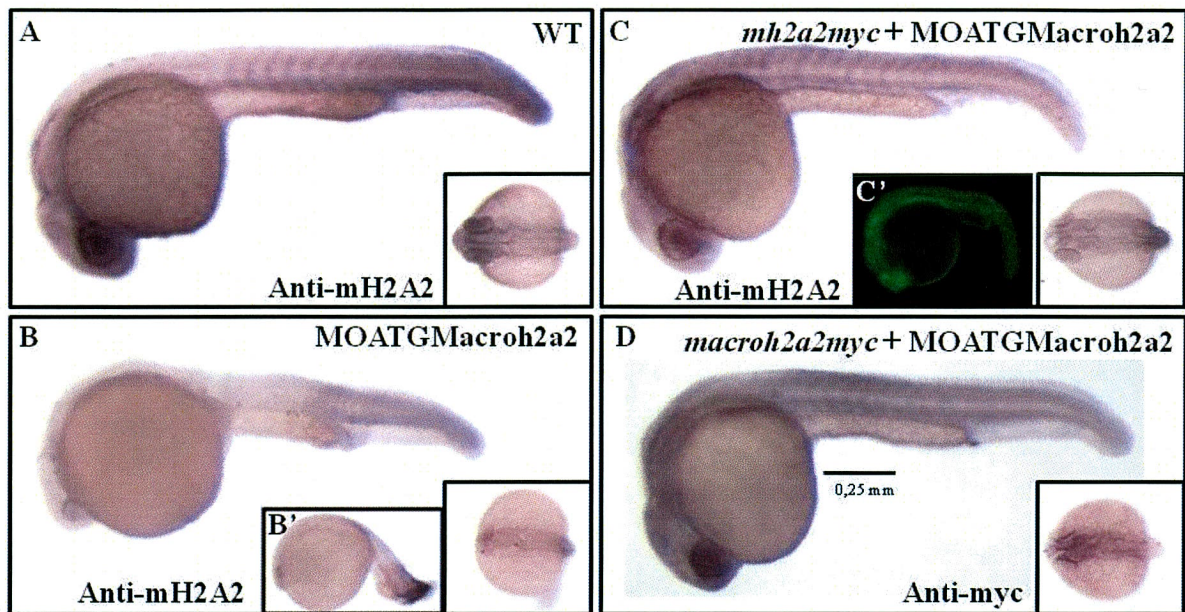


**Gráfico 2. Tasa de rescate fenotipo silvestre.** El gráfico muestra el porcentaje fenotípico obtenido en embriones de 24 hpf. La inyección se realizó con una cantidad de MOATGmh2a2 constante (4.1 ng/embrión) variando la cantidad de RNA mensajero. Se observó un alto porcentaje de rescate fenotípico (72%) y muy similar entre las distintas concentraciones de mRNA. Embriones inyectados con: MOATGMacroh2a2 (n=122), *mh2a2myc* (50pg) + MOATGMacroh2a2 (n=133), *mh2a2myc* (200pg) + MOATGMacroh2a2 (n=101). En azul, porcentaje de embriones que presentan fenotipo silvestre (WT); en rojo porcentaje de embriones que presentan fenotipo leve (F. leve) y en verde porcentaje de embriones que presentan fenotipo severo (F. severo).

Para comprobar que el rescate de fenotipo se debe a la traducción de la proteína, se analizó mediante inmunodetección en embriones de 24 hpf la expresión de Macroh2a2 utilizando un anticuerpo contra Macroh2a2, observando que en los embriones morfantes inyectados con el morfolino solo, hay inhibición de la inmunodetección de la proteína Macroh2a2 junto con el fenotipo morfante leve de microcefalia y microftalmia (Fig. 8B) y el fenotipo severo acéfalo (Fig. 8B'), comparado con el correspondiente estadio silvestre (Fig. 8A). Por el contrario, al co-inyectar el morfolino MOATGMacroh2a2 con el mRNA



de *mh2a2myc*, se observó la recuperación de la inmunodetección para la variante de histona, así como la recuperación del fenotipo silvestre (Fig. 8C). Como control interno se co-inyectó mRNA no relacionado (GFP); se observó embriones con fenotipo morfante que presentan fluorescencia (Fig. 8C'). Para verificar que el mRNA de *mh2a2myc* es traducido en el embrión, se utilizó un anticuerpo contra epítipo *myc*, observándose expresión ubicua.



**Figura 8. Rescate de la falta de función de Macroh2a2.** Embriones inyectados con 4,1ng/embrión de MOATGMacroh2a2 muestran disminución en la tinción por inmunohistoquímica de embrión con fenotipo leve (B) y fenotipo severo (B'), en comparación con embrión silvestre (A). La co-inyección de 4,1 ng/embrión de MOATMacroh2a2 con 50 pg/embrión de mRNA *mh2a2myc* muestra la recuperación del fenotipo y la detección de la proteína, la co-inyección con 50 pg/embrión mRNA no relacionado (GFP) no recupera el fenotipo morfante (C'). Para comprobar que el mRNA inyectado es traducido se realizó la inmunodetección del epítipo *myc* (D) Barra = 0,25 mm. Todos los embriones orientados en vista lateral, anterior izquierda. Insertos vista dorsal anterior izquierda.

## DISCUSIÓN

Macroh2a es una variante de histona altamente especializada que está presente únicamente en vertebrados y ha sido descrita como represora de la transcripción (Doyen y cols., 2006), manteniendo la estabilidad de dominios específicos de cromatina reprimida mediante mecanismos aún no resueltos. El extremo C-terminal de la histona canónica H2A se posiciona estratégicamente en el sitio de entrada y salida de la hebra de DNA del nucleosoma, por lo que una de las hipótesis propuesta para explicar la función de Macroh2a tiene relación con que el extremo C-terminal o dominio Macro característico de ésta variante, el que es dos veces el tamaño de la histona canónica. Esto hace suponer un notable impedimento estérico en el nucleosoma, imposibilitando la interacción de la hebra de DNA con factores de transcripción (Abbott y cols., 2004 y Kornberg y Lorch, 1999).

La familia Macroh2a se compone de dos isotipos, Macroh2a1 y Macroh2a2, que comparten características génicas siendo muy similares en su estructura. Adicionalmente, la isoforma Macroh2a1 presenta dos isoformas producto de *splicing* alternativo, Macroh2a1.1 y Macroh2a1.2 (Chadwick y Willard, 2001; Chadwick y cols., 2001).

Ambos isotipos han sido asociados con la formación y mantención de heterocromatina facultativa en el cromosoma X inactivo (Xi), focos de heterocromatina asociado a senescencia y regiones CpG metiladas del DNA incluyendo varios *locis* que se encuentran tanto en genes autosómicos como en Xi. El conjunto de estas evidencias confirmarían la participación de esta variante en un mecanismo de represión de la transcripción (Mietton y cols., 2009; Sporn y cols., 2009; Choo y cols., 2006). Aunque se sabe que comparten roles en estos eventos, también se ha demostrado que existe una expresión diferencial tejido específica de un isotipo por sobre otro en tejidos diferenciados

adultos y regiones de heterocromatina específicos, característica que permite sugerir funciones especializadas para cada isotipo (Costanzi y cols., 2001).

Estudios realizados en etapas embrionarias en ratón y pez cebra, han demostrado la presencia mayoritaria del isotipo Macroh2a2 en desmedro de Macroh2a1. Esta última aparece expresada durante estadios posteriores del desarrollo (Buschbeck y cols., 2009). Consistente con esto, recientemente se ha demostrado el enriquecimiento de Macroh2a2 en numerosos promotores de genes involucrados en vías de desarrollo embrionario, morfogénesis y organogénesis (Buschbeck y cols., 2009).

Teniendo en consideración los antecedentes aportados, hemos postulado que la variante de histona Macroh2a2 podría cumplir una función reguladora durante el desarrollo embrionario.

El análisis por inmunohistoquímica de la expresión espacial y temporal de Macroh2a2 mostró una expresión ubicua previa al inicio de la transcripción de genes cigóticos (2,75 hpf), hecho que confirma el aporte materno de la proteína (Kane y Kimmel, 1993). Mediante este patrón de expresión, se muestra que la expresión de la proteína comienza a restringirse a las 10,5 hpf hacia la región anterior y posterior del embrión, conservando este patrón hasta las 24 hpf donde se puede ver asociada claramente a estructuras anteriores como la retina, telencéfalo, diencéfalo, mesencéfalo. Esta expresión ubicua y posterior restricción de la expresión de Macroh2a2 a las regiones anterior y posterior del embrión, sugiere que Macroh2a2 podría cumplir una función inicial en etapas tempranas del desarrollo embrionario, para posteriormente participar en la formación específica de estructuras localizadas en las regiones anterior y posterior del embrión. En este contexto, recientemente se ha publicado que la falta de función de Macroh2a2 altera la

expresión de marcadores de sistema nervioso central, demostrando que la función de Macroh2a2 es necesaria para la formación de estos territorios (Buschbeck y cols., 2009). Estudios de nuestro laboratorio muestran que la falta de función de Macroh2a2 también afecta la formación del la cabeza, y la expresión de marcadores neurales como krox20 un marcador temprano de la segmentación del cerebro posterior, pax2.1 factor de transcripción que contiene el dominio *paired-box*, que participa en la formación de territorios segmentados del sistema nervioso, y six3 gen esencial para la formación de ojo y cerebro anterior (datos no mostrados).

Los genes de las histonas canónicas están codificados en *clusters*, carecen de intrones y de una señal de poli-adenilación, por lo que el mRNA maduro presenta una vida media corta y su transcripción está únicamente restringida a la fase S del ciclo celular. En contraste, las histonas variantes están codificadas en genes únicos y presentan características que permiten a sus mRNA maduros una mayor estabilidad en el tiempo. Además, ellas presentan un nivel de transcripción independiente de la fase S del ciclo celular (Doenecke y cols., 1997). Antecedentes previos han demostrado la existencia de mecanismos de transporte, desde el citoplasma hacia el núcleo, específicos e independientes para los complejos de histonas H2A/H2B y H3/H4 (Greiner y cols., 2004). En este contexto estudiamos si Macroh2a2 se localiza efectivamente en el núcleo, donde cumpliría su función reguladora de la transcripción. Usando inmunohistoquímica en embrión completo y microscopía confocal, determinamos que Macroh2a2 se localiza en el núcleo como lo demuestra la co-localización de la marca con DAPI, confirmando la interacción de la histona variante con el DNA.

El siguiente paso en la caracterización del efecto de Macroh2a2 en el desarrollo embrionario fue la evaluación fenotípica del *knockdown* mediante la microinyección de un oligonucleótido antisentido (morfolino) específico para bloquear el inicio de la traducción del RNA mensajero. En primera instancia, se corroboró la especificidad de unión del MOATGmh2a2 a la secuencia blanco mediante controles que demostraron el bloqueo total de la traducción de mRNA de Macroh2a2, los cuales permitieron establecer la acción específica del morfolino (dato no mostrado).

Los estudios de falta de función de Macroh2a2 en embriones inyectados a 0 hpf, muestran defectos en la formación de estructuras anteriores durante el desarrollo embrionario exhibiendo microcefalia y microftalmia. Asimismo, se observaron alteraciones en estructuras posteriores del embrión como acortamiento de la cola y defectos en la formación de los somitos. Estos resultados concuerdan con lo observado para el patrón de expresión de la proteína Macroh2a2, sugiriendo que ésta variante de histona participe en la formación de estas estructuras. No obstante, los mecanismos que regulan estos procesos son aún desconocidos. La falta de función de Macroh2a2 induce dos fenotipos característicos denominados fenotipo severo y fenotipo leve. Los embriones con fenotipo severo presentaron ausencia de cabeza (acefalia) presentando letalidad a las 17 hpf. En cambio los embriones con fenotipo leve sobreviven más de 32 hpf, y muestran defectos en la formación de estructuras anteriores y posteriores del embrión.

Interesantemente, los fenotipos observados en cada réplica en distintos experimentos presentaron dos fenotipos de intensidades diferentes (leve y severo), aún cuando la concentración del morfolino y el volumen inyectado era la misma. Usando un morfolino control fluorescente pudimos determinar que la distribución del morfolino en el

embrión no era siempre homogénea. De este modo, la concentración efectiva del morfolino en el embrión inyectado varía levemente (dato no mostrado). Por lo tanto, podemos presumir que la concentración de morfolino usada en este estudio se encuentra en un rango de concentración intermedia entre el fenotipo leve y severo.

Evidencias *in vitro* han demostrado que el posicionamiento de Macroh2a en la región promotora de un gen impide el inicio de la transcripción ejecutada por RNA polimerasa II (Doyen y cols., 2006). Estos antecedentes, junto con nuestras observaciones, nos permiten sugerir que el isotipo Macroh2a2 participaría en la mantención del estado cromatínico reprimido necesario para la expresión de genes que participan en la correcta formación de estructuras anteriores y posteriores del embrión del pez cebra.

Para determinar si los defectos observados en el desarrollo de embriones morfantes de Macroh2a2 se correlacionan con la inhibición de la traducción de la proteína, se realizó el experimento de rescate fenotípico (Eisen y Smith, 2008). La coinyección del mRNA de *macroh2a2myc* con el MOATGmh2a2 rescató el fenotipo morfante en el 70% de los embriones inyectados, indicando que el efecto observado en el desarrollo embrionario se debe efectivamente a la falta de función de Macroh2a2. La correcta traducción del RNA mensajero *in vivo* se corroboró usando inmunodetección contra el epítipo *myc*. Este rescate fenotípico no se observó al co-inyectar un mRNA control (GFP).

Como se mencionó anteriormente, se desconoce el mecanismo por el que Macroh2a ejerce su función represora, sin embargo, los antecedentes conocidos hasta ahora nos permiten especular respecto al mecanismo biológico de la histona variante Macroh2a2 durante el desarrollo embrionario.

Previamente, se han sugerido sitios putativos de asociación y/o interacción entre los distintos isotipos de MacroH2a con componentes de la maquinaria celular (Pehrson y cols 1998). En la actualidad se ha mostrado la interacción física de ambas isoformas de MacroH2A1 con proteínas que presentan poli ADP-ribosilaciones, así como también con la enzima Poli (ADP-ribosa) polimerasa-1 (PARP-1) (Timinszky y cols., 2009). Paralelo a estos trabajos, se ha demostrado que la actividad enzimática de PARP-1 es requerida en sitios de activación de la transcripción mediante la ADP-ribosilación de proteínas relacionadas con regiones específicas de la cromatina (Tulin y Spradling, 2003). Ouararhni y cols. (2006) presentaron evidencia experimental sugiriendo que la interacción entre el dominio no histónico (NHD) de MacroH2A1.1 y PARP-1 sería crucial en el silenciamiento de regiones promotoras de genes autosómicos, mediante la regulación negativa de la actividad enzimática de PARP-1 ejercida por MacroH2A1.1. Los autores concluyen que PARP-1 y MacroH2A1.1 actúan concertadamente para regular el estado transcripcional de la región promotora de *Hsp70.1* en células de mamíferos.

Al mismo tiempo, Nusinow y cols. en el año 2007 demostraron que el subtipo MacroH2A1.2 era capaz de inhibir la actividad enzimática de PARP-1 mediante mecanismo alostérico, modulando así la actividad catalítica. A su vez, estos autores demostraron la necesidad de PARP-1 y MacroH2A1 para establecer del silenciamiento del Xi. La unión del NHD de MacroH2A1.2 a PARP-1 produciría por consiguiente el secuestro y retención de PARP-1 en la cromatina. Se presentan entonces indicios claros de que la inactivación de PARP-1 sería un de los mecanismo por el que MacroH2A1 participaría en la mantención del silenciamiento transcripcional y en la modulación estructural de la cromatina.

Es sabido que entre los NHD de los isotipos Macroh2a1.2 y Macroh2a2 existe un 64% de identidad (Costanzi y Pehrson, 2001). Esto nos lleva a plantear la posibilidad que el macroh2a2 esté cumpliendo su rol en el desarrollo embrionario mediante el secuestro de PARP-1. Como indican nuestros resultados, la falta de función de la variante de histona Macroh2a2 produciría una des-represión génica, condictiendo a los defectos morfológicos descritos.

Se ha demostrado actualmente que macroH2A es capaz de dificultar el reclutamiento de complejos remodeladores de la transcripción como SWI/SNF, familia de complejos remodeladores capaces de activar la transcripción. Además demuestran que macroh2a no interfiere con la actividad de complejos remodeladores como ACF que participan en el silenciamiento de genes (Sudarsanam y Wilson, 2000; Fyodorov y cols., 2004; Chang y cols., 2008). Esto nos lleva a la conclusión de que el macroh2a estaría manteniendo el equilibrio transcripcional mediante la interacción mayoritaria con complejos represores y a su vez imposibilitando el reclutamiento de complejos activadores.

Durante la realización de esta tesis se publicó un trabajo que demuestra la afinidad de unión de ambos isotipos de macroH2A a regiones distales río arriba y río abajo del sitio de inicio de la transcripción, de una amplia variedad de genes y que en muchos casos ambas eran sobrelapadas. En este mismo trabajo estudios *in vitro* muestran que genes asociados al desarrollo embrionario serían regulados por la unión de macroH2A en forma reversible, particularmente de aquellos que codifican para proteínas que presentan homeodominios y otras proteínas que presentan sitios de unión al DNA. Junto con esto, se demostró que el enriquecimiento de macroh2a en los genes blanco era inversamente proporcional a la tasa transcripcional de estos (Buschbeck y cols., 2009).



Los genes descritos en este estudio corresponden a dos grandes familias de señalización: los genes *Hox* y la vía Wnt, relacionadas particularmente con vías implicadas en el desarrollo embrionario, morfogénesis y organogénesis. Los genes *Hox* definen el patrón antero-posterior en embriones vertebrados. El desarrollo del eje antero-posterior conlleva a la expresión de clústeres de genes homeóticos (por ejemplo 4 clusters en ratón: *Hox a, b, c y d*), determinantes para la especificación de la identidad posicional (la identidad de los distintos segmentos u órganos) a lo largo del eje. Se ha demostrado también la participación directa de genes *Hox* en la formación del cerebro posterior, arcos faríngeos y en desarrollo de extremidades. La expresión de los genes *Hox* es regulada de una forma compleja e interdependiente. Uno de los mecanismos de regulación conocidos para la expresión de genes *Hox* es la gradiente de ácido retinoico (AR), metabolito activo de la vitamina A, que es capaz de regular su expresión en el tiempo. Se ha demostrado que el bloqueo de la síntesis de AR impide la correcta formación del eje antero-posterior del embrión y además que la desregulación en la expresión de los genes *Hox* está asociada a algunos tipos de cáncer (Kimmel y cols., 2001; Favier y Dollé, 1997; Nunes y cols., 2003).

Buschbeck y cols. (2009) demostraron “*in vitro*” que la activación de genes HOX mediante gradientes de AR reducía la asociación de macroH2A en las regiones promotoras y que a su vez este proceso podía ser reversible disminuyendo las concentraciones de AR. Puede concluirse entonces que macroH2A actúa como regulador de la transcripción y permite la incorporación de modificaciones dinámicas en la cromatina.

Los resultados presentados en esta tesis se contrastan con los publicados, ya que en nuestro trabajo observamos un fenotipo de microcefalia y microftalmia no descrito previamente. Asimismo, el estudio de la expresión de los genes *krox20, pax2.1 y six3* muestra que están

disminuidos en los embriones morfantes (dato no mostrado), lo que tendría como consecuencia el fenotipo antes descrito.

*Six3* es un gen homeótico que se expresa en la placa neural anterior y primordio del ojo y es esencial para la formación del cerebro anterior y de los ojos. Se ha demostrado que la sobreexpresión de este gen produce un alargamiento de la región rostral del cerebro anterior y aumento en la expresión de *pax2* en el tallo óptico conduciendo a una desorganización general en el cerebro (Kobayashi y cols., 1998). Por otra parte, la sobreexpresión de la forma represora de *Six3* muestra un fenotipo opuesto al antes descrito (Kobayashi y cols., 2001). Recientemente estudios de falta de función de *six3a* y *six3b* induce defectos específicos en el cerebro anterior incluyendo adelgazamiento del telencéfalo, reducción severa del tamaño del ojo y separación incompleta del tallo óptico (Ando y cols., 2005).

En este contexto podemos suponer que la función de *Macroh2a2* tendría relación directa con el silenciamiento de factores represores de la transcripción de *six3*.

Los estudios realizados en esta tesis demuestran que *Macroh2a2* sería un factor importante en la regulación de la expresión dinámica de genes durante el desarrollo embrionario. Lo que nos lleva a suponer que el posicionamiento de *Macroh2a2* en regiones específicas de la cromatina define una regulación epigenética primordial en el correcto desarrollo del embrión.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo abren nuevas posibilidades de estudio para profundizar en la investigación de los genes específicos que pueden ser regulados por este mecanismo epigenético de reemplazo de histonas, así como las vías de regulación y los factores moleculares implicados en su función.

## CONCLUSIONES

La expresión de la variante de histona Macroh2a2 presenta una contribución materna.

La inmunodetección reveló la expresión de Macroh2a2 en la región anterior (cabeza) y la cola del embrión desde la 10,5 hpf, además la tinción con DAPI mostró localización nuclear en estos tejidos.

La falta de función de Macroh2a2 genera un fenotipo que afecta la formación de estructuras anteriores y posteriores del embrión.

El fenotipo morfante se rescata específicamente con el mRNA *mh2a2myc*.

## BIBLIOGRAFÍA

- Abbott D. W., Laszczak M., Lewis J. D., Su H., Moore S., Hills M., Dimitrov S., and Ausió J.** 2004. Structural Characterization of MacroH2A Containing Chromatin. *Biochemistry* 43, 1352-1359.
- Akey Ch. and Luger K.** 2003. Histone chaperones and nucleosome assembly. *Curr Opin Struct Biol.* 13, 6-14.
- Alberts B.** 2001. *Biología molecular de la célula*, Garland Science, Segunda edición.
- Ando H., Kobayashi M., Tsubokawa T., Uyemura K., Furuta T. and Okamoto H.** 2005. Lhx2 mediates the activity of Six3 in zebrafish forebrain growth. *Developmental Biology* 287, 456 – 468
- Angelov D., Molla A., Perche P., Hans F., Coté J., Khochbin S., Bouvet P. and Dimitrov S.** 2003. The histone variant MacroH2A interferes with transcription factors binding and SWI/SNF nucleosome remodeling. *Molecular Cell* 11, 1033–1041.
- Ausió J. and Abbott D. W.** 2002. The many tales of a tail Carboxyl-terminal tail Heterogeneity specializes Histone H2A variants for defined chromatin function. *Biochemistry* 41, 5945-5949.
- Ausió J.** 2006. Histone variants-the structure behind the function. *Brief Funct Genomics Proteomic* 5, 228-243.
- Beato M. and Einfeld K.** 1997. Transcription factor access to chromatin. *Nucleic Acids Research* 25, 3559–3563.
- Bernstein E. and Hake S. B.** 2006. The nucleosome: a little variation goes a long way. *Biochemistry. Cell Biol.* 84, 505–517.
- Boulard M., Bouvet P., Kundu T. K. and Dimitrov S.** 2007. Histone variant nucleosome, structure function and implication in disease. *Subcell Biochem* 41, 71–89.
- Buschbeck M., Uribealago I., Wibowo I., Rué P., Martin D., Gutierrez A., Morey L., Guigó R., López-Schier H. and Di Croce L.** 2009. The histone variant macroH2A is an epigenetic regulator of key developmental genes. *Nat Struct Mol Bio.* 16, 1074-1079.
- Chadwick B. P. and Huntington W. F.** 2001. A novel Chromatin protein, Distantly related to histone H2A is largely excluded from the inactive X chromosome. *J Cell Bio* 152, 375–384.

- Chadwick B. P., Valley C. M. and Willard H. F.** 2001. Histone variant macroH2A contains two distinct macrochromatin domain capable of directing macroH2A to the inactive X chromosome. *Nucleic Acids Res* 29, 2699-2705.
- Chang E. Y., Ferreira H., Somers J., Nusinow D., Owen-Hughes T., and Narlikar G. J.** 2008. MacroH2A allows ATP-Dependent chromatin remodeling by SWI/SNF and ACF complexes but specifically reduces recruitment of SWI/SNF. *Biochemistry* 47, 3726–13732.
- Choo J.H., Do Kim J. and Kim J.** 2007. MacroH2A1 knockdown effects on the Peg3 imprinted domain. *BMC Genomics* 479, 1-8.
- Choo J. H., Do Kim J., Chung J. H., Stubbs L. and Kim J.** 2006. Allele-specific deposition of macroH2A1 in imprinting control regions. *Hum Mol Genet* 15, 717-724.
- Cosgrove M. S., Boeke J. D. and Wolberger C.** 2004. Regulated nucleosome mobility and the histone code. *Nat Struct Molecular bio* 11, 1037-1043.
- Costa F.** 2008. Non-coding RNAs, epigenetics and complexity. *Gene* 410, 9–17.
- Costanzi C. and Pehrson J. R.** 1998. Histone macroH2A1 is concentrated in the inactive X chromosome of female mammals. *Nature* 393, 599- 601.
- Costanzi C. and Pehrson J.R.** 2001. MacroH2A2, a new member of the MACROH2A Core histone family. *J Biol Chem* 276, 21776–21784.
- Costanzi C., Stein P., Worrada D., Schultz R.M. and Pehrson J.R.** 2000. Histone macroH2A1 is concentrated in the inactive X Chromosome of female preimplantation mouse embryos. *Development* 127, 2283-2289.
- Doenecke D., Albig W., Bode C., Bradent B., Franke K., Gavenis K. and Witt O.** 1997. Histones: genetic diversity and tissue-specific gene expression. *Histochem Cell Biol* 107, 1–10.
- Doyen C., Montel F., Gautier T., Menoni H., Claudet C., Delacour-Larose M., Angelov D., Hamiche A., Bednar J., Faivre-Moskalenko C., Bouvet P. and Dimitrov S.** 2006. Dissection of the unusual structural and functional properties of the variant H2ABbd nucleosome. *EMBO J* 25, 4234–4244.
- Ehrenhofer-Murray A. E.** 2004. Chromatin dynamics at DNA replication, transcription and repair. *Eur. J. Biochem.* 271, 2335–2349.

- Eisen J. S. and Smith J. C.** 2008. Controlling morpholino experiments don't stop making antisense. *Development* 135, 1735-1743.
- Favier B. and Dolle P.** 1997. Developmental functions of mammalian Hox genes. *Molecular Human Reproduction* 3, 115–131.
- Fei L. and Shi Y.** 2009. Epigenetic regulation: methylation of histone and non-histone proteins. *Sci China C Life Sci* 54, 311-322.
- Fyodorov D. V., Blower M. D., Karpen G. H., and Kadonaga J. T.** 2004. Acf1 confers unique activities to ACF/CHRAC and promotes the formation rather than disruption of chromatin in vivo. *Genes Dev.* 18, 170-183.
- Gilbert S. L., Pehrson J. R. and Sharp P. A.** 2000. XIST RNA associates with specific regions of the inactive X chromatin. *J Biol Chem* 275, 36491–36494.
- Gilbert S.F.** 2005. Biología del desarrollo. Editorial Médica Panamericana, 7a Edición.
- Greiner M., Caesar S., Schlenstedt G.** 2004. The histones H2A-H2B and H3-H4 are imported into the yeast nucleus by different mechanisms. *Eur. J. Cell Biol.* 83, 511-520
- Holley S. A.** 2007. The genetics and embryology of zebrafish metamerism. *Dev Dynamics* 236, 1422–1449.
- Kamakaka R. T. and Biggins S.** 2005. Histone variants: Desviants? *Genes and Development* 19, 295–310.
- Kane D. A. and Kimmel C. B.** 1993. The zebrafish midblastula transition. *Development* 119, 447-456
- Kelly Ch., Chin A. J., Leatherman J. L., Kozlowski D. J. and Weinberg E. S.** 2000. Maternally controlled  $\beta$ -catenin-mediated signaling is required for organizer formation in the zebrafish. *Development* 127, 3899-3911.
- Kimmel C.B., Miller C.T., and Moens C. B.** 2001. Specification and Morphogenesis of the Zebrafish Larval Head Skeleton. *Developmental Bio* 233, 239–257.
- Kobayashi M., Nishikawa K., Suzuki T., and Yamamoto M.** 2001. The Homeobox Protein Six3 Interacts with the Groucho Corepressor and Acts as a Transcriptional Repressor in Eye and Forebrain Formation. *Developmental Bio* 232, 315–326.
- Kobayashi M., Toyama R., Takeda H., Dawid I. B. and Kawakami K.** 1998. Overexpression of the forebrain-specific homeobox gene six3 induces rostral forebrain enlargement in zebrafish. *Development* 125, 2973-2982.

- Kornberg R. D. and Lorch Y.** 1999. Twenty- Five years of the nucleosome, Fundamental particle of the Eukaryote chromosome. *Cell* 98, 285–294.
- Li J., Santoro R., Koberna K. and Grummt I.** 2005. The chromatin remodeling complex NoRC controls replication timing of rRNA genes. *EMBO J* 24, 120–127.
- Lieschke G. J. and Currie P.** 2007. Animal models of human disease: zebrafish swim into view. *Nature* 8, 353-357.
- Luger K., Mader A.W., Richmond R.K., Sargent D. F. and Richmond T. J.**1997. Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8Å resolution. *Nature* 389, 251-260.
- Mariño-Ramirez L., Kann M.G., Shoemaker B. A., and Landsman D.** 2005. Histone structure and nucleosome stability. *Expert Rev Proteomics* 2, 719–729.
- Marzluff W. F, Wagner E. J. and Duronio R. J.** 2008. Metabolism and regulation of canonical histone mRNAs: life without a poly(A) tail. *Nature* 9, 843-854.
- Mietton F., Sengupta A. K., Molla A., Picchi G., Barral S., Heliot L., Grange T., Wutz A. and Dimitrov S.** 2009. Weak but uniform enrichment of the histone variant macroH2A1 along the inactive X chromosome. *Mol Cell Bio* 29, 150–156.
- Nasevicius A. and Ekker S. C.** (2000). Effective targeted gene 'knockdown' in zebrafish. *Nat Genet.* 26, 216-220.
- Nojima H., Takashi Sh., Cheol-Hee K., Taijiro Y., Young-Ki B., Osamu M., Tsutomu H., Ajay Ch., Toshio H. and Masahiko H.** 2004. Genetic evidence for involvement of maternally derived Wnt canonical signaling in dorsal determination in zebrafish. *Mech Dev* 121, 371–386.
- Nunes F. D., Campos Souza de Almeida F., Tucci R., Cantanhede Orsini S. and de Sousa M.** 2003. Homeobox genes: a molecular link between development and cancer. *Pesqui Odontol Bras* 17, 94-98.
- Nusinow D.A., Hernandez-Muñoz I., Fazio T.G., Shah G. M., Kraus W. L. and Panning B.** 2007. Poly(ADP-ribose) Polymerase 1 Is Inhibited by a Histone H2A variant, macroH2A, and contributes to silencing of the inactive X chromosome. *J Bio Chem* 282, 12851–12859.
- Ouararhni K., Hadj-Slimane R., Ait-Si-Ali S., Robin P., Mietton F., Harel-Bellan A., Dimitrov St. and Hamiche A.** 2006. The histone variant mH2A1.1 interferes with trascription by down-regulating PARP-1 enzymatic activity. *Genes Dev* 20, 3324-3336.

- Pehrson J. R., Costanzi C., and Dharia C.** 1997. Developmental and tissue Expression patterns of histone MacroH2A1 subtypes. *J Cell Biochem* 65, 107–113.
- Pehrson J. R. and Fried V. A.** 1992. MacroH2A, a core histone containing a large nonhitone region. *Science* 257, 1398-1400.
- Pehrson J. R. and Fuji R. N.** 1998. Evolutionary conservation of histone macroH2A subtypes and domains. *Nucleic Acids Res.* 26, 2837–2842.
- Pennisi E.** 2001. Behind the Scenes of Gene Expression. *Science* 293, 1064-1067.
- Polo S. E. and Almouzni G.** 2006. Chromatin assembly: a basic recipe with various flavours. *Curr Opin Genet Dev* 16, 104–111.
- Racki L. R and Narlikar G. J.** 2008. ATP-dependent chromatin remodeling enzymes: two heads are not better, just different. *Curr Opin Genet Dev* 18, 137–144.
- Raghuram N., Carrera G., Th'ng J. and Hendzel M. J.** 2009. Molecular dynamics of histone H1. *Biochem Cell Biol* 87, 189-206.
- Ramakrishnan V.** 1997. Histone structure and the organization of the nucleosome. *Annu. Rev Biophys Biomol Struct* 26, 83–112.
- Rasmussen T. P., Mastrangelo M., Eden A., Pehrson J. R. and Jaenisch R.** 2000. Dynamic relocation of histone macroH2A1 from centrosomes to inactive X chromosomes during X inactivation. *J Cell Bio* 150, 1189- 1198.
- Schier A.F. and Talbot W S.** 2005. Molecular genetics of axis formation in zebrafish. *Annu Rev Genet* 39, 561–613.
- Smith M.** 1991. Histone stucture and function. *Cell Bio* 3, 429-437.
- Sporn J.C., Kustatscher G., Hothorn T., Collado M., Serrano M., Muley T., Schnabel P. and Ladurner A.G.** 2009. Histone macroH2A isoforms predict the risk of lung cancer recurrence. *Oncogene*, 1–6.
- Srivastava N., Gochhait S., de Boer P. and Bamezai R.** 2008. Role of H2AX in DNA damage response and human cancers. *Mutat Res* 7916, 9.
- Strahl B. D. and Allis C. D.** 2000. The language of covalent histone modifications. *Nature* 403, 41-45.
- Sudarsanam P. and Winston F.** 2000. The Swi/Snf family nucleosome-remodeling complexes and transcriptional control. *Peroxisome biogenesis disorders* 16, 345-351.



**Thatcher T. H. and Gorovsky M. A.** 1993. Phylogenetic analysis of the core histones H2A, H2B, H3 and H4. *Nucleic Acids Res* 22, 174-179.

**Timinszky G., Till S., Hassa P. O., Hothorn M., Kustatscher G., Nijmeijer B., Colombelli J., Altmeyer M., Stelzer E. H., Scheffzek K., Hottiger M. O. and Ladurner A. G.** 2009. A macrodomain-containing histone rearranges chromatin upon sensing PARP1 activation. *Nature* 16, 923-931.

**Tulin A. and Spradling A.** 2003. Chromatin Loosening by Poly(ADP)-ribose polymerase (PARP) at *Drosophila* Puff Loci. *Science* 299, 560-562.

**Vaissière T., Sawan C. and Herceg Z.** 2008. Epigenetic interplay between histone modification and DNA methylation in gene silencing. *Mutat Res* 659, 40–48.

**Westerfield M.** 2007. The zebrafish book. Printed by the University of Oregon Press. 5<sup>th</sup> Edition.

**Wu N., Hua-Mei Y., Bo C. and Jian-Fang G.** 2009. Histone H2A has a novel variant in fish oocytes. *Biol Reproduction* 81, 275–283.

**Zhang R., Poustovoitov M. V., Ye X., Santos H. A., Chen W., Daganzo S. M., Erzberger J. P., Serebriiskii I. G., Canutescu A., Dunbrack R.L., Pehrson J. R., Berger J. M., Kaufman P. D., and Adams P.D.** 2005. Formation of macroH2A-containing senescence-associated heterochromatin foci and senescence driven by ASF1a and HIRA. *Developmental Cell* 8, 19–30.