



Flores Herrera O, Riveros Rosas H, Sosa Peinado A, Vázquez Contreras E (eds). **Mensaje Bioquímico, Vol XXVII**. Depto Bioquímica, Fac Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. Cd Universitaria, México, DF, MÉXICO. (2003).

(<http://bq.unam.mx/mensajebioquimico>)

(ISSN-0188-137X)

EXPERIMENTACIÓN EN EL PEZ-CEBRA, UN MODELO DE BIOLOGÍA DEL DESARROLLO

Ernesto Maldonado

Departamento de Genética Molecular, Instituto de Fisiología Celular,
Universidad Nacional Autónoma de México. Circuito Exterior,
Ciudad Universitaria, Coyoacán, Apartado Postal 70-243 México, DF. 04510 MEXICO
Tel. 56-22-56-39
emaldona@ifisiol.unam.mx

Introducción

Aunque les voy a hablar de peces, nuestra historia comienza con una mosca llamada *Drosophila melanogaster*, que es el nombre científico de la mosca de la fruta. En 1973 una joven llamada Christiane Nusslein-Volhard realizaba sus estudios de doctorado en el Instituto Max-Planck de la ciudad de Tübingen, Alemania, en un proyecto de biología molecular en el que purificaba y estudiaba las propiedades de una RNA polimerasa de origen viral. En un principio, este proyecto le pareció interesante, sin embargo, luego de un tiempo se volvió tedioso y aburrido. Buscando otros temas de investigación, se entusiasmó con las lecturas de los trabajos de Alfred Kühn sobre la biología del desarrollo y con ciertos reportes acerca de la regeneración de la hidra. En ese momento se percató del interesante problema de la formación de patrones corporales durante el desarrollo embrionario. Por la misma época, su atención fue captada por el trabajo de un profesor del mismo Instituto Max-Planck, llamado Friedrich Bonhoeffer, quién

realizaba la mutagénesis en *Escherichia coli* y había aislado diferentes mutantes, encontrando varios genes novedosos. Sin embargo, lo que realmente atrajo su atención, fue la sofisticada metodología con la que el grupo de Bonhoeffer generaba y aislaba una gran cantidad de mutantes. Nusslein-Volhard llegó a la conclusión de lo útil que sería aplicar las poderosas técnicas de la genética molecular a los problemas del desarrollo embrionario.

Nusslein-Volhard concluyó su doctorado y en 1975 se mudó a la ciudad de Basel en Suiza para iniciar un postdoctorado en el laboratorio de Walter J. Gehring, en donde de manera entusiasta inició su trabajo con las moscas de la fruta o "*Drosophila*". El enfoque principal del laboratorio de Gehring era el de clonar genes interesantes para la biología del desarrollo. Con la ayuda del estudiante de doctorado Eric Wieschaus, pronto aprendió todas las técnicas necesarias para estudiar a los embriones de líneas mutantes de *Drosophila*.

Pasado un tiempo, Nusslein-Volhard comenzó a sentirse frustrada ya que los métodos para colectar e inspeccionar a los embriones le parecían tediosos e insatisfactorios. Así pues, y siguiendo su espíritu innovador, se asoció con otros postdoctorados (Jeanette Holden, David Ish Horowicz y Jitse van der Meer) y desarrolló algunas técnicas que le facilitaron el trabajo, tales como un sistema para la colecta simultánea (en bloques) de huevos de varias líneas de moscas, o un protocolo para la fijación y aclaramiento de la cutícula de los embriones que le permitieron observar la estructura, segmentos y polaridad en los embriones.

Para el año de 1978 recibió una oferta de trabajo por tres años, para compartir un laboratorio con Eric Wieschaus en el "European Molecular Biology Laboratory" (EMBL) que recientemente se había fundado. Nusslein-Volhard convenció a Wieschaus de que en ese momento eran las únicas personas en el mundo capaces de llevar a cabo una mutagénesis en gran-escala buscando mutantes de la fase embrionaria de *Drosophila*. Con la participación de dos técnicos se lanzaron a una empresa titánica, pero convencidos de que sería sumamente provechosa. Inventaron metodologías novedosas para incrementar la eficiencia en su trabajo, lo que les permitió aislar en 3 meses 4200 mutantes en genes localizados en el cromosoma 2 de la mosca, el cual contiene el 40% de su DNA.

Este fue el inicio de un trabajo por el que Christiane Nusslein-Volhard y Eric Wieschaus compartieron el premio Nobel en el año de 1995. Para el momento en que Nusslein-Volhard recibió el premio Nobel muchas cosas habían pasado. En 1986 un artículo firmado por George Streisinger de la Universidad de Oregon [1] atrajo su atención; en este manuscrito Streisinger sugería que el Pez-cebra (un pez de ornato que usualmente se consigue en tiendas de mascotas) podía ser utilizado como un modelo para el análisis genético del desarrollo embrionario en vertebrados.

Desde ese momento Nusslein-Volhard decidió repetir su mutagénesis en gran escala pero ahora en el Pez-cebra, obviamente en ese momento no existían precedentes ni siquiera para planear la logística con la que llevar a cabo este enorme proyecto que requeriría de cientos de miles de peces.

Finalmente en 1992, en su nuevo laboratorio del Instituto Max-Planck de la ciudad de Tübingen en Alemania, se inauguró un vivero con 7000 acuarios destinados a la enorme búsqueda de mutantes del Pez-cebra. Varias personas fueron claves para este proyecto, entre las que se encontraban los estudiantes Stefan Schulte-Merker y Matthias Hammerschmidt,

quienes junto con la Dra. Nancy Hopkins (profesor en visita sabática del MIT) comenzaron desde 1988 a establecer la infraestructura para el proyecto. La participación de Wolfgang Driever (un exalumno de Nusslein-Volhard) y de su estudiante Liliana Solnika-Krezel fue también crucial, ya que 25% del experimento se llevó a cabo en su laboratorio de la ciudad de Boston en los Estados Unidos.

Los resultados de este proyecto se dieron a conocer en diciembre de 1996 cuando la revista *Development* publicó un número especial (conocido como el “*Zebrafish issue*”) con 37 artículos, en el que se describen 1200 mutantes del Pez-cebra. Cada mutante con uno o más aspectos del desarrollo embrionario afectados.

¿Por qué estudiar la biología del desarrollo en un pez?

El Pez-cebra es un organismo modelo ideal para estudiar la genética y el desarrollo en organismos vertebrados [2-4]. Debido a que embriogénesis ocurre externamente además de que los embriones son transparentes, lo que permite observar en el microscopio todos los estadios de su desarrollo, y seguir con detalle las primeras divisiones celulares y la formación de las capas embrionarias (ectodermo, mesodermo y endodermo) (figura 1). El desarrollo de este organismo es rápido y a las 24 horas ya se aprecia la segmentación del cerebro y se han formado estructuras como el tubo neural, la notocorda y los somitos (precursores de músculo y esqueleto). Para los cinco días de desarrollo se han formado órganos sensoriales como los ojos y los oídos. Asimismo, han aparecido el corazón, el hígado, los riñones y el páncreas, además de que los sistemas circulatorio, digestivo y nervioso son perfectamente funcionales (figura 1). En este momento el pez es perfectamente capaz de responder a estímulos visuales, olfativos y mecánicos y comienza a nadar buscando alimento [5].

Los análisis genéticos y la disponibilidad de material biológico se facilitan por la cantidad de embriones (entre 100 y 200 individuos) que una sola pareja de peces puede producir cada semana. El Pez-cebra es diploide y con ciclos generacionales cortos (de 2 a 3 meses), los adultos tienen un tamaño de 3 centímetros, por lo que en un laboratorio acondicionado con 50 tanques (cada uno del tamaño de la caja para un ratón) se puede albergar una colonia de al menos 500 peces. Aunado a esto, el genoma completo del Pez-cebra se está secuenciando y ya existen mapas muy precisos de marcadores genéticos.

A la par de una descripción detallada de la anatomía del embrión y la larva del Pez-cebra, se han desarrollado metodologías robustas que permiten la experimentación en varios aspectos como son: la localización de proteínas “*in vivo*” por medio de fusiones de la proteína verde fluorescente (GFP), el apagado específico de genes empleando morfollinos (RNA antisentido) así como la ablación y el transplante de células [6, 7].

Una segunda mutagenesis en gran escala en el pez-cebra

Una manera de descifrar la función de un gen, consiste en inactivarlo dentro de un organismo modelo y observar el efecto que tiene sobre el desarrollo del individuo. Cuando se obtiene una mutante en el Pez-cebra y se determina con certeza qué gen está mutado, se genera una combinación ideal de conocimiento, ya que podemos predecir la función del gen (o la

proteína que codifica) y tenemos una herramienta para estudiar cómo participa este gen en el desarrollo. Un ejemplo de lo anterior es la mutante del Pez-cebra "*Weissherbst*", en la que se produce una anemia letal y cuyo gen mutado corresponde a la *Ferroportina-1*. La mutante *Weissherbst* se ha estudiado con detalle y ahora se sabe que la función de esa enzima es la de participar en el transporte de hierro durante el desarrollo del sistema hematopoyético [8].

Con el trabajo de mutagénesis a gran escala en el Pez-cebra que llevaron a cabo los grupos de Christiane Nusslein-Volhard y Wolfgang Driever hace 7 años, generaron 1200 mutantes que afectan el desarrollo, cuyos fenotipos son tan interesantes que de conocerse todos los genes que producen dichas mutaciones, nuestro conocimiento de la biología se incrementaría sustancialmente, incluyendo la causa de varias enfermedades hereditarias en humanos. Sin embargo, a la fecha solo se han logrado identificar 100 de los genes mutados. Esto se debe a que las mutaciones fueron inducidas con un mutágeno químico (Etil-nitroso-urea) y para identificar los genes responsables primero hay que determinar en qué cromosoma está la mutación y después ubicar su posición con exactitud (clonamiento posicional) para después aislarlo (clonarlo) y secuenciarlo. Así, la identificación de un solo gen representa una tarea enorme que puede emplear el trabajo de un solo investigador por un año o más. La otra manera de identificar los genes mutados, es por medio de la estrategia del "*gen candidato*", en la cual se compara el fenotipo de la mutante de Pez-cebra con mutantes similares en otros organismos como la *Drosophila* o el ratón en los cuales ya se conoce una gran colección de genes mutados.

Recientemente, entre los años de 1998 y 2002, el grupo de la Dra. Nancy Hopkins en el Instituto Tecnológico de Massachussets (MIT) de la ciudad de Boston, llevó a cabo una nueva mutagénesis en gran escala, pero empleando una novedosa metodología conocida como "*mutagénesis-insercional*", que básicamente permite generar a las mutantes en el Pez-cebra, pero al mismo tiempo identificar fácilmente a los genes responsables de la mutación (figura 2).

La diferencia principal entre la mutagénesis de Nusslein-Volhard y esta nueva *mutagénesis-insercional* consiste en lo siguiente: en lugar de utilizar un mutágeno químico se emplea a un retrovirus, el cual infecta a las células de los embriones e inserta de manera aleatoria fragmentos de DNA en el genoma del pez. La idea es de que algunas de estas inserciones van a colocarse interrumpiendo genes del desarrollo y entonces producirán las mutantes que se están buscando. En un ensayo piloto en el que se obtuvieron ocho mutantes [9-13], se demostró que por cada 100 inserciones se puede generar una mutante en el desarrollo del Pez-cebra.

Las inserciones retrovirales se integran en forma estable en el genoma del pez, de tal manera que varias generaciones después continúan presentes. Para identificar el gen que tiene una mutación, se corta el DNA en fragmentos y con la técnica llamada hibridización *southern blot* se localiza el fragmento que alberga la inserción y que provoca el fenotipo mutante. Como el DNA que flanquea por ambos lados a la inserción corresponde al gen mutado, es posible basarse en su secuencia para determinar de qué gen se trata. Lo anterior se logra a partir de comparaciones contra las bases de datos genómicas.

Con la *mutagénesis-insercional* a gran escala se logró introducir más de 50,000 inserciones retrovirales en el genoma del Pez-cebra y obtuvimos cerca de 500 mutantes de las cuales hemos identificado a la fecha un poco más de 300 genes [14, 15].

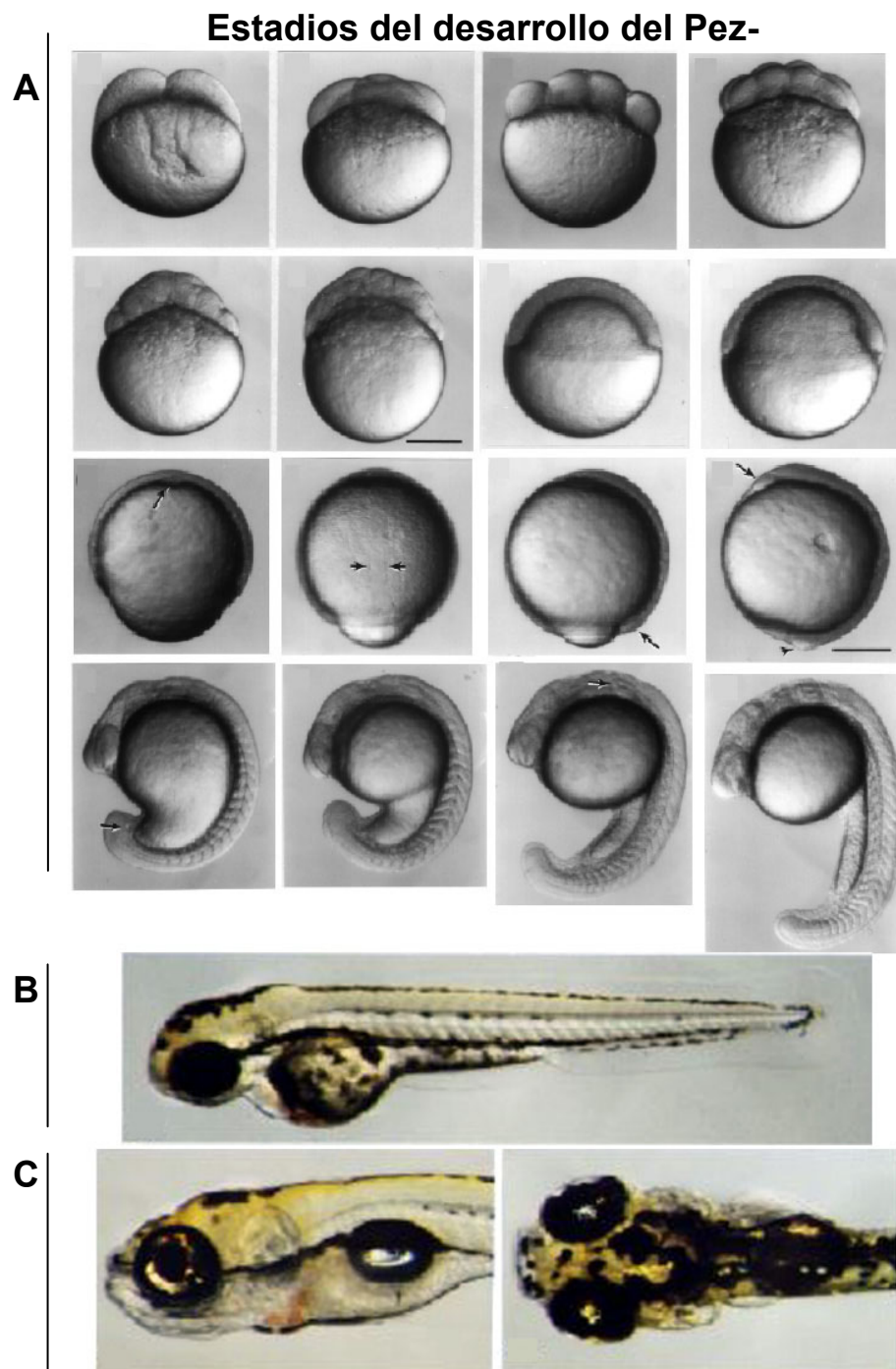


Figura 1. Estadios de desarrollo en el Pez-cebra (*Danio rerio*). (A) Se presentan las primeras 18 horas del desarrollo. La primera división celular ocurre 45 minutos después de la fertilización y las siguientes divisiones cada 15 minutos, aquí se muestran los eventos de blastulación, epíbole, gastrulación y somitogénesis. También se muestra a la larva del Pez-cebra a los 2 días (B) y 5 días de desarrollo (C).

Protocolo de la mutagénesis insercional

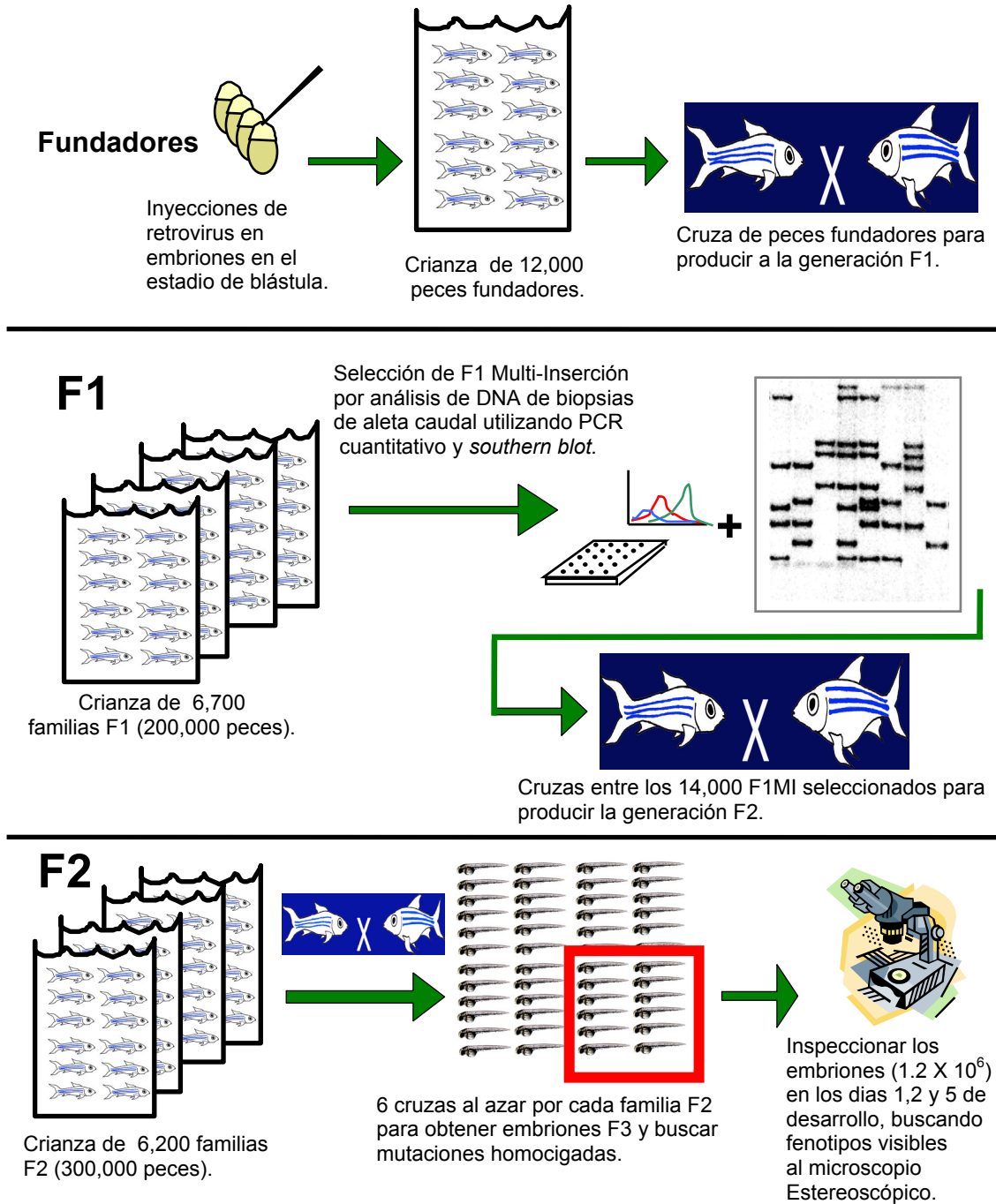


Figura 2. Diagrama de flujo de la mutagénesis insercional en gran escala. Los embriones en el estadio de blástula son inyectados con el retrovirus y después se crían hasta la madurez sexual. Estos peces fundadores se cruzan entre sí dando lugar a la generación F1. Entre los peces F1 se seleccionan aquellos con mayor número de inserciones, para ello se utiliza la técnica de PCR cuantitativo y *southern blot*. Estos peces con alta densidad de inserciones se denominaron F1MI (F1 Multi-Inserción). Se hacen cruza entre los F1MI y por cada cruza se cría a una familia F2. Se seleccionan parejas al azar por familia F2 y se llevan a cabo cruza para obtener embriones F3, que son inspeccionados en busca de las mutaciones que se han homocigado.

Este proyecto consistió en la inyección de un retrovirus pseudotipificado de alto título a 250,000 embriones en el estadio de blástula (figura 2). Después de 4 horas se seleccionaron los embriones con mayor número de eventos de inserción retroviral y estos fueron criados hasta la etapa adulta (12,000 peces fundadores).

En los organismos diploides cada cromosoma está por duplicado, lo que significa que cada gen está representado dos veces. Para poder observar el efecto de una mutación es necesario homocigarla, es decir que ambas copias del gen estén afectadas. Para homocigar las mutaciones y para aumentar el número de inserciones por cada pez, se produjeron 2 generaciones consecutivas de peces (F1 y F2, respectivamente) de la siguiente manera: los 12,000 peces fundadores fueron cruzados entre ellos para producir 200,000 peces de la generación F1 (primera generación), los cuales son mosaicos para las inserciones (cada célula con inserciones distintas) (figura 2). Posteriormente y para simplificar el trabajo y maximizar el espacio fue necesario identificar a los peces F1 con el mayor número de inserciones (llamados F1MI o F1 Multi-Inserción). Los F1MI se identificaron por medio del análisis del DNA tomado de biopsias de la cola de peces adultos de 8 semanas de edad. El número de inserciones se determinó por PCR cuantitativo y análisis tipo "southern". Con este método se seleccionaron 14,000 peces F1MI, cada uno de los cuales con un promedio de 10 inserciones retrovirales. Las generaciones F1 y F2 ya no son mosaicos para las inserciones ya que todas las células cargan con las mismas inserciones.

Por cada pareja sexual de peces F1 se produjo una familia F2 de alrededor de 48 individuos. La generación F2 consistió de 6,200 familias (300,000 peces adultos). Debido a que tanto el macho como la hembra F1 aportan sus genes con inserciones al 50% de su descendencia F2, al llevar a cabo cruces al azar entre miembros de la familia F2, aumenta la probabilidad (86% con 6 cruces) de que se crucen dos peces con exactamente la misma inserción retroviral. De ocurrir esto, el 25% de la descendencia homocigará la inserción y de ser mutagénica (1 de cada 100 inserciones) se obtendría una mutación en algún gen involucrado en el desarrollo del pez.

Se realizaron 40,000 cruces entre peces F2 y se inspeccionaron cuidadosamente los embriones F3 (aproximadamente 1.2×10^6 individuos), mientras tanto, se mantuvo a cada pareja progenitora separada del resto de la familia hasta completar el análisis. Los embriones se mantuvieron a 28°C y las observaciones se realizaron en microscopios estereoscópicos en los días 1, 2 y 5 del desarrollo. Lo que se buscaba era cualquier alteración del desarrollo que estuviese presente en 25% de los embriones.

Por cada 12.6 familias analizadas se encontró una mutante insercional, dando un total de 489 mutantes recesivos y letales en la embriogénesis, además de 4 mutantes dominantes (figura 3). Se encontraron mutantes afectadas en el desarrollo del cerebro, la notocorda, la cresta neural, la espina dorsal, los ojos, los oídos, y otros órganos sensoriales (como la línea lateral), la mandíbula, el tejido muscular, la pigmentación, los riñones, el páncreas, el hígado, el estómago, el intestino, el corazón, los vasos sanguíneos, además de mutantes en las que se encontró alterado el crecimiento, el comportamiento o la motilidad. También se obtuvieron mutantes con defectos tan severos y generales que los embriones no se desarrollaban o presentaban una necrosis general muy temprana (figura 3)

Algunas mutantes obtenidas en la mutagénesis insercional

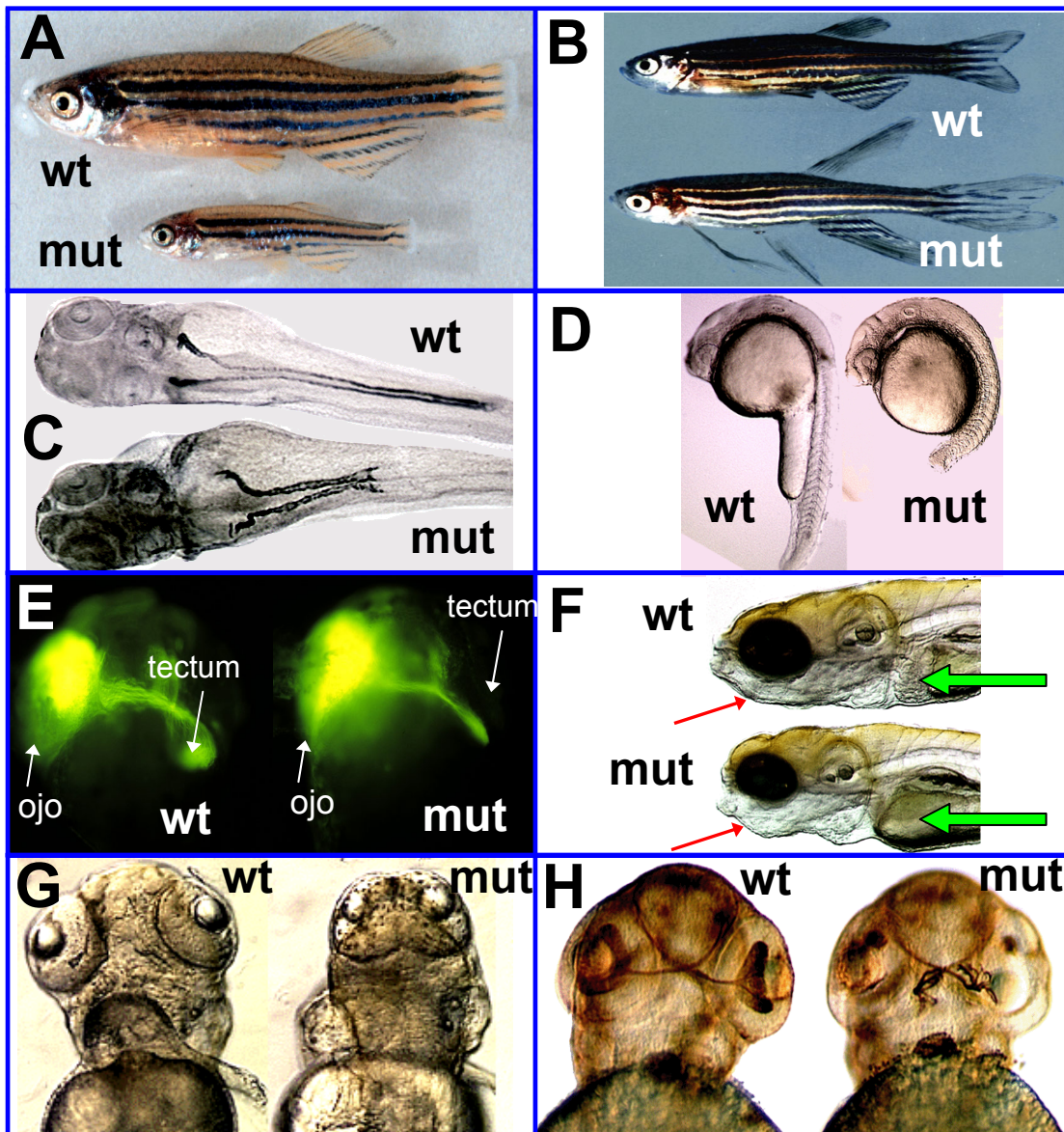


Figura 3. Se muestran algunos ejemplos de las mutantes obtenidas. (A) y (B) son mutantes dominantes para el gen *ef1A* (factor de elongación) y un canal rectificador de sodio-potasio, respectivamente. Los fenotipos observados corresponden a un menor crecimiento general (A) y un crecimiento exagerado de las aletas (B). En (C) se observan larvas de 3 días de edad en las que se aprecia una hibridación “*in situ*” que marca el pronefros (precursor del riñón en peces). El gen mutado corresponde a *HNF1β* y su mutación produce defectos en el desarrollo del pronefros. Esta preparación fue hecha por la Dra. Zhaoxia Sun. (D) Se observa el efecto de la mutación del factor transcripcional *caudal* en embriones de 24 horas de desarrollo. (E) La falta del gen *N-caderina* tiene efectos en la formación del cerebro del Pez-cebra, aquí se aprecia como los axones que van del ojo al tectum están alterados en la mutante, para apreciar esto se realizaron inyecciones del colorante DiO en el ojo izquierdo de larvas fijadas al quinto día de desarrollo. En (F) se observa una mutante con defectos en la formación de la mandíbula (flechas rojas) y en donde el hígado no se forma (flecha verde), el gen mutado es nuevo y no se ha estudiado con anterioridad. Una mutación en la subunidad Z del Complejo *Coatómero* produce una fusión de los ojos (G) y la inserción retroviral en el gen *neurogenina* produce que los axones que normalmente conectan el ojo y el tectum, ahora se conectan a músculos de la mandíbula (H) esto se aprecia con un marcaje de anticuerpo que revela a los axones en las larvas de 3 días de desarrollo. Esta preparación fue hecha por el Dr. Wenbiao Chen.

La metodología para identificar los genes mutados consiste en obtener DNA de los padres F2, de otros portadores F2 en la familia y de los embriones F3 que muestran el fenotipo. El DNA se corta con enzimas de restricción y se analiza con un ensayo tipo “*southern*”, utilizando como sonda a un fragmento complementario a cierto segmento del DNA de origen retroviral . El objetivo del experimento es identificar una banda del mismo peso molecular entre los padres y los embriones con el fenotipo (que suponemos que es la misma). Encontrar la misma banda en otros miembros de la familia F2 (portadores) nos permite, por medio de cruces, confirmar que esa banda representa a un fragmento de DNA que contiene a la inserción retroviral flanqueada por el gen interrumpido y mutado. Posteriormente se toman los fragmentos del DNA cortado por las enzimas de restricción y se ligan en cierto plásmido, se selecciona la construcción del tamaño predicho (la suma del peso molecular de nuestra banda de interés y el plásmido) y se amplifican las secuencias flanqueantes al inserto por PCR inverso. Los productos amplificados se secuencian y dicha información se compara contra bases de datos de los genomas de otros organismos (como la del NCBI) utilizando el programa BLAST, lo anterior con la intención de determinar la identidad del gen mutado por su similitud con homólogos de otras especies.

Entre los más de 300 genes que se clonaron, se encontraron varias enzimas del metabolismo anabólico y catabólico, también DNA polimerasas, RNA polimerasas, factores transcripcionales, proteínas que participan en la replicación del DNA, la traducción de la información genética, el tráfico vesicular o son componentes de la cromatina, diversas proteasas, chaperoninas, ATPasas, RNA helicasas, proteínas ribosomales, así como varios receptores y ligandos involucrados en transducción de señales, también canales iónicos, glicoproteínas y además toda una gama de proteínas cuya función es totalmente desconocida [15]

Conclusión

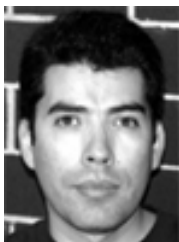
La *mutagénesis insercional* es una técnica novedosa que permite utilizar las poderosas herramientas de la genética molecular para encontrar y determinar la función de genes que participan durante el desarrollo de organismos vertebrados. El Pez-cebra es un modelo ideal para llevar a cabo proyectos ambiciosos con presupuestos moderados, además de poseer ventajas que lo hacen un gran modelo experimental.

Referencias

1. Streisinger, G., et al., *Segregation analyses and gene-centromere distances in zebrafish*. Genetics, 1986. **112**(2): p. 311-9.
2. Talbot, W.S. and N. Hopkins, *Zebrafish mutations and functional analysis of the vertebrate genome*. Genes Dev, 2000. **14**(7): p. 755-62.
3. Ingham, P.W., *Zebrafish genetics and its implications for understanding vertebrate development*. Hum Mol Genet, 1997. **6**(10): p. 1755-60.
4. Eisen, J.S., *Zebrafish make a big splash*. Cell, 1996. **87**(6): p. 969-77.
5. Kimmel, C.B., et al., *Stages of embryonic development of the zebrafish*. Dev Dyn, 1995. **203**(3): p. 253-310.
6. Nasevicius, A. and S.C. Ekker, *Effective targeted gene 'knockdown' in zebrafish*. Nat Genet, 2000. **26**(2): p. 216-20.
7. Amsterdam, A., et al., *Requirements for green fluorescent protein detection in transgenic zebrafish embryos*. Gene, 1996. **173**(1 Spec No): p. 99-103.

8. Donovan, A., et al., *Positional cloning of zebrafish ferroportin1 identifies a conserved vertebrate iron exporter*. Nature, 2000. **403**(6771): p. 776-81.
9. Amsterdam, A., et al., *Retrovirus-mediated insertional mutagenesis in zebrafish and identification of a molecular marker for embryonic germ cells [In Process Citation]*. Cold Spring Harb Symp Quant Biol, 1997. **62**: p. 437-50.
10. Culp, P., C. Nusslein-Volhard, and N. Hopkins, *High-frequency germ-line transmission of plasmid DNA sequences injected into fertilized zebrafish eggs*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**(18): p. 7953-7.
11. Gaiano, N., et al., *Insertional mutagenesis and rapid cloning of essential genes in zebrafish*. Nature, 1996. **383**(6603): p. 829-32.
12. Lin, S., et al., *Integration and germ-line transmission of a pseudotyped retroviral vector in zebrafish*. Science, 1994. **265**(5172): p. 666-9.
13. Allende, M.L., et al., *Insertional mutagenesis in zebrafish identifies two novel genes, pescadillo and dead eye, essential for embryonic development*. Genes Dev, 1996. **10**(24): p. 3141-55.
14. Amsterdam, A., et al., *A large-scale insertional mutagenesis screen in zebrafish*. Genes Dev, 1999. **13**(20): p. 2713-24.
15. Golling, G., et al., *Insertional mutagenesis in zebrafish rapidly identifies genes essential for early vertebrate development*. Nat Genet, 2002. **31**(2): p. 135-40.

Semblanza del Dr. Ernesto Maldonado.



El Dr. Ernesto Maldonado realizó sus estudios de licenciatura en la Facultad de Ciencias de la UNAM (1994) y de Doctorado en la Facultad de Química de la UNAM (1998). Realizó una estancia Postdoctoral en el laboratorio de la Dra, Nancy Hopkins en el "Center for Cancer Research" del Instituto Tecnológico de Massachussetts (1999-2000) como becario de la fundación norteamericana "PEW TRUST". Durante su estancia en el laboratorio de la Dra. Hopkins se entrenó en la utilización del Pez-cebra como modelo de Biología del desarrollo. Actualmente es Investigador Asociado C del Departamento de Genética Molecular del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM y miembro de la Sociedad Mexicana de Biología del Desarrollo.