

## **Generación de una Línea Transgénica de Pez Cebra para Estudiar la Remodelación de Uniones Adherentes**

*M.F. Sampedro, E.V. Paravani, M.F. Izaguirre y V. Sigot*

AUTORES: Laboratorio de Microscopía Aplicada a Estudios Moleculares y Celulares (LAMAE), Facultad de Ingeniería, Universidad Nacional de Entre Ríos, Argentina

CONTACTO: [vsigot@ingenieria.uner.edu.ar](mailto:vsigot@ingenieria.uner.edu.ar)

### **Resumen**

El remodelado dinámico de los contactos adhesivos intercelulares o uniones adherentes (UAs) mediado por la proteína cadherina epitelial E (cadh-E) es clave para coordinar los movimientos migratorios celulares durante la embriogénesis animal. Debido a la simplicidad estructural y a la accesibilidad experimental, el embrión de pez cebra (*Danio rerio*) se ha establecido como un modelo para estudiar migración celular y para entender la dinámica del tráfico vesicular y distribución de cadh-E en UAs.

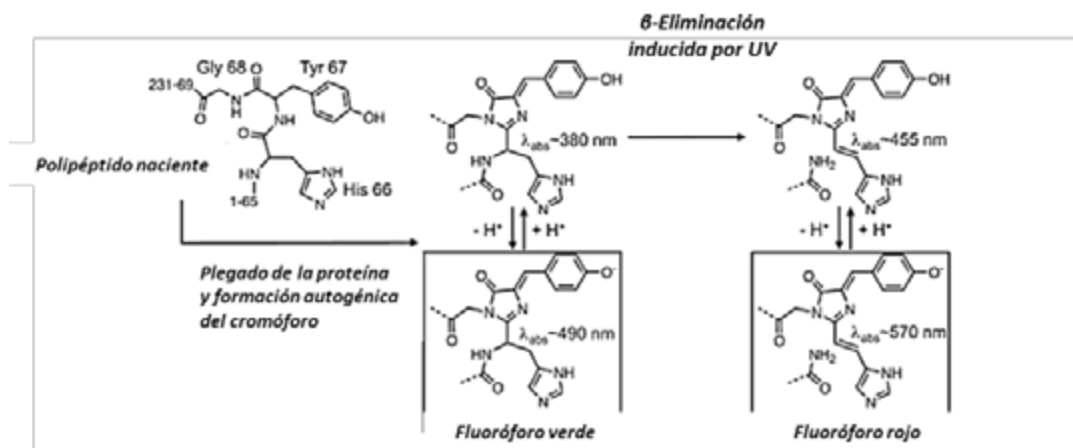
En el presente proyecto se propuso generar una línea transgénica estable de pez cebra (cadh-E-KikGR) para la expresión de cadh-E fusionada a la proteína fotoconvertible KikGR para visualizar in vivo la remodelación de UAs. En una primera etapa se analizó la expresión endógena nativa de cadh-E y se comparó con la expresión transgénica de cadh-E fusionada a la proteína reportera fluorescente GFP (Green Fluorescent Protein) como una primera estrategia de monitoreo. Se observó que cadh-E no se localiza en membranas como la cadh-E endógena por lo que la fusión no sería funcional una vez expresada en el embrión. El clonado de KikGR, de menor tamaño, en reemplazo de GFP en el vector final de expresión permitirá la obtención del embrión transgénico de interés.

**Palabras clave:** línea transgénica; pez cebra; cadherina-E; KikGR fotoconvertible; microscopía de deconvolución digital

## Introducción

La transgénesis implica la alteración genómica de un organismo a través de la inserción, modificación o eliminación de un gen con el objetivo de alterar una característica de interés [1]. En las últimas dos décadas esta tecnología se aplicó con éxito en peces teleósteos [2, 3]. También se han desarrollado peces modificados genéticamente como modelos experimentales de enfermedades humanas [4-7], para investigación biomédica, y estudios de organogénesis y embriogénesis [8-10]. El uso de genes reporteros de proteínas fluorescentes para visualizar in vivo el grado de mosaicismo en la expresión de un transgen facilita la identificación de los probables peces fundadores con la inserción del transgen en la línea germinal.

Las fusiones a la proteína fluorescente verde GFP (Green Fluorescent Protein) son las más utilizadas para seguir la dinámica de proteínas en células vivas en cultivo y en modelos animales [11,12]. Más recientemente, el desarrollo de proteínas fotoactivables y fotoconvertibles como Kaede, Dendra, Eos, y KikGR [12-14] permite monitorear el destino de poblaciones discretas de proteínas en localizaciones subcelulares [15]. Por su parte, KikGR, una proteína coralina, se fotoconvierte rápida y completamente de verde ( $\lambda$  emisión: 517 nm) a rojo ( $\lambda$  emisión: 593 nm) y su variante monomérica, ha resultado muy útil para microscopía de super-resolución [16, 17]. En los últimos años se han generado modelos de animales transgénicos para la expresión de estas proteínas fotoconvertibles los cuales se desarrollan normalmente indicando que estas proteínas no poseen efectos tóxicos [18, 19]. En la oscuridad estas proteínas emiten fluorescencia mientras que la irradiación con luz UV resulta en su transición irreversible a un estado altamente fotoestable emitiendo una brillante fluorescencia roja (Figura 1) que puede visualizarse por días sin fotoblanqueo significativo en un microscopio de epifluorescencia [20].



**FIGURA 1.** Estructura química del cromóforo y modificaciones inducidas por excitación con luz UV en proteínas fotoconvertibles de verde a rojo. Adaptado de [21].

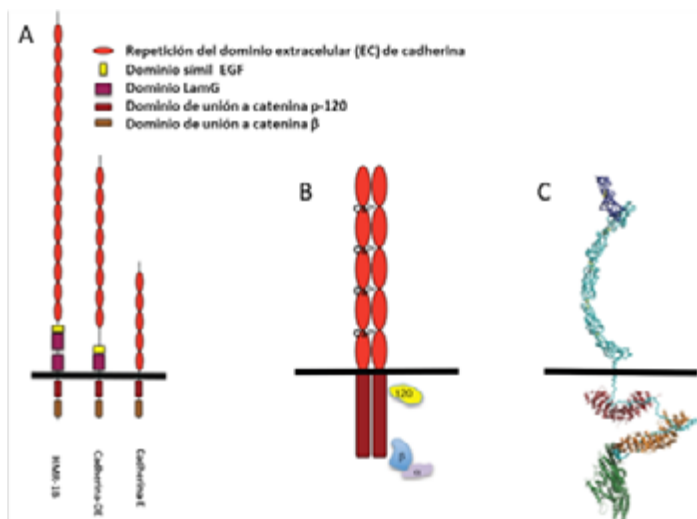
Los primeros reportes de fotoconversión para monitorear células en embriones animales fueron desarrollados por Hatta y colaboradores inyectando en estadio unicelular en el pez cebra ARNm o ADN codificando para la proteína Kaede para la expresión ubicua o tejido específica visualizando procesos morfogénicos como la neurulación y la formación de placodas [22].

Los numerosos trabajos citados reflejan el uso extendido en la actualidad de los ensayos de fotoconversión, para estudiar procesos celulares y moleculares durante la morfogénesis de distintos modelos animales. Así, se estudian la migración celular colectiva, el comportamiento de células individuales y

la localización celular de proteínas, con precisión nanométrica [16, 23]. En comparación con otros modelos animales el pez cebra es muy apropiado para microscopía *in vivo* y para la generación de líneas transgénicas debido a su transparencia óptica y facilidad de reproducción. En la actualidad existen numerosas líneas transgénicas de pez cebra que expresan proteínas fotoconvertibles de manera temporal y tejido-específica o en diferentes localizaciones subcelulares. En la base de datos ZFIN ([www.zfin.org](http://www.zfin.org)) se encuentran publicadas 463 líneas que expresan Kaede, 13 líneas que expresan Dendra, 13 líneas para EOs y 14 líneas para la expresión transgénica de KikGR.

Una de las estructuras principales de los contactos adhesivos célula-célula son las uniones adherentes (UAs) mediadas por las cadherinas (cadh) como receptores transmembrana [24, 25]. Las cadherinas son glicoproteínas pertenecientes a una súperfamilia de moléculas de adhesión dependientes de  $Ca^{2+}$ , que constituyen la base de las uniones adherentes y los desmosomas [24, 26]. Estas moléculas poseen un número variable de dominios extracelulares (EC) que consisten en secuencias repetidas con motivos negativamente cargados que actuarían ligando  $Ca^{2+}$ . Este catión cumple un rol importante en el mantenimiento de la rigidez de los dominios EC, esencial para el establecimiento de las interacciones homotípicas [27, 28].

Las cadherinas clásicas poseen 5 dominios EC (EC1-EC5) y funcionan como complejos macromoleculares transmembrana, donde su ectodominio N-terminal (EC1) media la unión adhesiva entre cadherinas presentes en las superficies de células vecinas, mientras que el dominio citoplasmático (DC) C-terminal interactúa con una amplia gama de proteínas citosólicas (Figura 2). Los cambios conformacionales en los ectodominios de cadherinas se transducen a través de la membrana plasmática para estimular eventos de señalización en el citoplasma y en el núcleo [31]. El rol fundamental del DC es establecer el anclaje entre las UAs, el citoesqueleto y la maquinaria endocítica [33-35].



**FIGURA 2.** (A) Representación esquemática de cadherina E de vertebrados y de sus posibles homólogos en *C. elegans* y *Drosophila melanogaster*, (B) Esquema del complejo dimérico cadherina-catenina en vertebrados, (C) Modelo del complejo cadherina-cateninas basado en las estructuras cristalinas. Adaptado de [41].

La fuerza de las UAs está modulada además por la organización lateral de cadherinas en la membrana. Estos receptores pueden formar dímeros mediante interacciones en “cis” entre dominios extracelulares y agruparse como oligómeros. Estas agrupaciones laterales se observan en sitios donde existe pre-

viamente una unión homofílica trans entre cadherinas [31, 36]. Esta acumulación de uniones mediadas por cadherinas aparece como un mecanismo adicional para reforzar las UAs [37].

La remodelación de UAs y la reorganización del citoesqueleto, entre otros factores relacionados con la matriz extracelular, son responsables del mantenimiento de la integridad de un tejido así como de la forma de las células dentro del mismo. Estos procesos también permiten la migración coordinada de algunos tejidos embrionarios hacia su destino final y asimismo, su interacción con los tejidos circundantes [38]. Durante la remodelación de las UAs, los filamentos de actina cortical ejercerían fuerzas sobre los complejos de cadh-E [26, 34, 38, 39], y estos actuarían como mecano-transductores de esas fuerzas controlando la forma y tamaño del contacto adhesivo [40]. Esta naturaleza dinámica de las UAs parece estar sustentada no solo por la comunicación bidireccional con el citoesqueleto, sino también por la regulación del tráfico vesicular endocítico, especialmente del reciclaje de cadherinas. Este mecanismo dirige el tráfico de las cadherinas internalizadas y de las recién sintetizadas a sitios específicos de la membrana, generando una distribución polarizada de estos receptores [26].

Una característica esencial de la morfogénesis animal es la capacidad de un grupo celular para responder a información espacial, remodelando contactos adhesivos intercelulares, y adaptando la arquitectura del citoesqueleto a medida que se desplaza hacia su localización final en el organismo [42-44].

En la última década se ha demostrado que la distribución asimétrica de las cadherinas resulta crucial para la migración colectiva de varios tipos celulares durante el desarrollo animal, incluyendo células limitantes ováricas (border cells) de *Drosophila melanogaster* [50], células mesenquimáticas progenitoras de *Xenopus laevis* [53] y en *Danio rerio*, las células del primordio de la línea lateral [54, 55] y las células del mesodermo durante la gastrulación [46].

El establecimiento de líneas transgénicas estables para la expresión de proteínas de interés fusionadas a proteínas fotoconvertibles es una estrategia fundamental para visualizar procesos dinámicos in vivo. Debido a las características físicas del pez cebra y dada la resolución espacio temporal de la técnicas microscópicas de fluorescencia que se disponen en el laboratorio, se propuso generar una línea transgénica para la expresión estable de cadh-E, fusionada a la proteína fotoconvertible KikGR como herramienta para estudiar la dinámica de las moléculas de adhesión celular epitelial.

Se cumplió hasta el momento con la obtención de embriones transgénicos transitorios para la expresión de cadh-E como fusión a la proteína reportera GFP (Green Fluorescent Protein), para evaluar la localización de cadh-E transgénica previo al reemplazo de GFP por KikGR en el vector de expresión final para la obtención del transgénico estable de interés.

## Metodología

### Mantenimiento de planteles de pez cebra y obtención de embriones

Actualmente el acuario de la Facultad de Ingeniería de la UNER cuenta con 4 planteles de pez cebra (*Danio rerio*) de cepas nativas, con aproximadamente 20 especímenes cada uno, incluyendo a los parentales y generaciones criadas en el mismo acuario.

Los planteles se encuentran agrupados por edad y se usan alternadamente cada 15 días. En las peceras se controla diariamente la temperatura (entre 26-28°C) y el pH (entre 7-8,5) del agua. Los peces son alimentados diariamente con escamas secas (TetraMin®) y artemia (A. salina).

Para la obtención de los embriones se realizan cruza semanales, seleccionando y separando machos y hembras reproductores, de acuerdo a procedimientos ya establecidos. Los huevos fecundados se separan y se lavan para microinyectar las soluciones de los vectores plásmidicos dentro de los 30-45 minutos luego de la fertilización.

### Detección de cadh-E mediante inmunofluorescencia y microscopía de deconvolución

Se estudió el patrón de expresión de cadh-E en células epidérmicas de embriones salvajes de 16, 24, 31, 48 y 72 hpf (horas post fertilización) fijados en Carnoy e inmunomarcados *in toto* con anti-E-cadh-I-gG-FITC (n=5 por estadio).

Las imágenes se adquirieron en un microscopio invertido IX83 Olympus de seccionamiento automático con una lente objetiva 40 X (AN 1,3 inmersión en aceite), con muestreo en x,y= 0.182  $\mu\text{m}/\text{pixel}$  con un paso en z de 0,33  $\mu\text{m}$  y se adquirieron al menos 50 secciones ópticas. Sobre los apilamientos (stacks) 3D se implementó el algoritmo de deconvolución Richardson-Lucy con 10 iteraciones (Plug in Deconvolution Lab2 en FIJI.3.0), empleando una PSF (del inglés, point spread function) teórica generada mediante Plug-In (PSF Generator, en FIJI 3.0). Sobre volúmenes seleccionados en regiones del tronco de los embriones y empleando el clasificador *Weka Trainable Segmentation* en FIJI 3.0, se segmentaron las UAs. Sobre las máscaras generadas se cuantificó la expresión de cadh-E como la suma de intensidades de fluorescencia en volúmenes de epidermis de 50x50x6  $\mu\text{m}^3$  (20 secciones ópticas) y se evaluó la morfología celular de la misma.

### Clonado de cadh-E en vector pT2AL

La primera estrategia de clonado probada consistió en insertar el gen de cadherina E (cdh1) en el plásmido pT2AL. El ADNc codificante para cadh-E canina se obtuvo del plásmido cadh-E-pEGFP-N1. La secuencia de cadh-E (inserto) se amplificó por PCR con oligos específicos diseñados con los sitios de corte de las enzimas HindIII y NcoI (Tabla 1).

**TABLA 1**

Forward cadh-E (con sitio HindIII)	5'CGGATGAAGCTTATGGGCCCTCGGTACGG 3'
Reverse cadh-E (con sitio NcoI)	5'GGCCATCCATGGAGTCGTCCTGCCACCTCC 3'

El vector destino pT2AL y el inserto fueron digeridos con ambas enzimas de restricción. Luego se separaron y purificaron por electroforesis en gel de agarosa al 1% en TAE 1X.

Se realizaron las mezclas de ligación (extremos cohesivos) con relaciones molares inserto a vector: 1:1, 3:1, 5:1 y 7:1, siguiendo los protocolos establecidos de la enzima Ligasa T4. Se realizaron los correspondientes controles negativos (vector digerido sin inserto + ligasa; vector digerido sin inserto y sin ligasa) y el control positivo de transformación con 70 ng de ADN de vector sin digerir.

Las incubaciones se realizaron ON a 16°C, se transformaron bacterias competentes (DH5 $\alpha$ ) en placas LB-agar con ampicilina y se seleccionaron clones potencialmente recombinantes, dejándolos crecer para purificar los posibles plásmidos recombinantes. La presencia del inserto se verificó inicialmente por digestión con HindIII y NcoI y electroforesis en gel de agarosa 1% en TAE1X. Los plásmidos que debido a su tamaño se consideraron recombinantes fueron enviados a secuenciar a la Universidad de Maine (USA) para verificar la exactitud de la construcción.

### Microinyección y visualización por microscopía de fluorescencia

Los primeros estudios de microscopía de fluorescencia se realizaron con embriones transgénicos transitorios. Se inyectaron 50 nl de solución (200  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) de pT2AL-GFP (control) y pT2AL-cadhE-GFP (recombinante), en el vitelo de embriones en estadio unicelular. La inyección de las soluciones de ADN o ARN se hace con microagujas que se preparan previamente utilizando un puller. Las microinyecciones se realizan con pulsos de N<sub>2</sub> a una presión de salida de 20 Bar y 2 ms de duración.

Los grupos experimentales se dividieron en: i) Embriones microinyectados con plásmidos pT2AL-GFP. ii) Embriones microinyectados con plásmidos pT2AL-cadh-E-GFP, iii) Embriones sin microinyectar.

La inserción por transposición del constructo de la fusión cadh-E-GFP, en el genoma del pez cebra requiere de la inyección simultánea del ARNm de la Transposasa de Tol2. Para obtener este ARNm se realizó la transcripción in vitro desde el plásmido pCS+Tol2. Próximamente se realizarán los ensayos de microinyección con plásmidos recombinantes, junto con este ARNm.

Los embriones microinyectados y no microinyectados (controles) se mantuvieron a 28°C en estufa en agua del sistema. A las 24 y 48 h post inyección se anestesiaron y montaron para su observación bajo un microscopio de seccionamiento óptico automatizado Olympus IX83, objetivo 20X, 0.75 AN, con set filtros de exc/em para FITC, para observar expresión de fluorescencia verde de GFP ( $\lambda$  em 520 nm).

### **Clonado de mKikGR en pCS+**

Previo a los estudios de microscopía de fluorescencia de time-lapse in vivo y a la generación del constructo de fusión cadh-E-mKikGR, se generó un vector de expresión pCS+KikGR para obtener embriones transgénicos transitorios que expresen la proteína fluorescente fotoconvertible mKikGR en citoplasma con el objetivo de poner a punto las condiciones de fotoconversión.

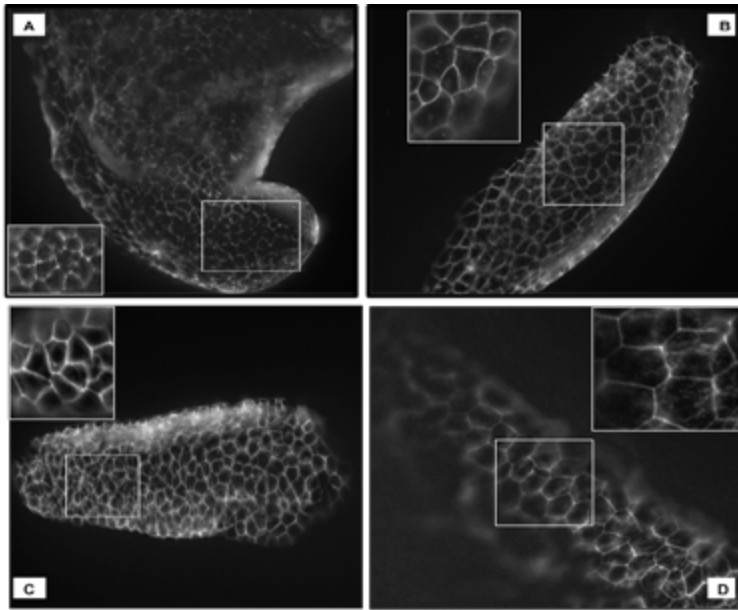
Para lograr esto, se subclonó esta proteína en un vector de expresión pCS+ utilizando las enzimas de restricción BamHI y XbaI. Luego de purificar el DNA plasmídico de colonias potencialmente recombinantes (pCS+mKikGR), se linealizó con HindIII y los productos de corte se sembraron en un gel de agarosa 1%/TAE1X, para seleccionar por tamaño aquellos que podían contener el inserto.

## **Resultados**

### **Expresión de cadh-E en epidermis embrionaria**

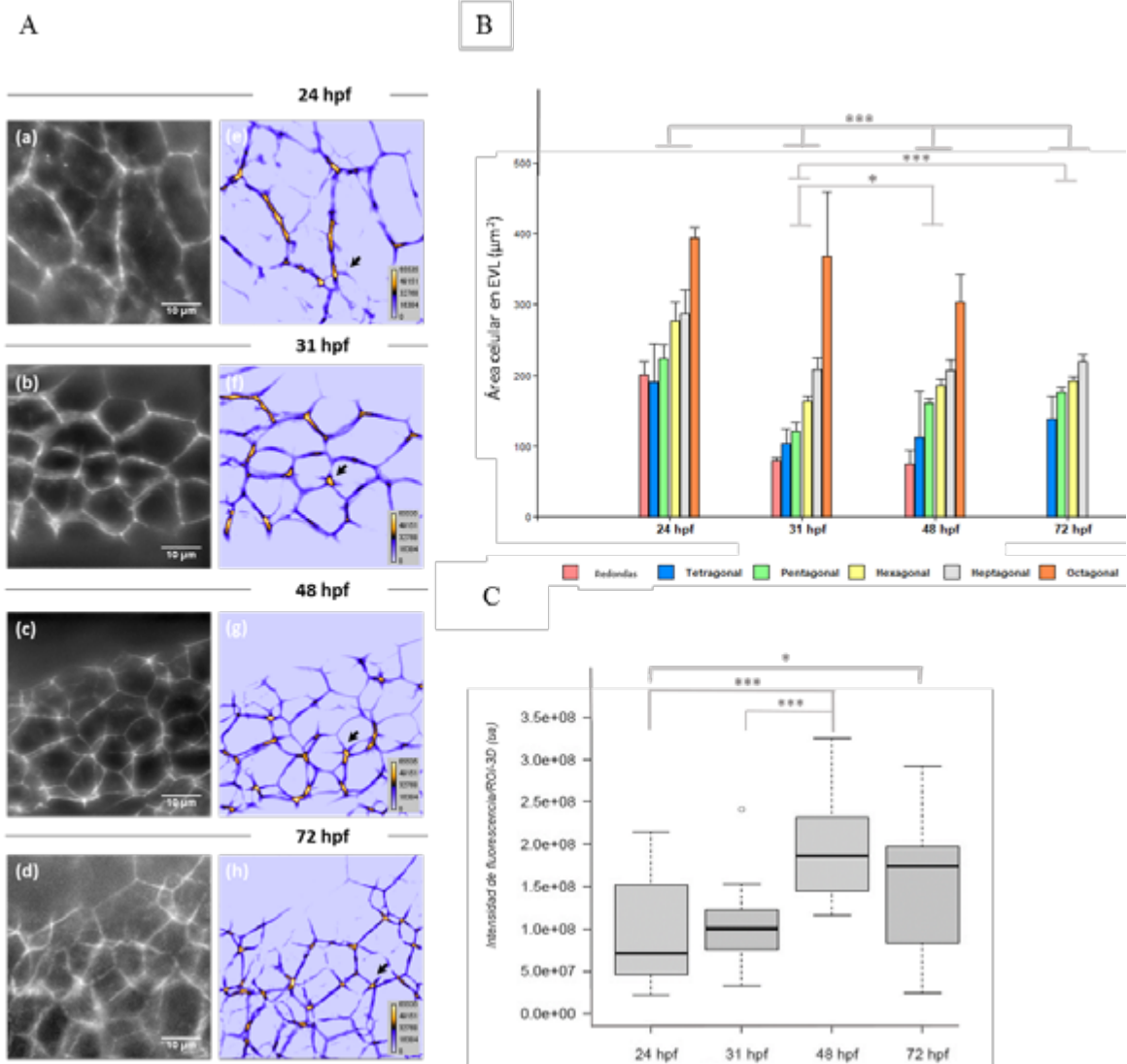
Durante el desarrollo embrionario del pez cebra y hacia las 16 hpf, la epidermis es una monocapa denominada EVL (enveloping layer). Hacia las 24 hpf se desarrolla una segunda capa, la capa epitelial basal (EBL, epidermal basal layer), proveniente del ectodermo ventral. Durante los primeros tres días de desarrollo la expresión de cadh-E es indispensable para mantener la integridad de esta bicapa. Por esto, previo a la generación de los embriones con expresión transgénica de cadh-E se analizó la expresión y distribución de cadh-E endógena en UAs mediante inmunofluorescencia en montaje completo, seguida de microscopía de deconvolución digital (MDD) y segmentación de las UAs (Figura 3).

Cadh-E se inmunolocalizó predominantemente en las membranas basolaterales de las células de la EVL en un patrón segmentado a las 16 hpf (Fig. 3A), incrementándose hacia las 31 hpf (Fig. 3B-C), donde se distinguen además las denominadas *puncta adherens* en los vértices entre 3 células. Hacia las 48 hpf (Fig. 3D), la inmunomarcación de cadh-E muestra un patrón continuo en la EVL y se empieza a detectar en las células de la EBL.



**FIGURA 3.** Proyecciones de máxima intensidad en el eje Z de 20 secciones ópticas en el volumen de embriones de 16 hpf (A), 24 hpf (B), 31 hpf (C) y 48 hpf (D) que muestra el patrón de expresión de cadh-E obtenido por IF de montaje completo. En A, imagen obtenida con objetivo 20X, B-D con objetivo 40X.

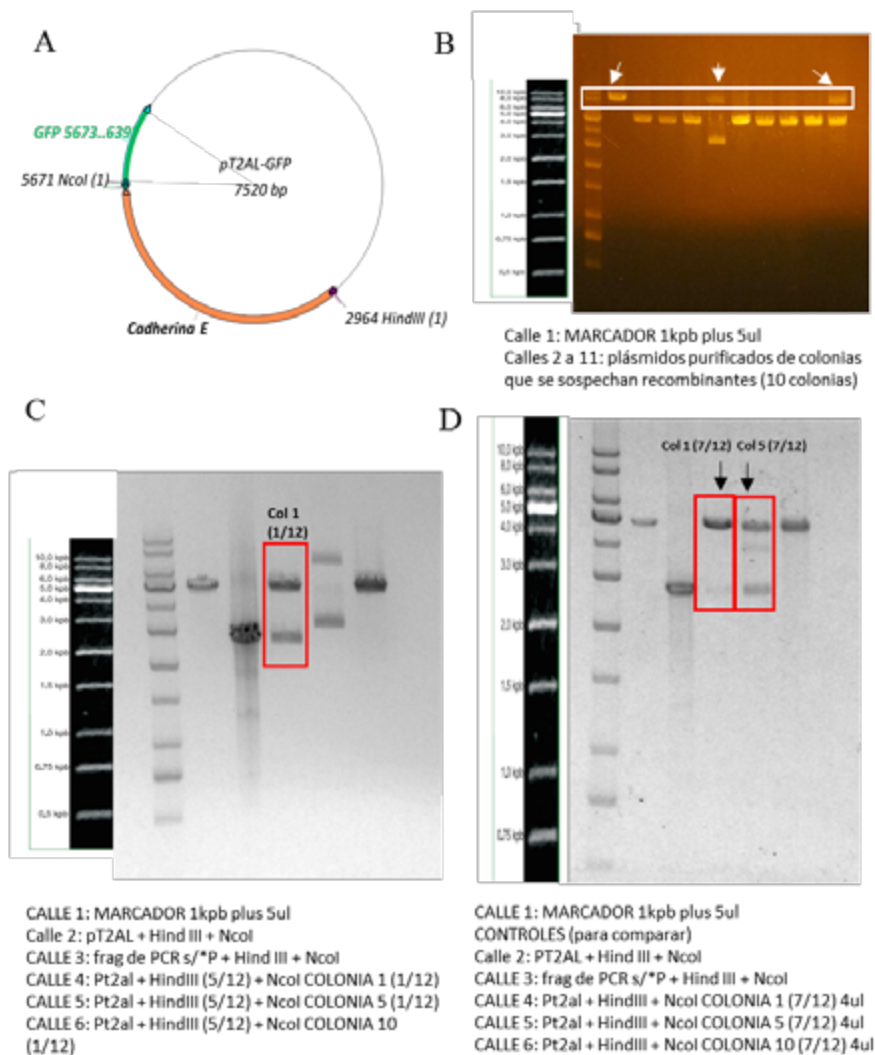
El análisis cuantitativo de la expresión de cadh-E en volúmenes fijos de epidermis mostró un aumento global de los niveles de esta proteína en los estadios analizados (Figura 4). El incremento más significativo fue observado entre las 31 a 48 hpf, consistente con el aumento de células positivas para cadh-E en la capa basal EBL (Fig. 4 A, C). Paralelamente, se observaron cambios extensivos en la morfología celular y una disminución significativa del área media de células penta y hexagonales en las células de la EVL desde las 24 hpf y hasta las 72 hpf (Fig. 4B).



### Clonado de *cadh-E* en pT2AL

Se realizó una estrategia de clonado que consistió en insertar el ADNc de *cadh-E* en el vector de expresión en pez cebra pT2AL y generar la fusión *cadh-E-GFP*, manteniendo el marco de lectura para la expresión de GFP como fusión C-terminal a *cadh-E* (Figura 5A). Luego de la transformación de DH5 $\alpha$  competentes con mezclas de ligación del inserto obtenido por PCR (2,7 pb) y el plásmido pT2AL (4,8 Kb), se seleccionaron los clones positivos y se purificaron los plásmidos potencialmente recombinantes. Se realizó la digestión secuencial y los productos de corte se sembraron en un gel de agarosa 1%/TAE. La linealización de los plásmidos con HindIII reveló tres plásmidos con el tamaño esperado para el recombinante (7,5 kb) (Fig. 5B), luego la digestión con NcoI permitió identificar la presencia del inserto (2,6 kb) (Fig. 5 C, D).





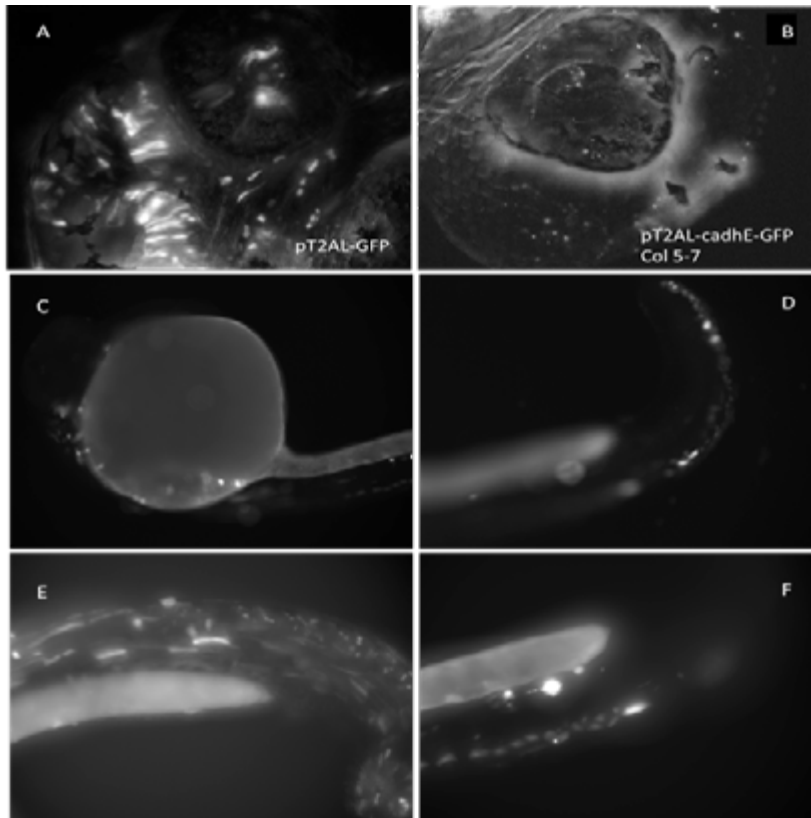
**FIGURA 5.** A) Vector de expresión final con la fusión ADNc cadh-E-GFP; B) Plásmidos digeridos sólo con HindIII. La banda de 7,5 kb en calles 2,6 y 11 (flechas blancas) correspondería a posibles plásmidos recombinantes; C-D) Doble digestión con HindIII y NcoI evidenció la presencia del inserto (2,6 kb) en los tres plásmidos seleccionados (banda inferior en recuadros).

Los plásmidos denominados Col 1 (1/12), Col 1 (7/12) y Col 5 (7/12) se enviaron a secuenciar para verificar la exactitud de la construcción. Las secuencias analizadas presentaron >97% de homología con la secuencia de cadh-E.

### Ensayo de la expresión transitoria de cadh-EGFP en embriones de pez cebra

Luego, se evaluó si los vectores recombinantes obtenidos expresaban la proteína de fusión cdh-E-GFP y si esta se localizaba correctamente, es decir si se observaba la fluorescencia de GFP en las UAs, análogamente a la proteína endógena detectada previamente por inmunofluorescencia. Esta estrategia se eligió como un paso previo antes de reemplazar a GFP por la proteína reportera fotoconvertible KikGR en pT2AL. Para evaluarla, los plásmidos recombinantes Col 1 (1/12), Col 1 (7/12) y Col 5 (7/12), se inyectaron en estadio de no más de 4 blastómeros cuando aún los citoplasmas se mantienen conectados al vitelo y el ADN inyectado puede difundir a todas las células. La expresión de la fusión de cadh-E-GFP se observó en embriones vivos decorionados a las 30 hpf. La expresión transitoria fue de tipo mosaico

o “puntiforme” y con localización citoplasmática en distintos tipos celulares siendo las intensidades de fluorescencia variables entre células de tronco y cola. No se observó localización específica en membranas de células de la epidermis análogamente a la expresión de cadh-E endógena revelada por inmunofluorescencia, en el tiempo observado con ninguno de los plásmidos recombinantes inyectados (Figura 6).



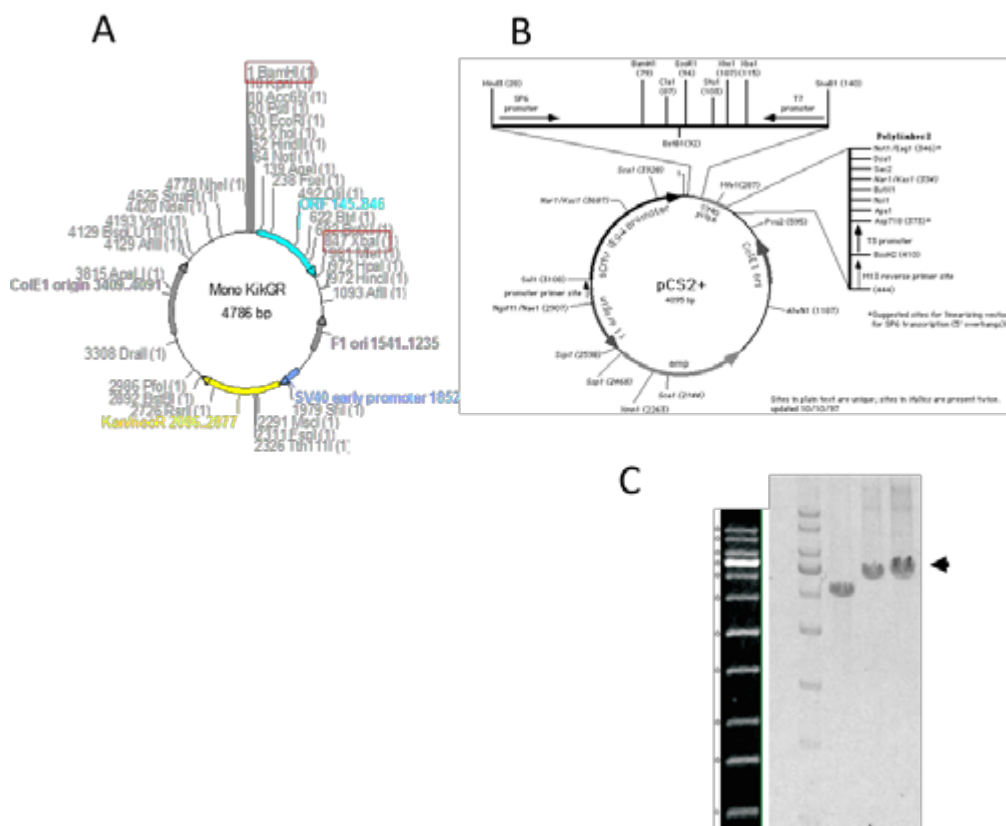
**FIGURA 6.** Expresión de GFP en embriones de pez cebra control e inyectados con los plásmidos recombinantes pT2AL-cadh-E-GFP y observados a las 30 hpf. A) Plásmido pT2AL-GFP como control de la expresión ubicua de GFP. Embriones PT2AL-cadh-E-GFP (B-F) B) magnificación de región de la cabeza de embrión inyectado con plásmido recombinante C) vista ventral; D-F) magnificación de región tronco y cola de distintos embriones. Filtros exc/em FITC, Objetivo 20X, AN 0,75.

La localización de GFP en citoplasma sugiere que la proteína de fusión cadh-E-GFP, aun siendo correcta la construcción recombinante, no sería transportada a las membranas celulares, *in vivo*.

Una explicación factible sería que pueden haberse introducido mutaciones durante la amplificación del gen por PCR que afecten la traducción o el reconocimiento y procesamiento del péptido señal que dirige a la proteína al sistema de endomembranas. Esto no se descarta a pesar de la alta homología (> 97%) reportada en los informes de secuenciación en la región amino terminal. Aún, si el péptido señal se tradujera correctamente, la proteína de fusión al ser de mayor tamaño que cadh-E puede que no sea correctamente dirigida al retículo endoplásmico o correctamente modificada pos-traduccionalmente en pez cebra.

### Subclonado de mKikGR en pCS+

Debido a que la proteína fotoconvertible monomérica mKikGR (~233 AA) es de menor tamaño que GFP (~900 AA) se espera que la fusión a cadh-E sea funcional, por lo que las estrategias apuntarán a reemplazar GFP por mKikGR como fusión C-Terminal en pT2AL. Por ello, en una segunda etapa y paralelamente a la generación del vector para la expresión de la fusión cadh-E-GFP en pez cebra; se subclonó la proteína fotoconvertible mKikGR (Figura 7A) en un vector de expresión pCS+ (Fig. 7B). Luego de purificar el DNA plasmídico de colonias potencialmente recombinantes, y linealizar con HindIII, los productos de corte se sembraron en un gel de agarosa 1%/TAE (Fig. 7C).



**FIGURA 7.** A) Mapa de sitios de corte con enzimas de restricción en vector donador (mKikGR); B) mapa destino del vector de expresión eucariota para expresión transitoria en pez cebra. Ambos fueron digeridos con BamHI y XbaI para llevar a cabo el subclonado; C) plásmidos digeridos con HindIII para chequear posibles recombinantes de acuerdo al tamaño (Kb) esperado; Calle 1: marcador 1kpb plus; calle 2: PCS+ +HindIII 4 kb CONTROL Vector destino vacío; calles 3-4: muestras pCS+KikGR potenciales recombinantes (4,8 kb).

Esta estrategia posibilitará la puesta a punto de las condiciones de fotoconversión en el microscopio Olympus IX83, mediante la generación de embriones transgénicos transitorios que expresen KikGR citoplasmática y en particular con la obtención de los clones funcionales pCS+KikGR se espera hacer luego el subclonado de KikGR como fusión C terminal a cadh-E en pT2AL en reemplazo de GFP.

## Conclusiones

Debido a que los resultados de expresión revelaron que la fusión de cadh-E a GFP genera una proteína de fusión que no se localiza en las membranas como la endógena, es necesario enfocar las actividades en el diseño de oligos con sitios de corte NcoI y ClaI para reemplazar GFP por la proteína fotoconvertible KikGR directamente en pT2AL. Debido a que KIKGR es una proteína de menor tamaño que GFP se espera que la fusión produzca una proteína funcional.

Por otro lado, la implementación de un método de segmentación de UAs en volúmenes de epidermis permitió cuantificar a partir la intensidad de fluorescencia los niveles de cadh-EI durante el desarrollo de la epidermis embrionaria. Este método podrá extenderse luego a embriones con doble marca y estimar relación fluorescencia verde/roja, en los ensayos de fotoconversión con el modelo transgénico in vivo.

Si bien aún no hemos obtenido en el tiempo estipulado la línea transgénica para la expresión de cadh-E-KikGR en pez cebra, sigue siendo importante su obtención ya que al momento no se encuentra reportada la existencia de la línea ni es posible importar peces transgénicos al país. Adicionalmente, la utilización de proteínas fotoconvertibles en un modelo animal concreto constituirá un avance metodológico para los estudios de biología celular y molecular en el ámbito de la FIUNER.

## Indicadores de producción

El siguiente artículo científico fue enviado para su publicación al International Journal of Cell Biology (Publisher: Hindawi; assigned the number 8427197). Actualmente estamos realizando los cambios sugeridos por los revisores.

Parte de los resultados se presentaron en el III Taller de Biología Celular y del Desarrollo. 27-29 de octubre de 2016. Chascomús, Buenos Aires.

EXPRESIÓN 3D DE CADHERINA E DURANTE EL DESARROLLO DE LA EPIDERMIS EMBRIONARIA DE DANIO RERIO. Sampedro, M.F., Izaguirre, M.F. y Sigot, V.

Los resultados obtenidos durante la ejecución de este proyecto contribuyen al plan de doctorado en Cs. Biológicas de la UNL de MF Sampedro (becaria CONICET)

## Bibliografía

1. Houdebine, L.M., Animal transgenesis: recent data and perspectives. *Biochimie*, 2002. 84(11): p. 1137-41.
2. Zhu, Z.Y. and Y.H. Sun, Embryonic and genetic manipulation in fish. *Cell Res*, 2000. 10(1): p. 17-27.
3. Zbikowska, H.M., Fish can be first--advances in fish transgenesis for commercial applications. *Transgenic Res*, 2003. 12(4): p. 379-89.
4. Dooley, K. and L.I. Zon, Zebrafish: a model system for the study of human disease. *Curr Opin Genet Dev*, 2000. 10(3): p. 252-6.
5. Ward, A.C. and G.J. Lieschke, The zebrafish as a model system for human disease. *Front Biosci*, 2002. 7: p. d827-33.
6. Amatruda, J.F. and E.E. Patton, Genetic models of cancer in zebrafish. *Int Rev Cell Mol Biol*, 2008. 271: p. 1-34.
7. Bandmann, O. and E.A. Burton, Genetic zebrafish models of neurodegenerative diseases. *Neurobiol Dis*, 2010. 40(1): p. 58-65.
8. Thisse, C. and L.I. Zon, Organogenesis--heart and blood formation from the zebrafish point of view. *Science*, 2002. 295(5554): p. 457-62.

9. Ackermann, G.E. and B.H. Paw, Zebrafish: a genetic model for vertebrate organogenesis and human disorders. *Front Biosci*, 2003. 8: p. d1227-53.
10. Perlin, J.R. and W.S. Talbot, Signals on the move: chemokine receptors and organogenesis in zebrafish. *Sci STKE*, 2007. 2007(400): p. pe45.
11. Kahana, J.A. and P.A. Silver, Use of the *A. victoria* green fluorescent protein to study protein dynamics in vivo. *Curr Protoc Mol Biol*, 2001. Chapter 9: p. Unit9 7C.
12. Lukyanov, K.A., et al., Innovation: Photoactivatable fluorescent proteins. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2005. 6(11): p. 885-91.
13. Gurskaya, N.G., et al., Engineering of a monomeric green-to-red photoactivatable fluorescent protein induced by blue light. *Nat Biotechnol*, 2006. 24(4): p. 461-5.
14. Zhang, M., et al., Rational design of true monomeric and bright photoactivatable fluorescent proteins. *Nat Methods*, 2012. 9(7): p. 727-9.
15. Habuchi, S., et al., mKikGR, a monomeric photoswitchable fluorescent protein. *PLoS One*, 2008. 3(12): p. e3944.
16. Watanabe, S., et al., Protein localization in electron micrographs using fluorescence nanoscopy. *Nat Methods*, 2011. 8(1): p. 80-4.
17. Fang, Z., et al., The membrane-associated protein, supervillin, accelerates F-actin-dependent rapid integrin recycling and cell motility. *Traffic*, 2010. 11(6): p. 782-99.
18. Griswold, S.L., et al., Generation and characterization of iUBC-KikGR photoconvertible transgenic mice for live time-lapse imaging during development. *Genesis*, 2011. 49(7): p. 591-8.
19. Nowotschin, S. and A.K. Hadjantonakis, Use of KikGR a photoconvertible green-to-red fluorescent protein for cell labeling and lineage analysis in ES cells and mouse embryos. *BMC Dev Biol*, 2009. 9: p. 49.
20. Baker, S.M., R.W. Buckheit, 3rd, and M.M. Falk, Green-to-red photoconvertible fluorescent proteins: tracking cell and protein dynamics on standard wide-field mercury arc-based microscopes. *BMC Cell Biol*, 2010. 11: p. 15.
21. Mizuno, H., et al., Photo-induced peptide cleavage in the green-to-red conversion of a fluorescent protein. *Mol Cell*, 2003. 12(4): p. 1051-8.
22. Hatta, K., H. Tsujii, and T. Omura, Cell tracking using a photoconvertible fluorescent protein. *Nat Protoc*, 2006. 1(2): p. 960-7.
23. Day, R.N. and M.W. Davidson, The fluorescent protein palette: tools for cellular imaging. *Chem Soc Rev*, 2009. 38(10): p. 2887-921.
24. Harris, T.J.C. and U. Tepass, Adherens junctions: from molecules to morphogenesis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2010. 11(7): p. 502-514.
25. Ivanov, A.I. and N.G. Naydenov, Dynamics and Regulation of Epithelial Adherens Junctions. 2013. 303: p. 27-99.
26. Collinet, C. and T. Lecuit, Stability and Dynamics of Cell-Cell Junctions. 2013. 116: p. 25-47.
27. Yagi, T. and M. Takeichi, Cadherin superfamily genes: functions, genomic organization, and neurologic diversity. *Genes Dev*, 2000. 14(10): p. 1169-80.
28. Chitaev, N.A. and S.M. Troyanovsky, Adhesive but not lateral E-cadherin complexes require calcium and catenins for their formation. *J Cell Biol*, 1998. 142(3): p. 837-46.
29. Chappuis-Flament, S., et al., Multiple cadherin extracellular repeats mediate homophilic binding and adhesion. *J Cell Biol*, 2001. 154(1): p. 231-43.
30. Sivasankar, S., et al., Direct molecular force measurements of multiple adhesive interactions between cadherin ectodomains. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999. 96(21): p. 11820-4.
31. Kovacs, E.M., et al., E-cadherin homophilic ligation directly signals through Rac and phosphatidylinositol 3-kinase to regulate adhesive contacts. *J Biol Chem*, 2002. 277(8): p. 6708-18.

32. Hong, S., R.B. Troyanovsky, and S.M. Troyanovsky, Spontaneous assembly and active disassembly balance adherens junction homeostasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2010. 107(8): p. 3528-3533.
33. Hartsock, A. and W.J. Nelson, Adherens and tight junctions: structure, function and connections to the actin cytoskeleton. *Biochim Biophys Acta*, 2008. 1778(3): p. 660-9.
34. Yamada, S., et al., Deconstructing the Cadherin-Catenin-Actin Complex. *Cell*, 2005. 123(5): p. 889-901.
35. Nelson, W.J., Regulation of cell-cell adhesion by the cadherin-catenin complex. *Biochem Soc Trans*, 2008. 36(Pt 2): p. 149-55.
36. Troyanovsky, R.B., E. Sokolov, and S.M. Troyanovsky, Adhesive and lateral E-cadherin dimers are mediated by the same interface. *Mol Cell Biol*, 2003. 23(22): p. 7965-72.
37. Yap, A.S., et al., Lateral clustering of the adhesive ectodomain: a fundamental determinant of cadherin function. *Curr Biol*, 1997. 7(5): p. 308-15.
38. Lecuit, T., Adhesion remodeling underlying tissue morphogenesis. *Trends in Cell Biology*, 2005. 15(1): p. 34-42.
39. Yonemura, S., Cadherin-actin interactions at adherens junctions. *Current Opinion in Cell Biology*, 2011. 23(5): p. 515-522.
40. Maitre, J.L., et al., Adhesion functions in cell sorting by mechanically coupling the cortices of adhering cells. *Science*, 2012. 338(6104): p. 253-6.
41. Ishiyama, N., et al., Dynamic and static interactions between p120 catenin and E-cadherin regulate the stability of cell-cell adhesion. *Cell*, 2010. 141(1): p. 117-28.
42. Takeichi, M., et al., Patterning of cell assemblies regulated by adhesion receptors of the cadherin superfamily. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 2000. 355(1399): p. 885-90.
43. Gumbiner, B.M., Regulation of cadherin-mediated adhesion in morphogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2005. 6(8): p. 622-34.
44. Shimizu, T., et al., E-cadherin is required for gastrulation cell movements in zebrafish. *Mech Dev*, 2005. 122(6): p. 747-63.
45. Theveneau, E. and R. Mayor, Cadherins in collective cell migration of mesenchymal cells. *Current Opinion in Cell Biology*, 2012. 24(5): p. 677-684.
46. Arboleda-Estudillo, Y., et al., Movement Directionality in Collective Migration of Germ Layer Progenitors. *Current Biology*, 2010. 20(2): p. 161-169.
47. Janssens, K., H.H. Sung, and P. Rorth, Direct detection of guidance receptor activity during border cell migration. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2010. 107(16): p. 7323-7328.
48. Disanza, A., et al., Endocytosis and spatial restriction of cell signaling. *Molecular Oncology*, 2009. 3(4): p. 280-296.
49. Wan, P., et al., Guidance receptor promotes the asymmetric distribution of exocyst and recycling endosome during collective cell migration. *Development*, 2013. 140(23): p. 4797-4806.
50. Janssens, K., H.H. Sung, and P. Rorth, Direct detection of guidance receptor activity during border cell migration. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010. 107(16): p. 7323-8.
51. Inaki, M., et al., Effective guidance of collective migration based on differences in cell states. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2012. 109(6): p. 2027-32.
52. Jacquemet, G., M.J. Humphries, and P.T. Caswell, Role of adhesion receptor trafficking in 3D cell migration. *Current Opinion in Cell Biology*, 2013. 25(5): p. 627-632.
53. Chen, X. and B.M. Gumbiner, Paraxial protocadherin mediates cell sorting and tissue morphogenesis by regulating C-cadherin adhesion activity. *J Cell Biol*, 2006. 174(2): p. 301-13.
54. Kerstetter, A.E., et al., Cadherin-2 function in the cranial ganglia and lateral line system of developing zebrafish. *Dev Dyn*, 2004. 230(1): p. 137-43.
55. Lecaudey, V., et al., Dynamic Fgf signaling couples morphogenesis and migration in the zebrafish lateral line primordium. *Development*, 2008. 135(16): p. 2695-705.

**PID 6145**

**Denominación del Proyecto**

Generación de una línea transgénica de pez cebra para estudiar la remodelación de uniones adherentes

**Directora del proyecto**

SIGOT, Valeria

**Codirectora**

IZAGUIRRE, María Fernanda

**Unidad Ejecutora**

Facultad de Ingeniería

**Dependencia**

Universidad Nacional de Entre Ríos

**Contacto**

[vsigot@ingenieria.uner.edu.ar](mailto:vsigot@ingenieria.uner.edu.ar)

**Integrantes del Proyecto**

Paravani, Enrique Valentín (docente); Sampetro, María Florencia; Calcaterra; Nora Beatriz (colaborador)

**Fechas de iniciación y de finalización efectivas**

01/04/2015 y 31/03/2018)

Aprobación del Informe Final mediante Resolución CS N° 280/18 (12-11-2018)

[<< VOLVER AL INICIO](#)