

Departamento de Biología Molecular y Bioquímica

Facultad de Ciencias

Universidad Autónoma de Madrid



TESIS DOCTORAL

**ESTUDIO DE LA REGULACIÓN DE LOS
GENES *Six3* EN VERTEBRADOS**

Leonardo Beccari. Licenciado en Biología

Directora de Tesis: Dra. Paola Bovolenta

Lugar de realización: Instituto Cajal y Centro de Biología

Molecular Severo Ochoa

ÍNDICE

Abstract	1
Abreviaturas	2
1. Introducción	3
1.1. Desarrollo y especificación temprana de los territorios neurales.....	4
1.1.1. Regionalización del prosencéfalo: el modelo prosomérico.....	4
1.1.2. Organización de los territorios prosencefálicos en la placa neural anterior.....	5
1.2. Mecanismos moleculares implicados en la especificación de la placa neural anterior.....	7
1.2.1. Principales vías de señalización implicadas en el desarrollo del SNC.....	7
1.2.2. Vías de señalización en el desarrollo temprano del SNC.....	9
1.2.3. Factores de transcripción y redes génicas en la especificación de territorios prosencefálicos.....	11
1.3. Aproximación al estudio de las redes transcripcionales.....	14
1.3.1. Anatomía de un gen: regiones no codificantes reguladoras.....	14
1.3.2. Predicción de factores reguladores de la expresión génica.....	18
1.3.3. El medaka como modelo experimental para el estudio de la regulación génica.....	17
1.4. El gen <i>Six3</i> en la especificación y desarrollo de las estructuras prosencefálicas.....	19
1.4.1. Organización genómica del gen <i>Six3</i>	20
1.4.2. El gen <i>Six3</i> en el pez medaka.....	21
2. Objetivos	24
3. Material y métodos	26
3.1. Mantenimientos de los stock de medaka.....	27
3.2. Análisis <i>in silico</i> de regiones reguladoras.....	27
3.2.1. Identificación de elementos no codificante conservados.....	27
3.2.2. Predicción <i>in silico</i> de sitios de unión para factores de transcripción.....	27
3.2.3. Predicción <i>in silico</i> de grandes dominios reguladores.....	31
3.3. Construcción de plásmidos.....	31
3.4. Transfección de células y ensayos de luciferasa.....	31

3.5. Generación de líneas transgénicas.....	32
3.6. Ensayos de inmunoprecipitación de cromatina	33
3.7. Inyección de ARNm y morfolino	34
3.8. Hibridación <i>in situ</i>	34
3.9. Análisis de los niveles relativos de expresión génica.....	34
3.10. Análisis de Imagen y métodos de cuantificación	35
3.11. Análisis de la proliferación celular.....	36
4. Resultados- Bloque I: identificación de elementos reguladores en	
<i>trans</i> de la expresión génica.....	37
4.1. Identificación <i>in silico</i> de reguladores putativos de la	
expresión del gen <i>Six3.2</i>	39
4.2. Validación de candidatos en ensayos de luciferasa.....	41
4.3. Rastreo masivo de reguladores del gen <i>Six3.2</i> en ensayos	
de transactivación transcripcional	45
Resultados Bloque II: Papel funcional del gen <i>Sox2</i> como regulador	
de la expresión de <i>Six3.2</i> en fases tempranas del desarrollo	51
4.4. <i>Sox2</i> regula directamente la actividad del promotor de	
<i>Six3.2</i>	52
4.5. Distintos niveles de actividad del gen <i>Six3.2</i> , bajo el	
control de <i>Sox2</i> , regulan la especificación de los dominios	
de telencéfalo y retina.....	56
4.6. <i>Six3.2</i> regula la especificación del hipotálamo de forma	
independiente de <i>Sox2</i>	64
4.7. La actividad de <i>Sox2</i> y <i>Six3.2</i> en el prosencéfalo controla	
la proliferación de los precursores telencefálicos y regula	
directamente los genes <i>Foxg1</i> , <i>Rx3</i> y <i>Nkx2.1</i>	68
Resultados-Bloque III: Identificación de reguladores en <i>cis</i> y en <i>trans</i>	
de la expresión del gen <i>Six3.1</i>	74
4.8. Identificación de elementos reguladores en <i>cis</i> de la	
expresión de <i>Six3.1</i>	75
4.9. Identificación de factores reguladores en <i>trans</i> de la	
expresión de <i>Six3.1</i>	77
Resultados- Bloque IV: Estudio de la regulación a nivel genómico de	
los genes <i>Six3</i> de vertebrados	81
4.10. Análisis <i>in silico</i> de la región cromosómica del gen <i>Six3</i> y	
sus parálogos	82

4.10.1. El gen <i>Six3</i> se encuentra en una región genómica sintéticamente conservada	82
4.10.2. La distribución de elementos aisladores y módulos conservados no codificantes predice un marco de regulación común entre los genes <i>Six3</i> y <i>Ppm1b</i>	85
4.11. Validación experimental de los putativos elementos aisladores identificados <i>in silico</i>	87
5. Discusión	90
5.1. Evolución diferencial de la regulación de los genes <i>Six3.1</i> y <i>Six3.2</i>	91
5.2. Papel de los genes <i>Sox2</i> y <i>Six3.2</i> en la especificación temprana de territorios prosencefálicos.....	92
5.3. Evidencias de la existencia de niveles superiores de regulación en el control transcripcional de los genes <i>Six3</i>	97
6. Conclusiones	98
7. Bibliografía	99

ABREVIATURAS

aHip: Hipotálamo alar

bHip: hipotálamo basal

co: copa óptica

Di: Diencéfalo

EC: elemento/s conservado/s

ER: elemento/s regulador/es

FT: factor/es de transcripción

Hip: Hi: hipotálamo

Mes: mesencéfalo

MO: morfolino/s

nr: neurorretina

Op: campo presuntivo de telencéfalo

P: prosencéfalo

Romb: Rombencéfalo

SU: sitio/s de unión

T/ Tel: Telencéfalo

tp: campo presuntivo de telencéfalo

vo: vesícula óptica

ABSTRACT

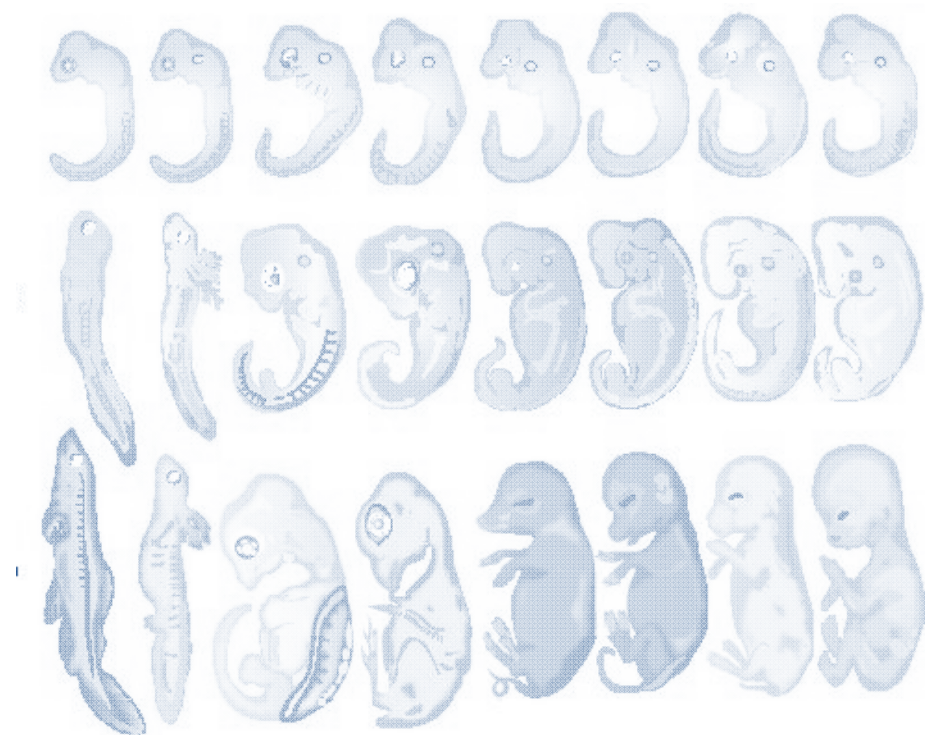
Understanding the structure and function of gene regulatory networks is crucial to our comprehension of the processes underlying the development of the adult brain. Several genes implicated in the development of the prosencephalic structures have been already identified, including transcription factors and signaling molecules. These molecules act in combinatorial and hierarchical networks to specify different domains of the prosencephalon. Among them, *Six3*, a member of the *Sine oculis* family of homeobox-containing transcription factors, is expressed at different levels in anterior brain (forebrain). Work in different species demonstrated that *Six3* plays a crucial role in forebrain development by controlling cell proliferation and the expression of Wnt, *Shh*, *BMP* and *Nodal* signaling molecules. Yet, there is little information on the mechanisms that regulate *Six3* expression. We also have a poor grasp on how *Six3* differentially contributes to the specification of each one of the prosencephalic structures in which it is expressed. In this thesis, we took advantage of the easy experimental manipulation, compact genome and high transgenesis efficiency of the medaka fish (*Oryzias latipes*) to address these questions. Due to ancestral duplication of the teleosts' genomes, there are two paralog of the mammalian *Six3* gene in medaka: *Six3.1* and *Six3.2*. Previous works have dissected the *cis*-regulatory code controlling *Six3.2* expression. Here we identified five *cis*-regulatory modules controlling *Six3.1* transcription in stable medaka transgenic lines. Based on the syntenic genomic organization and the distribution of enhancers and insulators, we also show that *Six3* may share common regulatory elements with *Ppm1b*, a gene coding for a protein phosphatase with postulated roles in *BMP*, *TGF* and *Nodal* signaling inhibition. Furthermore, combining an in silico-predicted candidate approach with a high throughput screening we have identified a number of trans-regulatory factors, which modulate, in a positive or negative way, the transcriptional activity of either *Six3.1* and/or *Six3.2* regulatory regions. These include members of the *Sox*, *Pax*, *Otx*, *Tcf*, *Msx*, *Fox* and TALE families of transcription factors. Among all factors, we have further focused on the regulatory interaction between *Sox2* and *Six3.2* demonstrating that a *Sox2*-mediated activation of different levels of *Six3.2* differentially patterns the forebrain preferentially favoring telencephalic development. These activities are, in turn executed by *Foxg1* and *Rx3*, which are differentially and directly regulated by *Six3.2* and *Sox2*. In line with this idea, we also show that in medaka fish, *Six3.1* and *Six3.2* have adopted somewhat specialized functions: *Six3.1* has a preponderant function in retinal development, whereas *Six3.2* is required for telencephalic patterning.

In conclusion, our study provides additional and important information of the transcriptional network responsible for vertebrate forebrain development, highlighting new aspects of *Six3* and *Sox2* function.

1. INTRODUCCIÓN

A pesar de las diferencias entre los cerebros de las distintas especies de vertebrados, los mecanismos básicos que conducen a su formación están evolutivamente conservados. Se sabe que la formación del sistema nervioso central (SNC) comienza mucho antes de que aparezca ninguna evidencia morfológica de las distintas partes que lo componen, y que este proceso requiere la participación de moléculas señalizadoras y de una red de factores de transcripción (FT). Sin embargo, las relaciones existentes entre estas moléculas, los mecanismos que regulan su expresión, y su contribución a la especificación de diferentes territorios, siguen siendo preguntas abiertas.

En esta introducción se presentan resumidamente los eventos más destacados en la formación del SNC, en particular de las regiones prosencefálicas, así como algunos de los genes más importantes implicados en estos procesos, con un énfasis particular en el FT *Six3*, sobre el que se centra este estudio. Así mismo, se introducirá el sistema modelo empleado, el pez medaka (*Oryzias latipes*) y los fundamentos de la metodología utilizada en el mismo.



1.1. Desarrollo y especificación temprana de los territorios neurales

El desarrollo del SNC de vertebrados inicia a partir de una capa germinal embrionaria denominada **ectodermo** (Rubenstein et al 1998). El ectodermo central adquiere identidad neural a través de un proceso conocido como **inducción neural** y comienza a sufrir un engrosamiento centralizado dando lugar a la **placa neural**. Ésta es el primordio a partir del cual se van a originar todas las estructuras que conformarán el SNC y en ella ya es posible distinguir, por expresión génica diferencial, las cuatro grandes regiones del futuro tubo neural: **prosencefalo**, **mesencefalo**, **rombencefalo** y **médula espinal**, así como sus subdivisiones principales (**Fig. 1** y **Fig. 2A**).

1.1.1. Regionalización del prosencefalo: el modelo prosoméxico

El prosencefalo es el primordio que dará lugar a la porción del cerebro donde residen nuestros pensamientos, memorias y emociones, y deriva, a su vez, de la porción más rostral de la placa neural, denominada **placa neural anterior** (PNA, **Fig. 2A**). El prosencefalo consta de una serie de regiones claramente reconocibles hacia el final de la somitogénesis, pudiéndose diferenciar el telencefalo, posicionado rostro-dorsalmente, el hipotálamo, en posición ventral, los ojos y, más caudalmente, el diencefalo (**Fig. 1** y **2C**). Este último se divide, a su vez, en una serie de subdominios que, de anterior a posterior, son: el tálamo ventral (o pretálamo-PTa), el tálamo dorsal (o tálamo-Ta) y el pretecho (PT).

Estas divisiones, definidas en base a criterios fundamentalmente morfológicos, han sido recientemente reinterpretadas en clave evolutiva-ontológica, desembocando en la enunciación del **modelo prosoméxico** (Puelles & Rubenstein 2003; Rubenstein et al 1998), según el cual el prosencefalo de vertebrados consta de subdivisiones transversales y longitudinales, reconocibles en base a combinaciones de patrones de expresión génica. Este modelo, aunque aún en revisión, provee un marco conceptual muy valioso a la hora de entender e interpretar los estudios de desarrollo del sistema nervioso central y, en particular, de las estructuras prosencefálicas.

El modelo prosoméxico considera la existencia de cuatro grandes dominios transversales (o **prosómeros**) dentro del prosencefalo (**Fig. 1**), divididos a su vez en cuatro regiones longitudinales (de dorsal a ventral: placa del techo, zona alar, zona basal y placa del suelo). Los tres primeros prosómeros, nombrados **p1**, **p2** y **p3** en sentido caudo-rostral, contendrían, en su porción alar, los tres territorios diencefálicos citados anteriormente. En cambio, telencefalo, ojo e hipotálamo se englobarían dentro del denominado **prosencefalo secundario** (PS). Los dos primeros pertenecen a la región alar, mientras que el último consta de una componente alar, una basal y la placa del suelo. El modelo prosoméxico, si bien postulado inicialmente en pollo y ratón (Bulfone et al 1993; Puelles et al 1999; Puelles & Rubenstein 2003; Rubenstein et al 1994), ha sido corroborado en diversas especies, incluyendo el pez medaka y el pez cebra (Kage et al 2004; Wullimann & Puelles 1999; Wullimann et al 1999), confirmando la conservación evolutiva que subyace a la organización del SNC en general (**Fig. 1**).

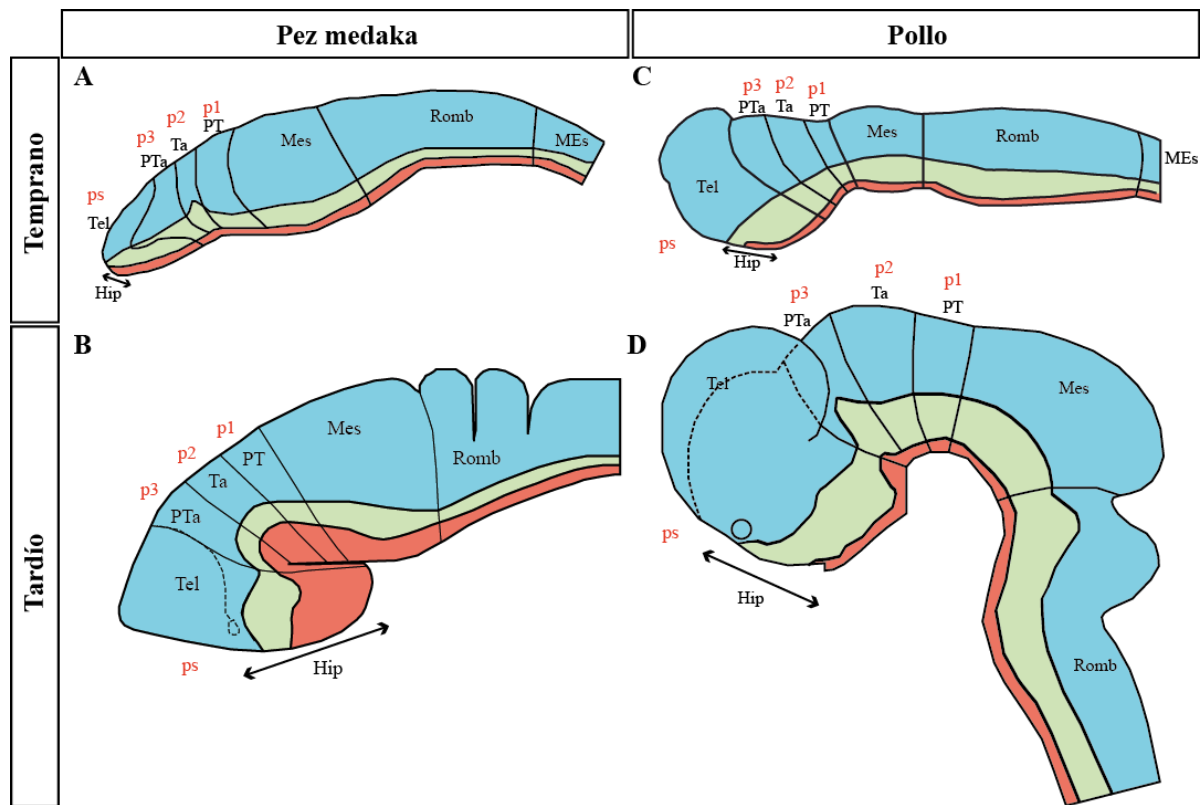


Figura 1. Conservación evolutiva de las subdivisiones del SNC de vertebrados. Representaciones esquemáticas del tubo neural del pez medaka (A, B) y de pollo (C, D) en distintos estadios de desarrollo. Las diferentes divisiones transversales del SNC (p1, p2, p3 y ps) se delimitan con líneas negras continuas mientras que las subdivisiones longitudinales se representan en diferentes colores (azul: placa alar; verde: placa basal; rosa: placa del suelo). La región del hipotálamo, que consta de una subdivisión alar, una basal y una componente de la placa del suelo se delimita con un corchete. Nótese la conservación de los diferentes dominios neurales entre las dos especies. Hip: hipotálamo; ME: medula espinal; Mes: mesencéfalo; PT: preteectum; PTa: pretálamo; Romb: rombencéfalo; Ta: talamo; Tel: telencefalo

1.1.2. Organización de los territorios prosencefálicos en la placa neural anterior

El estudio de **mapas moleculares** y de **destino** en diferentes especies, y la aportación conceptual del modelo prosomérico, han permitido importantes avances en nuestro conocimiento sobre los procesos de desarrollo del SNC (Couly & Le Douarin 1987; Fernandez-Garre et al 2002; Garcia-Lopez et al 2004; Inoue et al 2000; Pombero & Martinez 2009; Russek-Blum et al 2009; Sanchez-Arrones et al 2009; Staudt & Houart 2007);(Puelles et al 1999; Puelles & Rubenstein 2003; Rubenstein & Puelles 1994; Rubenstein et al 1998; Shimamura et al 1995). Actualmente se sabe que los territorios del prosencéfalo se corresponden con dominios moleculares definidos dentro de la PNA (**Fig. 2**). Sin embargo, resulta difícil establecer relaciones topológicas claras entre la localización de dichos territorios en el cerebro adulto y su posición inicial dentro de la placa neural, debido, en parte, a la gran complejidad estructural del prosencéfalo y a los **movimientos morfogenéticos (Fig. 2B)** que tienen lugar durante su desarrollo (Boucaut et al 1984; Greene & Copp 2009; Keller et al 1992; Schoenwolf 1991). Además existen importantes diferencias interespecíficas en los procesos que conducen a la formación del tubo neural (Foley et al 2000; Foley & Stern 2001; Wilson & Houart 2004;{Chuang, 2002 #1297}), por lo que en este trabajo nos centraremos en el desarrollo de las estructuras prosencefálicas de peces. Gracias al estudio de mapas moleculares y de destino en diferentes especies de vertebrados (England et al 2006; Fernandez-Garre

et al 2002; Inoue et al 2000; Sanchez-Arrones et al 2009; Staudt & Houart 2007), se ha determinado que las porciones dorsales y ventrales del prosencéfalo difieren en su localización a lo largo del eje antero-posterior de la PNA y se ha podido determinar la posición de los distintos dominios neurales dentro de la misma (**Fig. 2**):

- El dominio telencefálico: ocupa la posición más anterior dentro de la PNA, extendiéndose lateralmente en sentido caudal (Grinblat et al 1998; Houart et al 2002). Dentro de este dominio, la porción más caudo-lateral dará lugar al dominio dorsal del telencéfalo (pallium), mientras que la prospectiva región basal (que originará el subpallium), se encuentra ubicada más rostralmente y, por tanto, más cerca de la línea media.
- El campo morfogenético de ojo: parece constituir un territorio único en peces, situado centralmente dentro de la PNA y que ocupa la mayor parte de la misma (Graw 2010). Éste limita con los progenitores telencefálicos en su porción rostro-lateral y, caudalmente, con los dominios de hipotálamo (situado en la línea media) y diencefalo.
- Los precursores hipotalámicos: se disponen caudalmente al dominio prospectivo de ojo y telencéfalo. Sin embargo, al producirse los movimientos morfogenéticos de convergencia y extensión, que transformarán la placa neural en una estructura tridimensional denominada **quilla neural**, estos progenitores migrarán rostralmente, dividiendo el campo de ojo en dos mitades bilaterales y situándose en su posición definitiva dentro del tubo neural (Varga et al 1999).

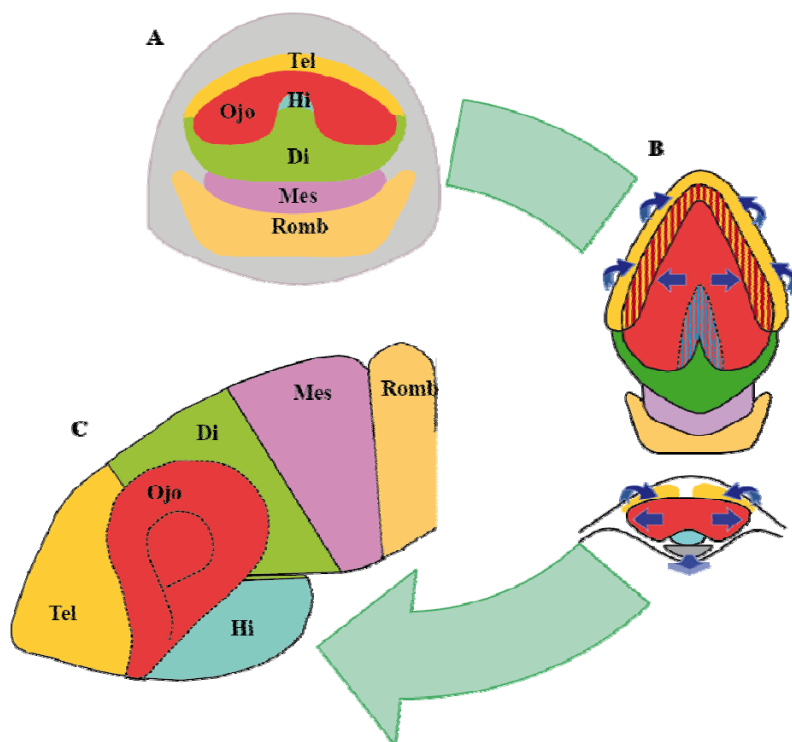


Figura 2. Organización de los territorios de la placa neural. A-C) Representaciones esquemáticas de los dominios del SNC en diferentes estadios del desarrollo. Durante la gastrulación (A) los precursores de los territorios neurales se sitúan en distintas posiciones a lo largo de los ejes antero-posterior y próximo-distal. Con los movimientos de convergencia y extensión, a finales de la gastrulación (B), los precursores convergen hacia la línea media de forma que los que ocupaban inicialmente las posiciones más distales en la PN quedan localizados ahora más dorsalmente. Además los progenitores hipotalámicos, guiados por señales provenientes del mesodermo precordial, migran anteriormente provocando la separación del campo morfogenético de ojo y la evaginación de las vesículas ópticas. Las flechas azules esquematizan los movimientos morfogenéticos descritos. De esta forma los diferentes territorios neurales adquieren su posición definitiva dentro del embrión (C).

- El dominio de precursores diencefálicos: se localiza en la porción más posterior de la PNA, limitando caudalmente con el prospectivo mesencéfalo, pero aún no está claro hasta que punto están especificadas sus distintas subdivisiones y que posición ocupen dentro de la PNA. No obstante, se sabe que los progenitores de la porción más posterior del diencefalo (p1) se sitúan

caudalmente a los de la región adyacente (p2). Además, dentro de estos territorios, los precursores de porciones más dorsales, se posicionan caudalmente a los que darán lugar a los núcleos más ventrales (Russek-Blum et al 2009).

De esta forma, se consigue codificar, dentro de una estructura bidimensional, la posición que ocuparán los diferentes territorios del SNC.

1.2. Mecanismos moleculares implicados en la especificación de la placa neural anterior

El desarrollo embrionario está organizado por la actividad combinada de una serie de vías de señalización y de FT, que se utilizan de forma repetitiva a lo largo del mismo, especificando progresivamente las diferentes estructuras embrionarias. En este apartado revisaremos las principales vías y fuentes de señalización implicadas en la especificación temprana de los territorios del SNC, así como algunos de los FT más importantes.

1.2.1. Principales vías de señalización implicadas en el desarrollo del SNC

Los experimentos pioneros de Spemann y Mangold, demostraron que el desarrollo embrionario de los seres vivos está orquestado por una serie de “actividades inductoras” (Spemann & Mangold 1924) propias de determinados tejidos del embrión. A estos tejidos se les denominó como organizadores debido precisamente a su capacidad de instruir a los tejidos circundantes para adoptar un destino determinado (Wolpert 1996). Estudios posteriores demostraron que estas actividades inductoras se debían a diferentes moléculas señalizadoras, secretadas por los organizadores y que recibieron el nombre de, **morfógenos** (Wolpert 1996). Los morfógenos forman gradientes de actividad dentro del embrión, los cuales, su vez, son interpretados por las células a las que proveen de **información posicional** sobre su localización dentro del embrión (Ashe & Briscoe 2006). Existen diferentes familias de morfógenos, pero todas ellas comparten un mismo mecanismo de actuación. Según este, la molécula señalizadora se une a un receptor de las células diana, desencadenando una vía de transducción intracelular que acabará con la regulación transcripcional de genes específicos. El tipo y nivel de actividad de dicha vía de señalización determinará los genes a regular así como sus niveles de transcripción. Entre las familias más comunes de morfógenos se encuentran:

- **La familia de los Wnts:** es una familia de glucoproteínas ricas en cisteínas y consta de al menos 19 miembros en vertebrados. Estas moléculas interactúan con receptores transmembrana de la familia Frizzled (Fz) mediando diferentes vías de transducción (Bovolenta et al 2008; Bovolenta et al 2006; Hoppler & Kavanagh 2007): A) Vía canónica de la β -catenina: la unión del ligando al receptor Fz resulta en la activación de Dishevelled (Dsl) que inhibe la actividad de la enzima 3-glucógeno sintasa quinasa (GSK3). Esto resulta en la acumulación citosólica de β -catenina que, a su vez, se translocará al núcleo interactuando con los factores de transcripción Tcf y promoviendo la expresión de genes diana. B) Vía de la polaridad plaar celular (PCP): promueve cambios en la polaridad y motilidad celular. En esta vía la activación de Dsl resulta

en la activación de la Rho-GTPasa y/o Rac-GTPasa las cuales, a su vez, activan la vía de JNK promoviendo los cambios en el citoesqueleto. C) Vía del calcio: la activación de Fz induce la activación de PLC que media la conversión de IP2 en IP3 y DAG. El IP3 inducirá la liberación de calcio intracelular que activará una serie de proteínas de señalización como la CaM quinasa II, PKC, calcineurina y NF-AT.

- **Familia HedgeHog:** se conocen al menos 3 homólogos en vertebrados: Sonic Hedgehog (Shh), Indian hedgehog (Ihh) y Desert hedgehog (Dhh). De estos, el primero es el que ejerce el mayor número de funciones descritas en el desarrollo del SNC. Estas moléculas se unen al receptor transmembrana Patched. (Ptc). En ausencia de ligando, Ptc reprime a la proteína transmembrana Smoothed (Smo), lo que permite el procesamiento proteolítico de los efectores de la vía, los FT Gli1-Gli3, que se translocan al núcleo reprimiendo la transcripción de genes diana ((Esteve & Bovolenta 2006; Marti & Bovolenta 2002; Sanchez-Camacho et al 2005). Por el contrario, la unión de ligando permite la activación de Smo y esto permite que las proteínas Gli no se procesen proteolíticamente y se transloquen al núcleo en su forma activadora, promoviendo la expresión de los genes diana.
- **Familia del factor de crecimiento fibroblástico (FGF):** consta de alrededor de 20 miembros en vertebrados con multitud de isoformas. Estas proteínas pueden activar un conjunto de receptores de membrana con actividad tirosina quinasa denominados receptores del factor crecimiento fibroblástico (FGFR; (Turner & Grose 2010). La unión del ligando provoca la dimerización del receptor y la activación de 4 vías de señalización clave: Ras-Raf-MAPK, PIK3-AKT, JAK-STAT y PLC γ , resultando en la translocación de determinados factores de transcripción al núcleo, regulando la expresión de genes diana. El gen *Fgf8* es uno de los miembros de esta familia con funciones reconocidas en el desarrollo del cerebro y ojo.
- **La superfamilia del TGF- β :** consta de cerca de 30 miembros en vertebrados distribuidos en diferentes familias, entre las que cabe destacar la del factor de crecimiento transformante (TGF- β), de la activina y de las proteínas morfogenéticas de hueso (BMP). Los receptores de este tipo de proteínas están formados por dos subunidades transmembrana (tipo I y tipo II) que, en ausencia del ligando, se encuentran en estado disociado permaneciendo inactivas (Miyazawa et al 2002; Miyazono et al 2001). La unión del ligando al receptor tipo II provoca la dimerización de las 2 subunidades y la fosforilación del receptor tipo I que, de este modo, pasa a estar en su forma activa. A su vez, el receptor tipo I activado fosforila a las proteínas Smad que son los efectores de la vía y que, finalmente, formarán un complejo capaz de translocarse al núcleo y regular la expresión de genes diana.
- **El ácido retinoico:** es el producto metabólico de la vitamina A, que se convierte a ácido retinoico a través de una ruta biosintética que implica las actividades enzimáticas de la retinol deshidrogenasa y de la retinaldehído deshidrogenasa. El ácido retinoico puede atravesar las membranas celulares y unirse directamente a la Proteína de Unión a Ácido Retinoico Celular

(CRABP), localizada en el citosol de la célula diana. Este complejo ligando- receptor entrará en el núcleo donde el ácido retinoico podrá unirse a receptores específicos (RAR y RXR, revisado en (Maden 2007), permitiendo su heterodimerización y formando un complejo transcripcional que reconoce una secuencia específica de ADN, conocida como elemento de respuesta a ácido retinoico (RARE).

Aunque presentado de forma simplificada, este resumen pone de manifiesto la complejidad de los mecanismos de acción de los morfógenos mencionados. Además, hay que considerar que dichas moléculas señalizadoras pueden activar simultáneamente diferentes vías de señalización de forma dependiente del contexto celular sobre el que estén actuando y que existen relaciones de regulación recíproca entre las vías de señalización de los diferentes tipos de morfógenos, lo que hace aún más difícil descifrar cómo estas moléculas puedan llevar a cabo sus funciones *in vivo*.

1.2.2. *Vías de señalización en el desarrollo temprano del SNC*

La especificación del tejido nervioso comienza gracias a la actividad de un centro organizador (denominado escudo en peces, labio dorsal del blastoporo en anfibios y nodo o línea primitiva en aves y mamíferos) situado en la porción dorsal del embrión y al cual nos referiremos con el nombre de organizador primario (Wilson & Houart 2004). Éste secreta moléculas, como Cordinina y Nogina, que antagonizan la actividad de BMPs, provenientes de la porción ventral del embrión y que especificaría las células hacia un destino de ectodermo no neural (**Fig. 3A**). También han sido implicadas en este proceso las vías de señalización de FGF y Wnt (Lallier & DeSimone 2000; Slack & Tannahill 1992; Stern 2002). La actividad conjunta de estas vías de señalización resulta en la especificación del tejido neural ya en estadios de gastrulación, cuando comienza la expresión de los primeros marcadores neurales como *Sox2* y *Sox3* (Papanayotou et al 2008; Rogers et al 2009; Wills et al 2010). Este tejido neural presenta inicialmente carácter anterior, pero será sucesivamente regionalizado gracias a la actividad de diversos centros organizadores y del propio organizador primario.

Hay que tener en cuenta, sin embargo, que, concomitantemente a la especificación del neuroectodermo, se está formando, debido a los movimientos de **gastrulación**, el futuro mesodermo embrionario (Kodjabachian et al 1999); (Camus et al 2000; Keller et al 1992), el cual avanzará en sentido rostral por debajo del ectodermo neural (**Fig. 2b y 3B**). Además, el progreso de la **epibolia** irá elongando el embrión en dirección caudal (Wilson & Houart 2004). Todos estos procesos son muy importantes a la hora de entender la actividad de los centros organizadores que van a especificar los diferentes territorios neurales. Por ejemplo, el propio organizador primario, tras la inducción del tejido neural, cambiará su actividad, pasando a ser una fuente de señales caudalizantes (Wilson & Houart 2004). Éstas se mantendrán alejadas de las porciones anteriores de la placa neural gracias a que los movimientos de epibolia-gastrulación desplazarán el organizador primario de su posición inicial, creando un gradiente de actividad postero- anterior de dichas moléculas (**Fig. 4B**).

Así pues, en relación con la placa neural anterior y, posteriormente, en el tubo neural en desarrollo pueden distinguirse una serie de fuentes de señalización (Wilson & Houart 2004):

- El **borde neural anterior**, situado en la porción más anterior del borde entre ectodermo neural/no neural, libera moléculas señalizadoras de la vía de FGF y antagonistas de Wnt, contribuyendo a la especificación rostro-caudal de la PNA (**Fig. 3B**). Posteriormente (**Fig. 4C, C'**), otra importante fuente de FGFs será el ectodermo rostral de la cabeza (Kobayashi et al 2002; Paek et al 2009; Storm et al 2006).
- **Istmo** o Borde Mesencéfalo-Rombencefalo: se sitúa en el límite entre el mesencéfalo y el rombencefalo, orquestando la especificación de estos territorios (**Fig. 4C**). Actúa como una fuente de *Wnt1* y de *Fgf8* (Martinez 2001). La primera, que se expresa también en la porción del techo del mesencéfalo y en una fina banda ventral por delante del organizador ístmico, actúa como un factor caudalizante reprimiendo la expresión de marcadores prosencefálicos como *Six3* (Braun et al 2003; Lagutin et al 2003). Otra importante fuente de señalización Wnt es el diencéfalo, donde encontramos altos niveles de *Wnt8b* el cual promueve destinos prosencefálicos caudales (diencéfalo) a consta de territorios más rostrales (Kim et al 2007; Kim et al 2002; Lako et al 1998).
- **Zona Limitans intratálmica** (ZLI): es una estrecha franja situada entre el pretálamo y el tálamo dorsal (**Fig. 4C**) que actúa como una fuente de Sonic Hedgehog (Shh), el cual va a contribuir a la especificación de los territorios diencefálicos (Ishibashi et al 2005; Scholpp et al 2006; Vieira & Martinez 2006; Zeltser 2005).
- **Placa del suelo** (PS): constituye la porción más ventral del tubo neural (**Fig. 4C**). Actúa como una fuente de Shh que organiza la especificación próximo-distal y dorso-ventral de los territorios prosencefálicos (Ekker et al 1995).
- **Mesodermo de la placa precordial** (MPP): se forma por debajo de la placa neural a partir de los derivados tempranos del organizador primario (**Fig. 3B, C**) y, conforme avanza la gastrulación, irá migrando rostralmente, actuando como una fuente de moléculas anti-caudalizantes, como FGFs y antagonistas de la vía de Wnt, que protegen a la PNA de las señales provenientes del OP (Feldman et al 2000; Feldman & Stemple 2001; Gritsman et al 1999; Wilson & Houart 2004). Otras moléculas señalizadoras secretadas por el MPP son Nodal y Hedgehog (Hh). Éstas son necesarias para la inducción y especificación D-V del territorio hipotalámico (Sbrogna et al 2003). Además, se ha demostrado que la señalización de Nodal dirige el movimiento rostral de los progenitores hipotalámicos e interviene en el establecimiento de la asimetría izquierda-derecha del cerebro (Camus et al 2000).
- En estadios tempranos el **ectodermo no neural** es una importante fuente de BMPs (**Fig. 4B**) que actúan como inhibidores del destino neural y contribuyen a especificar el borde ectodermo neural/ no neural (McCollum et al 2007; Patthey et al 2009; Rhinn et al 2006; Yaguchi et al 2006). Más adelante el ectodermo de la cabeza es una fuente de señales como BMP y TGF

(Furuta & Hogan 1998; Dudley et al 1995; Sanford et al 1997), que intervienen en la especificación de las placodas sensoriales.

En la **Fig. 4** se presenta un esquema de las principales fuentes de señalización descritas en este apartado, así como de las moléculas señalizadoras secretadas.

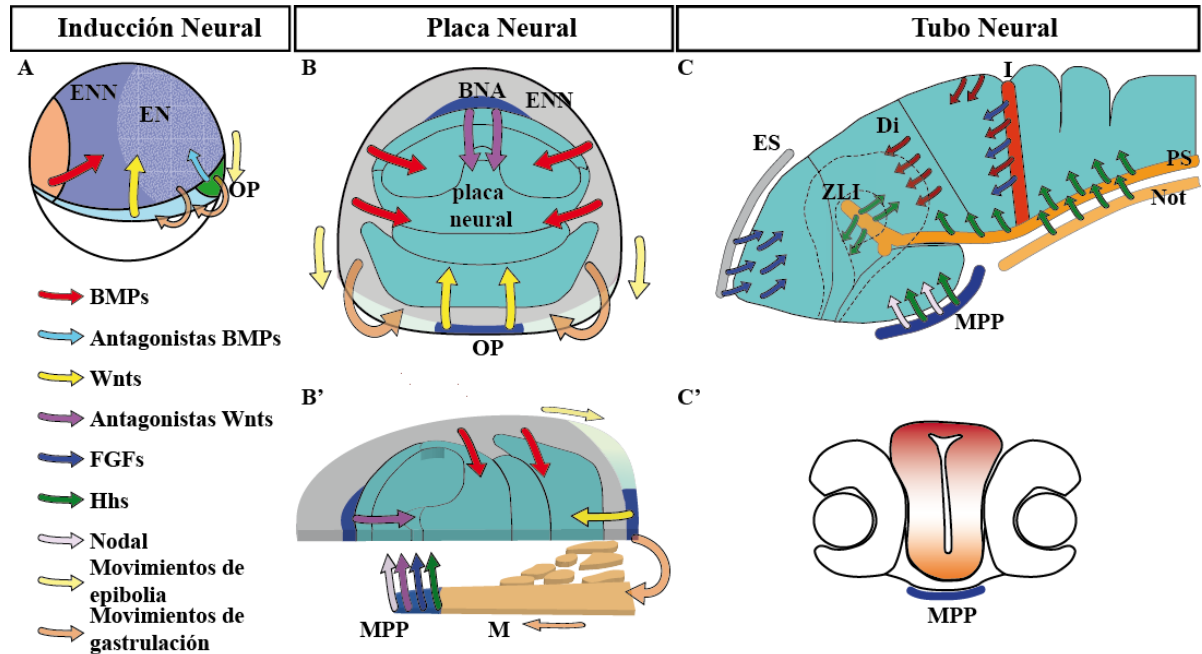


Figura 3. Principales fuentes de señalización durante el desarrollo del SNC de peces. Durante la inducción neural (A) el organizador primario (OP) actúa como una fuente de antagonistas de Wnt (proveniente del **anillo germinal-celeste**) y de BMP (proveniente del organizador del lado ventral del embrión). A medida que progresa la gastrulación (B, B') los movimientos de epibolia alejan el organizador primario, que en estos estadios actúa como una fuente caudalizante (principalmente Wnts), de la futura porción anterior del embrión. Al mismo tiempo, los movimientos de gastrulación sitúan el mesodermo de la placa precordial (MPP) por debajo de la PNA y este actúa como una fuente de FGF, antagonistas de Wnt, Nodal y Hh. Otras importantes fuentes de señalización en este estadio son el borde neural anterior (BNA) y el ectodermo no neural (ENN). El primero es una fuente de FGF y antagonistas de Wnt, mientras que el segundo libera BMP. En estadios más avanzados del desarrollo (C, C') podemos distinguir una serie de centros organizadores que intervienen en la especificación de las diferentes subdivisiones del SNC. Entre estos organizadores destacan la ZLI, la placa del suelo (PS) y la notocorda (Not) que liberan Shh, el Itsmo, (FGF y Wnt), la placa del techo (Wnt), la placa precordial (Shh y Nodal) y el ectodermo superficial de la cabeza -ES-(FGF).

1.2.3. Factores de transcripción y redes génicas en la especificación de territorios prosencefálicos

Las señales de los diferentes morfógenos son interpretadas por las células a través de vías de transducción de señal cuyo nivel de actividad permitirá la expresión diferencial, en el espacio y en el tiempo, de determinados factores de transcripción que, a su vez, determinarán la ejecución de programas de especificación propios de cada tipo celular.

En los últimos años, se han identificado varios FT que intervienen en la especificación de las diferentes estructuras prosencefálicas. La mayoría de estos genes pertenecen a la superfamilia de **genes homeóticos**. La **Fig. 3** y la **Tabla I** resumen algunos de los principales FT implicados en el desarrollo de las regiones prosencefálicas, así como su expresión dentro de la placa y tubo neural. Estos genes se caracterizan por presentar patrones de expresión muy dinámicos y, generalmente,

localizados en territorios concretos, en cuya especificación intervienen.

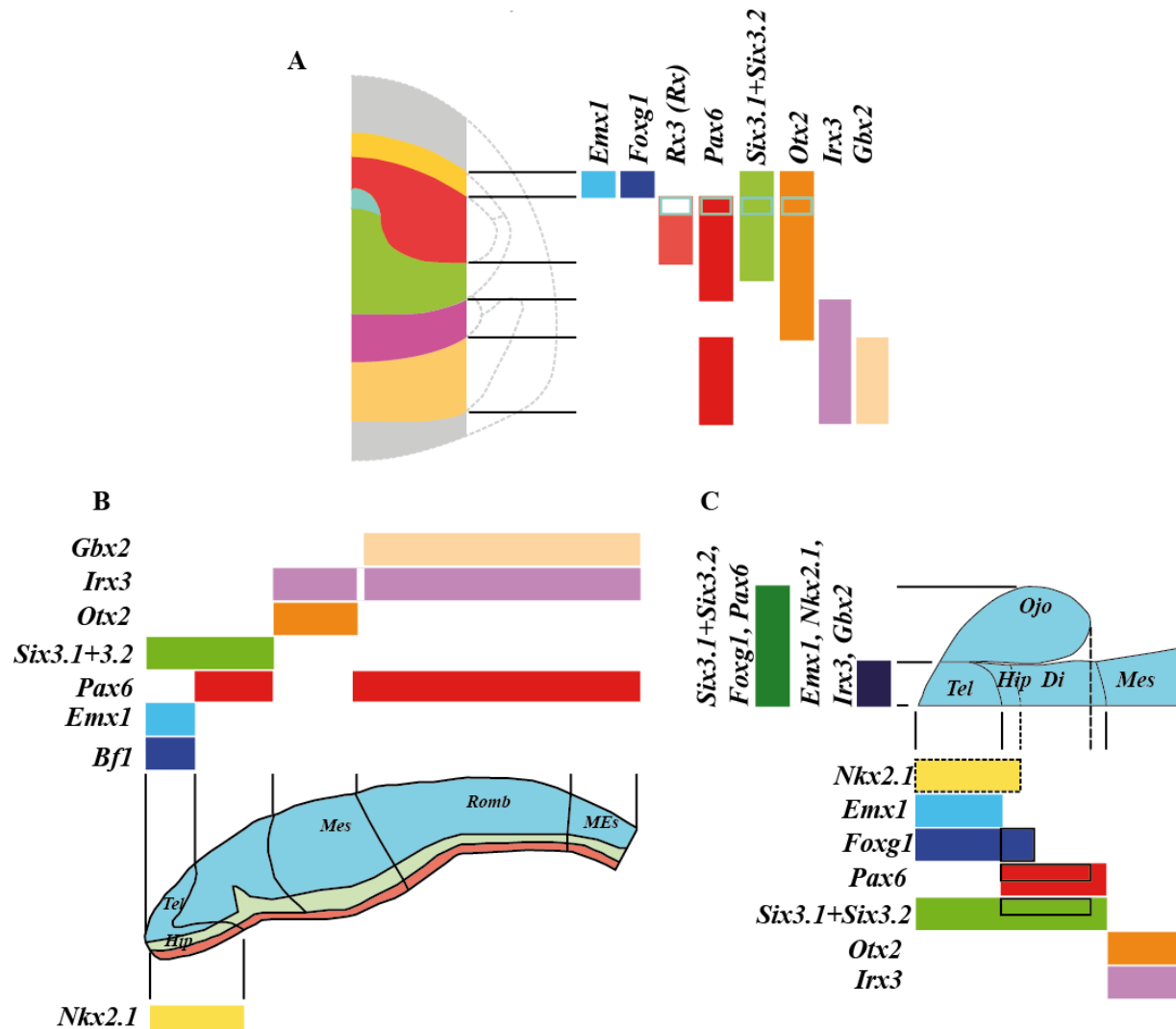


Figura 3. Diferentes FT se expresan de forma combinatoria en el sistema nervioso. A-C) Representaciones esquemáticas de los patrones de expresión de diferentes FT en los dominios de precursores neurales de la PNA (A) o del tubo neural (B, C). Los dominios de expresión de cada gen se representan con barras de colores. El recuadro blanco en A, representa el dominio de expresión hipotalámico de los diferentes genes analizados (un recuadro blanco simboliza que el gen no se expresa en ese dominio). El recuadro con línea discontinua negra en C representa el dominio de expresión hipotalámico (la ausencia de recuadro indica que el gen no se expresa en ese dominio). Los recuadros con línea negra continua representan la expresión del gen correspondiente en el ojo, un medio rectángulo representa que el gen se expresa, además, en el diencéfalo. Nótese que los diferentes territorios prosencefálicos se caracterizan por diferentes combinaciones de FT.

Por tanto, la actividad temprana de las diferentes vías de señalización determinará un patrón burdo de expresión de FT, dibujando un mapa inicial de los diferentes territorios prosencefálicos dentro de la placa neural (**Fig. 3A**). Este patrón inicial, será sucesivamente refinado gracias a relaciones de regulación recíproca entre los diferentes FT, determinando de forma exacta la extensión e identidad de los dominios neurales. A su vez, la expresión combinada de una serie de FT dentro de un determinado dominio (**Fig. 3B,C**). induce la expresión diferencial de otros FT en porciones discretas del mismo, permitiendo la subespecificación progresiva de las estructuras que conformarán el SNC adulto. Hay que considerar además, que la actividad transcripcional de un FT depende, en muchos casos, de la presencia de determinados cofactores dentro del tejido, que influenciarán su capacidad para activar o reprimir distintos conjuntos de genes.

Tabla I: resumen de algunos de los principales FT implicados en la especificación de territorios prosencefálicos y de los defectos ocasionados por su falta de función

Gen	Defectos de la falta de función	Referencias
<i>Six3</i>	Pérdida de estructuras del prosencéfalo secundario. Especificación aberrante del diencéfalo.	(Lagutin et al 2003; Lavado et al 2008)
<i>Otx2</i>	Pérdida del prosencéfalo	(Tian et al 2002)
<i>Pax6</i>	Pérdida de los ojos, y bulbo olfatorio. Especificación aberrante del diencéfalo y eje hipotálamo- telencéfalo.	(Stoykova et al 1996)
<i>Bfl</i>	Hipoplasia del telencéfalo y pérdida de estructuras telencefálicas tempranas. Anomalías oculares.	(Martynoga et al 2005)
<i>Emx1</i>	El doble mutante <i>Emx1/2</i> presenta afectaciones en estructuras telencefálicas dorsales.	(Yoshida et al 1997)
<i>Rx</i>	Anoftalmia y ausencia de la neurohipófisis	(Huang et al 2010)
<i>Nkx2.1</i>	Ausencia de pituitaria, defectos en hipotálamo y derivados basales del telencéfalo,	(Marin et al 2002)
<i>Irx3</i>	Reducción del rombencéfalo y mesencéfalo, extensión caudal del prosencéfalo.	(Braun et al 2003; Rodriguez-Seguel et al 2009)
<i>Gbx2</i>	Defectos en rombencéfalo y expansión del mesencéfalo. Alteración del organizador ístmico y sus derivados	(Millet et al 1999)

Por otra parte, algunos de los genes mencionados son capaces de controlar la expresión de uno o varios morfógenos, estableciendo bucles de retroalimentación (positiva o negativa) que juegan un papel esencial en el desarrollo. Por ejemplo, se ha visto que el gen *Six3* es capaz de reprimir directamente la expresión de moléculas señalizadoras como *BMP4*, *Wnt1* y *Wnt8b* (Gestri et al 2005; Lagutin et al 2003; Liu et al 2010) y, a su vez, las vías de señalización de Wnt y BMP reprimen la expresión de *Six3* (McCollum et al 2007); (Braun et al 2003). Estas regulaciones mutuas intervienen, respectivamente, en la consolidación de los destinos de ectodermo neural y ectodermo no neural, y en la especificación antero-posterior de las estructuras prosencefálicas. *Foxg1* y *Fgf8* constituyen otro ejemplo ya que se ha visto que *Fgf8* induce la expresión de *Foxg1* en el telencéfalo y viceversa, permitiendo la correcta especificación de los territorios telencefálicos (Paek et al 2009; Storm et al 2006). Además, se ha visto que la respuesta de un tejido a la señalización de los morfógenos depende, en parte, del conjunto de FT expresados por el mismo. Por ejemplo, los FT *Six3* e *Irx3*, expresados en dominios excluyentes del tubo neural, condicionan la respuesta del tejido a la señalización de FGF, permitiendo la expresión diferencial de genes diana en sus respectivos territorios (Kobayashi et al 2002).

1.3. Aproximación al estudio de las redes transcripcionales

El estudio de las redes transcripcionales resulta difícil de abordar a través de las técnicas empleadas clásicamente, que solo permiten afectar la función de un número reducido de genes. Sin embargo, en los últimos años, se han desarrollado aproximaciones basadas en la identificación de elementos reguladores dentro del genoma, así como de los factores que se unen a dichos elementos para controlar la expresión génica (Fredman et al 2009b). Esto ha sido posible, en parte, gracias a la secuenciación de los genomas de especies pertenecientes a distintos linajes evolutivos, a la ingente cantidad de información acerca de los perfiles de expresión génica y al avance en las metodologías experimentales que permiten el estudio de los mecanismos de regulación transcripcional.

En este apartado se introducen los conceptos básicos de la regulación génica y se definen diferentes niveles de estudio a la hora abordar la cuestión del control transcripcional de un gen. Así mismo se presentará el modelo de estudio empleado en este trabajo

1.3.1. Anatomía de un gen: regiones no codificantes reguladoras

Además de la región que dará lugar al producto de transcripción, existen secuencias reguladoras que pueden estar localizadas en cualquier extremo del gen, o incluso dentro de este. Estas secuencias se conocen genéricamente con el nombre de elementos reguladores en *cis*, en contraposición con las proteínas que se unen a ellas controlando la expresión espacio- temporal del gen y que se denominan elementos o factores reguladores en *trans*. Existen diferentes tipos de secuencias reguladoras en *cis*:

- El **promotor basal**: se define de forma general como la mínima secuencia de ADN suficiente para iniciar la transcripción de un gen y es la región diana donde se ensamblará un complejo transcripcional formado por la RNA polimerasa II (en el caso de genes que codifican ARNm) y una serie de otros FT que permiten la estabilización del complejo y la iniciación de la transcripción (Baumann et al 2010; Juven-Gershon & Kadonaga 2010). Entre estos factores se encuentran proteínas adaptadoras que permiten la interacción de dicho complejo transcripcional con otros FT unidos a secuencias de ADN localizadas bien en las proximidades del promotor mínimo, bien a grandes distancias del sitio de inicio de la transcripción. Existen diferentes tipos de promotores para los genes que codifican ARNm, pero la mayoría de ellos suelen estar contenido en una pequeña franja de ADN de hasta 100pb localizada en las inmediaciones del sitio de inicio de la transcripción (Baumann et al 2010).
- **Potenciadores (enhancers)**: son secuencias de ADN que activan la utilización de un promotor controlando la eficiencia y el nivel de actividad transcripcional del mismo. Estas regiones pueden activar promotores de genes localizados incluso a grandes distancias dentro del cromosoma (**Fig. 5**) y pueden localizarse 5' o 3' del locus génico así como dentro de los intrones del mismo o en la propia cadena complementaria de la región transcrita del gen (Heintzman et al 2009; Riethoven 2010); (Williams et al 2010). Durante la década de los 90 han emergido una

serie de generalizaciones que ponen en relieve la importancia de estos potenciadores en el control de la expresión génica diferencial:

- La mayoría de los genes requieren de potenciadores para su transcripción.
 - Los potenciadores son el principal determinante de la transcripción diferencial de un gen en el espacio y en el tiempo.
 - Los potenciadores pueden actuar de forma combinatoria: un gen dado puede estar regulado por varios potenciadores y, al mismo tiempo, un potenciador puede controlar la expresión de varios genes (**Fig. 5A**). Además, diferentes elementos reguladores pueden actuar de forma sinérgica para controlar la expresión de genes diana (Maeda & Karch 2011).
 - La transcripción es regulada por una interacción de factores de transcripción unidos al potenciador y el complejo de transcripcional localizado en el promotor basal del gen. Un potenciador suele contener secuencias de reconocimiento para múltiples factores de transcripción.
- **Silenciadores:** son secuencias de ADN que inhiben la utilización de un promotor (Riethoven 2010).
 - **Aisladores:** son secuencias de ADN que limitan el rango de actividad de los potenciadores/silenciadores (Riethoven 2010). Así mismo también pueden impedir que regiones de heterocromatina adyacentes acaben reprimiendo a los genes que deben mantenerse transcripcionalmente activos. Aunque se sabe poco acerca de los mecanismos de actuación de estos aisladores en vertebrados, se ha propuesto que estos podrían contribuir al establecimiento de dominios estructurales dentro de la cromatina (Dillon 2006), (Amouyal 2010a; b), permitiendo que regiones inicialmente alejadas en el genoma quedasen en las condiciones de proximidad adecuadas para que diferentes elementos reguladores en *cis* pudiesen interactuar (**Fig. 5B**). Así mismo, el establecimiento de estos dominios protegería a los genes contenidos en ellos del efecto de secuencias reguladoras situadas en regiones adyacentes y de los efectos de posición de la cromatina circundante.

Típicamente el concepto de *locus* génico y de sus límites ha estado asociado a la secuencia de ADN capaz de ser transcrita activamente y de llevar a cabo una función biológica. Sin embargo, el descubrimiento de los elementos reguladores mencionados anteriormente y del impacto que estos pueden ejercer sobre la función génica está cambiando esta noción inicial hacia un nuevo modelo en el que el gen se entiende como una entidad funcional (Alonso et al 2009). Por tanto, en esta nueva concepción el locus génico incluiría también las regiones reguladoras responsables de la correcta expresión del gen, lo cual hace que sus límites se extiendan enormemente y resulte mucho más difícil trazar fronteras donde un gen acaba y empieza otro (Alonso et al 2009). En particular, los genes implicados en procesos de desarrollo suelen presentar regiones reguladoras más extensas que la de

otros genes (Nelson et al 2004), probablemente en relación con la complejidad de sus patrones de expresión.

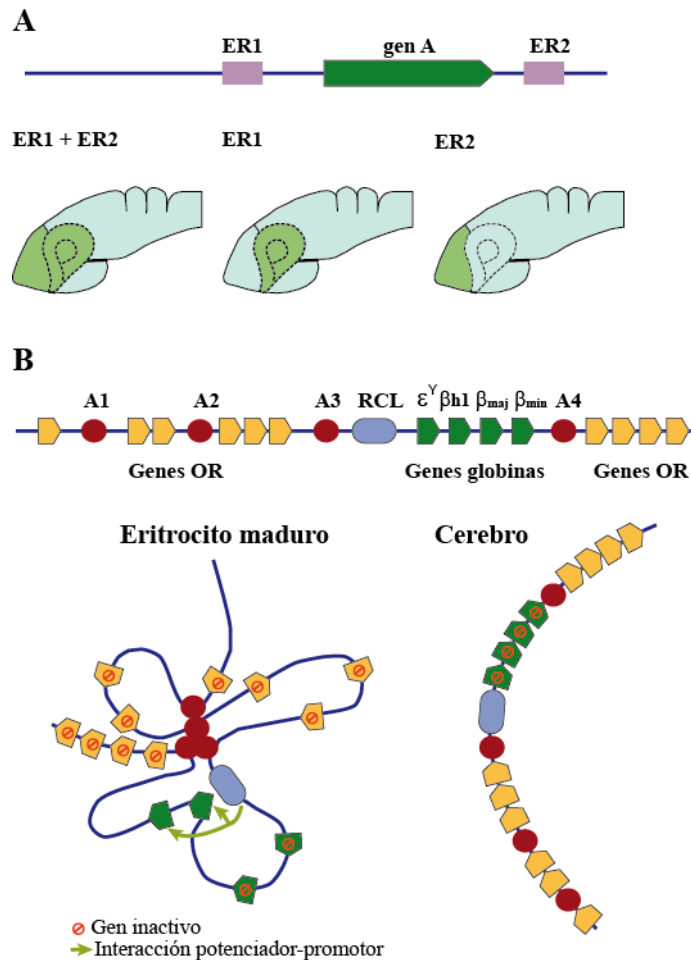


Figura 5. Control de la expresión génica por elementos reguladores en cis. A) Representación esquemática de un hipotético gen cuya transcripción es regulada por dos potenciadores (ER1 y ER2) situados 5' y 3' a la región transcrita del gen y que dirigen la expresión del mismo al ojo y al telencéfalo respectivamente. B) Representación esquemática de la región cromosómica de ratón que contiene los genes de las globinas. Estos genes se expresan en los eritrocitos maduros durante el desarrollo embrionario (ϵ^Y y $\beta H1$) o en el individuo adulto (β_{maj} , β_{min}) y su transcripción está controlada por una región de control del locus (RCL) situada 5' al cluster. Estos genes están contenidos a su vez dentro del cluster de los genes de receptores de odorantes (OR). En esta región genómica se localizan diversos elementos aisladores (A1-A4). En los eritrocitos maduros de individuos adultos los elementos aisladores, mediante la unión de CTCF, permiten la formación de bucles en la cromatina que acercan la RCL a los genes β_{maj} y β_{min} permitiendo su transcripción. Los genes de receptores de odorantes se encuentran reprimidos pero dicha inhibición no es capaz de superar las barreras impuestas por los aisladores. En el cerebro, los elementos aisladores A3 y A4 no interaccionan lo que provoca que la RCL no pueda interaccionar con sus genes diana.

1.3.2. Predicción de factores reguladores de la expresión génica

Debido a la complejidad del control transcripcional de un gen resulta difícil caracterizar en detalle sus elementos reguladores. Conceptualmente, podemos discriminar tres niveles en el estudio de la regulación transcripcional:

- Identificación de la región reguladora proximal de un gen: consiste en aislar la región 5' al sitio de inicio de la transcripción del gen cuya tamaño varía entre las 500pb y las 10kb. Esta región es sucesivamente testada en experimentos de transgénesis *in vivo* para ver si recapitula el patrón de expresión génica, o bien es empleada para validar putativos factores reguladores mediante diferentes técnicas experimentales como los ensayos de activación transcripcional, ensayos de retraso de banda en gel (EMSA), inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) etc..
- Identificación de regiones reguladoras localizadas en regiones distales: En muchos casos, los elementos reguladores de un gen pueden encontrarse a grandes distancias del sitio de inicio de la transcripción. En estos casos, dichos elementos pueden ser identificados mediante programas de

predicción *in silico*. Este abordaje se basa en que los sitios de unión de distintos FT tienden a agruparse en regiones discretas del ADN formando módulos de un tamaño relativamente pequeño (desde aproximadamente 100pb hasta pocas kb). Dichos módulos, debido a su relevancia funcional, permanecen relativamente conservados con respecto a las regiones de ADN adyacentes y pueden ser identificados mediante programas de alineamientos específicos. A este tipo de predicciones se les conoce como análisis de **huella filogenética**.

Además, existen programas de predicción *in silico* que determinan la presencia de sitios de unión (SU) putativos para factores de transcripción dentro de una secuencia de ADN determinada. Sin embargo, este procedimiento suele resultar en un gran número de falsos positivos. Es necesario, por tanto, confrontar este tipo de análisis con la información de huella filogenética para la región de ADN en estudio, para determinar cuáles de esos SU putativos están evolutivamente conservados, y, por tanto, mejores candidatos a desempeñar un rol funcional.

- Análisis de grandes dominios de regulación transcripcional: la expresión de uno o varios genes puede estar controlada por múltiples secuencias reguladoras y hemos visto como la actividad de elementos aisladores contribuye al establecimiento de dominios estructurales y funcionales en la cromatina. Sin embargo, la complejidad de estos dominios de regulación hace difícil su caracterización. Una de las técnicas que más han permitido progresar en el estudio de este tipo de procesos es la captura de conformación de cromatina (CCC o 3C;). Esta técnica permite detectar la interacción entre diferentes regiones del genoma, basándose en el hecho de que su interacción acerca secuencias de ADN que, de otra forma, estarían localizadas en posiciones muy alejadas del cromosoma (Vassetzky et al 2009). Además, existen herramientas informáticas para la predicción de elementos aisladores basados en la búsqueda de SU para CTCF, un FT que reconoce secuencias específicas dentro del ADN y modela la cromatina a través de múltiples mecanismos (Ohlsson et al 2010). Además, el análisis comparativo de grandes regiones cromosómicas entre múltiples especies (análisis sinténico) permite determinar agrupaciones de genes que se han mantenido estables a lo largo de los diferentes linajes evolutivos, lo que podría indicar una relación funcional en la regulación de dichos genes (Fredman et al 2009a; Navratilova et al 2009).

En conclusión, la comprensión de los mecanismos de regulación transcripcional requiere de la combinación de diferentes tipos de aproximaciones experimentales, tanto *in silico* como *in vivo*, con el fin de identificar los elementos reguladores de un gen y entender su funcionalidad dentro del organismo.

1.3.3. El medaka como modelo experimental para el estudio de la regulación génica

En los últimos años, la secuenciación de los genomas de diferentes especies de peces teleósteos y el avance en las técnicas de transgénesis han contribuido a establecer estas especies, y en particular el pez cebra y el pez medaka, como potentes herramientas para el estudio de la regulación transcripcional (Grabher & Wittbrodt 2007; Kawakami 2007; Korzh 2007; Takeda & Shimada

2010). El pez medaka es un pez teleósteo de agua dulce proveniente del este asiático. Tras la fecundación externa, la hembra pone de 20 a 30 huevos que se quedan anclados externamente al vientre materno. Los huevos se desarrollan durante un periodo de 10 días tras los cuales la larva del pez eclosiona. Tras pasar por una serie de estadios larvarios, el pez se desarrolla en un individuo adulto reproductivo. El pez medaka presenta una serie de características que lo hacen particularmente útil como modelo experimental:

- El desarrollo es externo y tanto el huevo como el embrión son transparentes, lo que permite visualizar fácilmente el desarrollo embrionario. Además existen descripciones detalladas de los diferentes estadios de desarrollo (Iwamatsu 2004).
- Ciclo de vida rápido: en condiciones óptimas estos peces tardan sólo dos meses en llegar a la edad reproductiva.
- Fácil de criar y de mantener: son más resistentes que otras especies como el pez cebra. El pez medaka aguanta temperaturas de entre 4 y 40°C, pudiendo utilizar este parámetro para controlar la velocidad con la que se desarrollan los huevos. Además, se puede controlar el momento diario de apareamiento mediante ciclos de luz/oscuridad y los peces pueden cruzarse de forma continua.
- Alta eficiencia de transgénesis.
- Actualmente se dispone de la secuencia completa del genoma, que tiene aproximadamente 700 millones de pares de bases (Ahsan et al 2008). Este tamaño supone la mitad del genoma del pez cebra, lo cual facilita el análisis de secuencias reguladoras conservadas.
- Gran diversidad de líneas mutantes estables.

Tabla II: resumen comparativo de las principales ventajas del pez medaka y el pez cebra como modelos experimentales para ensayos de transgénesis.

	Pez Medaka	Pez cebra
Eficiencia de transgénesis	+++	++++
Desarrollo visible	Si	Si
Tiempo de desarrollo (hasta eclosión)	10 días	2-3 días
Control del desarrollo por T^a	+++	+
Tamaño del genoma	700Mb	1505Mb
Proporción duplicaciones génicas	+	++

En resumen, los peces constituyen un excelente sistema modelo para llevar a cabo estudios de control de la expresión génica. Sin embargo, el genoma compacto y el menor número de duplicaciones génicas del pez medaka en comparación con el pez cebra, constituyen importantes ventajas a la hora de emplearlo en estudios de control transcripcional.

1.4. El gen *Six3* en la especificación y desarrollo de las estructuras prosencefálicas

El gen *Six3* es un FT, perteneciente a la familia *Six* de genes homeóticos, que participa en la especificación de los territorios prosencefálicos. Esta familia debe su nombre a su miembro fundador, el gen *Sine oculis* de *Drosophila*. Sus miembros presentan un dominio característico, el dominio Six (DS), responsable de la interacción con otros cofactores (como es caso de los correpresores transcripcionales Groucho), y un homeodominio (HD), adyacente al primero (**Fig. 6A**), con características estructurales particulares que son responsables de la especificidad de unión al ADN y que los distinguen de otros HD (Kawakami et al 2000; Seo et al 1999). El extremo amino-terminal y carboxilo-terminal, en cambio, presentan menor conservación dentro de la familia (Weasner & Kumar 2009). De los seis componentes que integran la familia *Six/Sine oculis*, solo dos, *Six3* y *Six6*, se expresan durante el desarrollo del sistema nervioso (revisado en (Kawakami et al 2000). Estos dos genes constituyen un subgrupo específico dentro de la familia y presentan una inserción de cuatro aminoácidos, VAP(G/A), en el DS que los distingue del resto de miembros (Kawakami et al 2000). Además, se sabe que el dominio carboxilo de *Six3* y *Six6* consta de varias regiones que les proporcionan propiedades funcionales específicas.

Se ha descrito que *Six3* lleva cabo diversas funciones, dependientes e independientes de su actividad transcripcional. En el primer caso, se sabe que *Six3* puede interaccionar una gran variedad de cofactores (Fougerousse et al 2002; Laflamme et al 2003; Lopez-Rios et al 2003; Tessmar et al 2002), pudiendo ejercer tanto de represor como de activador transcripcional (**Fig. 6B**). Además, *Six3* interacciona con elementos remodeladores de la cromatina como MTA1 y HDAC2 (Manavathi et al 2007), diversificando aún más su multiplicidad de funciones. Además, *Six3* puede reconocer distintas secuencias dentro del ADN. Por ejemplo, es capaz de unirse a la secuencia TAAT (común a los genes homeobox), aunque parece que otras posiciones, fuera de este núcleo consenso sean importantes para determinar la especificidad de reconocimiento (Berger et al 2008; Zhu et al 2002), así como a la secuencia consenso TGATAC, característica de los miembros de la familia *Six* (Kawakami et al 1996; Suh et al 2010). Alternativamente, se han descrito secuencia de reconocimiento alternativas, como el motivo AACTCATTTT, presente en un potenciador del gen *Shh* (Jeong et al 2008). Es posible que tanto la interacción con otros cofactores como el contexto genómico circundante a estas secuencias jueguen un papel en la especificidad de reconocimiento de *Six3*. Por último, *Six3* puede actuar de forma independiente de transcripción, interaccionando con el inhibidor de la replicación celular Geminina (**Fig. 6C**) para controlar el balance entre proliferación y diferenciación (Del Bene et al 2004).

Se han encontrado homólogos de *Six3* en prácticamente todos los linajes evolutivos, desde cnidarios hasta vertebrados, y siempre en relación con la especificación de estructuras neurales (Bovolenta et al 1996; Bovolenta et al 1998; Conte et al 2005; Jean et al 1999; Lopez-Rios et al 1999; Oliver et al 1995; Pineda & Salo 2002; Seo et al 1998a; Seo et al 1998b; Suh et al 2010; Wei

et al 2009; Zhou et al 2000). En ratón *Six3* se expresa desde estadios muy tempranos en la PNA, interviniendo en la especificación de estructuras prosencefálicas anteriores (Lagutin et al 2003; Oliver et al 1995). Posteriormente, su expresión se mantiene en telencéfalo, ojo, hipotálamo y pretálamo, en línea con el fenotipo presentado por los ratones nulos de *Six3*, en los cuales las estructuras prosencefálicas anteriores no se forman (Lagutin et al 2003; Lavado et al 2008), y con la etiología de las mutaciones encontradas en humanos, donde la falta de función de *Six3* resulta en holoprosencefalia asociada a microftalmia colobomatoso, atelencefalia o sinencefalia e hipopituitarismo (Cohen 2006; Gaston-Massuet et al 2008; Gaston-Massuet et al 2009; Lacbawan et al 2009; Leppert et al 1999; Pasquier et al 2005; Ribeiro et al 2006; Wallis et al 1999). Además, también se ha descrito un papel de *Six3* en la especificación de los territorios diencefálicos y del hipotálamo (Inbal et al 2007; Lavado et al 2008), así como en la especificación de subtipos celulares (células horizontales y amacrinas; (Fuhrmann et al 2009; Inoue et al 2002) de la retina y en la formación de la lente (Liu et al 2006).

Gran parte de los fenotipos atribuidos a la falta de función de *Six3* se han explicado en base a su capacidad de regular directamente la expresión de diversas moléculas señalizadoras como *Wnt1*, *Wnt8b*, *BMP4*, *Shh* y *Nodal* (Gestri et al 2005; Inbal et al 2007; Jeong et al 2008; Lagutin et al 2003; Liu et al 2010) y se ha descrito que la sobreexpresión de *Six3* induce la formación de ojos ectópicos, de forma dependiente de su actividad como represor transcripcional mediante la interacción con los cofactores Groucho; (Kobayashi et al 2001; Kobayashi et al 1998; Loosli et al 1999; Lopez-Rios et al 2003; Zhu et al 2002). Sin embargo, los genes dianas de *Six3* y los mecanismos por los cuales este gen contribuye a la especificación de los diferentes territorios prosencefálicos, así como los factores que controlan su expresión siguen estando, en gran parte, desconocidos.

1.4.1. Organización genómica del gen *Six3*

El gen *Six3* se localiza en el cromosoma 2 (Cr2p21). Deleciones de esta región están asociadas con holoprosencefalia, de forma similar a lo descrito para la mutación del gen *Six3* en humano (Geng et al 2008; Granadino et al 1999; Ribeiro et al 2006). Por el contrario duplicaciones de esta región se han asociado frecuentemente a defectos oculares, hipertelorismo y retraso mental, aunque no ha sido demostrada una relación directa entre estas anomalías y la duplicación del gen *Six3* (Al-Saffar et al 2000; Megarbane et al 1997). En este trabajo se presenta un análisis más extenso de la región cromosómica que contiene el gen *Six3*, demostrando que presenta una estructura sinténicamente conservada a lo largo de los distintos linajes evolutivos de vertebrados. En todas las especies de peces teleósteos, debido a la duplicación genómica ocurrida ancestralmente en este linaje encontramos dos parálogos del gen *Six3* de mamíferos. Sin embargo, la estructura genómica de la región cromosómica de humano se mantiene altamente conservada para, al menos, una de las dos duplicaciones, sugiriendo que podrían existir relaciones funcionales que justificasen dicha organización cromosómica, tal y como se discute más adelante.

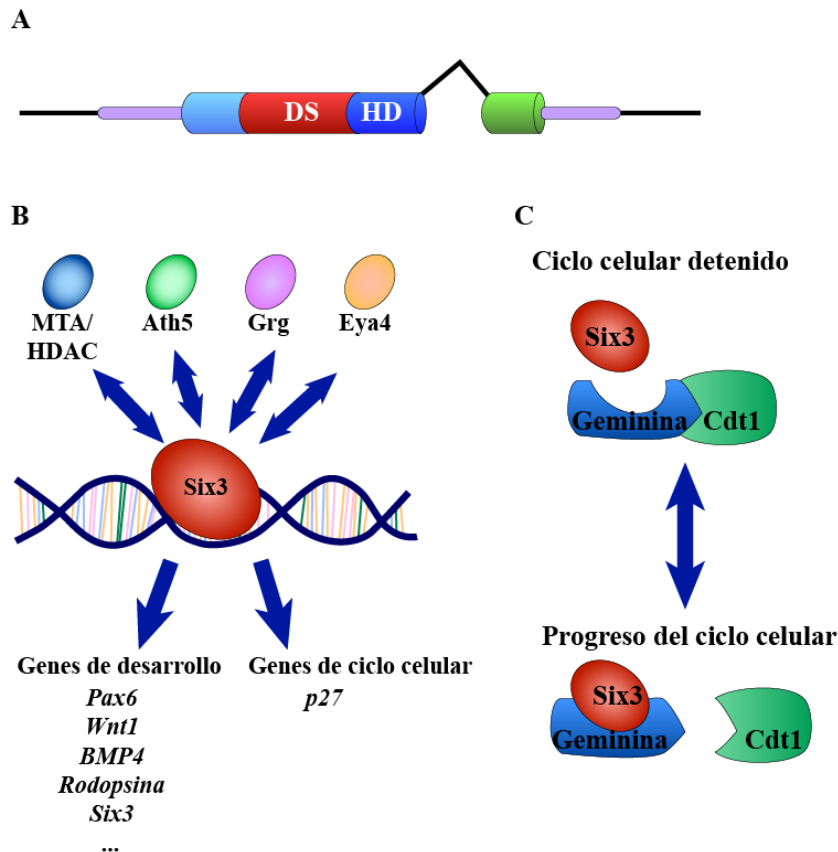


Figura 6. Estructura y función del gen *Six3*. A) Representación esquemática del locus del gen *SIX3* humano. Las secuencias codificantes se representan como cilindros de colores, mientras que las regiones 5' y 3' no traducidas con una línea morada. Las regiones genómicas flanqueantes al locus y del intrón se representan con una línea negra. Los dominios amino y carboxilo se representan respectivamente en celeste y verde; DS: dominio Six; HD: homeodominio. B-C) *Six3* puede actuar de forma dependiente o independiente de transcripción. En el primer caso (B) interacciona con distintos cofactores, otros FT y elementos remodeladores de la cromatina para regular la transcripción de genes de desarrollo y genes implicados en ciclo celular. Por otra parte, *Six3* interacciona con Geminina, permitiendo la liberación de Cdt1 y la progresión del ciclo celular (C).

1.4.2. El gen *Six3* en el pez medaka

El genoma del pez medaka presenta dos parálogos del gen *Six3* de mamíferos, denominados *Six3.1* y *Six3.2* (Conte & Bovolenta 2007; Loosli et al 1998). El patrón de expresión de estas dos isoformas (Conte & Bovolenta 2007), se ha diversificado en diferentes regiones prosencefálicas, de forma que solo la combinación de ambos genes reproduce la expresión del gen *Six3* de vertebrados superiores (Conte et al 2005; Granadino et al 1999; Kawakami et al 1996; Oliver et al 1995). Sin embargo, el análisis de las secuencias aminoacídicas de estos dos parálogos y de sus patrones de expresión sugiere que *Six3.2* es el ortólogo del gen *Six3* de mamíferos (Conte & Bovolenta 2007).

Se ha descrito que una región de aproximadamente 4kb, localizada 5' con respecto al sitio de inicio de la transcripción del gen, es capaz de recapitular la expresión del gen *Six3.2* de medaka (Conte & Bovolenta 2007). Dicha región reguladora consta de un total de 10 elementos conservados, que actúan como potenciadores, silenciadores o represores de silenciadores (silencer blockers). De entre estos módulos, la región D es la responsable de la expresión temprana del gen (**Fig. 7A**), desde estadios de placa neural (estadio 16) hasta la formación de la copa óptica (estadio 23). En cambio los elementos I-L dirigen la expresión de *Six3.2* en estadios más tardíos (**Fig. 7B**), tanto en el cerebro

como en la retina. Además, dentro de estas regiones los elementos que controlan la expresión en diencefalo, hipotálamo y telencefalo se encuentran organizados linealmente en dirección 5'-3'. La acción de estos dos elementos principales es, a su vez modulada por los otros módulos conservados, que permiten el control fino de la expresión de *Six3.2*:

- El elemento A actúa como un silenciador que inhibe la expresión del gen en territorios caudales. De hecho, al eliminar esta región, la expresión de *Six3.2* se extiende hacia regiones más caudales, incluyendo la médula espinal.
- El elemento G actúa como represor del elemento IL durante un limitado periodo de tiempo (estadios 24-32). Sin embargo actúa, en combinación con los elementos E-H, como modulador de los elementos D e IL en las otras fases del desarrollo, siendo necesario el conjunto de estas regiones para recapitular la expresión completa de *Six3.2*.

En este mismo trabajo (Conte & Bovolenta 2007) también se identificó una región del gen *SIX3* humano, correspondiente a los módulos G-IL de medaka, capaz de recapitular su patrón de expresión durante las fases tardías del desarrollo, lo que indica la existencia de mecanismos conservados en el control transcripcional de ambos genes. Por tanto, en base a estas evidencias experimentales, nos propusimos utilizar la región reguladora del gen *Six3.2* como herramienta de partida para identificar reguladores en *trans* de su expresión que, además, pudiesen contribuir a la regulación de su homólogo en mamíferos.

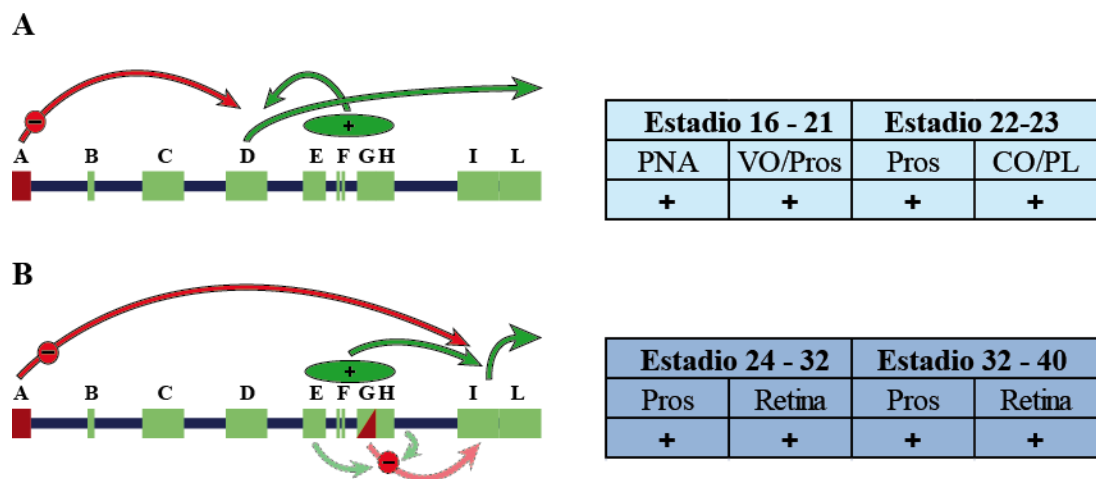


Figura 7. La actividad combinada de los elementos reguladores de *Six3.2* determina su patrón de expresión. Representaciones esquemáticas del efecto de diferentes elementos reguladores del gen *Six3.2* durante fases tempranas (A) y tardías (B) del desarrollo. Los rectángulos verdes y rojos representan módulos no codificantes conservados identificados en una región de 4,1kb situada 5' al locus del gen *Six3.2*. El color de los mismos indica su efecto (potenciador o silenciador) sobre la actividad del promotor de *Six3.2*. Los elementos D e IL son los principales responsables de la expresión de *Six3.2*, y su efecto se representa con flechas grandes. Los demás elementos actúan como moduladores de estos dos potenciadores y su efecto se representa con flechas de punta fina verdes (potenciadores) o rojas (silenciadores). El elemento G actúa como silenciador durante los estadios 24-32 (B) y su efecto se representa con una flecha rojo-pálida. Este efecto es modulado por los elementos E-H por durante este periodo (representados con flechas verde-pálido). La actividad de dichos elementos durante las otras fases del desarrollo se representa con flechas sólidas. Las tablas adyacentes a las figuras resumen los territorios donde la actividad de estos elementos reguladores dirige la expresión de *Six3.2*. PNA: placa neural anterior; VO: vesículas ópticas; Pros: prosencéfalo. CO: copa óptica; PL: placoda de la lente.

Los patrones de expresión de los genes *Six3.1* y *Six3.2* de medaka sugieren que, entre estos dos parálogos, podría haberse producido también una segregación de los elementos de control transcripcional. Por tanto, para entender la regulación del gen *Six3* de mamíferos es necesario estudiar el control transcripcional de ambos genes. Sin embargo, no existe, ninguna información acerca de la regulación del gen *Six3.1* de medaka por lo que se hace necesario identificar y caracterizar los elementos reguladores responsables del control de su expresión.

En conclusión, el presente trabajo pretende profundizar en distintos aspectos de la regulación de los genes *Six3.1* y *Six3.2* e identificar factores reguladores que controlen la expresión de los mismos durante el desarrollo de las estructuras prosencefálicas, con el objetivo de contribuir al conocimiento de las redes transcripcionales que intervienen en su especificación.

2. OBJETIVOS

“Es posible, yo pienso, por medio de la experimentación solamente, determinar qué tan lejos y en qué sentido podemos continuar la investigación de las causas de la forma”

THOMAS HUNT MORGAN
1898

El presente estudio pretende contribuir a descifrar que factor o factores son responsables de la expresión del gen *Six3* y como el control diferencial de la misma pueda contribuir a la especificación de los territorios prosencefálicos. Sin embargo, en una óptica más amplia, esperamos que este trabajo permita obtener conclusiones extrapolables a otros FT, permitiendo progresar en nuestro conocimiento sobre como las redes génicas pueden estar controlando el desarrollo embrionario en general y, más particularmente, el del sistema nervioso.

Para ello empleamos como sistema modelo el pez medaka, abordando el estudio de los 2 parálogos del gen *Six3* de mamíferos: *Six3.1* y *Six3.2*. En el caso de este último, trabajos previos en el laboratorio, habían contribuido a descifrar el código de secuencias reguladoras responsables del control de su expresión mientras que carecíamos de información previa disponible acerca del primero.

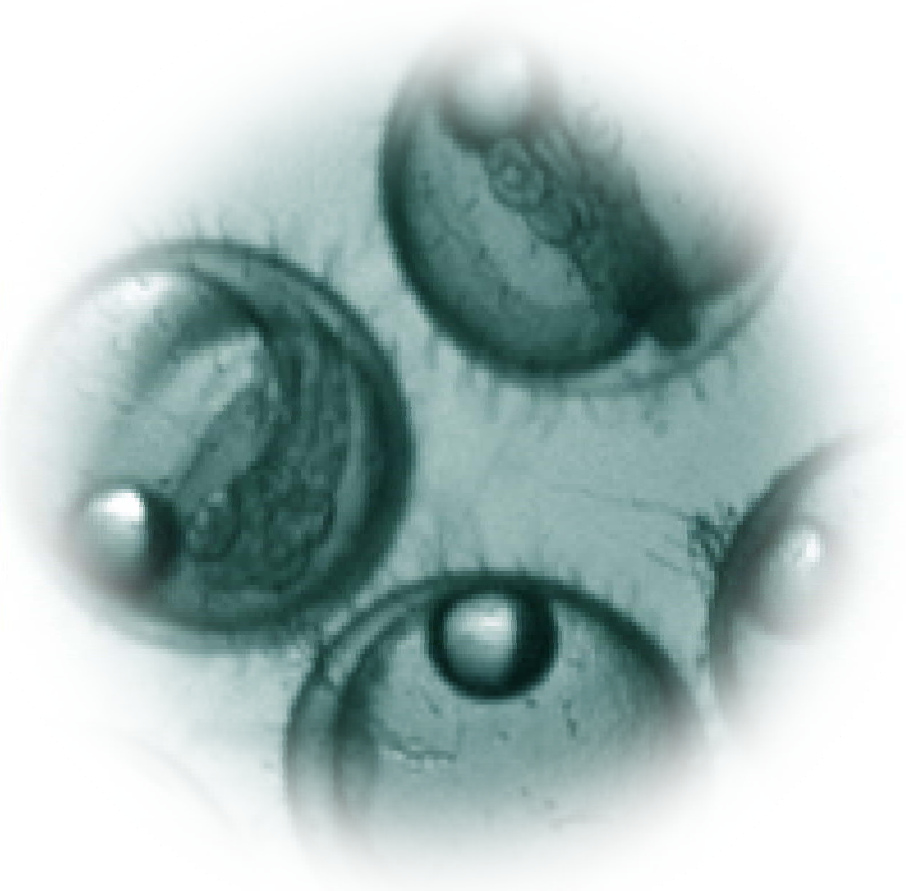
Por tanto, los objetivos concretos de este trabajo pueden resumirse en los siguientes apartados:

- I. Identificar reguladores *en trans* de la expresión de *Six3.2*, con un enfoque particular en la búsqueda de FT que pudieran estar controlando la expresión temprana de *Six3.2* en territorios prosencefálicos.**
- II. Determinar si, y como, la expresión de los genes *Six3.1* y *Six3.2* contribuye a la especificación diferencial de los territorios prosencefálicos.**
- III. Identificar y caracterizar los elementos reguladores *en cis* y *en trans* de la expresión del gen *Six3.1*.**
- IV. Determinar la existencia de dominios superiores de regulación dentro de la región genómica correspondiente al gen *Six3* y sus parálogos y su posible implicación funcional.**

3. MATERIAL Y MÉTODOS

“Las grandes mentes progresistas de la embriología no han buscado la hipótesis; ellas han observado embriones”

JANE OPPENHEIMER
1995



3.1. Mantenimiento de los stock de medaka

Los stocks de medaka silvestres utilizados en el presente estudio pertenecen a la cepa CAB y fueron mantenidos dentro del animalario, en acuarios dotados de un sistema de recirculación de agua con control constante de temperatura (26°C), pH (6,8-7.0) y salinidad (600µS) y con un ciclo de luz/oscuridad de 14/10 horas. Los huevos de medaka se recogieron y mantuvieron en medio Yamamoto en un incubador en condiciones de temperatura (28°C) y humedad constante. Los embriones fueron estadificados según criterios morfológicos basados en Iwamatsu, 2004.

3.2. Análisis *in silico* de regiones reguladoras

3.2.1. Identificación de elementos no codificantes conservados

Las secuencias genómicas a analizar se descargaron de las bases de datos Ensembl (www.ensembl.org) o USCS (<http://genome.ucsc.edu>). Las secuencias obtenidas de diferentes especies se compararon a través de alineamientos múltiples utilizando los programas mVista-LAGAN (<http://genome.lbl.gov/vista/index.shtml>), Mulan (<http://mulan.dcode.org>) y/o Multialin (<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>). Para el análisis de secuencias poco conservadas, se realizaron comparaciones par a par utilizando los programas mVista-ShuffleLAGAN (<http://genome.lbl.gov/vista/index.shtml>) o zPicture (<http://zpicture.dcode.org/>). En ambos casos se obtuvieron gráficos de conservación en forma de picos (regiones conservadas) y valles (regiones no conservadas). Finalmente, para la comparación de secuencias entre especies muy alejadas filogenéticamente se utilizó el programa Lalign (www.ch.embnet.org/software/LALIGN_form.html). Este programa utiliza el algoritmo de Huang y Miller para comparar pares de secuencias (Homer et al 2009) buscando alineamientos locales dentro de las mismas. Esto permite encontrar pequeños bloques de homología que serían difícilmente detectables con los algoritmos empleados por los programas de alineamiento anteriormente mencionados.

3.2.2. Predicción *in silico* de sitios putativos de unión de factores de transcripción

Las secuencias genómicas de los genes *Six3.1* y *Six3.2* de medaka se analizaron mediante los programas Jaspar (<http://jaspar.genereg.net>), MatInspector (www.genomatix.de) y P-Match (<http://www.biobase.de/index.php?id=291>). Los SU identificados fueron filtrados de forma manual en función de su conservación evolutiva sobre la base del alineamiento múltiple obtenido con el programa Multialin. Por otra parte, los alineamientos resultantes de los programas mVista, Mulan o zPicture se utilizaron como base para la búsqueda de SU putativos conservados de forma automatizada mediante la herramienta rVista ejecutada desde la propia interfaz de dichas herramientas. Los SU encontrados a través de este análisis fueron clasificados en función de la familia génica de pertenencia de sus respectivos FT. Los candidatos seleccionados fueron ulteriormente filtrados en base a la información existente en la bases de datos Pubmed

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>), Genecards (www.genecards.org) y OMIM (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim>). Así mismo, se analizaron los patrones de expresión disponibles de los FT candidatos en las bases de datos de expresión génica EMAGE (www.emouseatlas.org) y ZFIN (<http://zfin.org>).

Las regiones reguladoras de los genes *Rx3*, *Foxg1* y *Nkx2.1* se alinearon con los programas Mulan, mVista-Shuffle-LAGAN y/o Lalign en función del grado de conservación observada entre las diferentes especies en estudio. Los SU putativos para *Sox2* se buscaron a través del programa rVista, mientras que para *Six3* los SU potenciales se buscaron de forma manual utilizando las secuencias consenso descritas para este FT (Suh et al 2010).

3.2.3. Predicción *in silico* de grandes dominios reguladores

Como primera aproximación al análisis de grandes dominios reguladores se analizaron las relaciones sinténicas entre los genes contenidos en la región del Cr2p21 de humano (donde está contenido el gen *Six3*). Dicha región se comparó con la equivalente de diferentes especies de mamíferos y vertebrados. Los listados completos de genes contenidos en dichas regiones y su posición relativa en el genoma se obtuvieron de la base de datos USCS y se verificaron manualmente en todas las especies. La comparación par a par entre las diferentes especies se realizó con el programa OrthoclusterDB (<http://genome.sfu.ca/orthoclusterdb>) y también de forma manual, tomando la región cromosómica de humano como referencia.

La información acerca de expresión, función génica y trastornos genéticos asociados a los diferentes genes contenidos en la región cromosómica analizada se obtuvo de forma similar a la mencionada en el apartado 3.2.2.

La predicción de los SU putativos de CTCF en el genoma de las diferentes especies se realizó a través del programa InsulatorDB (<http://insulatordb.uthsc.edu>) y los resultados se compararon con los perfiles de unión de CTCF publicados para el genoma humano (Barski et al 2007) a través del explorador USCS genome browser. El análisis de la densidad y distribución de putativos elementos reguladores se realizó con el programa ANCORA (<http://ancora.genereg.net>).

3.3. Construcción de plásmidos

Los elementos no codificantes conservados identificados para el gen *Six3.1* se amplificaron por PCR con cebadores específicos (**Tabla III**) a partir de ADN genómico de medaka extraído con el kit TRIZOL (Invitrogen). De la misma forma se amplificó una región no conservada de 5062 pb comprendida entre las posiciones -5000 y +60 del gen, y supuestamente conteniente el promotor mínimo del mismo (**Tabla III**). Todos estos elementos se clonaron directamente en el vector PCR 2.1TOPO (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante. La región promotora de 5kb del gen *Six3.1*, y un subfragmento de aproximadamente 3kb de la misma (-2819,+60) se clonaron en el vector de transgénesis IsceI-EGFP (Conte & Bovolenta 2007) mediante enzimas de restricción

específicas, generando las construcciones *Six3.1*-II y *Six3.1*-III respectivamente (**Tabla IV**). Los diferentes elementos conservados (A-E) se clonaron en distintas combinaciones 5' al fragmento de 3kb conteniente el promotor mínimo del gen *Six3.1*, obteniendo las construcciones de transgénesis *Six3.1*-iIII y *Six3.1*-iVI (**Tabla IV**). Por otra parte, una región reguladora del gen *Nkx2.1* de ratón, comprendida entre las posiciones -495 y +1802 con respecto al sitio de inicio de la transcripción del gen, se clonó de forma similar a lo descrito para los módulos reguladores del gen *Six3.1* (**Tabla III**), generando la construcción *mNkx2.1*:EGFP.

Tabla III. Cebadores utilizados para el clonaje de las regiones reguladoras de los genes *Six3.1* y *Nkx2.1*.

Gen	Especie	Región	Cebadores utilizados (F/R)
<i>Six3.1</i>	Medaka	-5062,+60	GAGATCTGTCCTCTCTAACTGAA/ TAAAGATGTTTCTGTTATAAGCTT
<i>Six3.1</i>	Medaka	A	GCAGGGAGATCTGTCCTTTGGGGT/ GTGATCAGAAATCGTCGACAGGCCTG
<i>Six3.1</i>	Medaka	B	GCTGTTATAAGCTTCTCTAACTGAAAC/ GAAGACAAAGTAGATCTCCATCACTC
<i>Six3.1</i>	Medaka	C	GGGAAAGCTTTCTAAAGATGTTTCA/ TGGGTTAAAGAGCTACAAAGCTTACA
<i>Six3.1</i>	Medaka	D-E	GAGTCGGTCGACGTTCTGGCTGCTC/ AAGATTCTCGAGATTTGCACCACTTC
<i>Nkx2.1</i>	Ratón	-495,+1802	AGATTCTCGAGATAGCTACAAA/ GTTATAAGCTTCTAAGAGCTACAAA

Tabla IV. Elementos reguladores del gen *Six3.1* clonados en las diferentes construcciones de transgénesis.

Nombre de la construcción	Elementos reguladores clonados
<i>Six3.1</i> -I	-5062,+60
<i>Six3.1</i> -II	-2189,+60
<i>Six3.1</i> -III	A, B, C, D, E, (-2189,+60)
<i>Six3.1</i> -IV	A, B, C, (-2189,+60)
<i>Six3.1</i> -V	A, B, (-2189,+60)
<i>Six3.1</i> -VI	B, C, (-2189,+60)

Para los estudios de regulación transcripcional en células P19 (ensayos de luciferasa), se utilizó el vector reportero pGL3b-TK, derivado del plásmido comercial pGL3basic (Promega) al cual se le insertó el promotor mínimo de la TK. Utilizando el vector pGL3b-TK como base, se clonaron diferentes regiones reguladoras de *Six3.2* en posición 5' del promotor mínimo de la timidina quinasa (TK), (**Tabla V**) mediante amplificación con cebadores específicos y digestión con enzimas de restricción, generando las construcciones *Six3.2*-cI – *Six3.2*-cXI (**Tabla V**).

Tabla V. Cebadores utilizados para el clonaje de los diferentes elementos reguladores del gen *Six3.2*.

Nombre de la construcción	Elementos del promotor <i>Six3.2</i>	Cebadores utilizados (F/R)
<i>Six3.2-cI</i>	A, B, C, D, E, F, G, H, I, L	ATGGTACCCAACCCGTGTAATACAC/ ATTGGTCTTCTTGGTCTCGAGGTAGCGTTGTC
<i>Six3.2-cII</i>	D, E, F, G, H, I, L	AAGCCTGTGTGTGCTAGCGTTCCAGTG/ ATTGGTCTTCTTGGTCTCGAGGTAGCGTTGTC
<i>Six3.2-cIII</i>	D	GTGCTCGAGTTCCAGTGTTG/ GCAGGTGCGACTCCGAATATG
<i>Six3.2-cIV</i>	I, L	GCAGATTGACTTGCTAGCATTCAAATTC/ ATTGGTCTTCTTGGTCTCGAGGTAGCGTTGTC
<i>Six3.2-cV</i>	E, F, G, H	ATTGCCATTGGACATTGGGG/ AGGTAGGTCCCTTTGGGCTC
<i>Six3.2-cVI</i>	D(1-137)	AATCTCGAGACGGCAGGTGAATAAACTTG / GCAGGTGCGACTCCGAATATG
<i>Six3.2-cVII</i>	D(1-181)	AATCTCGAGTGACGTAAACAAAAGCCATG / GCAGGTGCGACTCCGAATATG
<i>Six3.2-cVIII</i>	D(1-250)	AATCTCGAGCAGTCAAGTGATTTCCGAAT / GCAGGTGCGACTCCGAATATG
<i>Six3.2-cIX</i>	D(137-392)	GTGCTCGAGTTCCAGTGTTG/ AATCTCGAGCAAGTTTATTACCTGCCGT
<i>Six3.2-cX</i>	D(181-392)	GTGCTCGAGTTCCAGTGTTG/ AATCTCGAGCATGGCTTTTGTTTACGTCA
<i>Six3.2-cXI</i>	D(250-392)	GTGCTCGAGTTCCAGTGTTG/ AATCTCGAGATTTCGAAATCACTTGACTG
<i>Six3.2cXII</i>	D mutado	GACGTAACGGAAGCCATGTAAAACGCGTGGGTTA GCTGTGGCTT
pGL3b- <i>Six3.2</i> prom	A, B, C, D, E, F, G, H, I, L, 5'NT	CCTCATTAAATGCCGCTAAC/ ATCTGAAAACCATGGAAATG

La mutagénesis de los SU para *Sox2* dentro del modulo D se realizó con el Kit QuikChange Lightning Multi Site-Directed Mutagenesis Kit (Strataclone) utilizando un cebador específico (**Tabla V**) y tomando como molde el plásmido *Six3.2-cIII*. La construcción resultante se denominó *Six3.2-cXII*.

Para el rastreo masivo de reguladores del gen *Six3.2* se utilizó la secuencia completa del promotor de *Six3.2*, incluyendo la región del promotor mínimo y la región 5' no traducida (5'NT) del gen (**Tabla V**). Esta secuencia se clonó directamente en el vector pGL3b, respetando el marco abierto de lectura del reportero luciferasa, generando la construcción pGL3b-*Six3.2*prom. Así mismo, la región promotora del gen *Rx3* de medaka, de aproximadamente 3,5kb, incluyendo el promotor mínimo y la región 5' no traducida del gen (Rembold et al 2006) se subclonó a partir del vector original en el vector pGL3b, utilizando enzimas de restricción específicas, para generar el plásmido pGL3b-*Rx3*prom.

Para la búsqueda de factores reguladores en *trans* de la expresión del gen *Six3.1*, los elementos conservados A, B y C, se subclonaron en el vector pGL3b-TK generando el plásmido reportero *Six3.1* A-Cluc. En el presente trabajo nos referiremos a todas estas construcciones con el nombre genérico de plásmidos reporteros.

Para los ensayos de transfección en células, las secuencias codificantes de los genes *Pax6*, *Sox2*, *Six3.1* y *Six3.2* se amplificaron por PCR utilizando cebadores específicos y se clonaron en el vector pCMV-3myc generando los plásmidos 3myc-Pax6, 3myc-Sox2, 3myc-Six3.1 y 3myc-Six3.2 respectivamente. Este vector deriva del plásmido comercial pCMV (Clontech) al cual se le insertó un casete conteniente otros 2 epítomos myc en posición amino terminal. Para la búsqueda masiva de reguladores del gen *Six3.2* se utilizó una librería unigénica de ADNc de medaka de 1064 genes catalogados previamente como “reguladores del desarrollo” (Souren et al 2009). La región codificante completa de estos genes está clonada en el vector pCMV6Sport, permitiendo su correcta expresión en células eucariotas (Souren et al 2009). Todos los genes testados en esta librería se encuentran verificados por secuenciación y clasificados.

Para la síntesis *in vitro* del ARNm de los genes *Sox2*, *Six3.1* y *Six3.2* las respectivas construcciones se subclonaron en el vector pCS2+ utilizando enzimas de restricción específicas.

Para la generación de sondas a utilizar en los experimentos de hibridación *in situ*, los ADNc de los genes *Arx*, *Dmbx1*, *Emx3*, *Nkx2.1*, *Sox1*, *Sox2* y *Sox3*, se amplificaron con cebadores específicos (**Tabla VI**), utilizando como molde ADNc de embriones de estadio 16-24. El ARN fue extraído utilizando el reactivo Trizol (invitrogen) y el ADNc se sintetizó con la ayuda del kit First-Strand cADN Synthesis Kit (GE healthcare). Los productos de PCR obtenidos fueron clonados en el vector comercial pDrive (Qiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Todas las construcciones generadas en este estudio fueron verificadas por secuenciación.

Tabla VI. Cebadores utilizados para la clonación de ADNc de genes de medada.

Gen clonado	Cebadores utilizados (F/R)
<i>Arx</i>	GACGCACTACCCCGATGTAT/CTGCTGAAGTGGAGGAGGAG
<i>Dmbx1</i>	AGCGTGAGACGAAGGAGAAAC/CATCTGGGTAGTGTGTCTTCTG
<i>Emx3</i>	ACGATCGAGACGCTGGTGGG/CTGTTTTGGAACCAAACCTTT
<i>Nkx2.1</i>	AGTGGCATGGATGGATGGCGCAGG/TCACCTGGGTCCGGCGTCAGA
<i>Sox1</i>	ATGTATAGCATGATGATGGAAACG/TCCTAAATGTGCGTTAGAGGGA
<i>Sox2</i>	TGCATAGAAAATCGGCAGGTAAGT/ACATGTGTGTTAACGGCAGCGTGC
<i>Sox3</i>	GCGTTCAGGCACAACCTTTT/GCCCGCACAGTCTTTACATT

3.4. Transfección de células y ensayos de luciferasa

Las células P19 se mantuvieron en cultivo con medio MEM α +glutamax (Gibco) suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS) y en condiciones de temperatura (37°C) y P_{CO2} (95%) constantes. Para la validación de candidatos en ensayos de luciferasa, las células P19 se transfectaron en placas P48, con diferentes proporciones de los plásmidos reporteros y efectores utilizando el reactivo Fugene HD transfection Reagent (Roche) a un ratio 5:2 (μ l Fugene: μ g ADN) siguiendo las especificaciones del fabricante. La transfección se realizó en medio MEM α +glutamax (Gibco) sin suero. A las 7 horas posttransfección se suplementó el medio con FBS a una concentración final del 5% y se mantuvieron en cultivo durante 48 horas. Para cada pocillo se transfectaron 50ng de plásmido reportero Firefly luciferasa y 10ng del plásmido pRL-CMV (Promega). Este último es

utilizado como control interno de transfección al codificar para la enzima luminogénica Renilla bajo el control del promotor constitutivo CMV. Los plásmidos de expresión de los diferentes candidatos a ensayar fueron cotransfectados a concentraciones variables, en el rango de 25-250ng de plásmido/pocillo. Los ensayos de luciferasa se realizaron por triplicado y cada experimento se repitió un mínimo de 3 veces. Para la medición de la actividad luciferasa se utilizó el kit Dual-Luciferase[®] Reporter Assay System (Promega), como descrito previamente (Conte et al 2010b).

Para la búsqueda masiva de reguladores del gen *Six3.2* se transfectaron células BHK21 crecidas a baja confluencia en placas de 96 pocillos como descrito previamente (Souren et al 2009). Las células se mantuvieron en cultivo en placas P100 con medio DMEM+10%FBS (Gibco). Aproximadamente 6 horas antes de la transfección las células se sembraron en las placas de 96 pocillos a una densidad de 20-30.000 células/pocillo. Para cada pocillo se preparó una mezcla de ADN con el plásmido reportero pGL3b-*Six3.2*prom (50ng/pocillo), el plásmido de control interno de transfección pRL-CMV (5 ng/pocillo) y uno de los 1064 clones de la librería de cADN codificantes de medaka (en una cantidad estimada de 150ng/pocillo). Las mezclas de ADN se incubaron con el reactivo de transfección Fugene 6 (Roche) en un ratio 5:1 (μ l reactivo: μ gr ADN total), durante un periodo de 30min a temperatura ambiente y el complejo de transfección se añadió directamente a las células en presencia del medio DMEM+10%FBS. A las 48 horas post-transfección las células se lisaron y la actividad luciferasa se midió con el kit Dual-Luciferase[®] Reporter Assay System (Promega). Cada clon de la librería se ensayó por triplicado. Para los ensayos dosis-respuesta los clones positivos se volvieron a transfectar a diferentes concentraciones y el experimento se realizó dos veces de forma independiente utilizando como reporteros de control interno de transfección los plásmido pRL-CMV y PRL-SV40 (Promega). Este último codifica para el reportero Renilla bajo el control del promotor mínimo del virus del simio 40. De esta forma se verifica que los cambios observados en los diferentes ensayos no se deben a efectos inespecíficos del clon sobre el reportero control. El tratamiento estadístico de los resultados del rastreo se realizó como descrito previamente (Souren et al 2009).

3.5. Generación de líneas transgénicas

Los huevos de medaka recién fertilizados se recogieron y mantuvieron en medio Yamamoto frío (4-10°C) para detener su desarrollo. Los diferentes plásmidos empleados en este estudio (ver arriba) se prepararon utilizando el Kit High Pure Plasmid Isolation Kit (Roche) para asegurar una pureza y concentración del ADN óptimas. La mezcla del ADN se preparó según descrito previamente (Thermes et al 2002). Los huevos de medaka se inyectaron en estadio de una célula y se crecieron y estadificaron de acuerdo a (Iwamatsu 2004). La activación del transgén se monitorizó en base a la expresión de la EGFP en embriones vivos observados bajo una lupa de fluorescencia (Leica). Los individuos seleccionados se criaron bajo condiciones estándar y, una vez alcanzada la madurez

sexual, se cruzaron con individuos silvestres de la cepa CAB. La descendencia se seleccionó nuevamente en base a la expresión del gen reportero.

3.6. Ensayos de inmunoprecipitación de cromatina

Los ensayos de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) se realizaron de acuerdo al protocolo descrito (Wells et al 2000), con pequeñas modificaciones. Las células P19 de una placa P100 (aproximadamente 15 millones), transfectadas con 3µgr de plásmido reportero y 9µgr de plásmido efector, fueron tratadas con formaldehído (Sigma) al 1% durante 15min a temperatura ambiente para fijar la unión entre FT y ADN. A continuación las células fueron despegadas mecánicamente de la placa y, tras una serie de lavados, incubadas en un tampón de lisis que permitiese la ruptura de las membranas nucleares y celulares y la liberación de la cromatina. Dicha cromatina fue fragmentada por sonicación hasta obtener fragmentos de aproximadamente 400-600pb. Por cada condición experimental se incubó 1µgr de cromatina por cada anticuerpo utilizado. Las proteínas de fusión 3myc-Pax6, 3myc-Sox2 y 3myc-Six3.2 se inmunoprecipitaron utilizando 1µgr de anticuerpo anti-myc monoclonal de ratón (Sigma); como control negativo se utilizó un anticuerpo IgG de ratón (Sigma). La cromatina se incubó toda la noche con el anticuerpo a 4°C y, al día siguiente, durante 1-3 horas con un 1µgr de anticuerpo anti IgG. Para amplificar la señal, los complejos cromatina-FT-anticuerpo fueron inmunoprecipitados incubando la muestra con células StaphA pretratadas (Calbiochem). Dichas células presentan en su superficie la proteína A que tiene una elevada afinidad por la fracción constante de las IgG. Tras una serie de lavados para eliminar la contaminación debida a interacciones inespecíficas, el complejo cromatina-FT-anticuerpo-StaphA fue eluido y se revirtió la unión FT-ADN. Finalmente el ADN fue aislado mediante columnas de purificación (Qiagen PCR purification kit) y analizado por PCR cuantitativa, utilizando cebadores específicos. El experimento se realizó por triplicado y se repitió un mínimo de 2 veces de forma independiente. El enriquecimiento relativo entre la condición experimental (anticuerpo anti-myc) y la condición control (IgG inespecífica) se calculó mediante la formula $2^{-\Delta\Delta Ct}$, donde $\Delta\Delta Ct = Ct_{c-Myc} - Ct_{IgG}$. Como control negativo se utilizaron cebadores específicos contra el extremo 3' de la región codificante del reportero luciferasa o bien contra la secuencia codificante de la β -actina de ratón (Tabla VII).

Tabla VII. Cebadores utilizados para la PCR a tiempo real de los ensayos de ChIP.

Secuencia diana	Cebadores específicos (F/R)
<i>Six3.2</i> –caja D	CAAACAAGGCTCCTCCAAG/ ATGCAAAGCCTCCTACCTGAC
<i>Six3.2</i> Caja I-L	TTAAAGCTCCCTCTCCCTCAC/ GCCTATCTGCTGAATGGAATG
<i>Rx3</i> módulo conservado	CAAAGATTGACAGCAGTGTGG/ CCCCTCATTAGGCAAACAAAG
<i>Foxg1</i> módulo conservado	CAGTTCAATGACAGCTTGAC/ CTGATATGCAGGAAGGAAAAGT
<i>Luciferasa</i>	TTCCCGCCGCCGTTGTTGTT/ CCCTTCTTGGCCTTTATGAG
<i>b-actina</i>	TTCTTTGCAGCTCCTTCGTT/ GGACCCTGCAGTGAGGTACT

3.7. Inyección de ARN y morfolino

Los ARNm de *Sox2*, *Six3.1* y *Six3.2* se obtuvieron mediante el kit de síntesis *in vitro* de Ambion y se inyectaron a una concentración variable de entre 5-50ng (*Sox2*), 20-100ng (*Six3.1*) y 1.0-30ng (*Six3.2*). Las concentraciones elegidas en este trabajo fueron de 20ng para *Sox2*, 20 y 40ng para *Six3.1*, y 1,0-12,5ng de *Six3.2*. Además se diseñaron una serie de morfolinós (MO, Gene Tools) dirigidos específicamente contra los ARNm de los genes *Sox2* (5'TCTCCATCATGTTATACATCAGGGA-3'), *Six3.1* (5'GCGTGTGGGAAGGCAGGCGGCGGAC-3'; (Carl et al 2002)) y *Six3.2* (5'TGGAAATGACCTGAGAGAGAAAGAA-3'). Como controles se utilizaron bien un MO dirigido contra la secuencia genómica del gen de la β -globina humana (Genetools), bien un MO con 5 desapareamientos con respecto a la secuencia diana del gen *Six3.2*. Nos referiremos a dichos morfolinós con el nombre genérico de MO control (MOc). La especificidad y eficiencia de inhibición de cada MO se determinó como anteriormente descrito (Conte et al ; Eisen & Smith 2008; Ruiz et al 2009). Mientras que los MOc no tuvieron efecto alguno a ninguna de las concentraciones probadas (20-100 μ M), los embriones tratados con el MO contra *Six3.2* (MO-*Six3.2*) presentaron fenotipos anómalos siguiendo una respuesta dosis-dependiente, sin llegar a detectarse efectos inespecíficos del mismo (Robu et al 2007). Todos los MOs se inyectaron en embriones de medaka en estadio de 2 células. Se realizó un mínimo de 3 experimentos por cada marcador y condición experimental analizados.

3.8. Hibridación *in situ*

Las hibridaciones *in situ* en embriones enteros (*in toto*) se realizaron como descrito previamente (Conte & Bovolenta 2007). En el presente estudio se utilizaron ribosondas antisentido dirigidas contra distintas regiones de los ARNm de los genes *Fgf8*, *Rx3*, *Rx2*, *Six3.2*, *Foxg1*, *Sox2*, *Dmbx1*, *Emx3*, *Nkx2.1*, *Nkx2.2* y *Arx*. La detección de los respectivos ARNm se realizó utilizando los sustratos NBT/BCIP (Roche; precipitado púrpura), BCIP (Roche; precipitado azul claro) o Fast red (Roche; precipitado rojo con capacidad para emitir en fluorescencia).

3.9. Análisis de los niveles relativos de expresión génica

La extracción de ARN total de embriones de medaka en estadio 16 o 19 se realizó utilizando el reactivo Trizol (Invitrogen) siguiendo las especificaciones del fabricante. Tras el tratamiento con ADNasaI (Roche) para eliminar posibles contaminaciones con ADN genómico que pudiesen alterar los resultados experimentales se procedió a la retrotranscripción del ARN mediante oligonucleótidos aleatorios usando el kit First-Strand cDNA Synthesis Kit (GE Healthcare). El ADNc así obtenido se utilizó como molde en reacciones de PCR convencional y cuantitativa (PCRc).

Las reacciones de PCRc se llevaron a cabo por triplicados en placas de 96 pocillos utilizando el reactivo SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) y el sistema ABI PRISM 7700 Sequence Detection System (Applied Biosystems). Para cada reacción de PCR se utilizaron 2 µl de ADNc o, en el caso de las reacciones de amplificación del ARNr 18s, utilizado como control Interno de normalización, 2 µl de una dilución 1:10 del mismo ADNc. El diseño de cebadores específicos para cada uno de los genes a estudiar se realizó con la ayuda del software Primer3 Plus (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>, **Tabla VIII**). La adquisición de datos y análisis de los resultados se realizó usando el programa 7500 System SDS Software (v2.0.1, Applied Biosystems). La señal del complejo SYBR Green/ADN bicatenario se normalizó al valor del fluoróforo de referencia pasiva ROX, con el objetivo de reducir las fluctuaciones de medida debidas a diferencias entre pocillos no relacionables con los productos de amplificación. Los experimentos se replicaron de forma independiente un mínimo de 3 veces.

Tabla VIII. Cebadores utilizados para el análisis de los niveles de expresión génica por PCR a tiempo real.

Gen diana	Cebadores específicos (F/R)
<i>18s rRNA</i>	GGTAACCCGCTGAACCCAC/ CCATCCAATCGGTAGTAGCG
<i>Foxg1</i>	TGTCCCCCTTCTGTCTTTG/ TGGTTGCTGCTCATGTTCCCTG
<i>Rx3</i>	GCTGTTGCTGTGATGCAAAC/ TGGTAAAGGTGGTTCGGTTC
<i>Six3.1</i>	TCTCCCGTAAACACAGATG/ TAAAGCTCGCATAGCATCC
<i>Six3.2</i>	CCCATCCTTGGATTCAGTC/ CAGGATTGCATCTTGTCTGGC

3.10. Análisis de imagen y métodos de cuantificación

Los embriones fueron visualizados y fotografiados con una lupa Leica M205FA acoplada a una cámara de color Leica DFC500 y analizados con la ayuda del software ImageJ®. Las dimensiones de los territorios de telencéfalo, hipotálamo, diencéfalo y mesencéfalo se estimaron en base a la extensión de los dominios de expresión de los marcadores *Fgf8*, *Emx3*, *Foxg1*, *Arx*, *Nkx2.1* y *Dmbx1*, (**Fig. 8**). En cambio la superficie del dominio de expresión de los genes *Rx3* y *Rx2* se utilizó como estimador del tamaño de las vesículas ópticas (**Fig. 8**). Tanto la media±error típico, como la moda y los percentiles 25 y 75 de las diferentes distribuciones de valores obtenidos por este procedimiento se calcularon con la ayuda del programa GraphPad Prism®. Para el análisis estadístico de los resultados se utilizó el test T de Student, con un nivel de significación mínimo $\alpha=0,05$.

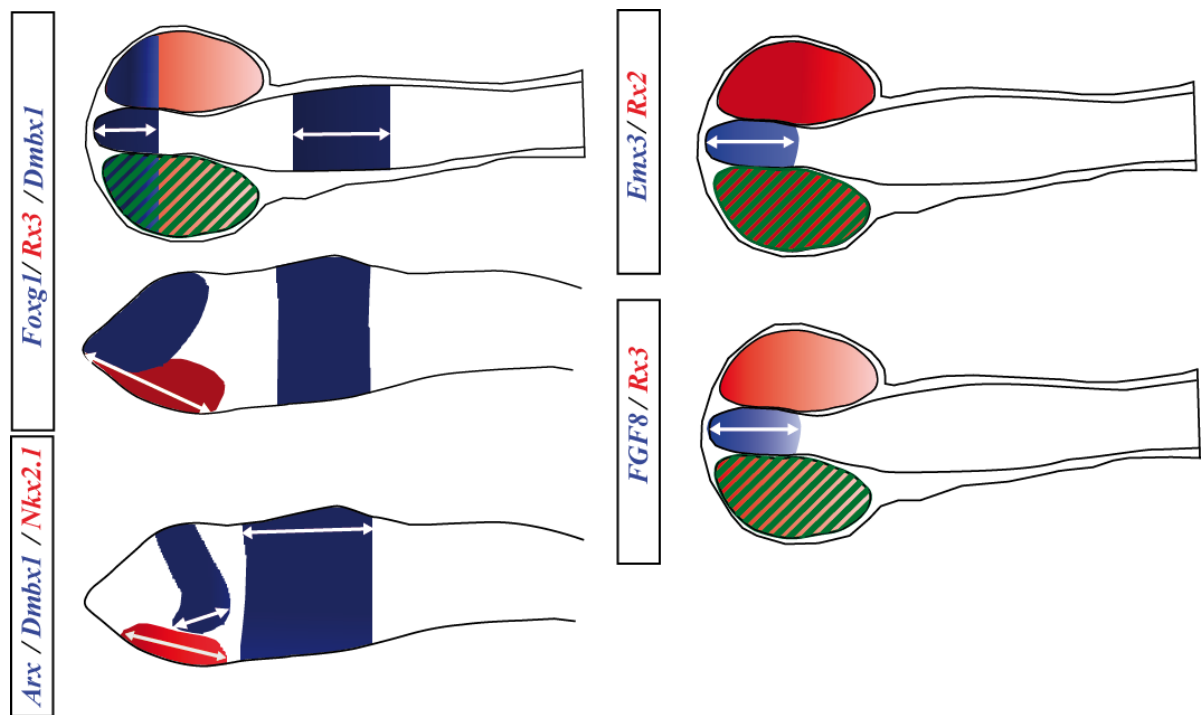


Figura 8. Sistema empleado para la estimación del tamaño de los territorios prosencefálicos. Se muestran representaciones esquemáticas de los dominios de expresión de diferentes marcadores génicos en el embrión de medaka. El tamaño de los territorios de telencéfalo (marcado por la expresión *Foxg1*, *Emx3* o *Fgf8*) hipotálamo (*Rx3* o *Nkx2.1*), pretálamo (porción ventral del dominio *Arx*+) y mesencéfalo (*Dmbx1*+) se estimó en base a la extensión de sus respectivos marcadores (líneas de flecha blancas). El territorio de retina se midió en base a la superficie del dominio de expresión de los genes *Rx3* o *Rx2* (área entramada verde).

3.11. Análisis de la proliferación

Para el análisis de la proliferación celular, se utilizó el marcador de proliferación fosfohistona H3 (PH3). Los embriones de medaka, en estadio 20, fueron recolectados y fijados en paraformaldehído al 4%. Tras ser decorionados, lavados varias veces en PBS-tritonX100 1% (PBS-Tx1%) e incubados a 4°C toda la noche en el mismo tampón, los embriones se trataron durante 40 min a temperatura ambiente en PBS-Tx1%+Tripsina 0,1% para favorecer su permeabilización. A continuación se bloquearon durante 4-5h a temperatura ambiente en una solución de PBS-Tx1%+FBS al 5% y, seguidamente, se incubaron durante 48 horas a 4°C con el anticuerpo anti-PH3 de conejo (1:200; Millipore) en la misma solución de bloqueo y durante otras 48h con un anticuerpo secundario anti-IgG de conejo acoplado a peroxidasa (1:750). Tras una serie de lavados con PBS-Tx1%, se detectó el marcaje mediante el substrato diaminobenzidina (Sigma) que proporciona un precipitado color marrón. Los embriones así tratados fueron observados y fotografiados en un microscopio Leica y el número de células PH3+ fue estimado con la ayuda del programa ImageJ®. El número total de células fue normalizado a la superficie de los territorios de ojo y telencéfalo, estimada en base a criterios morfológicos.

4. RESULTADOS

BLOQUE I

Identificación de elementos reguladores en *trans* de la expresión del gen *Six3.2*

El gen *Six3* presenta un patrón de expresión muy complejo y dinámico, expresándose en diferentes territorios prosencefálicos y sus derivados, desde estadios tempranos hasta etapas avanzadas del desarrollo del SNC y en el adulto. En el pez medaka la expresión de sus dos parálogos, *Six3.1* y *Six3.2*, se encuentra segregada espacialmente en diferentes regiones del prosencéfalo, sugiriendo una posible diversificación de sus funciones. Puesto que trabajos previos de nuestro laboratorio habían caracterizado en detalle la región reguladora del gen *Six3.2* de medaka, nos propusimos identificar los factores en *trans* responsables de su expresión a lo largo del desarrollo, con la hipótesis de que algunos de estos factores podrían controlar también la expresión del gen *Six3* en mamíferos.

En esta parte del trabajo se presentan los distintos abordajes utilizados para la identificación de dichos factores. Éstos incluyen diferentes técnicas bioinformáticas para predecir posibles FT de transcripción candidatos y su validación en ensayos de luciferasa. Además, se presenta un rastreo masivo de factores reguladores en *trans* mediante ensayos de transactivación transcripcional.

“Impulsados por la hipótesis, acaso ocurrirá sorprender en los hechos diversa cosa que lo buscado, pero mejor es esto que no encontrar nada, que es justamente lo que sucede al mero e impasible contemplador de los fenómenos naturales”.

SANTIAGO RAMÓN Y CAJAL
Los tónicos de la voluntad

4.1. Identificación *in silico* de reguladores putativos de la expresión temprana del gen

Six3.2

El genoma de medaka contiene dos parálogos del gen *Six3* de mamíferos: *Six3.1* y *Six3.2* (Conte & Bovolenta 2007). Durante las fases tempranas del desarrollo del sistema nervioso, el primero se expresa principalmente en el ojo y la región hipotalámica alar, mientras que el segundo se encuentra diferencialmente distribuido dentro del prosencéfalo secundario con altos niveles dentro del telencéfalo (en su porción dorsal) y con menor intensidad dentro de los primordios de la retina y del hipotálamo (en su porción basal). A medida que progresa el desarrollo, el patrón de expresión de ambos genes segrega a distintas regiones prosencefálicas (Conte & Bovolenta 2007) (Loosli et al 1998).

Con el objetivo de identificar factores reguladores en *trans* responsables del patrón de expresión de *Six3.2*, se realizó una búsqueda de SU putativos para FT conservados dentro de la región promotora del mismo, previamente caracterizada en el laboratorio (Conte & Bovolenta 2007). Para identificar el mayor número posible de candidatos se emplearon una serie herramientas de predicción (Jaspar, MatInspector, P-match y rVista) que difieren en los criterios de búsqueda y/o en cuanto al repertorio de FT utilizados para el análisis (Fig. 9). Sin embargo, este abordaje presenta el inconveniente de que dichos programas son incapaces de distinguir entre sitios que ejercen una función *in vivo* y secuencias no funcionales, lo que resulta en un elevado número de falsos positivos (Brzezinski et al 2010; Friberg et al 2005). Para superar en cierta medida esta limitación, utilizamos una serie de criterios de selección que permitieron limitar al máximo el número de falsos positivos (Fig. 9). En primer lugar, para cada uno de los programas empleados se establecieron criterios de búsqueda lo más restrictivos posibles pero capaces de proporcionar un número aceptable de resultados (Tabla VIII).

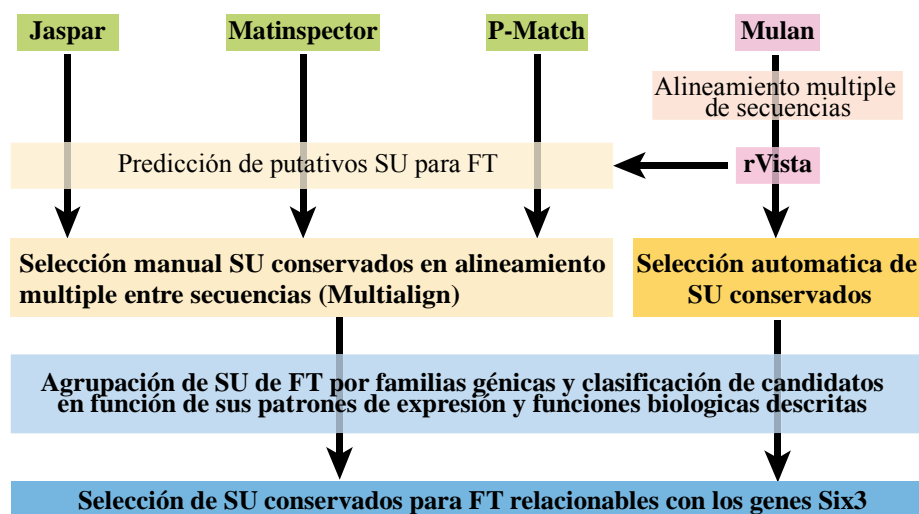


Figura 9. Aproximación empleada para la predicción *in silico* de reguladores en *trans* de la expresión génica. Se muestra un resumen esquemático del proceso de predicción de SU putativos para FT en la región reguladora del gen *Six3.2*. Este esquema es aplicable, con alguna modificación, también al estudio realizado para el gen *Six3.1*.

Tabla VIII: Resultados de la predicción de SU para FT con diferentes programas

	Jaspar			Matinspector			P-Match			rVista		
Criterio de búsqueda	%ID matriz			%ID matriz			%ID			%ID matriz		
	85	90	95	85	90	95	90 SM NS	mi n FP	mi n FP/FN	85	90	OP T
N. total resultados	1301	528	189	1357	526	257	10469	167	3792	3991	1324	1047

Para cada programa se evidencian en azul los criterios de búsqueda escogidos

En muchas ocasiones, para una determinada secuencia diana, estos programas reconocieron SU para distintos miembros de una misma familia de FT. Se ha descrito que a menudo los FT pertenecientes a una misma familia pueden compartir secuencias diana. Además, no se puede descartar que miembros de una misma familia, para los cuales no se dispone de una matriz consenso definida, puedan también reconocer la secuencia diana en cuestión. Apoyándonos en estas razones, filtramos manualmente los resultados obtenidos y agrupamos los distintos SU en función de la familia génica de pertenencia de sus respectivos FT (**Tabla IX**). A continuación, los resultados de los diferentes programas empleados en este estudio se juntaron para su posterior análisis. No se observaron diferencias en la distribución de los SU dentro y fuera de los elementos reguladores descritos para el gen *Six3.2* (**Fig. 10**), indicando que una proporción importante de los SU predichos en este análisis podrían no ser realmente funcionales *in vivo*.

Como segundo criterio de selección procedimos a filtrar los resultados obtenidos en función de la conservación evolutiva de dichos SU. Para ello se alinearon las secuencias genómicas de 5 peces teleósteos (medaka, espinoso, fugu, tetraodon y pez cebra) con los programas Mulan y Multialign (**Fig. 9 y Fig. 10A**) lo que resultó en la identificación de los diferentes módulos conservados descritos para el gen *Six3.2* (Conte & Bovolenta 2007). Sobre este alineamiento se verificó, de forma manual, la conservación de los SU predichos con Jaspar, Matinspector y P-Match (**Fig. 9**). En cambio, el programa rVista, ejecutado desde la interfaz de la herramienta Mulan, permite obtener de forma automática los SU conservados entre las distintas especies (**Fig. 9**). Puesto que la secuencia del gen *Six3a* del pez cebra resultó ser mucho más divergente con respecto a las demás especies de peces teleósteos, se consideraron como positivos aquellos SU conservados en, al menos, 4 especies diferentes. Este procedimiento redujo considerablemente el número de SU predichos, cuya localización puede, además, correlacionarse con la de los diferentes elementos reguladores en *cis* descritos para el gen *Six3.2* (**Fig. 10B**).

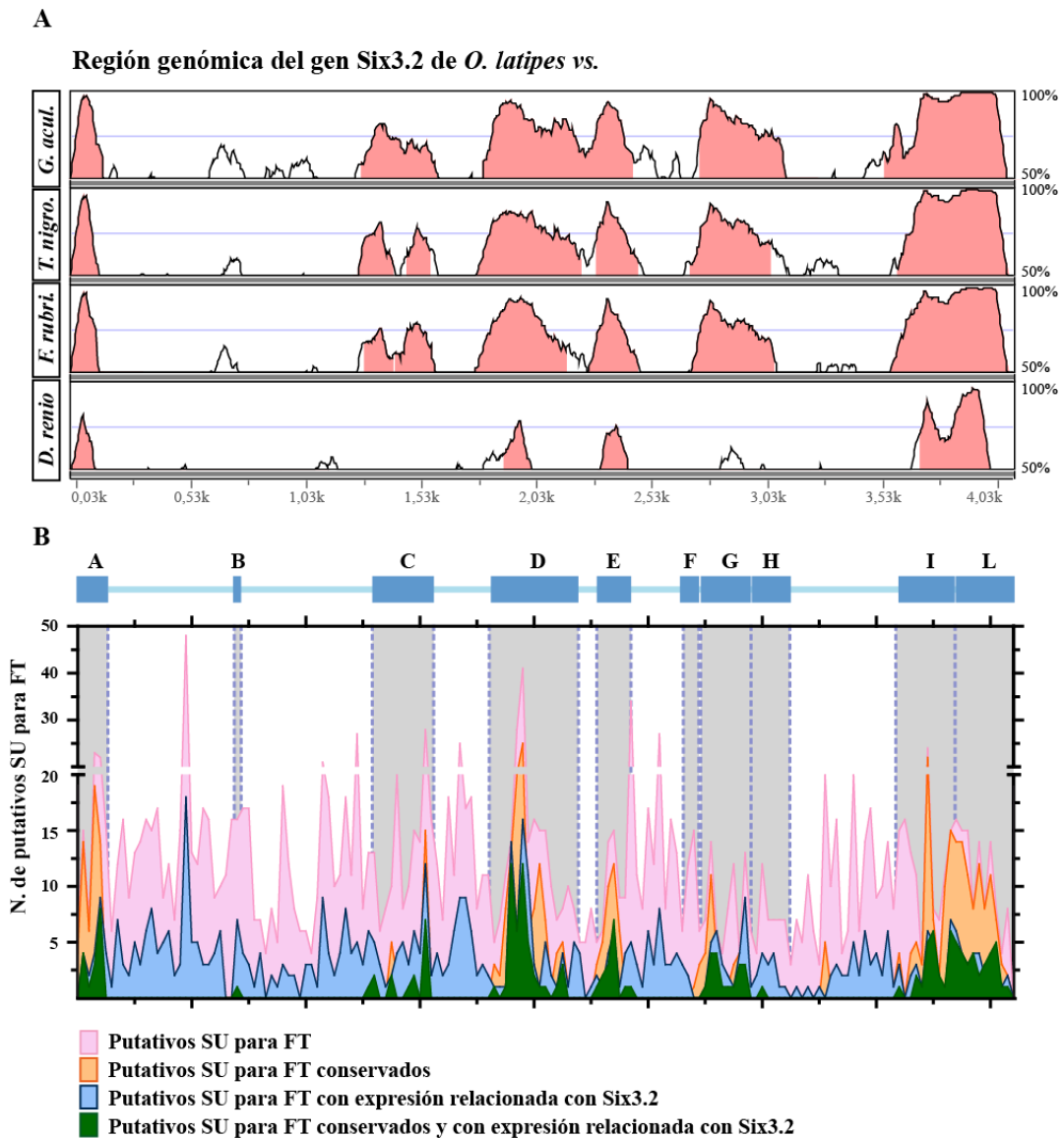


Figura 10. Los SU para potenciales reguladores del gen *Six3.2* se agrupan en los módulos conservados descritos para el mismo. A) Comparación múltiple de las regiones reguladoras del gen *Six3.2* de medaka (*Oryzias latipes*) y sus respectivos ortólogos en diferentes especies de teleosteos (*Gasteorosteus aculeus*, *Tetraodon nigroviridis*, *Fugu rubripes* y *Danio rerio*). Los módulos conservados se definen como regiones de al menos 70% de homología en 100pb y se representan en forma de picos de color rosa. B) Representación de la distribución de SU putativos a lo largo de las 4095pb de la región reguladora descrita para el gen *Six3.2* identificados con los diferentes programas empleados en este estudio. Nótese como la distribución de los SU conservados para FT funcionalmente relacionados con *Six3.2* coincide con los módulos reguladores descritos para este gen (representados por las cajas azules y las regiones sombreadas en gris dentro de la grafica).

A continuación se analizó la información disponible acerca del patrón de expresión de distintos miembros de las familias de FT seleccionadas en la búsqueda anterior (Fig. 9). Aquellos FT cuyo patrón de expresión fue solapante o mutuamente excluyente con el de *Six3.2* se denominaron “FT relacionados”. Por el contrario, aquellos genes cuyo patrón de expresión no fuese directamente relacionable con *Six3.2* se descartaron del análisis.

Este procedimiento acotó los posibles candidatos a un número reducido de genes, incluyendo miembros de las familias *Fox*, *Sox*, *Pax*, *Pbx*, *Tcf* y *Tale* entre otros (Tabla IX), para los cuales

existen evidencias bibliográficas que apoyarían un posible papel regulador de los mismos sobre la expresión de *Six3.2*.

Tabla IX. Evidencias publicadas que apoyan el posible papel regulador de los FT candidatos identificados *in silico*

Familia génica	Evidencias previas	Referencias
Sox	<i>Sox2</i> y <i>Sox3</i> se expresan en la PNA y territorios prosencefálicos. Mutaciones en <i>SOX2</i> resultan en anofthalmia y defectos cerebrales. <i>Sox2</i> está implicado en inducción de la lente.	(Kelberman et al 2008; Smith et al 2009)
Pax	<i>Pax6</i> se expresa y es requerido para la especificación de territorios prosencefálicos y de la lente. Se ha descrito que se une al promotor del gen <i>Six3</i> de humano y otros vertebrados. Otros miembros de la familia Pax (<i>Pax3/7</i>) tienen expresión complementaria a <i>Six3</i> .	(Smith et al 2009; Stoykova et al 1996)
Tale	Varios genes <i>Meis</i> y <i>Pbx</i> se expresan en estructuras prosencefálicas y están implicados en el desarrollo de la lente. <i>Pbx2</i> y <i>Pbx4</i> se requieren para el desarrollo del ojo. <i>Six3</i> e <i>Irx3</i> se expresan en dominios excluyentes dentro de la PNA. Se ha postulado una represión mutua entre <i>Six3</i> e <i>Irx3</i> .	(Bumsted-O'Brien et al 2007; Conte et al 2010a; French et al 2007; Rodriguez-Seguel et al 2009; Zhang et al 2002)
Tcf	La vía de Wnt, de la cual son efectores, está relacionada con especificación AP de territorios prosencefálicos y se ha descrito que inhibe la expresión de <i>Six3</i> . Los mutantes <i>Headless (Tcf3^{-/-})</i> carecen de ojos y telencéfalo.	(Dorsky et al 2003; Kim et al 2000)
Otx	<i>Otx2</i> se expresa en PNA y territorios prosencefálicos y se requiere para su correcta especificación. Más tarde <i>Otx2</i> y <i>Six3</i> se expresan en dominios excluyentes durante la especificación del epitelio pigmentario y la neurorretina.	(Martinez-Morales et al 2003; Tian et al 2002)
Gli	La vía de <i>Shh</i> , cuya actividad transcripcional está mediada por los FT <i>Gli1-3</i> , está implicada en especificación y regionalización de hipotálamo, diencéfalo y telencéfalo, y en la especificación próximo-distal de la vesícula óptica.	(Chuang & Raymond 2002)
Msx	Expresión excluyente con <i>Six3</i> durante la especificación de la placa neural.	(Ishimura et al 2000)
Six	<i>Six3</i> regula su propio promotor en diferentes especies.	(Manavathi et al 2007)
Fox	Distintos genes <i>Fox</i> se coexpresan con <i>Six3.2</i> en diferentes territorios. Ej: <i>FoxE3</i> está implicado en el desarrollo de la lente. <i>Foxg1</i> controla la especificación del telencéfalo. <i>FoxN4</i> se requiere para la especificación de células amacrinas.	(Brownell et al 2000; Martynoga et al 2005)
NeuroD	Implicado en la especificación de células amacrinas. Regula el promotor de <i>Six6</i> .	(Conte et al 2010c; Inoue et al 2002)
Vsx/Rx	<i>Vsx1</i> y <i>Vsx2</i> se expresan en la neurorretina. Su defecto provoca microftalmia/anofthalmia e intervienen en la especificación de subtipos celulares de la retina. Los genes <i>Rx</i> se expresan en ojo e hipotálamo. La falta de función de <i>Rx3</i> resulta en ausencia de ojos. Su sobreexpresión induce la formación de ojos ectópicos.	(Bailey et al 2004; Decembrini et al 2006; Passini et al 1997)
Lmo	<i>Lmo4</i> limita el tamaño del prosencefalo regulando <i>Six3</i> e <i>Irx3</i> en el pez cebra.	(McCollum et al 2007)

No obstante, la búsqueda *in silico* de SU putativos para FT está condicionada por la disponibilidad de matrices consenso para los mismos. Además, muchos FT pueden reconocer distintas secuencias diana en el ADN, por lo que la utilización de una única matriz consenso a veces no resulta efectiva para predecir los SU de estas proteínas. Estas razones podrían justificar el hecho de que no se pudieran encontrar SU para FT cuyo patrón de expresión y función *in vivo* serían compatibles con un posible efecto regulador sobre el gen *Six3.2*. Un ejemplo de estos candidatos es el gen *Prox1* que se ha propuesto como activador directo del gen *SIX3* humano (Lengler & Graw 2001).

4.2. Validación de candidatos en ensayos de luciferasa

Una serie de FT, representativos de las diferentes familias de candidatos identificadas en el apartado anterior, se testaron en ensayos de luciferasa (**Tabla X**) en base a su capacidad para regular la actividad de la región promotora del gen *Six3.2* o de diferentes elementos de la misma (**Fig. 11A**, **Tabla X**). Entre ellos, *Pax6* se había descrito como un regulador directo del gen *Six3a* del pez cebra (Wargelius et al 2003);(Lengler & Graw 2001) y del gen *SIX3* humano, ortólogos del gen *Six3.2* de medaka. Utilizamos, por tanto, este gen para validar nuestra aproximación experimental. Como esperado, *Pax6* activó de forma dosis-dependiente la región reguladora de *Six3.2* (**Fig. 11B**), aunque solo se observaron diferencias significativas con aquellas construcciones carentes de los módulos A, B y C pero que contuviesen la región D. Esto concuerda con el papel represor propuesto para el elemento A (Conte & Bovolenta 2007) y con la presencia de SU putativos para *Pax* en la caja D (**Tabla X**). En cambio, *Pax2*, otro miembro de la familia *Pax* que se ha descrito poder reconocer las mismas secuencias de *Pax6* (Baumer et al 2003), no fue capaz de activar la construcción cII (**Tabla X**), sugiriendo que el efecto de *Pax6* sería específico de este FT.

Tabla X. Efecto de los distintos FT candidatos ensayados

FT ensayado	Predicción SU	Efecto
<i>Gata1</i>		NE
<i>Gata2</i>	A, C, D, E, G, I, L	NE
<i>Gata3</i>		NE
<i>Foxg1</i>	A, C, D, E, G, I, L	NE
<i>Neurod</i>	B, D, E, I, L	NE
<i>Lef1ca*</i>		+
<i>Tcf3ca*</i>	C, E	+
<i>Tcf4dn*</i>		+
<i>Sox2</i>		+
<i>Sox3</i>	A, C, D, E, G, I, L	NE
<i>Sox21</i>		NE
<i>Otx2</i>	D, G, I	NE
<i>Vsx2</i>	D, I	NE
<i>Pax2</i>		NE
<i>Pax6</i>	C, D, E, G, I, L	+
<i>Six3</i>		NE
<i>Six6</i>	A, L	NE
<i>Meis1b</i>		NE
<i>Pbx1</i>	A, E, G, I, L	+
<i>Irx3</i>	-	NE
<i>Msx2</i>	I	-
<i>Prox1</i>	-	NE
<i>Gli1</i>		NE
<i>Gli2</i>	A, I	NE

Se resume la localización de los SU putativos de los FT ensayados y su efecto sobre el promotor de *Six3.2*.

+: Activador; -: represor; NE: Ningún efecto

* En el caso de los FT *Lef1*, *Tcf3*, y *Tcf4* se utilizaron formas constitutivamente activadoras de los mismos

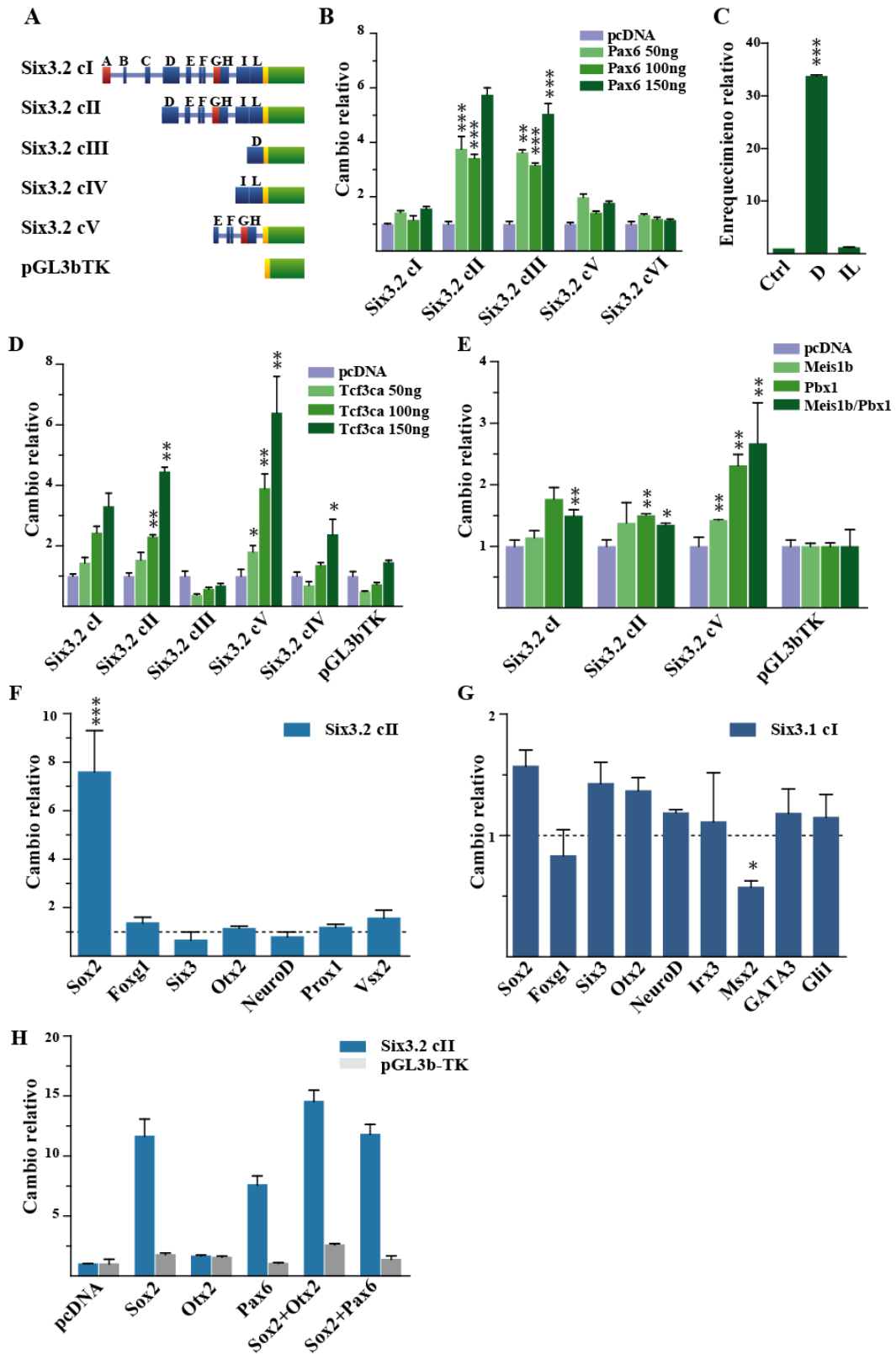


Figura 11. Distintos FT regulan la actividad transcripcional del gen *Six3.2*. A) Esquema de las construcciones empleadas en los ensayos de luciferasa. B) Efecto de diferentes dosis de Pax6 sobre las construcciones reporteras del gen *Six3.2* en ensayos de luciferasa. Pax6 activó los plásmidos reporteros cII y cIII que contienen el módulo D. C) ChIP realizada en células P19 cotransfectadas con el reportero cII y el plásmido de expresión 3myc-Pax6. El anticuerpo anti-myc precipitó el módulo D pero no la caja I-L ni una región control del plásmido pGL3b. D-H) Efecto de diferentes FT sobre la actividad de los vectores reporteros del gen *Six3.2*. Una forma constitutivamente activadora de Tcf3 (Tcf3ca) activó las construcciones que contienen los módulos E-H e I-L, pero no la caja D (D). Pbx1 activó los reporteros cI y cII, pero su efecto fue significativamente mayor sobre la construcción cV (E). La cotransfección con Meis1b no alteró el efecto de Pbx. Sox2 activó de forma significativa las construcciones cI y cII (F-G), mientras que Msx2 reprimió la actividad de cI (G). La cotransfección de Sox2 con Otx2 o Pax6 no alteró los niveles de activación del reportero cII (H).

Para determinar si dicha regulación se debiese a la unión directa de Pax6 al módulo D realizamos ensayos de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) en células P19 cotransfectadas con el vector reportero cII y el plásmido de expresión 3myc- Pax6. La inmunoprecipitación con el anticuerpo anti-myc resultó en un enriquecimiento de más de 30 veces para la región D con respecto a la región de control negativo, pero no para el bloque I-L (**Fig. 11C**), en línea con la ausencia de activación observada para la construcción cIV en los ensayos de luciferasa.

Una vez demostrada la validez de nuestra aproximación experimental, precedimos a testar otros de los factores candidatos más representativos identificados en el análisis *in silico* (**Tabla X, Fig. 11D-H**). La mayoría de los genes se ensayaron en cotransfección con los plásmidos reporteros cI y cII debido al efecto inhibitorio observado anteriormente con la construcción cI (**Fig.11B**). De estos, los FT Sox2, Pbx1 y una forma activadora constitutiva del gen *Tcf3* (*Tcf3ca*) regularon positivamente la región reguladora de *Six3.2* aunque el primero mostró un mayor efecto en comparación con los otros dos y con el gen Pax6 (**Fig. 11D-F**). El gen *Msx2*, en cambio, se comportó como un represor transcripcional, al inhibir significativamente la actividad del plásmido cI (**Fig.11G**). El FT *Tcf3ca* activó la construcción cV aproximadamente 6 veces (**Fig. 11D**), en línea con la presencia de SU putativos para Tcf/Lef en el elemento E (**Tabla X**), pero también reguló positivamente la actividad de los reporteros cI, cII y cIV (**Fig. 11D**), sugiriendo que, al menos en los módulos conservados I-L, podrían existir otros SU para este factor, no identificados en nuestro análisis *in silico*. En cambio, Pbx1 activó de forma máxima la construcción cIV, en línea con la predicción de SU para este FT en la caja I-L (**Fig. 11E, Tabla X**), mientras que su efecto sobre los reporteros cI y cII fue comparativamente muy inferior, indicando que otros elementos reguladores podría antagonizar el efecto de este FT en nuestro sistema experimental. Los genes Pbx forman complejos transcripcionales con los FT Meis y con distintos FT de tipo homeodominio o bHLH para unirse al ADN (Sagerstrom 2004). Sin embargo, Meis1b solo activó de forma marginal el reportero cIV y la cotransfección de Pbx1 con Meis1b (**Fig. 11E**) no alteró significativamente el efecto activador del mismo, aunque no se excluye la posibilidad de que otros miembros de la familia TALE u otros FT puedan requerirse para potenciar el efecto de Pbx1 *in vivo*, de forma similar a lo descrito para otros genes diana de estas proteínas (Liu et al 2001; Moens & Selleri 2006).

El efecto regulador del gen Sox2 se caracteriza más adelante en el trabajo. Sin embargo, puesto que se ha descrito que este FT puede interactuar de forma cooperativa con los genes Pax6 y Otx2 en la activación de otros genes implicados en el desarrollo del ojo (Chassaing et al 2009; Danno et al 2008; Inoue et al 2007; Kamachi et al 2001) nos propusimos verificar si este pudiese ser también el caso del gen *Six3.2*. En línea con estas evidencias, los SU putativos para Sox2 y Pax6 se encuentran agrupados de forma repetitiva dentro de la región D y también se encontraron posibles secuencias de unión para Sox2 y Otx2 dentro de la región I-L (**Tabla X**, datos no mostrados). Sin embargo, la combinación de Sox2 con Pax6 no incrementó significativamente su capacidad de transactivación ni

sobre el reportero cII (**Fig. 11H**), ni sobre la construcción cIII (datos no mostrados). Así mismo, la contranfección de Sox2 con Otx2 tampoco resultó en un efecto significativo (**Fig. 11H**).

En conjunto, estos resultados identifican una serie de FT capaces de regular la actividad del promotor de *Six3.2* actuando sobre diferentes módulos reguladores del mismo y que podrían ser candidatos a controlar la expresión del gen *Six3.2* también *in vivo*.

4.3. Rastreo masivo de reguladores del gen *Six3.2* en ensayos de transactivación transcripcional

El método presentado en el apartado anterior ha permitido identificar un importante número de reguladores del gen *Six3.2*. Sin embargo, presenta una serie de restricciones que limitan su marco de aplicación. Entre estas cabe destacar que, para un número importante de FT todavía no se dispone de una matriz que defina su secuencia de reconocimiento, que determinados FT pueden reconocer secuencias de ADN distintas a la descrita por su matriz consenso, y que, en ciertos casos, resulta difícil encontrar una conservación de los sitios de reconocimientos a lo largo de diferentes linajes evolutivos.

Para superar estas limitaciones llevamos a cabo un rastreo masivo de reguladores transcripcionales del gen *Six3.2* mediante ensayos de luciferasa utilizando una librería de expresión de medaka, secuenciada y clasificada, compuesta por clones codificantes únicos (Souren et al 2009). Un total de 1064 genes de esta librería, catalogados como “reguladores del desarrollo” se testaron en base a su habilidad para activar o reprimir un vector reportero que incluye la región reguladora completa de *Six3.2* (pGI3b-*Six3.2*prom, ver material y métodos). Esta técnica ha sido empleada para la identificación de factores reguladores en *trans* del gen *Ath5* de medaka (Souren et al 2009). Los 1064 clones se cotransfectaron por triplicado (**Fig. 12**) junto con el vector reportero pGI3b-*Six3.2*prom y el plásmido de control que pRL-CMV, que expresa el reportero Renilla bajo el promotor constitutivo del citomegalovirus (CMV), sirviendo como control interno de transfección y permitiendo corregir los errores debidos a variaciones en el número inicial de células, eficiencia de transfección y diferencias en las tasas de proliferación/apoptosis. El 91,82%

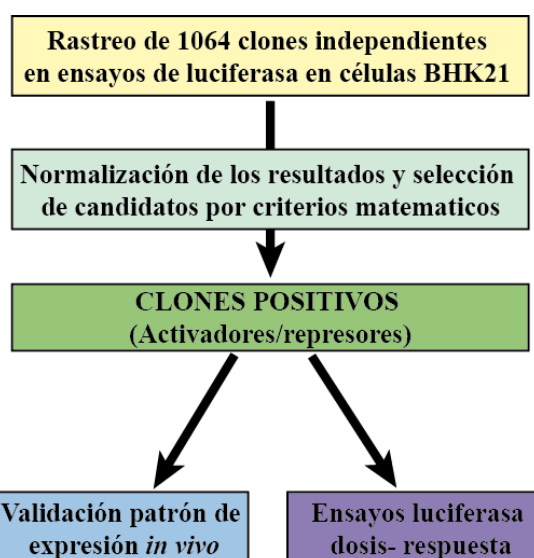
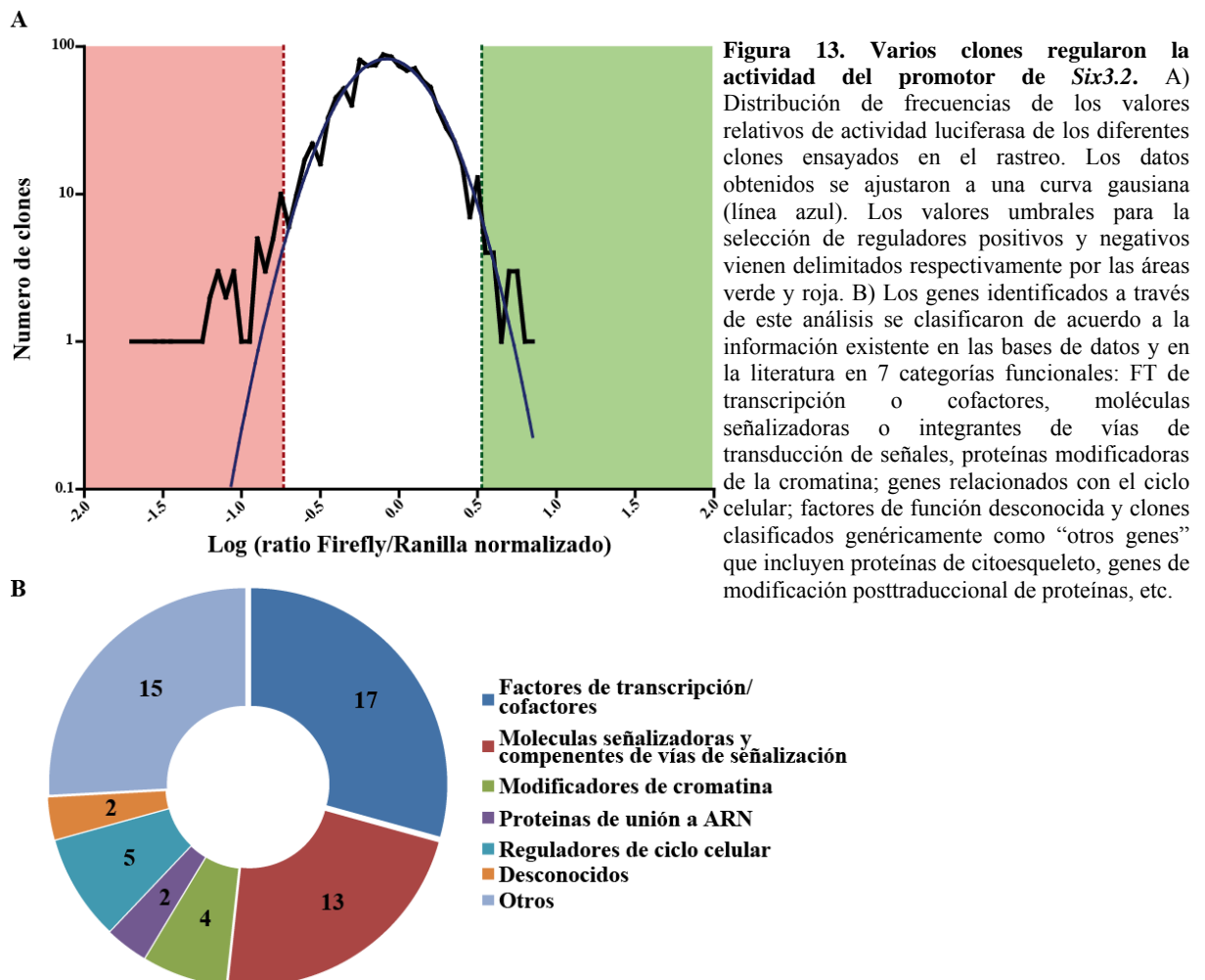


Figura 12. Procedimiento experimental empleado para el rastreo de reguladores en *trans* del gen *Six3.2*. Se muestran resumidos los principales pasos del proceso de rastreo y validación de los reguladores en *trans* del gen *Six3.2*.

de los clones probados dieron lecturas validas, reflejando la robustez y fiabilidad del método empleado. Puesto que sólo un pequeño número de genes, en comparación con el número total de clones ensayados, es susceptible de ejercer un efecto en el promotor de *Six3.2*, las variaciones al

rededor de la media de sus niveles de actividad relativa (medida como el cociente entre la actividad del reportero y la actividad del plásmido control) pueden considerarse como aleatorias y ajustarse a una distribución de tipo normal. Por el contrario, es poco probable que aquellos valores situados fuera de dicha curva puedan deberse a variaciones aleatorias y, por tanto, dichos clones serían plausibles reguladores de la actividad de *Six3.2*. Por tanto, ajustamos los datos obtenidos a una curva gaussiana (**Fig. 13A**) y seleccionamos los candidatos en base a criterios matemáticos. La media de dicha curva se calculó en base a los valores normalizados de todos los clones. Aquellos genes que dieron valores a 0,48 o 1,69 veces la media fueron seleccionados como represores o activadores respectivamente. Un total de 58 genes cumplieron los criterios mencionados, lo que supone un 5,45% del total de clones ensayados. La mayoría de estos ADNc se clasificaron como factores de transcripción (27,58%) y componentes de vías de señalización (22,41%), en línea con los resultados descritos para el gen *Ath5* (Souren et al 2009), mientras que el resto se clasificaron en diferentes categorías funcionales (**Fig. 13B**).



A continuación se caracterizó la actividad de cada uno de los 58 clones seleccionados en el análisis anterior determinando el efecto regulador de los mismos a diferentes concentraciones (**Fig.12**). Este ensayo se realizó utilizando paralelamente 2 vectores reporteros como controles internos de transfección (pRL-CMV- y pRL-SV40-Renilla), con el fin de excluir posibles efectos de

regulación sobre los promotores de referencia. Para cada factor se probó un amplio rango de concentraciones, que variaron desde una proporción 1:2 con respecto al reportero pGL3b-*Six3.2*prom hasta la relación 4:1. De los 58 clones ensayados, 16 (27,58%) regularon de forma dosis-dependiente la actividad de *Six3.2* (**Fig. 16**) en las dos condiciones experimentales ensayadas, mientras que un 37,93% no mostró variación alguna en ninguno de los dos ensayos (**Tablas XI y XII**). El resto (65,51%) reguló de forma dosis dependiente el reportero pGL3b-*Six3.2*prom solamente en uno de los dos ensayos (**Tablas XI y XII**), evidenciando la necesidad de caracterizar más en detalle su efecto regulador.

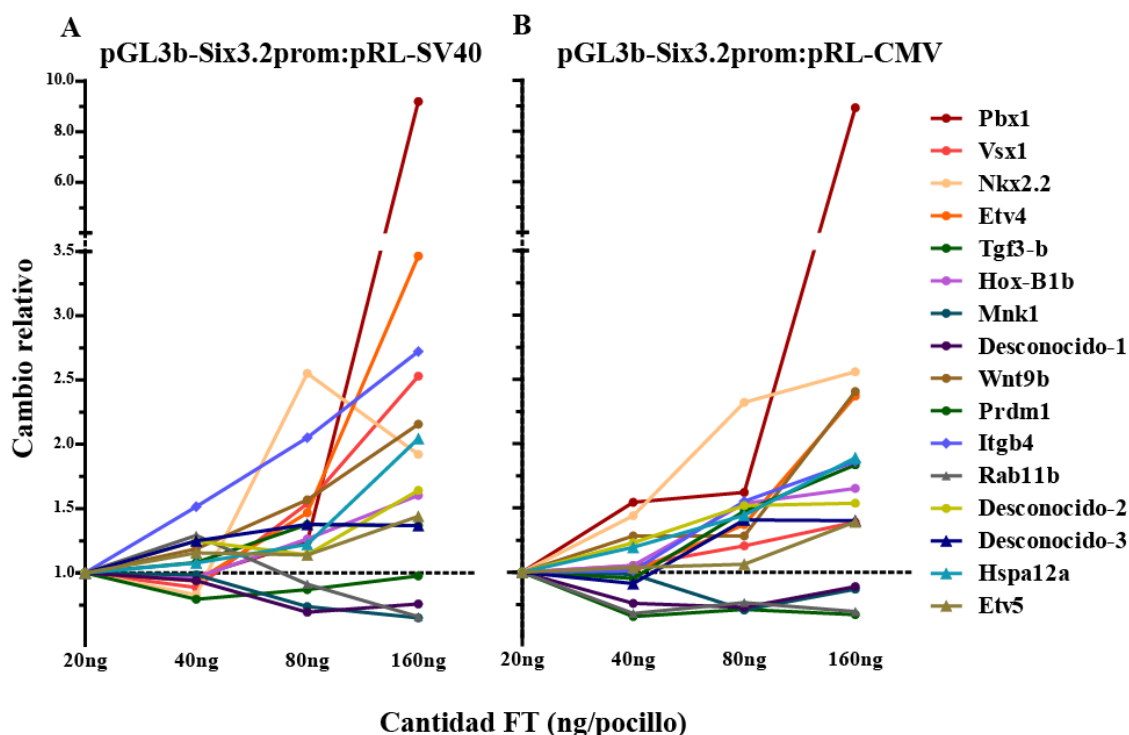


Figura 14. Un total de 16 clones regularon la actividad de la región reguladora de *Six3.2* en ensayos independientes. A-B) Ensayos de luciferasa mostrando la respuesta dosis-dependiente de 16 de los 58 clones identificados en el rastreo de reguladores del gen *Six3.2*, utilizando como reportero de control interno de transfección los plásmidos pRL-CMV (A) y pRL-SV40(B). Para cada clon se representa el valor modal de tres replicados a las diferentes dosis de FT ensayadas.

Entre los 16 genes finalmente seleccionados se encuentran los factores de transcripción *Pbx1*, identificado también a través de la aproximación de análisis *in silico* presentada anteriormente, *Vsx1*, *Prdm1* y *Nkx2.2* (**Fig. 14A,B, Tabla XI-XII**). De éstos, el gen *Nkx2.2* se expresa desde estadios tempranos en el hipotálamo presuntivo, y colocaliza con *Six3.2* en la porción más anterior del mismo (**Fig. 15A**). Esto sugiere que el gen *Nkx2.2* podría controlar la expresión de *Six3.2* en este territorio aunque no excluye que otros miembros de la misma familia, como *Nkx2.1*, también expresado en el dominio hipotalámico (**Fig. 27B**), puedan contribuir al control de la expresión de *Six3.2* *in vivo*. Por otra parte, los genes *Vsx1* y *Prdm1* de medaka se expresan en la retina durante la especificación de los distintos tipos de neuronas (**Fig. 15B, C**), de forma similar a lo descrito en otras especies, donde se ha visto que intervienen en la especificación de los subtipos celulares de la misma (Brzezinski et al 2010; Chow et al 2004; Decembrini et al 2006; Sanchez-Sanchez et al 2010). Además varios genes

Pbx, incluidos los FT *Pbx2*, *Pbx4* y *Pbx1* (French et al 2007); **Fig.15D**) se expresan durante el desarrollo temprano y tardío de la retina. Así mismo, el gen *Six3.2* se expresa también en la retina a estos estadios (Conte & Bovolenta 2007) y se han descrito diversas funciones para el gen *Six3* en la especificación de los subtipos celulares de la retina de vertebrados (Dyer 2003) (Inoue et al 2002), lo que sugiere que la regulación de *Six3.2* por parte de los FT *Pbx1*, *Prdm1* y *Vsx1* podría tener una relevancia funcional en este proceso.

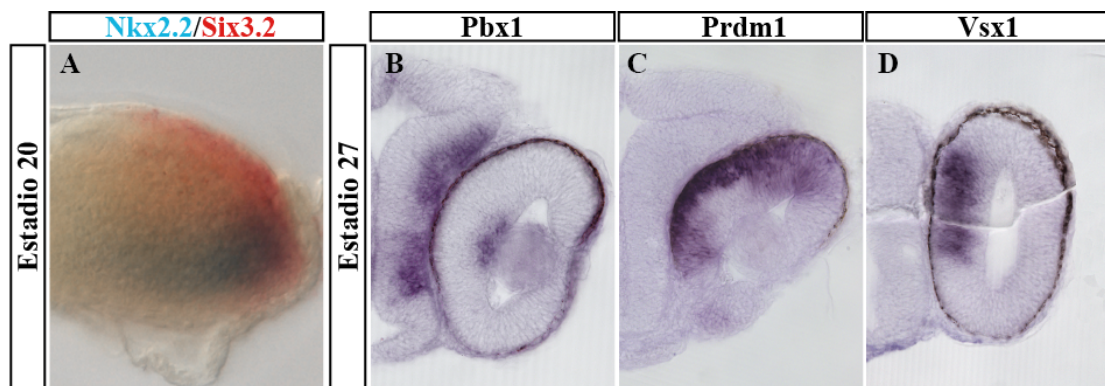


Figura 15. Los genes *Nkx2.2*, *Pbx1*, *Prdm1* y *Vsx1* presentan patrones de expresión compatibles con la regulación del gen *Six3.2*. A) vista lateral de un embrión de medaka de estadio 19 hibridado con sondas específicas para *Nkx2.2* (azul claro) y *Six3.2* (rojo). B-C) Secciones transversales de embriones de medaka en estadio 27, mostrando la expresión de los genes *Pbx1*, *Prdm1* y *Vsx1* en la retina neural.

En su conjunto, estos resultados identifican una serie de reguladores del gen *Six3.2*. Aunque es necesario llevar a cabo experimentos para corroborar estas relaciones y verificar su posible función *in vivo*, algunos de los genes identificados son candidatos más que plausibles a controlar diferentes aspectos de la expresión de *Six3.2*. Finalmente, la complementariedad entre los resultados de las dos aproximaciones empleadas en este estudio pone de manifiesto la necesidad de utilizar diferentes aproximaciones experimentales a la hora de identificar el mayor número de reguladores de la expresión de un determinado gen.

Tabla XI. Efectos dosis-respuesta de los 58 clones positivos identificados en el rastreo de reguladores en *trans* del gen *Six3.2* utilizando como control interno de transfección el reportero pRL-CMV.

	pRL-CMV			
	20ng	40ng	80ng	160ng
<i>Rac1</i>	0,026±0,001	0,038±0,002	0,033±0,001	0,039±0,006
<i>Bcl2l10</i>	0,018±0,001	0,021±0,003	0,015±0,001	0,017±0,003
<i>Pdcl3</i>	0,040±0,003	0,051±0,008	0,070±0,004	0,081±0,005
<i>Sdf1 protein</i>	0,032±0,003	0,046±0,005	0,048±0,002	0,056±0,007
<i>Pbx1</i>	0,033±0,004	0,051±0,005	0,054±0,001	0,298±0,077
<i>Vsn11</i>	0,042±0,005	0,063±0,012	0,073±0,004	0,075±0,009
<i>Vsx1</i>	0,082±0,010	0,087±0,013	0,099±0,011	0,115±0,019
<i>Nkx2-2</i>	0,035±0,007	0,050±0,008	0,081±0,008	0,089±0,009
<i>Bag2</i>	0,047±0,008	0,065±0,014	0,079±0,006	0,100±0,008
<i>Elmo1</i>	0,034±0,005	0,051±0,008	0,054±0,003	0,059±0,013
<i>Etv4</i>	0,061±0,006	0,061±0,005	0,083±0,003	0,144±0,009
<i>Rhoa</i>	0,030±0,005	0,039±0,004	0,038±0,000	0,055±0,006
<i>Quaking</i>	0,025±0,002	0,027±0,001	0,031±0,005	0,025±0,004
<i>Act16a</i>	0,038±0,005	0,054±0,009	0,061±0,008	0,053±0,000
<i>Neurod4</i>	0,049±0,003	0,059±0,007	0,081±0,014	0,088±0,008
<i>Nrf1</i>	0,030±0,001	0,042±0,006	0,042±0,010	0,027±0,001
<i>Isl2</i>	0,074±0,002	0,079±0,016	0,125±0,023	0,125±0,012
<i>Sip1</i>	0,056±0,002	0,059±0,007	0,079±0,029	0,057±0,001
<i>Prmt8</i>	0,050±0,004	0,041±0,004	0,064±0,014	0,047±0,003
<i>Tgfb3</i>	0,075±0,007	0,049±0,004	0,053±0,010	0,050±0,003
<i>Chuk</i>	0,072±0,008	0,054±0,009	0,069±0,012	0,065±0,002
<i>Hox-b1b</i>	0,101±0,011	0,106±0,006	0,155±0,015	0,167±0,022
<i>Cap1</i>	0,099±0,007	0,119±0,008	0,144±0,020	0,146±0,009
<i>Dzip11</i>	0,077±0,007	0,073±0,009	0,074±0,017	0,061±0,003
<i>Wnt7b</i>	0,052±0,004	0,071±0,013	0,054±0,010	0,070±0,005
<i>Snai1</i>	0,071±0,004	0,080±0,006	0,060±0,009	0,072±0,005
<i>Homólogo a mynn</i>	0,086±0,013	0,102±0,019	0,088±0,028	0,125±0,011
<i>Mink1</i>	0,073±0,010	0,072±0,007	0,052±0,010	0,064±0,008
<i>Aplnr</i>	0,070±0,008	0,069±0,007	0,064±0,019	0,097±0,005
<i>Fzd7</i>	0,036±0,008	0,033±0,012	0,019±0,001	0,018±0,002
<i>Homólogo a znf771</i>	0,076±0,008	0,058±0,000	0,055±0,013	0,067±0,004
<i>Rab31</i>	0,058±0,005	0,058±0,011	0,073±0,007	0,066±0,006
<i>Hdac1</i>	0,091±0,015	0,085±0,004	0,105±0,030	0,157±0,013
<i>Wnt9b</i>	0,064±0,009	0,082±0,016	0,082±0,024	0,155±0,033
<i>Prdm1</i>	0,072±0,003	0,068±0,005	0,106±0,014	0,132±0,006
<i>Gadd45g</i>	0,030±0,003	0,034±0,002	0,033±0,006	0,051±0,002
<i>Itgb4</i>	0,059±0,004	0,060±0,006	0,092±0,008	0,110±0,013
<i>Rab11b</i>	0,056±0,001	0,038±0,003	0,048±0,005	0,039±0,004
<i>Desconocido1</i>	0,045±0,006	0,035±0,003	0,044±0,008	0,038±0,003
<i>Efnb2</i>	0,080±0,006	0,069±0,006	0,109±0,020	0,089±0,005
<i>Dnmt</i>	0,055±0,008	0,048±0,003	0,079±0,015	0,090±0,006
<i>Copa</i>	0,061±0,004	0,057±0,008	0,068±0,004	0,062±0,008
<i>Cts11a</i>	0,059±0,001	0,058±0,003	0,094±0,008	0,078±0,003
<i>Dlx5</i>	0,060±0,016	0,040±0,000	0,060±0,006	0,054±0,003
<i>Fgf3</i>	0,082±0,016	0,063±0,004	0,111±0,021	0,068±0,007
<i>Clns1a</i>	0,097±0,008	0,085±0,006	0,140±0,025	0,131±0,017
<i>Desconocido-2</i>	0,086±0,003	0,106±0,010	0,131±0,017	0,132±0,014
<i>Desconocido-3</i>	0,088±0,017	0,080±0,008	0,124±0,004	0,123±0,009
<i>Egf17</i>	0,047±0,002	0,068±0,005	0,057±0,009	0,076±0,010
<i>Rhombotin-1</i>	0,125±0,025	0,125±0,020	0,124±0,015	0,164±0,015
<i>Etv5</i>	0,059±0,009	0,069±0,008	0,068±0,008	0,086±0,008
<i>Prkaa1</i>	0,051±0,003	0,060±0,018	0,062±0,013	0,073±0,011
<i>Aldh1a2</i>	0,036±0,005	0,062±0,004	0,044±0,004	0,051±0,006
<i>Irx1</i>	0,076±0,010	0,116±0,017	0,091±0,011	0,113±0,010
<i>Hspa12a</i>	0,062±0,012	0,074±0,004	0,089±0,017	0,117±0,011
<i>N4bp1</i>	0,155±0,019	0,181±0,027	0,141±0,015	0,138±0,008
<i>Hdac1</i>	0,061±0,008	0,086±0,006	0,086±0,021	0,210±0,039
<i>Dedd</i>	0,069±0,008	0,083±0,020	0,069±0,003	0,086±0,011

Para cada clon se muestran los valores medios de tres réplicas ±error típico

Tabla XII: Efectos dosis- respuesta de los 58 clones positivos identificados en el rastreo de reguladores en *trans* del gen *Six3.2* utilizando como control interno de transfección el reportero pRL-SV40.

	pRL-SV40			
	20ng	40ng	80ng	160ng
<i>Rac1</i>	0,035±0,003	0,030±0,003	0,033±0,001	0,018±0,000
<i>Bcl2l10</i>	0,035±0,004	0,037±0,002	0,015±0,001	0,039±0,002
<i>Pdcl3</i>	0,043±0,003	0,046±0,003	0,070±0,003	0,051±0,007
<i>Sdf1 protein</i>	0,042±0,007	0,034±0,003	0,048±0,001	0,026±0,002
<i>Pbx1</i>	0,046±0,004	0,040±0,001	0,054±0,002	0,380±0,034
<i>Vsnl1</i>	0,040±0,003	0,042±0,002	0,073±0,005	0,035±0,002
<i>Vsx1</i>	0,077±0,006	0,068±0,003	0,099±0,009	0,195±0,021
<i>Nkx2-2</i>	0,034±0,003	0,031±0,000	0,081±0,007	0,073±0,017
<i>Bag2</i>	0,048±0,004	0,036±0,002	0,079±0,000	0,037±0,003
<i>Elmo1</i>	0,040±0,001	0,042±0,003	0,054±0,001	0,041±0,007
<i>Etv4</i>	0,066±0,004	0,062±0,003	0,083±0,009	0,206±0,026
<i>Rhoaa</i>	0,036±0,003	0,024±0,000	0,038±0,001	0,020±0,000
<i>Quaking</i>	0,035±0,002	0,029±0,001	0,031±0,002	0,020±0,001
<i>Actl6a</i>	0,043±0,005	0,038±0,000	0,061±0,001	0,036±0,001
<i>Neurod4</i>	0,051±0,001	0,044±0,004	0,081±0,001	0,049±0,001
<i>Nrf1</i>	0,053±0,002	0,048±0,002	0,042±0,004	0,077±0,001
<i>Isl2</i>	0,056±0,006	0,054±0,002	0,125±0,000	0,067±0,003
<i>Sip1</i>	0,047±0,004	0,040±0,000	0,079±0,000	0,040±0,003
<i>Prmt8</i>	0,038±0,003	0,038±0,001	0,064±0,000	0,031±0,002
<i>Tgfb3</i>	0,044±0,004	0,035±0,002	0,053±0,001	0,043±0,001
<i>Chuk</i>	0,048±0,003	0,047±0,001	0,069±0,001	0,083±0,000
<i>Hox-b1b</i>	0,066±0,005	0,069±0,001	0,155±0,004	0,114±0,001
<i>Cap1</i>	0,062±0,002	0,056±0,003	0,144±0,004	0,082±0,002
<i>Dzip11</i>	0,047±0,000	0,041±0,001	0,074±0,001	0,056±0,003
<i>Wnt7b</i>	0,052±0,002	0,049±0,000	0,054±0,005	0,055±0,002
<i>Snail</i>	0,046±0,001	0,049±0,005	0,060±0,004	0,042±0,001
<i>Homólogo a mynn</i>	0,065±0,006	0,063±0,000	0,088±0,007	0,073±0,003
<i>Mink1</i>	0,051±0,003	0,054±0,004	0,052±0,002	0,035±0,002
<i>Aplnr</i>	0,054±0,003	0,067±0,003	0,064±0,001	0,125±0,003
<i>Fzd7</i>	0,045±0,002	0,038±0,002	0,019±0,011	0,036±0,002
<i>Homólogo a znf771</i>	0,058±0,004	0,054±0,004	0,055±0,001	0,044±0,001
<i>Rab31</i>	0,068±0,001	0,052±0,003	0,073±0,001	0,051±0,002
<i>Hdac1</i>	0,070±0,002	0,077±0,002	0,105±0,004	0,077±0,007
<i>Wnt9b</i>	0,074±0,003	0,088±0,004	0,082±0,000	0,160±0,004
<i>Prdm1</i>	0,056±0,000	0,060±0,001	0,106±0,004	0,077±0,002
<i>Gadd45g</i>	0,038±0,003	0,044±0,002	0,033±0,004	0,037±0,002
<i>Itgb4</i>	0,084±0,007	0,117±0,004	0,092±0,007	0,210±0,018
<i>Rab11b</i>	0,035±0,002	0,045±0,004	0,048±0,001	0,025±0,002
<i>Desconocido1</i>	0,037±0,001	0,049±0,001	0,044±0,001	0,055±0,001
<i>Efnb2</i>	0,058±0,002	0,069±0,004	0,109±0,001	0,080±0,007
<i>Dnmt</i>	0,042±0,000	0,041±0,002	0,079±0,002	0,058±0,007
<i>Copa</i>	0,061±0,000	0,079±0,000	0,068±0,006	0,097±0,005
<i>Ctsl1a</i>	0,041±0,001	0,049±0,006	0,094±0,002	0,046±0,003
<i>Dlx5</i>	0,044±0,001	0,042±0,003	0,060±0,001	0,044±0,001
<i>Fgf3</i>	0,054±0,003	0,063±0,003	0,111±0,005	0,065±0,000
<i>Clns1a</i>	0,044±0,001	0,051±0,003	0,140±0,002	0,057±0,006
<i>Desconocido-2</i>	0,051±0,002	0,064±0,002	0,131±0,004	0,085±0,009
<i>Desconocido-3</i>	0,049±0,002	0,061±0,001	0,124±0,004	0,067±0,010
<i>Egfl7</i>	0,039±0,003	0,042±0,003	0,057±0,000	0,044±0,001
<i>Rhombotin-1</i>	0,053±0,006	0,060±0,004	0,124±0,002	0,061±0,007
<i>Etv5</i>	0,045±0,000	0,047±0,001	0,068±0,001	0,063±0,005
<i>Prkaa1</i>	0,039±0,004	0,040±6,679	0,062±0,003	0,040±0,000
<i>Aldh1a2</i>	0,048±0,001	0,049±0,000	0,044±0,004	0,056±0,002
<i>Irx1</i>	0,050±0,003	0,052±0,003	0,091±0,001	0,063±0,001
<i>Hspa12a</i>	0,049±0,001	0,053±0,002	0,089±0,001	0,101±0,008
<i>N4bp1</i>	0,081±0,006	0,087±0,005	0,141±0,005	0,109±0,003
<i>Hdac1</i>	0,046±0,002	0,045±0,001	0,086±0,004	0,068±0,004
<i>Dedd</i>	0,046±0,001	0,051±0,003	0,069±0,002	0,052±0,004

Para cada clon se muestran los valores medios de tres réplicas ±error típico

4. RESULTADOS

BLOQUE II

Papel funcional del gen *Sox2* como regulador de la expresión de *Six3.2* en fases tempranas del desarrollo

A pesar de existir un importante número de trabajos caracterizando la función del gen *Six3* y sus parálogos en el desarrollo de las estructuras prosencefálicas, poco se sabe sobre cómo este FT contribuye diferencialmente a su especificación, ni de los mecanismos que controlan su expresión temprana en dichos territorios. El gen *Six3.2* se expresa desde estadios de PNA en diferentes dominios prosencefálicos y con distintos niveles de intensidad, constituyendo un excelente punto de partida para abordar el estudio de estos procesos.

En esta parte del trabajo nos centramos en el papel de un FT identificado en el apartado anterior como candidato a regular *in vivo* la expresión de *Six3.2*: el gen *Sox2*. Combinando ensayos de activación transcripcional e inmunoprecipitación de cromatina en células con experimentos de ganancia/pérdida de función *in vivo* demostramos que *Sox2* es un regulador temprano de la expresión de *Six3.2*, controlando sus niveles de expresión en distintos dominios prosencefálicos y describimos como dichos niveles contribuyen diferencialmente a la especificación de estas estructuras.

4.4. *Sox2 regula directamente la actividad del promotor de Six3.2*

Se sabe que distintos miembros de la familia *SoxB* se expresan durante el desarrollo del sistema nervioso central de vertebrados. El subgrupo *SoxB1* consta de 3 miembros en mamíferos, mientras que en el pez cebra se han descrito dos duplicaciones adicionales (*Sox1*, *Sox2*, *Sox3* *Sox19a/b*). Además los genes *Sox2*, *Sox3*, *Sox19a* y *Sox19b* actúan de forma redundante durante las fases tempranas de especificación de tejido nervioso (Germana et al 2010; Miyagi et al 2009; Okuda et al 2010; Okuda et al 2006; Vríz & Lovell-Badge 1995) en el pez cebra. Sin embargo, en el pez medaka solo pudimos identificar los parálogos *Sox1*, *Sox2* y *Sox3* (**Fig. 16**), posiblemente indicando un menor grado de redundancia funcional.

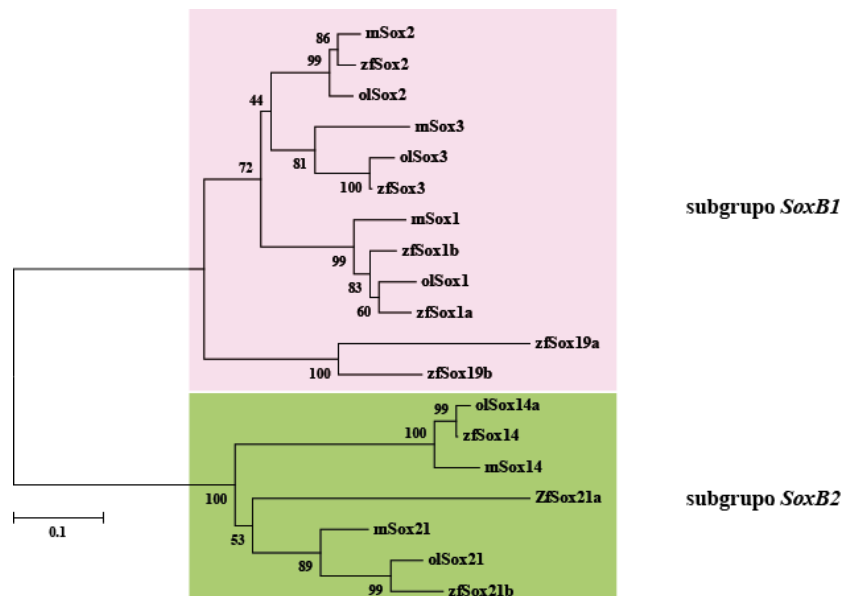


Figura 16. Análisis filogenéticos identifican 3 miembros del subgrupo *SoxB1* en medaka. Las secuencias de los diferentes genes fueron identificadas y descargadas de la base de datos USCS mediante búsqueda por BLAT usando la secuencia descrita de los genes *SoxB* de pez cebra y ratón. Las secuencias proteicas de los genes *Sox* se alinearon con el programa MUSCLE y se definieron bloques de conservación con el programa GBLOCKS. Finalmente las secuencias de estos bloques fueron alineadas con el programa MEGA4 y se determinaron las distancias filogenéticas mediante el método Neighbor-joining, (bootstrap=500). Los valores de bootstrap se indican al lado de cada nodo. Nótese que no se encontraron genes ortólogos a los genes *Sox19* y *Sox19b* del pez cebra en medaka ni en ratón, sugiriendo que estos provendrían de un evento de duplicación génica ocurrido en este linaje. Medaka: ol; pez cebra: zf; Ratón m

En medaka, *Sox2* y *Sox3* se expresan en todo el SNC en desarrollo (**Fig. 17 I-L, R**), mientras que la expresión de *Sox1* está restringida al hipotálamo (**Fig. 17O**), en concordancia con los patrones descritos para estos genes en otras especies (Miyagi et al 2009). Además, tanto *Sox2* como *Sox3* se expresan a diferentes niveles en los territorios prosencefálicos, siendo su expresión muy baja en las vesículas ópticas en evaginación y progresivamente más intensos en hipotálamo y telencéfalo a estadio 20 (**Fig. 17**). De forma similar, el gen *Six3.2* también se expresa con diferentes niveles de intensidad en el prosencefalo embrionario: la expresión del mismo es alta en el telencéfalo presuntivo a estadio 20, mientras que sus niveles son menores en las vesículas ópticas, donde forma un gradiente antero^{alto}-posterior^{bajo} (**Fig. 17**). Finalmente se detectaron bajos niveles de expresión de *Six3.2* en el hipotálamo y en el diencéfalo (*Pax6+*, **Fig. 17**). Este patrón contrasta con la distribución

del ARNm del gen *Six3.1*, el otro parólogo del gen *Six3* de mamíferos (Loosli et al 1998). Este se expresa de forma intensa en las vesículas ópticas, en el diencéfalo y en el dominio alar del hipotálamo (**Fig. 17**), pero está ausente de la porción dorsal del telencéfalo, en línea con la segregación de la expresión de estos genes descrita previamente (Conte & Bovolenta 2007).

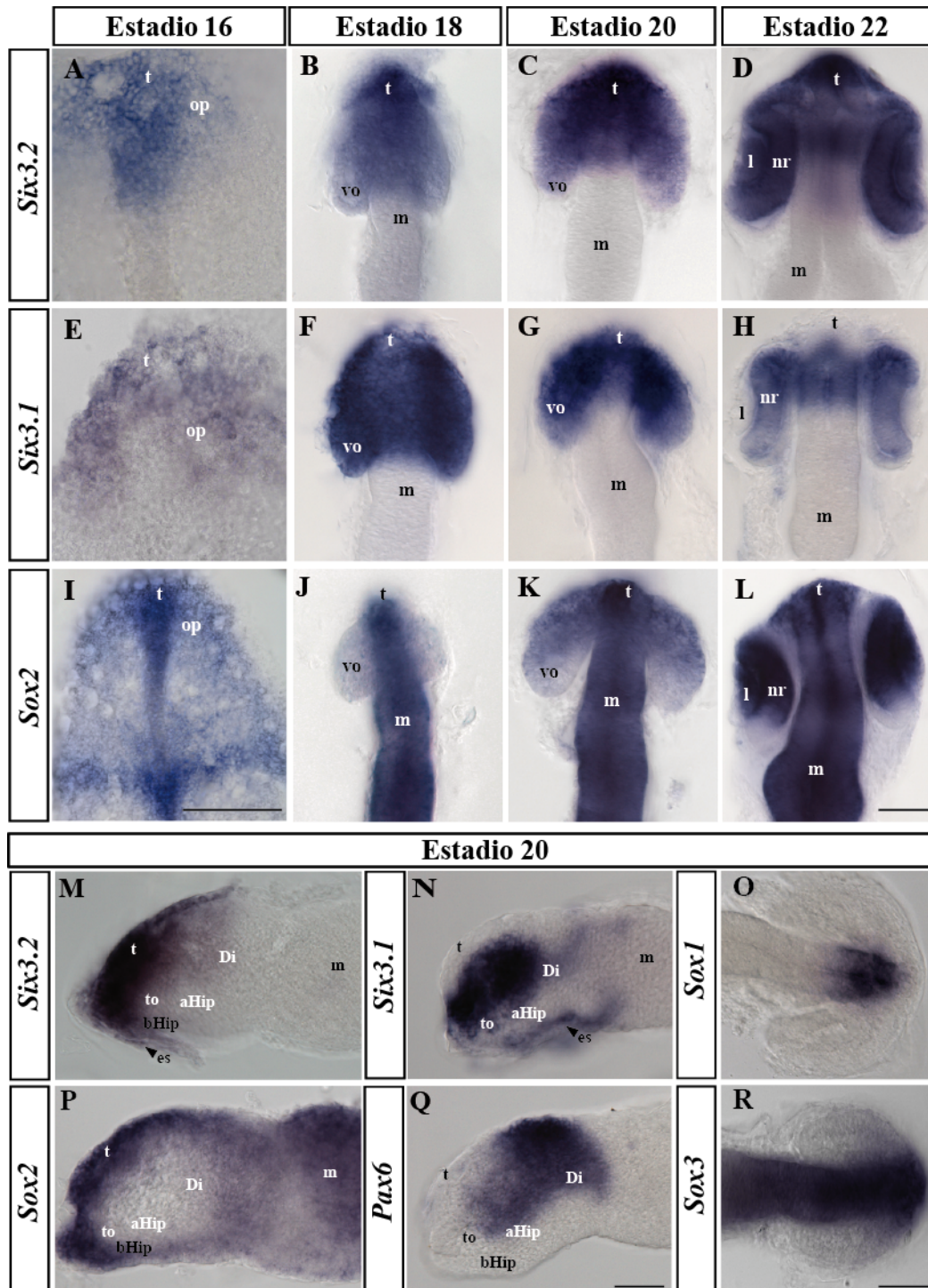


Figura 17. *Sox2* y *Six3.2* se expresan de forma diferencial en dominios solapantes del prosencéfalo. Vistas dorsales y laterales de embriones de medaka en diferentes estadios de desarrollo hibridados *in toto* con sondas específicas para los genes *Six3.2* (A-D,M), *Six3.1* (E-H,N), *Sox2* (I-L, P), *Sox1* (O), *Sox3* (R), y *Pax6* (Q). *Sox2* y *Six3.2* se expresan a altos niveles en el telencéfalo y con menos intensidad en ojo y en hipotálamo a estadio 20 (C, K, P). Además *Six3.2* se expresa también en la porción anterior del diencéfalo (M), positiva para *Pax6* (Q). En cambio, *Six3.1* se localiza a altos niveles en las vesículas ópticas, diencéfalo e hipotálamo a estadio 20, pero está ausente en el telencéfalo dorsal. aHip: Hipotálamo alar; bHip: Hipotálamo basal; Di: Diencéfalo; Es: ectodermo superficial; l: lente; m: mesencéfalo; nr: neurorretina; op: ojo presuntivo; t: telencéfalo; to: tallo óptico; vo: vesículas ópticas. Barra de escala: 40µm.

Con el fin de validar la posible regulación funcional de los genes *Sox* sobre el promotor de *Six3.2* probamos distintos miembros de los subgrupos *SoxB1* y *SoxB2* en ensayos de luciferasa en células P19. La cotransfección con cantidades crecientes de *Sox2* resultó en la activación de las construcciones contenientes los elementos reguladores D e IL (Fig. 18B).

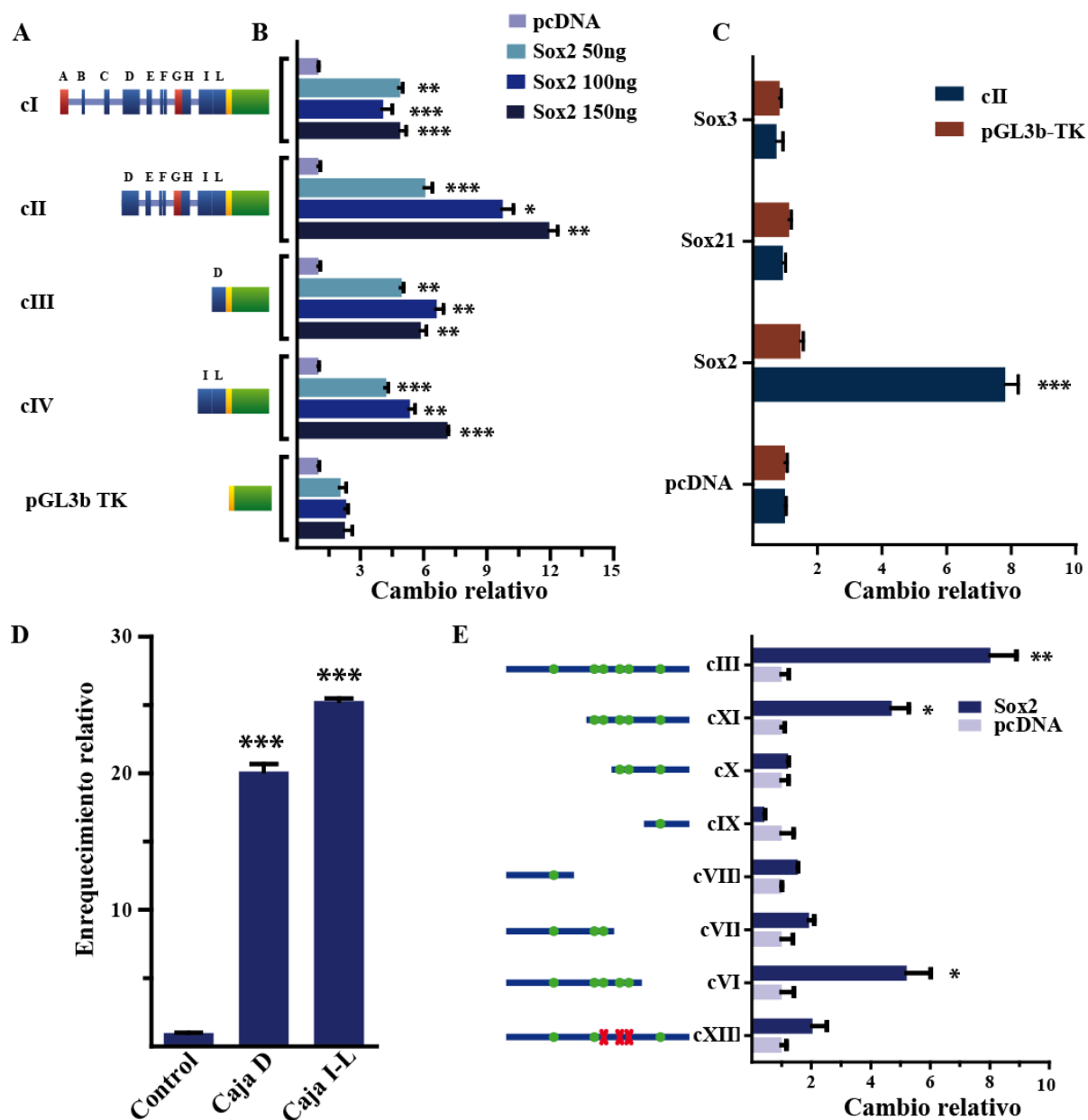


Figura 18. Sox2 activa la transcripción de *Six3.2* uniéndose directamente a los módulos D e I-L. A-B) Ensayos de luciferasa mostrando el efecto de cantidades crecientes del plásmido de expresión Sox2-myc sobre diferentes construcciones reporteras del gen *Six3.2*. Sox2 activó de forma significativa todas las construcciones, pero el efecto sobre el reportero cI fue menor en comparación a cII. C) Otros miembros de la familia de FT *SoxB*, como Sox3 y Sox21 no activaron de forma significativa la construcción cII, que sí respondió positivamente cuando se cotransfectó con Sox2. D) ChIP realizada en células P19 cotransfectadas con la construcción cII y el plásmido de expresión Sox2-myc. El anticuerpo anti-myc inmunoprecipitó eficientemente los módulos D e IL, pero no la región de control negativo. E) Ensayos de luciferasa mostrando el efecto de Sox2 sobre diferentes variaciones del reportero cIII: deleciones de la porción central del módulo D resultaron en una inhibición del efecto activador de Sox2. Así mismo, mutagenesis de un cluster 3 tres SU putativos para *Sox* resultaron también en una inhibición de la actividad luciferasa promovida por Sox2. *: p<0,05; **: p<0,01; ***: p<0,001.

Estos resultados concuerdan con la distribución de los SU putativos para Sox2 descrita anteriormente (Tabla X). Además, la construcción cII se activó en mayor medida que la cI (Fig. 18B), en línea con lo observado previamente para el FT Pax6 y con el papel represor propuesto para el elemento A. En cambio ni Sox3 ni Sox21 fueron capaces de modificar significativamente la actividad del reportero cII (Fig. 18C), sugiriendo un efecto específico de Sox2 en el control transcripcional de *Six3.2* a pesar de la redundancia funcional descrita para los genes del grupo SOxB1 (Okuda et al 2010).

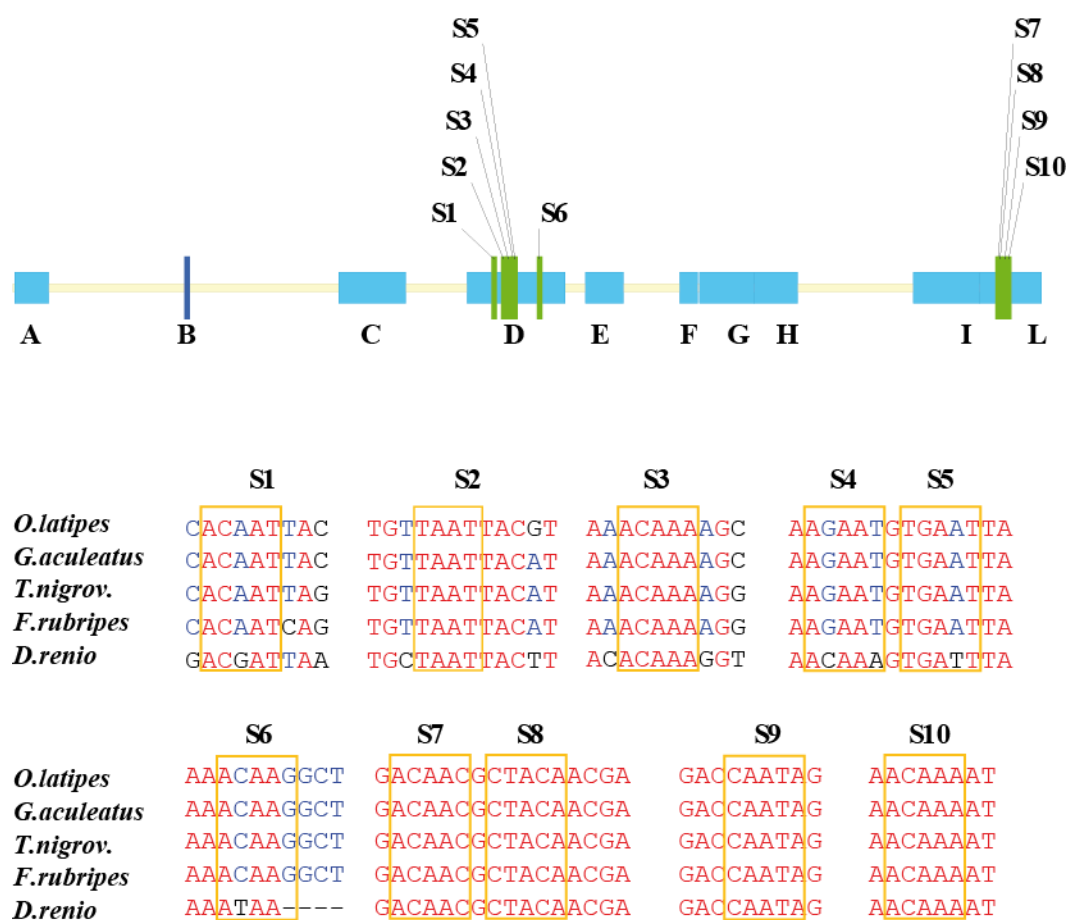


Figura 19. El elemento D contiene varios sitios conservados agrupados en cluster en su región central.

Alineamiento múltiple del elemento regulador D de medaka entre diferentes especies de peces teleosteos (*Gasterosteus aculeatus*, *Tetraodon nigroviridis*, *Fugu rubripes* y *Danio renio*). Las posiciones conservadas en todas las especies se marcan en rojo, mientras que los nucleótidos conservados en al menos 3 secuencias se representan en azul. Los rectángulos de color naranja representan la localización de los SU putativos para Sox.

Para comprobar si el efecto de Sox2 se debiese a su unión directa al promotor de *Six3.2*, se realizaron ensayos de inmunoprecipitación de cromatina en células P19 cotransfectadas con la construcción cII y los plásmidos de expresión de Sox2-myc. La inmunoprecipitación con el anticuerpo anti-myc resultó en un enriquecimiento para las regiones D e IL de veinte y veinticinco veces respectivamente con respecto al control (Fig. 18D). Dentro de la región D se pudieron

identificar varios SU putativos para *Sox* (**Tabla X, Fig. 19**). Para acotar la región del elemento D responsable del efecto activador de *Sox2*, realizamos ensayos de luciferasa con una serie de construcciones de la región D en las cuales se eliminaron diferentes porciones de dicho elemento (**Fig. 18E**). La comparación de los niveles de activación de estos reporteros indica que la activación del módulo D requiere la porción central de la caja D, presentes solamente en las construcciones cIII, cVI y cXI, y donde se concentran varios SU putativos para *Sox* (**Fig. 18E, Fig. 19**). En línea con estos resultados, mutaciones en tres de los SU contenidos en esta región resultaron en una completa abolición del efecto activador de *Sox2* (**Fig. 18E**). Estos resultados sugieren que estos SU son necesarios para el efecto activador de *Sox2*, aunque no excluyen la posibilidad que otros SU putativos puedan contribuir al control transcripcional de *Six3.2* por parte del mismo.

4.5. Distintos niveles de actividad del gen *Six3.2*, bajo el control de *Sox2*, regulan la especificación de los dominios de telencéfalo y de retina

Una vez caracterizada la interacción funcional entre *Sox2* y las regiones reguladoras del gen *Six3.2* nos preguntamos cuáles podrían ser sus posibles consecuencias funcionales *in vivo*. Para ello inyectamos oocitos de medaka en estadio de 1-2 células bien con el ARNm, bien con el morfolino (MO) de *Sox2*. Así, la inyección de 200 μ M de MO *Sox2* resultó en una evidente reducción morfológica en el tamaño de las vesículas ópticas a estadio 19 (**Fig. 20A**). En consonancia con este fenotipo, la expresión de *Six3.2*, medida tanto por PCR cuantitativa como por hibridación *in situ*, se vio significativamente reducida en los embriones inyectados con el MO *Sox2* en comparación con los inyectados con el MOc (**Fig. 20**). Esta reducción fue particularmente pronunciada en el dominio telencefálico, pero también se vieron reducidos los niveles de *Six3.2* en el ojo y en la porción más anterior del hipotálamo (**Fig. 20**). Es de notar que en ningún caso se observó una completa desaparición de la expresión de *Six3.2* en los territorios prosencefálicos.

De acuerdo con estos resultados, la inyección del ARNm de *Sox2* (20ng/ μ l) resultó en un incremento significativo de los niveles de *Six3.2* (**Fig. 20**), y en una extensión de sus dominios de expresión telencefálico e hipotalámico hacia niveles más caudales (cabeza de flechas rojas y negras respectivamente, **Fig. 20A**). Además también se observó un incremento en los niveles de *Six3.2* en la porción más distal de las vesículas ópticas aunque, contrariamente a lo que habría cabido esperar, los embriones inyectados con el ARNm de *Sox2* mostraron una evidente reducción morfológica de las mismas (**Fig. 20A**). Además, cabe destacar que la sobreexpresión de *Sox2* no indujo en ningún caso la expresión ectópica de *Six3.2* fuera de los dominios prosencefálicos. Estos resultados sugieren que *Sox2* actúa como un modulador de la expresión de *Six3.2* pero no es suficiente para la misma. Además, la correlación entre los patrones de expresión de ambos genes (**Fig. 17A,D,I,L**) sugiere que *Sox2* podría estar controlando *in vivo* los niveles de *Six3.2* en los distintos dominios prosencefálicos.

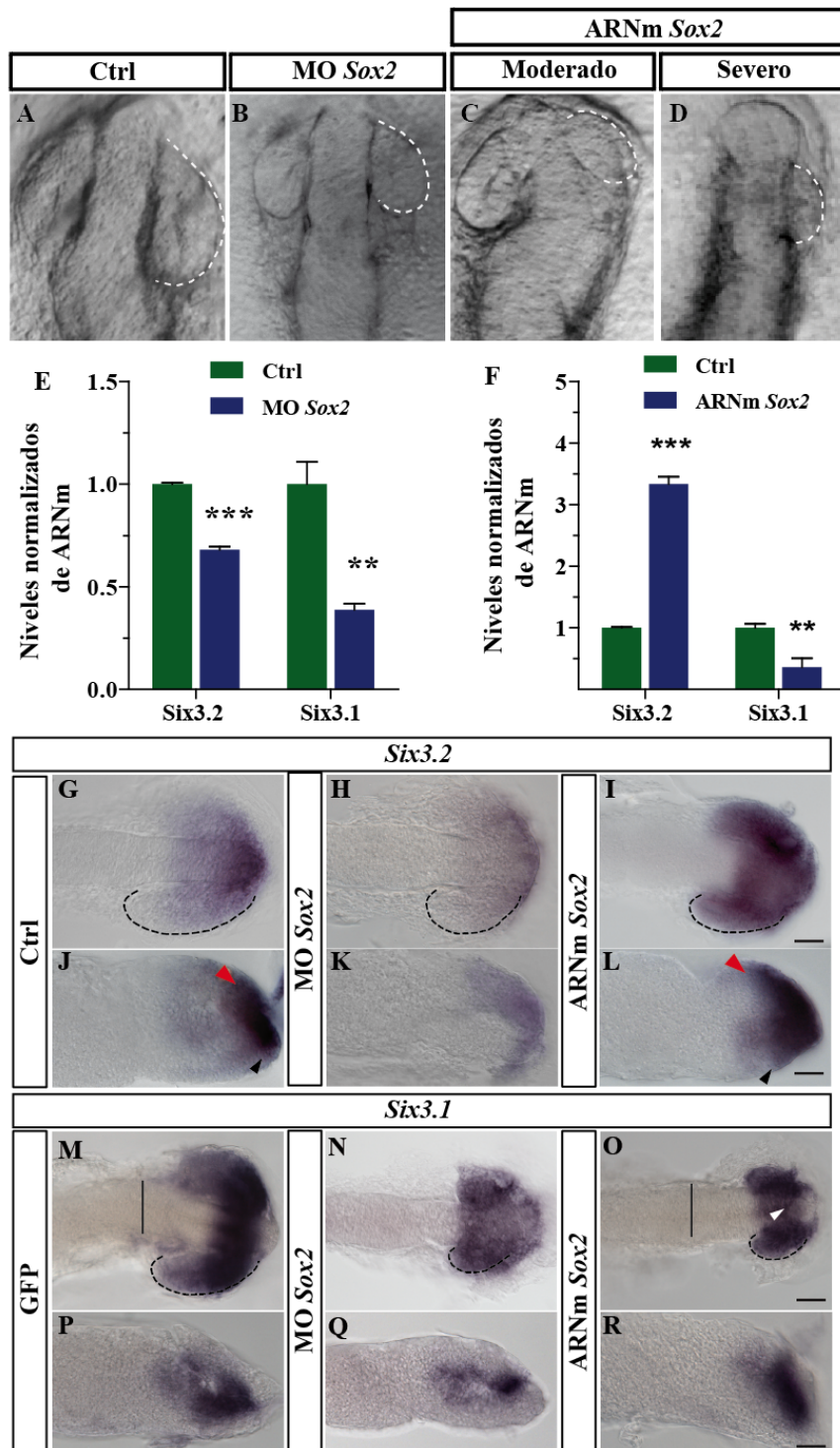


Figura 20. Sox2 regula la expresión de Six3.2 in vivo. A-D) Vistas dorsales de embriones de medaka control e inyectados con el ARNm o el MO *Sox2*. Ambos redujeron el tamaño de las vesículas ópticas, pero la sobre-expresión de *Sox2* produjo, en los casos más severos, una expansión de la porción anterior del prosencéfalo (asterisco en D). E-F) PCR a tiempo real midiendo los niveles de ARNm de *Six3.1* y *Six3.2* en embriones inyectados con el MO o con el ARNm de *Sox2*. F-Q) Vistas dorsales y laterales mostrando la expresión de *Six3.2* (G-L) y *Six3.1* (M-R) en embriones control e inyectados con el MO o el ARNm de *Sox2*. El primero disminuyó los niveles de expresión de *Six3.2* y de *Six3.1* de forma generalizada, mientras que el segundo extendió caudalmente la expresión de *Six3.2* en el dominio telencefálico e hipotalámico (cabezas de flecha negra y roja respectivamente). Además la sobreexpresión de *Sox2* resultó en un incremento en los niveles de *Six3.1* en subpalio, y vesículas óptica (a pesar de su reducido tamaño), pero lo redujo de forma drástica en el diencefalo. **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,0001$. Barra de escala: 40 μ m.

Para corroborar que los efectos de la ganancia o pérdida de función de *Sox2* sobre la expresión de *Six3.2* fuesen específicos, y no simplemente debidos a alteraciones estructurales de los territorios porsencefálicos, analizamos la expresión de *Six3.1* en embriones inyectados con el MO o el ARNm de *Sox2* en comparación con los individuos control. La inyección del MO *Sox2* resultó en una reducción significativa de los niveles de ARNm de *Six3.1* (Fig. 20E), con una notable disminución en los territorios de diencefalo, hipotálamo alar, subpalio y ojo. Por el contrario, la sobreexpresión de *Sox2* no alteró tan drásticamente el patrón de expresión de *Six3.1* (Fig. 20M,O), pero los niveles totales de su ARNm resultaron significativamente reducidos en comparación con los individuos

control (**Fig. 20F**). Cabe plantear que esta disminución pueda deberse a la reducción del territorio de ojo observada en los embriones inyectados con *Sox2*, así como al aumento del dominio telencefálico negativo para *Six3.1*. Es posible, sin embargo, que *Sox2* pueda controlar directamente la expresión de *Six3.1* en el de ojo, puesto que la sobreexpresión y la pérdida de función de *Sox2* resultan, respectivamente, en un incremento o una disminución de los niveles de *Six3.1* dentro de las vesículas ópticas independientemente del tamaño de esta estructura (**Fig. 20M-O**).

Para caracterizar más en profundidad el fenotipo observado en los experimentos de pérdida y ganancia de función de *Sox2* y su relación funcional con *Six3.2* en los territorios prosencefálicos analizamos diferentes marcadores moleculares específicos para dichos dominios. Así, la inyección de 200 μ M de MO *Sox2* redujo significativamente los dominios de expresión de los marcadores telencefálico (*Fgf8*, *Emx3* y *Foxg1*) y de retina (*Rx3*) frente a los embriones inyectados con el MOc (**Fig. 21A,B,D,E,G,H,I,J,L, Tablas XIIIa,b,e,f**). Por el contrario, los embriones inyectados con 20ng/ μ l del ARNm de *Sox2* mostraron una evidente expansión del telencéfalo y una reducción del tamaño de las vesículas ópticas en comparación con los individuos control (**Fig. 21A,C,D,F,I,K,M**). Esta reducción resultó particularmente llamativa, puesto que se ha descrito en la literatura que tanto *Sox2* como *Six3* son necesarios para el desarrollo del ojo en mamíferos y que la sobreexpresión de *Six3.1* en medaka induce la expansión del dominio óptico y la formación de estructuras ectópicas con características de retina (Loosli et al 1999).

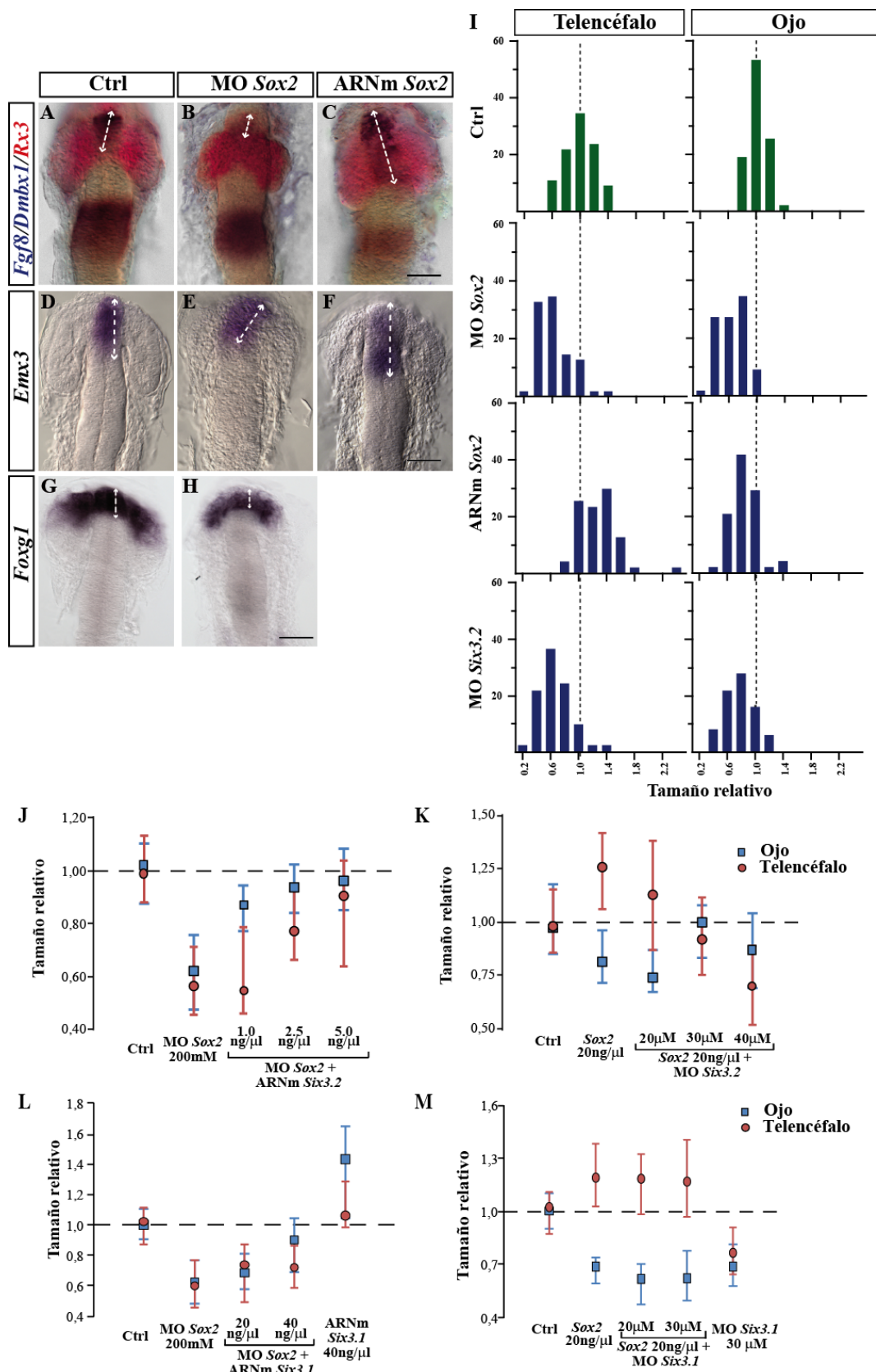


Figura 21. Sox2 controla la especificación de telencéfalo y retina de forma dependiente de Six3.2. A-H) Vistas dorsales de embriones de medaka de diferentes condiciones experimentales, mostrando la expresión de diferentes marcadores telencefálicos (*Fgf8*, *Emx3*, *Bfl*, líneas de flecha discontinuas) y de retina (*Rx3*). I) Distribución de frecuencias de los tamaños relativos de telencéfalo y retina, cuantificados por la expresión de *Fgf8* y *Rx3*, en diferentes condiciones experimentales. Los MO de *Sox2* y *Six3.2* redujeron el telencéfalo y las vesículas ópticas, mientras que la sobreexpresión de *Sox2* extendió el dominio telencefálico y disminuyó el de retina. J-M) Cuantificación de los tamaños relativos de telencéfalo y retina en embriones de diferentes condiciones experimentales. Los puntos rojos y azules representan la moda de sus tamaños relativos y las barras los percentiles 25 y 75 de cada distribución. El ARNm y el MO de *Six3.2* rescataron respectivamente los efectos de la inhibición y de la sobreexpresión de *Sox2* sobre ambos territorios. En cambio, la sobreexpresión de *Six3.1* sólo rescató el tamaño de las vesículas ópticas en los embriones inyectados con el MO de *Sox2*. Barra de escala: 40μm.

Tabla XIIIa. Estadística de los efectos de la inhibición de *Sox2* en el tamaño del telencéfalo y su rescate a dosis crecientes de ARNm de *Six3.2*

Telencéfalo	Inyección	MO <i>Sox2</i> 0,62±0,03 (n=48)	MO <i>Sox2</i> +		
			ARNm <i>Six3.2</i> 1.0ng/μl 0,61±0,03 (n=48)	ARNm <i>Six3.2</i> 2.5ng/μl 0,82±0,04 (n=36)	ARNm <i>Six3.2</i> 5.0ng/μl 0,88±0,06 (n=22)
	MOc 1,00±0,04 (n=31)	-38% p<0,0001	-39% p<0,0001	-18% p=0,0070	-12% p=0,112
	MO <i>Sox2</i> 0,62±0,03 (n=48)	-	-1% p=0,907	+20% p<0001	+26% p<0,0001

Tabla XIIIb. Estadística de los efectos de la inhibición de *Sox2* en el tamaño del ojo y su rescate a dosis crecientes de ARNm de *Six3.2*

Ojo	Inyección	MO <i>Sox2</i> 0,63±0,03 (n=48)	MO <i>Sox2</i> +		
			ARNm <i>Six3.2</i> 1.0ng/μl 0,87±0,02 (n=48)	ARNm <i>Six3.2</i> 2.5ng/μl 0,93±0,03 (n=36)	ARNm <i>Six3.2</i> 5.0ng/μl 0,95±0,04 (n=22)
	MOc 1,00±0,03 (n=31)	-37% p<0,0001	-13% p<0,0001	-7% p=0,081	-5% p=0,028
	MO <i>Sox2</i> 0,63±0,03 (n=48)	-	+24% p<0,001	+30% p<0,001	+32% p<0,0001

Tabla XIIIc. Estadística de los efectos de la sobreexpresión de *Sox2* en el tamaño del telencéfalo y su rescate a dosis crecientes de MO de *Six3.2*

Telencéfalo	Inyección	ARNm <i>Sox2</i> 1,28±0,04 (n=48)	MO <i>Six3.2</i> 0,67±0,03 (n=40)	ARNm <i>Sox2</i> +		
				MO <i>Six3.2</i> 20μM 1,16±0,07 (n=28)	MO <i>Six3.2</i> 30μM 0,93±0,03 (n=71)	MO <i>Six3.2</i> 40μM 0,71±0,05 (n=35)
	GFP 1,00±0,03 (n=55)	+28% p<0,0001	-33% p<0,0001	+16% p<0,0001	-7% p=0,14	-29% p<0,0001
	ARNm <i>Sox2</i> 1,28±0,04 (n=48)	-	-61% p<0,0001	-9,% p=0,64	-35% p<0001	-57% p<0,0001

Tabla XIIId. Estadística de los efectos de la sobreexpresión de *Sox2* en el tamaño del ojo y su rescate a dosis crecientes de MO de *Six3.2*

Ojo	Inyección	ARNm <i>Sox2</i> 0,84±0,03 (n=48)	MO <i>Six3.2</i> 0,79±0,03 (n=40)	ARNm <i>Sox2</i> +		
				MO <i>Six3.2</i> 20μM 0,80±0,03 (n=28)	MO <i>Six3.2</i> 30μM 0,97±0,02 (n=71)	MO <i>Six3.2</i> 40μM 0,88±0,04 (n=35)
	GFP 1,00±0,03 (n=55)	-16% p<0,0001	-21% p<0,0001	-20% p=0,0002	-3% p=0,48	-12% p=0,015
	ARNm <i>Sox2</i> 0,84±0,03 (n=48)	-	-5% p=0,21	-4% p=0,38	+13% p=0,0005	+4% p=0,49

Tabla XIIIe. Estadística de los efectos de la inhibición de *Sox2* en el tamaño del telencéfalo y su rescate a dosis crecientes de ARNm de *Six3.1*

			MO <i>Sox2</i> +			
Telencéfalo	Inyección	MO <i>Sox2</i> 0,63±0,03 (n=55)	ARNm <i>Six3.1</i> 40ng/μl 1,07±0,03 (n=33)	ARNm <i>Six3.1</i> 40ng/μl 0,72±0,05 (n=24)	ARNm <i>Six3.1</i> 40ng/μl 0,72±0,04 (n=27)	
	MOc	1,00±0,03 (n=31)	-37% p<0,0001	+7% p=0,026	-28% p<0,0001	-28% p<0,0001
	MO <i>Sox2</i>	0,63±0,05 (n=55)	-	-44% p<0,0001	-5% p=0,11	-3% p=0,10

Tabla XIIIf. Estadística de los efectos de la inhibición de *Sox2* en el tamaño del ojo y su rescate a dosis crecientes de ARNm de *Six3.1*

			MO <i>Sox2</i> +			
Ojo	Inyección	MO <i>Sox2</i> 0,65±0,03 (n=55)	ARNm <i>Six3.1</i> 40ng/μl 1,37±0,08 (n=33)	ARNm <i>Six3.1</i> 20ng/μl 0,87±0,05 (n=24)	ARNm <i>Six3.1</i> 40ng/μl 0,87±0,04 (n=27)	
	MOc	1,00±0,03 (n=31)	-35% p<0,0001	+37% p<0,0001	-13% p<0,010	-13% p<0,004
	MO <i>Sox2</i>	0,65±0,03 (n=55)	-	+72% p<0,0001	+22% p<0,0001	+22% p<0,0001

Tabla XIIIg: Estadística de los efectos de la sobreexpresión de *Sox2* en el tamaño del ojo y su rescate a dosis crecientes de MO de *Six3.1*

			ARNm <i>Sox2</i> +			
Telencéfalo	Inyección	ARNm <i>Sox2</i> 1,22±0,05 (n=37)	MO <i>Six3.1</i> 40μM 0,78±0,04 (n=24)	MO <i>Six3.1</i> 20μM 1,17±0,04 (n=36)	MO <i>Six3.1</i> 40μM 1,19±0,06 (n=16)	
	GFP	1,00±0,03 (n=31)	+22% p<0,0001	-22% p<0,0001	+17% p<0,0001	+19% p<0,0001
	ARNm <i>Sox2</i>	1,22±0,05 (n=37)	-	-44% p<0,0001	-5% p=0,11	-3% p=0,10

Tabla XIIIg: Estadística de los efectos de la sobreexpresión de *Sox2* en el tamaño del telencéfalo y su rescate a dosis crecientes de MO de *Six3.1*

			ARNm <i>Sox2</i> +			
Ojo	Inyección	ARNm <i>Sox2</i> 0,69±0,03 (n=37)	MO <i>Six3.1</i> 40μM 0,70±0,03 (n=24)	MO <i>Six3.1</i> 20μM 0,62±0,03 (n=36)	MO <i>Six3.1</i> 40μM 0,65±0,05 (n=16)	
	GFP	1,00±0,03 (n=31)	-31% p<0,0001	-30% p<0,0001	-38% p<0,0001	-35% p<0,0001
	ARNm <i>Sox2</i>	0,69±0,03 (n=37)	-	+1% p<0,0001	+7% p=0,075	+3% p=0,44

Estas evidencias nos llevaron, por tanto, a plantear que la sobreexpresión de *Six3.2*, mediada por *Sox2*, promoviese el desarrollo del telencéfalo a expensas del territorio de retina, sobrepasando la actividad de *Six3.1* en el ojo. De ser así, los efectos del MO y del ARNm de *Sox2* deberían verse rescatados, respectivamente, por la coinyección del ARNm o del MO de *Six3.2*. En línea con esta hipótesis el tamaño de los dominios de telencéfalo (*Fgf8*-positivo) y retina (*Rx3*-positivo) se rescataron cuando el MO *Sox2* se coinyectó con concentraciones crecientes de ARNm de *Six3.2* aunque el dominio de ojo requirió dosis inferiores de ARNm de *Six3.2* que el telencéfalo para volver a los valores de los individuos control (2,5 y 5ng/μl respectivamente; **Fig. 21J, Tabla XIIIa**). De la misma forma, la coinyección del ARNm de *Sox2* con el MO *Six3.2* (20-40μM) rescató significativamente los efectos del primero en el tamaño de estos dominios, llegando a valores indistinguibles de los controles a la dosis de 30mM. Sin embargo, resultó en una disminución de los mismos hasta valores inferiores a los controles a la dosis de 40mM (**Fig. 21K, Tabla XIIIa,b**), posiblemente reflejando una disminución de la actividad de *Six3.2* por debajo de los niveles endógenos. De acuerdo con esta hipótesis, la inyección de diferentes concentraciones del MO *Six3.2* sólo (30-60μM) resultó también en una reducción de los territorios de telencéfalo y retina aunque el primero se vio mas severamente afectado por la inhibición del gen *Six3.2* (**Fig. 21I, Tabla XIIIc,d**). Ninguno de los fenotipos descritos se apreció al inyectar el MO control (ver material y métodos), indicando que los efectos observados son específicamente relacionables con la actividad de *Six3.2*.

En cambio, aunque la inyección del ARNm de *Six3.1* expandió el tamaño de los dominios de telencéfalo (*Fgf8*) y retina (*Rx3*), de acuerdo con lo descrito en la literatura (Loosli et al 1999), solo pudo rescatar sólo parcialmente la disminución observada en las vesículas ópticas tras la inyección del MO *Sox2*, (**Fig. 21L, Tabla XIIIf**). Por el contrario, la coinyección del ARNm de *Six3.1* no tuvo ningún efecto en la disminución del telencéfalo producida por el MO *Sox2* (**Fig. 21L, Tabla XIIIe**). En consonancia con estos resultados, la inyección del MO *Six3.1* resultó en una significativa reducción de ambos territorios, pero no recuperó los fenotipos provocados por la sobreexpresión de *Sox2* sobre los mismos (**Fig. 21M, Tabla XIIIg,h**), indicando que los efectos de *Sox2* en dichos territorios estarían específicamente mediados por *Six3.2*, aunque *Six3.1* puede suplir en cierta medida la función de este último en el ojo.

En su conjunto, estos resultados sugieren que los niveles de *Sox2* en telencéfalo y ojo controlan la expresión de *Six3.2*, cuyos niveles de actividad determinan, a su vez, la correcta especificación de dichos territorios. Así pues, la especificación del telencéfalo requeriría altos niveles de actividad de *Sox2* y *Six3.2*, siendo muy sensible incluso a ligeras variaciones de este último. Por el contrario el territorio de retina se especifica a niveles de *Sox2* y *Six3.2* comparativamente menores, y se ve negativamente afectado cuando sus niveles varían por encima o por debajo del rango de actividad endógeno.

Para corroborar que *Six3.2* estuviese implicado en esta regulación diferencial de los territorios de retina y telencéfalo, llevamos a cabo experimentos de sobreexpresión con diferentes concentraciones

de su ARNm. En comparación con los individuos control, la ganancia de función de *Six3.2* resultó en diferentes fenotipos caracterizados morfológicamente por una disminución o una expansión de las vesículas ópticas (**Fig. 22A-E**). De estos, los embriones que presentaron una reducción del dominio *Rx3*- positivo presentaron un aumento significativo del territorio telencefálico (*Emx3+/Fgf8+*; **Fig. 22A,B,D,F**). Por el contrario, aquellos individuos con ojos expandidos presentaron tanto una reducción como un aumento del telencéfalo (**Fig. 22A,C,D,E,G**). Sin embargo, a pesar de que estos 3 fenotipos aparecieron a todas las concentraciones de ARNm probadas, la proporción relativa de cada uno de ellos resultó ser fuertemente dependiente de la dosis. Así, con la concentración más baja (2,5ng/μl), la mayoría de los embriones presentaron una expansión del dominio de retina y una disminución del telencéfalo (**Fig. 22H**), mientras que con dosis ligeramente más altas (5ng/μl) predominaba el fenotipo opuesto (**Fig. 22I**). Finalmente, la mayoría de los embriones con una expansión de los dos dominios se obtuvieron al inyectar las mayores concentraciones de ARNm (7,5-12,5ng/μl; **Fig. 22J**). Este último fenotipo se asemeja bastante a lo observado para la sobreexpresión del gen *Six3.1* (Loosli et al 1999) o del propio *Six3* en medaka y otras especies (Lagutin et al 2001; Lopez-Rios et al 2003), sugiriendo que, a estas concentraciones, *Six3.2* podría perder parte de su especificidad funcional y actuar de forma similar a su ortólogo en mamíferos. En su conjunto, estos resultados apoyan la hipótesis de que los niveles de actividad del gen *Six3.2* son importantes para la especificación diferencial de los territorios de telencéfalo y retina.

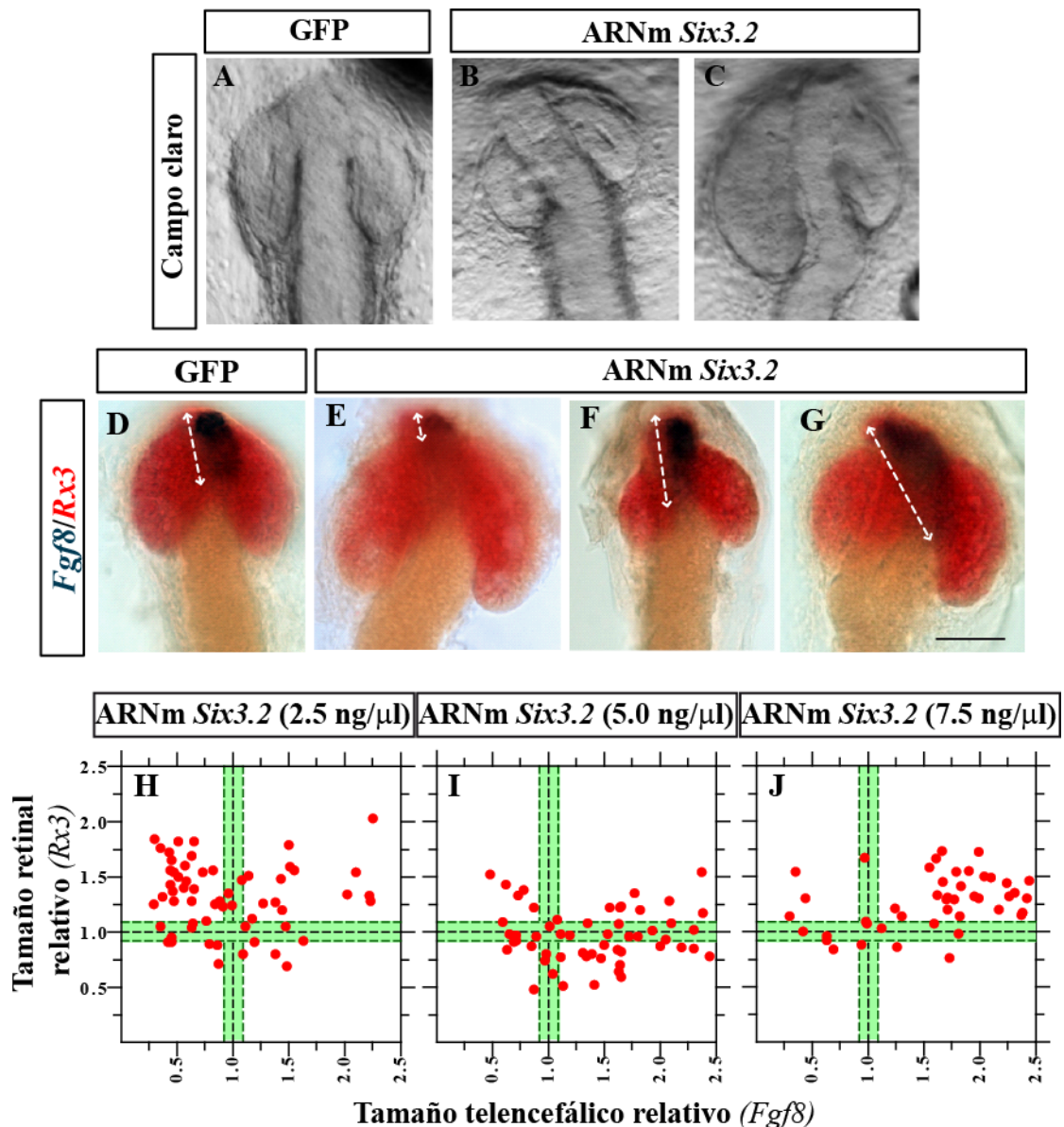


Figura 22. La ganancia de función de *Six3.2* afecta diferencialmente al tamaño de los territorios de telencéfalo y retina. A-G Vistas dorsales en campo claro y de HIS dobles para *Fgf8* (azul) y *Rx3* (rojo) de embriones de medaka control e inyectados con el ARNm de *Six3.2*. La sobreexpresión de *Six3.2* resultó en embriones con vesículas ópticas reducidas (B, F) o expandidas (C, E, G). La extensión del dominio telencefálico se indica con líneas de flecha discontinuas (D-G). H-J Representación bidimensional de los tamaños relativos de telencéfalo (eje x) y retina (eje y) en embriones inyectados con concentraciones crecientes de ARNm de *Six3.2*. Los tamaños de telencéfalo y retina se cuantificaron en base a los dominios de expresión de *Fgf8* y *Rx3* respectivamente. El área verde representa los tamaños de ambos territorios en los embriones control (inyectados con GFP) y corresponde a los individuos comprendidos entre los percentiles 25 y 75 (líneas discontinuas negras) de cada distribución. Todos los valores se normalizaron a la media de los individuos control. Barra de escala: 40 μM.

4.6. *Six3.2* regula la especificación del hipotálamo de forma independiente de *Sox2*

En los apartados anteriores hemos demostrado un requerimiento dosis-dependiente de los genes *Sox2* y *Six3.2* en la especificación de los dominios de telencéfalo y retina. Sin embargo, los patrones de expresión de los dos genes solapan también en el hipotálamo, aunque con niveles comparativamente más bajos que en el telencéfalo (Fig. 17M). Además, alteraciones en los niveles de *Sox2* afectan a la expresión de *Six3.2* en este territorio (Fig. 20J-L) y mutaciones en el gen *SOX2* de humanos resultan en anomalías del eje hipotálamo-hipófisis (Hagstrom et al 2005; Kelberman et

al 2006). Por tanto, en base a estas evidencias nos planteamos si *Sox2* y *Six3.2* podrían intervenir también en la especificación del hipotálamo. En este sentido, en los ratones nulos para *Six3*, la región talámica prospectiva queda como el territorio prosencefálico mas rostral, puesto que las estructuras anteriores, incluyendo el hipotálamo, están ausentes (Lavado et al 2008). Además la disminución de los niveles de actividad de *Six3.1* en medaka interfiere con la especificación de estructuras prosencefálicas ventrales (Carl et al 2002). En contraste con estas evidencias, el MO *Six3.2* produjo un incremento del territorio hipotalámico positivo para *Rx3* y *Nkx2.1*, asociado con una disminución del dominio pretalámico, marcado por la expresión central de *Arx* (**Fig. 23A,B,F,G, Tabla XIV**, datos no mostrados). Viceversa, la inyección de concentraciones crecientes de ARNm de *Six3.2* redujeron progresivamente el tamaño del hipotálamo y expandieron el pretálamo (**Fig. 23A,B,F,G**). Estos cambios estuvieron asociados con variaciones opuestas en el tamaño del territorios mesencefálico (*Dmbx1+*; **Fig. 23A,C,F,G, Tabla XIVc**). Además, los efectos de *Six3.2* en el hipotálamo resultaron independientes de *Sox2*, puesto que la sobreexpresión de este

provocó un incremento significativo del territorio *Nkx2.1+* sin afectar ni al diencéfalo ni al mesencéfalo (**Fig. 23A,D,F**), mientras que el MO *Sox2* afectó negativamente a los tres dominios (**Fig. 23A,E,F,G, Tabla XIVa-c**). Así mismo, y en contraste con lo observado en el telencéfalo, la coinyección del MO *Sox2* con el ARNm de *Six3.2* no rescató el tamaño del hipotálamo ni del mesencéfalo, si no que incluso resultó en una mayor disminución de los mismos a las dosis más altas de ARNm (**Fig. 23G, Tabla XIVa,c**). En cambio, el territorio pretalámico resultó significativamente expandido tras la coinyección del MO *Sox2* y del ARNm de *Six3.2*, sugiriendo que *Six3.2* actúa de forma independiente de *Sox2* en este dominio.

Estas evidencias sugieren que *Six3.2* antagonizaría la especificación del hipotálamo de forma independiente de la función de *Sox2* el cual, en cambio, promovería el destino hipotalámico a través de la activación de otros genes diana. Así mismo los genes *Sox2* y *Six3.2* parecen actuar de forma independiente también en la especificación de los dominios de pretálamo y mesencéfalo.

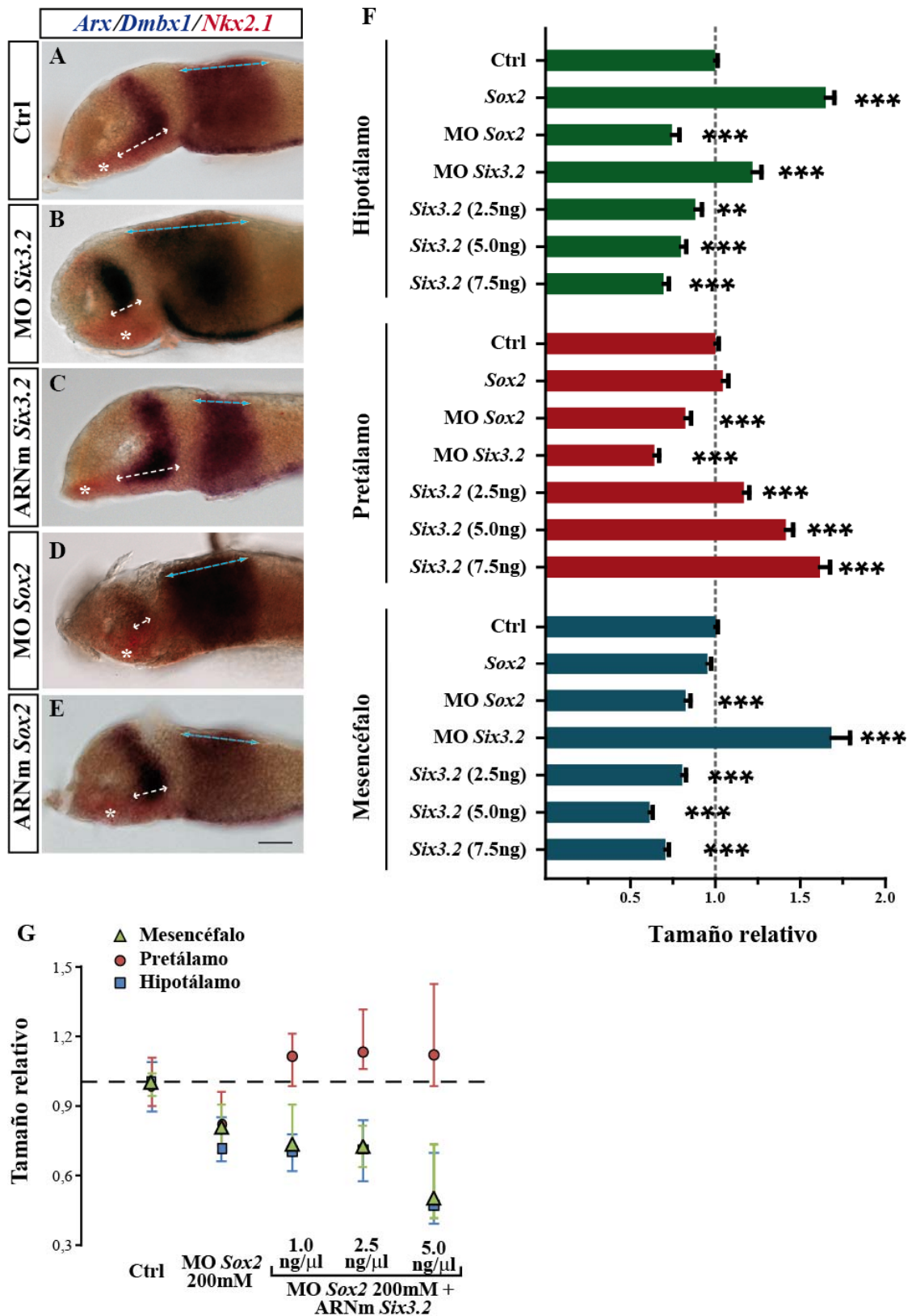


Figura 23. *Sox2* y *Six3.2* regulan la especificación de estructuras prosencefálicas de forma diferencial. A-E) Vistas laterales de embriones de medaka de diferentes condiciones experimentales analizados por HIS de los marcadores *Nkx2.1*, *Arx* y *Dmbx1*. F) Cuantificación de los tamaños relativos de los territorios de hipotálamo, pretálamo y mesencéfalo. Las barras representan los valores medios + error típico. El MO de *Sox2* resultó en una disminución de los dominios de hipotálamo (*Nkx2.1*+, asteriscos), pretálamo (expresión ventral del marcador *Arx* -líneas de flecha discontinuas) y mesencéfalo (líneas de flecha continuas). G) Cuantificación de los tamaños relativos de hipotálamo, pretálamo y mesencéfalo en diferentes condiciones experimentales como indicado en los paneles. Los puntos azules, rojos y verdes indican la moda de los tamaños relativos de estos territorios, mientras que las barras superior e inferior representan, respectivamente, el percentil 75 y el percentil 25 de cada distribución.

Tabla XIVa: Efecto de la inhibición de *Sox2* y de la coinyección del ARNm de *Six3.2* sobre el tamaño del hipotálamo.

		MO Sox2+			
		MO Sox2 0,74±0,04 n=18	ARNm Six3.2 1.0ng/μl 0,71±0,02 n=37	ARNm Six3.2 2.5ng/μl 0,70±0,03 n=35	ARNm Six3.2 5.0ng/μl 0,52±0,05 n=17
Hipotálamo	MOc 1,00±0,02 n=37	-26% p<0,0001	-29% p<0,0001	-30% p<0,0001	-48% p<0,0001
	MO Sox2 0,74±0,04 n=18		-3% p=0,42	-4% p=0,33	-22% p=0,0017

Tabla XIVb: Efecto de la inhibición de *Sox2* y de la coinyección del ARNm de *Six3.2* sobre el tamaño del pretálamo.

		MO Sox2+			
		MO Sox2 0,82±0,03 n=18	ARNm Six3.2 1.0ng/μl 1,12±0,03 n=37	ARNm Six3.2 2.5ng/μl 1,17±0,03 n=35	ARNm Six3.2 5.0ng/μl 1,16±0,07 n=17
Pretálamo	MOc 1,00±0,03 n=37	-18% p=0,0008	+12% p=0,011	+17% p=0,0003	+16% p=0,015
	MO Sox2 0,82±0,03 n=18		+30% p<0,0001	+35% p<0,0001	+34% p<0,0001

Tabla XIVc: Efecto de la inhibición de *Sox2* y de la coinyección del ARNm de *Six3.2* sobre el tamaño del mesencéfalo.

		MO Sox2+			
		MO Sox2 0,82±0,03 n=18	ARNm Six3.2 1.0ng/μl 0,77±0,03 n=37	ARNm Six3.2 2.5ng/μl 0,74±0,02 n=35	ARNm Six3.2 5.0ng/μl 0,55±0,05 n=17
Mesencéfalo	MOc 1,00±0,02 n=37	-26% p<0,0001	-29% p<0,0001	-30% p<0,0001	-48% p<0,0001
	MO Sox2 0,82±0,03 n=18		-3% p=0,19	-4% p=0,022	-22% p<0,0001

4.7. La actividad *Sox2* y *Six3.2* en el prosencéfalo controla la proliferación de los precursores telencefálicos y regula directamente los genes *Foxg1*, *Rx3* y *Nkx2.1*

Los resultados presentados en esta parte del trabajo indican que los niveles de actividad de *Six3.2* especifican los territorios neurales a lo largo del eje antero-posterior: rostralmente dicha actividad se encuentra bajo el control de *Sox2*, favoreciendo la especificación del telencéfalo, mientras que en territorios más caudales ambos genes actuarían de forma diferencial. Para explicar dichas observaciones tomamos en consideración dos posibles mecanismos, no necesariamente excluyentes entre sí.

En primer lugar, es posible que diferencias en la tasa de división celular pudieran explicar las alteraciones morfológicas observadas en los embriones inyectados, puesto que se ha descrito que tanto *Sox2* como *Six3.2* controlan la proliferación de los precursores neurales (Appolloni et al 2008; Avilion et al 2003; Del Bene et al 2004; Dyer 2003; Ferri et al 2004; Gestri et al 2005; Sikorska et al 2008). En este sentido, estudiamos la proliferación regional de los territorios de telencéfalo y retina mediante inmunohistoquímica contra el marcador de mitosis PH3. La sobreexpresión de *Sox2* promovió la proliferación de los precursores telencefálicos sin afectar al dominio de retina, mientras que el MO *Sox2* produjo una disminución de la misma en los dos territorios (**Fig. 24**). De forma similar, la inyección del MO *Six3.2* resultó en una menor proporción de mitosis en el telencéfalo y en el ojo, mientras que su sobreexpresión incrementó la densidad de células PH3+ en el telencéfalo, pero la redujo de forma significativa en el ojo (**Fig. 24**). Estos datos concuerdan con las alteraciones observadas en estos territorios tras la inyección del MO o el ARNm de *Six3.2* y sugieren que la activación de *Six3.2* mediada por *Sox2* podría reclutar un mayor número de progenitores proliferantes dentro del telencéfalo.

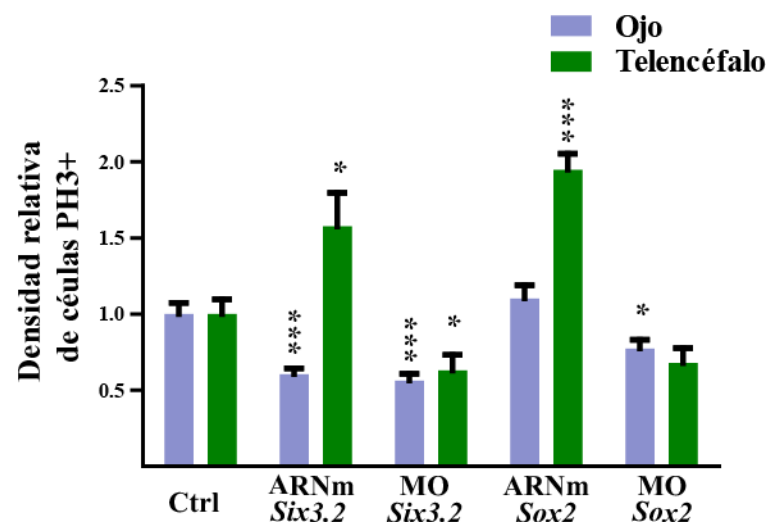


Figura 24. *Sox2* y *Six3.2* controlan la proliferación de los precursores de telencéfalo y retina. A) cuantificación de la densidad de células PH3+ en los dominios de telencéfalo y retina. Los valores de los distintos tratamientos se relativizaron y compararon con los controles. *:p<0,05; ***: p<0,0001

En segundo lugar, y para corroborar la posibilidad anterior, consideramos que *Six3.2* podría estar confiriendo identidad de tejido a través del control de la expresión de otros genes implicados en la especificación de las estructuras prosencefálicas anteriores. Por ejemplo, en el pez cebra se ha visto recientemente que *Rx3* promueve la especificación de la retina a expensas del dominio telencefálico, reprimiendo directa o indirectamente la actividad de *Foxg1* (Stigloher et al 2006). A este respecto, la inyección de concentraciones crecientes del ARNm de *Six3.2* resultó en una disminución de *Rx3* en la retina y, de forma aún más drástica, suprimió casi totalmente la expresión del mismo en el hipotálamo (**Fig. 25D-F**), incluso a concentraciones a las cuales otros marcadores hipotalámicos, como *Nkx2.1* (**Fig. 23C,F**), presentaron una disminución mucho menor. Por el contrario la sobreexpresión de *Six3.2* indujo un aumento de la expresión de *Foxg1* tanto en el telencéfalo como en la retina, de forma dependiente de la dosis (**Fig. 25A-C**). Este efecto se observó aún a la concentración más baja probada, a la cual la expresión de otros marcadores telencefálicos (*Fgf8*, *Emx3*) resultaba disminuida con respecto a los controles (**Fig. 22D-H**, datos no mostrados). En línea con estos resultados, la inyección del MO de *Six3.2* resultó en un incremento de cuatro veces en los niveles de ARNm de *Rx3*, mientras que los de *Foxg1* se redujeron en más de 3 veces (**Fig. 25I**). Estas evidencias plantean una posible regulación directa de *Six3.2* sobre genes *Rx3* y *Foxg1*. En consonancia con esta hipótesis el análisis de huella filogenética de los respectivos promotores permitió identificar una serie de SU putativos para *Six3* (**Fig. 26A-C**). Así mismo también se identificaron SU para *Sox2* en el elemento conservado EC1 del gen *Rx3* (**Fig. 26B,C**), pero no en los módulos EC1 y EC2 de *Foxg1*. En base a estas evidencias realizamos experimentos de CHIP en células P19 co-transfectadas con el plásmido de expresión 3myc-*Six3.2* y con el vector reportero pGL3b*Rx3*prom (ver material y métodos). El anticuerpo dirigido contra el epítipo myc fue capaz de inmunoprecipitar eficientemente la región conservado EC1 de *Rx3*, así como el elemento EC1 del gen *Foxg1* endógeno de la células P19 (**Fig. 25J**). Además, el módulo EC1 de *Rx3* también pudo ser eficientemente inmunoprecipitado con el anticuerpo anti-myc cuando el vector reportero se co-transfectó con el plásmido de expresión 3myc-*Sox2* (**Fig. 25J**), sugiriendo que *Sox2* controlaría de forma directa la expresión de *Rx3*, y en línea con las evidencias experimentales descritas para el gen *Rx* de *Xenopus* (Danno et al 2008).

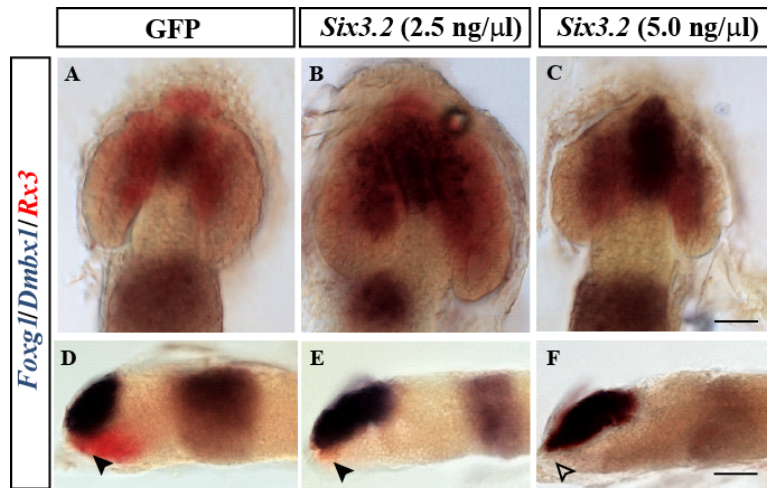
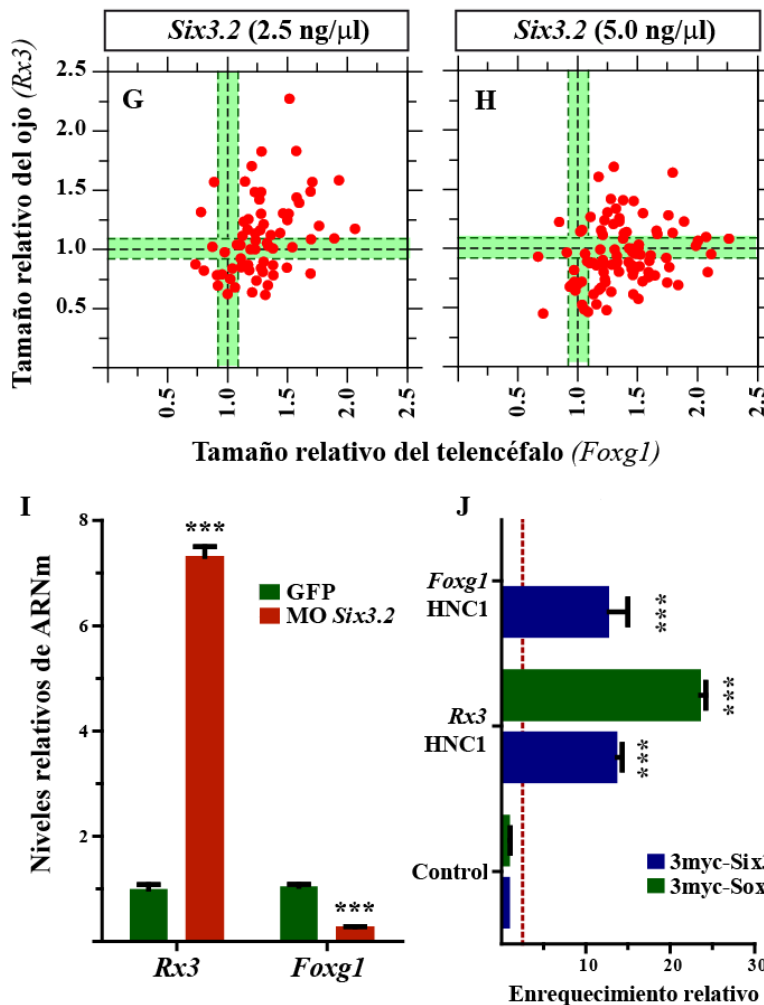


Figura 25. *Sox2* y *Six3.2* se unen a elementos reguladores de los genes *Rx3* y *Foxg1* y regulan su expresión. A-F) HIS dobles para *Dmbx1*, *Foxg1* y *Rx3* en embriones control e inyectados con el ARNm de *Six3.2*. La expresión de *Rx3* en hipotálamo (cabeza de flecha negra) se redujo drásticamente con la inyección del ARNm de *Six3.2* hasta prácticamente desaparecer a la dosis más alta (cabeza de flecha hueca). La expresión de *Foxg1* se expandió notablemente a ambas dosis. G-H) Cuantificación de los dominios de expresión de *Foxg1* y *Rx3* en telencéfalo (eje x) y retina (eje y) a distintas dosis de ARNm de *Six3.2*. El área verde representa los tamaños de ambos territorios de los embriones control comprendidos entre los percentiles 25 y 75 (líneas discontinuas negras) de cada distribución. I) PCR a tiempo real mostrando los niveles de ARNm de *Rx3* y *Foxg1*, relativizados al *ARN 18s* en embriones control e inyectados con el MO *Six3.2*. J) ChIP realizada contra los elementos reguladores de los genes *Foxg1* de ratón y *Rx3* de medaka en células P19 transfectadas con los plásmidos de expresión 3myc-*Sox2* y 3myc-*Six3.2*. Para el gen *Rx3* ambos vectores se cotransfectaron con la construcción reportera pGL3b-*Rx3*prom, mientras que para *Foxg1* se utilizaron cebadores específicos para la región reguladora del gen endógeno de ratón. La grafica muestra los promedios de un experimento representativo realizado por triplicados. El ensayo se repitió 3 veces. Las veces de enriquecimiento para las 3 regiones testadas se normalizaron respecto a los valores obtenidos en la inmunoprecipitación con el anticuerpo IgG. Un enriquecimiento superior a 3 veces (línea roja discontinua) se consideró como positivo. ***: $p < 0,001$



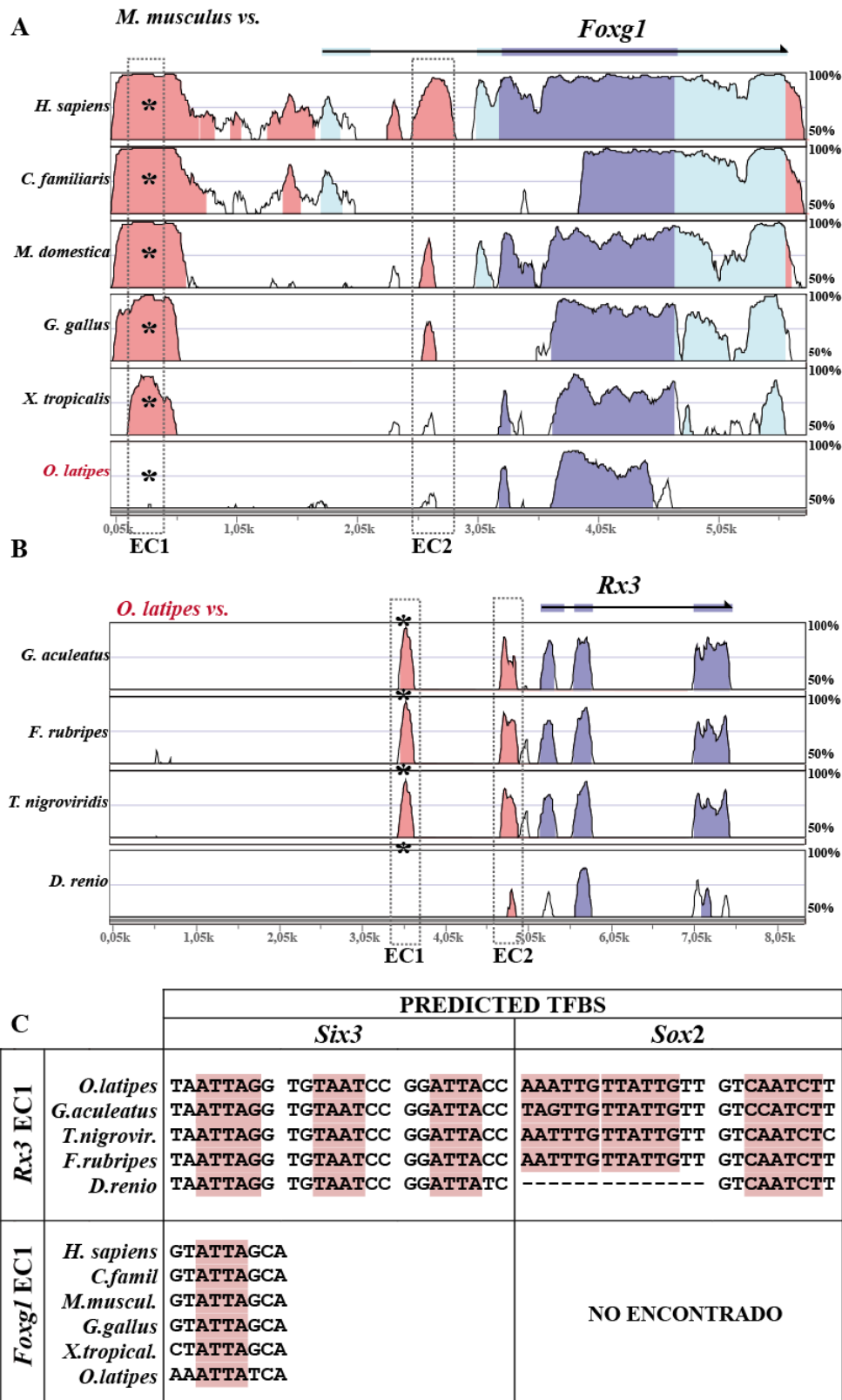


Figura 26. Analisis *in silico* predicen la existencia de SU conservados para *Sox2* y *Six3* en los elementos reguladores de *Foxg1* y *Rx3*. A) alineamiento múltiple de la región genómica correspondiente al gen *Foxg1* entre distintas especies de vertebrados realizado con el programa mVista-LAGAN. B) Alineamiento múltiple de la región reguladora del gen *Six3.2* de medaka con diferentes especies de peces teleosteos. Los elementos no codificantes conservados (70% homología sobre 100pb) en A y B se representan como picos rosas. C) Alineamientos múltiples de las SU de *Sox2* y *Six3* identificados en los elementos conservados indicados en A y en B. El núcleo de la secuencia consenso se resalta en rosa.

Además, a través de la comparación de las secuencias genómicas de diversas especies de vertebrados, también pudimos identificar SU putativos para *Sox* dentro de una región conservada no codificante contenida dentro del primer intron gen *Nkx2.1*. Dichos SU estarían conservados en diferentes linajes evolutivos desde peces hasta mamíferos (**Fig. 27A**). El laboratorio de Silvia Nicolis (Università degli Studi di Milano-Bicocca, Milan) ha demostrado que dicha región reguladora es activada por *Sox2* en ensayos de luciferasa y que este efecto se debe a la unión directa de *Sox2* a dichas secuencias. En colaboración con este laboratorio, hemos generado una línea transgénica estable en la cual el conjunto de las primeras 500pb localizadas 5' al inicio de transcripción del gen *Nkx2.1* de ratón, el primer exón del mismo y la región intrónica conteniente el putativo elemento regulador, es capaz de dirigir la expresión del reportero EGFP a la porción anterior del hipotálamo (**Fig. 27C,F**).

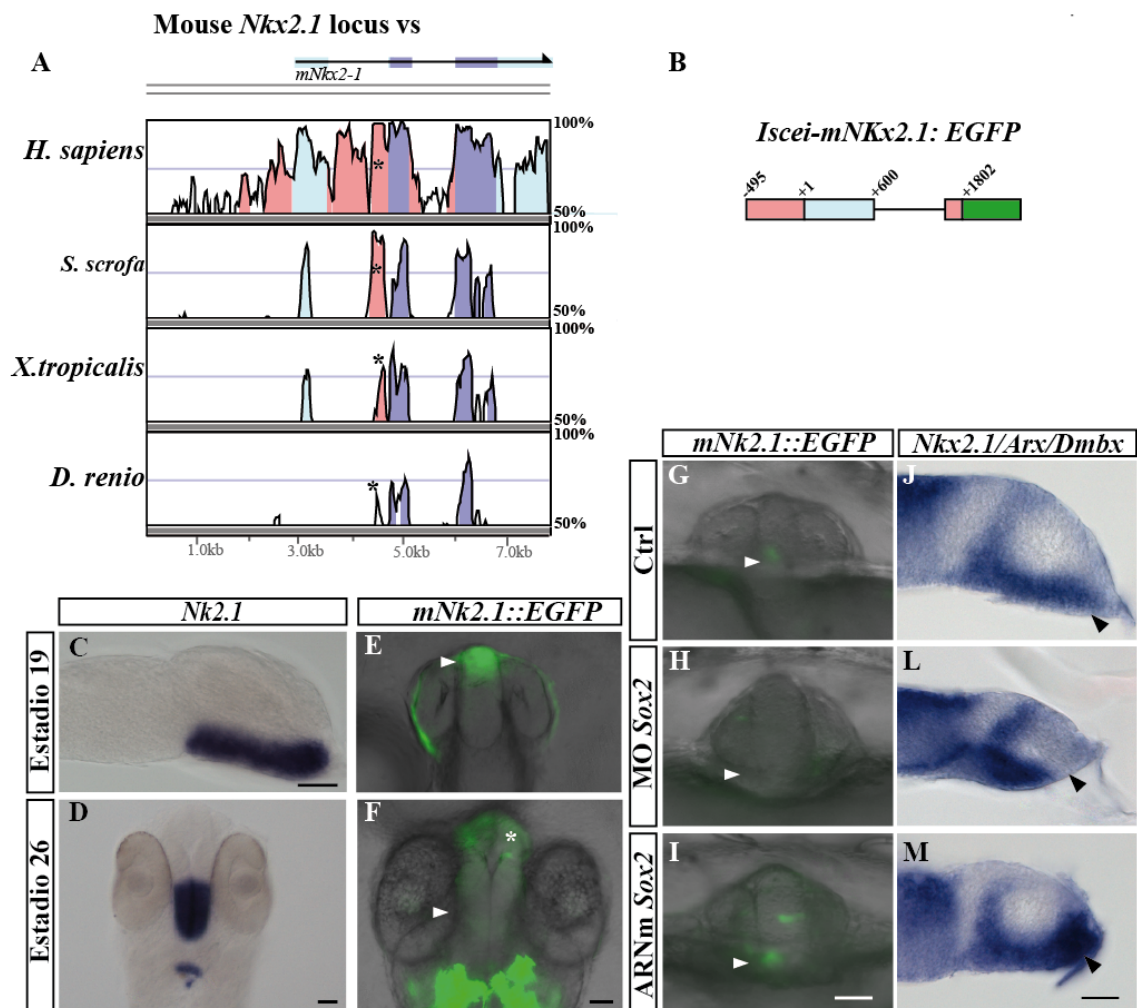


Figura 27. *Sox2* controla la actividad de un elemento regulador del gen *Nkx2.1*.A) Alineamiento múltiple de la región genómica del gen *Nkx2.1* entre diferentes especies. B) Representación esquemática de la construcción *mNkx2.1::EGFP* empleada en los ensayos de transgénesis y que incluye el elemento conservado del intrón 1 con los SU para *Sox*. C-F) Esta región dirigió la EGFP a la porción anterior del hipotálamo (cabeza de flecha blanca) a estadio 19 (E) y a estadio 26 (F) recapitulando parcialmente la expresión endógena del gen *Nkx2.1* de medaka (C,D). A estadio 26 se observó una expresión ectópica en la porción anterior del prosencéfalo (asterisco). G-H) Vistas frontales en epifluorescencia de embriones de medaka inyectados con la construcción *mNkx2.1::EGFP* sola o en combinación con el MO o el ARNm de *Sox2*. El MO y el ARNm de *Sox2* resultaron respectivamente en una inhibición y una sobreactivación (cabezas de flecha) del reportero en comparación con los individuos control. J-M) HIS de los marcadores *Nkx2.1*, *Arx* y *Dmbx1* en embriones control e inyectados con el MO o el ARNm de *Sox2*. El MO *Sox2* disminuyó la expresión de *Nkx2.1* en la porción anterior del hipotálamo, mientras que su sobreexpresión la incrementó (cabezas de flecha en I-M). Barra de escala: 40µm

Además, la coinyección de esta construcción reportera con el ARNm o el MO de *Sox2* resulta respectivamente en un aumento y una disminución de los niveles de GFP en esta región (**Fig. 27G-D**), así como del patrón de expresión del gen *Nkx2.1* endógeno de medaka (**Fig. 25A,D,E, Fig. 26J-M**), sugiriendo que *Sox2* también podría estar controlando directamente la expresión *in vivo* del gen *Nkx2.1* de medaka.

Estos resultados permiten proporcionar una explicación a nivel molecular de los fenotipos observados al manipular experimentalmente los niveles de actividad de *Sox2* y/o *Six3.2* y establecen una red de regulación en la cual *Six3.2* y *Sox2* regulan los genes *Rx3*, *Foxg1* y, posiblemente *Nkx2.1* para especificar los diferentes territorios prosencefálicos.

4. RESULTADOS

BLOQUE III

Identificación de reguladores en *cis* y en *trans* de la expresión del gen *Six3.1*

Los procesos de duplicación génica están frecuentemente asociados con la subfuncionalización y neofuncionalización de los nuevos parálogos originados. Los resultados presentados en éste trabajo sugieren que este podría haber sido también el caso de los genes *Six3* en peces. Así, en el pez medaka, los genes *Six3.1* y *Six3.2* han segregado espacialmente sus patrones de expresión en los diferentes territorios prosencefálicos y parecen haber adquirido funciones específicas dentro de los mismos. Frecuentemente este tipo de segregación funcional lleva consigo la segregación de los elementos reguladores de la expresión génica. En los apartados anteriores de este trabajo nos centramos en la regulación del gen *Six3.2* de medaka, por ser el homólogo más cercano al gen *Six3* de mamíferos. Sin embargo, para poder comprender en profundidad la regulación de este último es necesario estudiar también los elementos reguladores (en *cis* y en *trans*) de su otro parálogo: el gen *Six3.1*.

En este apartado se presenta una caracterización de la región genómica localizada 5' al gen *Six3.1* y que contiene diferentes módulos conservados con función reguladora. Así mismo, se muestran resultados preliminares acerca de la identificación de elementos reguladores en *trans* del gen *Six3.1*.

4.8. Identificación de elementos reguladores en cis de la expresión de *Six3.1*

Como ya comentado, no existe, hasta la fecha, ninguna información acerca de la regulación del gen *Six3.1* de medaka o de sus correspondientes ortólogos en otras especies de peces. Por tanto, el paso inicial consistió en identificar los elementos reguladores *en cis* responsables de su patrón de expresión. El gen *Six3.1* se ubica en el cromosoma 19 y está localizado a aproximadamente 24kb del gen situado inmediatamente 5' (el gen *Ppm1b*), y a 3kb del gen *Prkce*, localizado corriente abajo. Como aproximación inicial al estudio de los elementos reguladores *en cis* de la expresión del gen *Six3.1*, analizamos esta región comparándola con las secuencias homólogas de diferentes especies de peces teleósteos. A diferencia del gen *Six3.2*, la comparación de las secuencias genómicas de distintas especies de peces teleósteos no obtuvo ningún resultado en las primeras 6kb, a excepción de una pequeña región, inmediatamente adyacente al 5' del gen, de aproximadamente 100pb. Dicha región, se postuló inicialmente como el promotor mínimo del gen. En concordancia con estos datos, ni la construcción *Six3.1-I*, ni la *Six3.1-II*, que contienen respectivamente un fragmento de 5 y 3kb 5' respecto al sitio de inicio de la transcripción (ver material y métodos) dirigieron la expresión de la EGFP en los dominios de expresión del gen *Six3.1*. Sin embargo, al analizar una región genómica más amplia se identificaron un total de 5 módulos no codificantes, relativamente conservados entre las diferentes especies de teleósteos. Dichos elementos se nombraron alfabéticamente (A-E) en función de su distancia al locus génico, localizándose en una región de aproximadamente 13,5kb situada a 6kb del locus de *Six3.1* (**Fig. 28A**). El grado de conservación de estos elementos fue sensiblemente menor que el observado para los módulos reguladores del gen *Six3.2* (**Fig. 10A**), de acuerdo con el mayor grado de divergencia evolutiva observado entre las secuencias codificantes de *Six3.1* y el gen *Six3* de mamíferos (Conte & Bovolenta 2007). Estas regiones fueron clonadas secuencialmente detrás del fragmento de 3kb descrito anteriormente, para generar la construcción *Six3.1-III*. La línea transgénica correspondiente presentó expresión del reportero EGFP en distintas estructuras prosencefálicas tanto a estadios tempranos (estadio 16-21) como tardíos (24-32) del desarrollo (**Fig. 28B-E**, datos no mostrados). Así, en estadio de placa neural se observó expresión de GFP en la placa neural anterior (**Fig. 28C**) y, durante la formación del tubo neural, la actividad del transgen se localizó en las vesículas ópticas, hipotálamo y diencefalo así como en la región del itmo y en el ectodermo de las presuntivas placodas craneales, reproduciendo la distribución del ARNm del gen *Six3.1* endógeno (**Fig. 28D**). La correlación entre la distribución del reportero y la expresión de *Six3.1* se observó también a estadio 24, cuando la señal de GFP se detectó en el dominio de retina neural de la copa óptica (reproduciendo el gradiente antero-posterior observado en la expresión de *Six3.1*), hipotálamo, bulbo olfatorio y diencefalo (**Fig. 28E**).

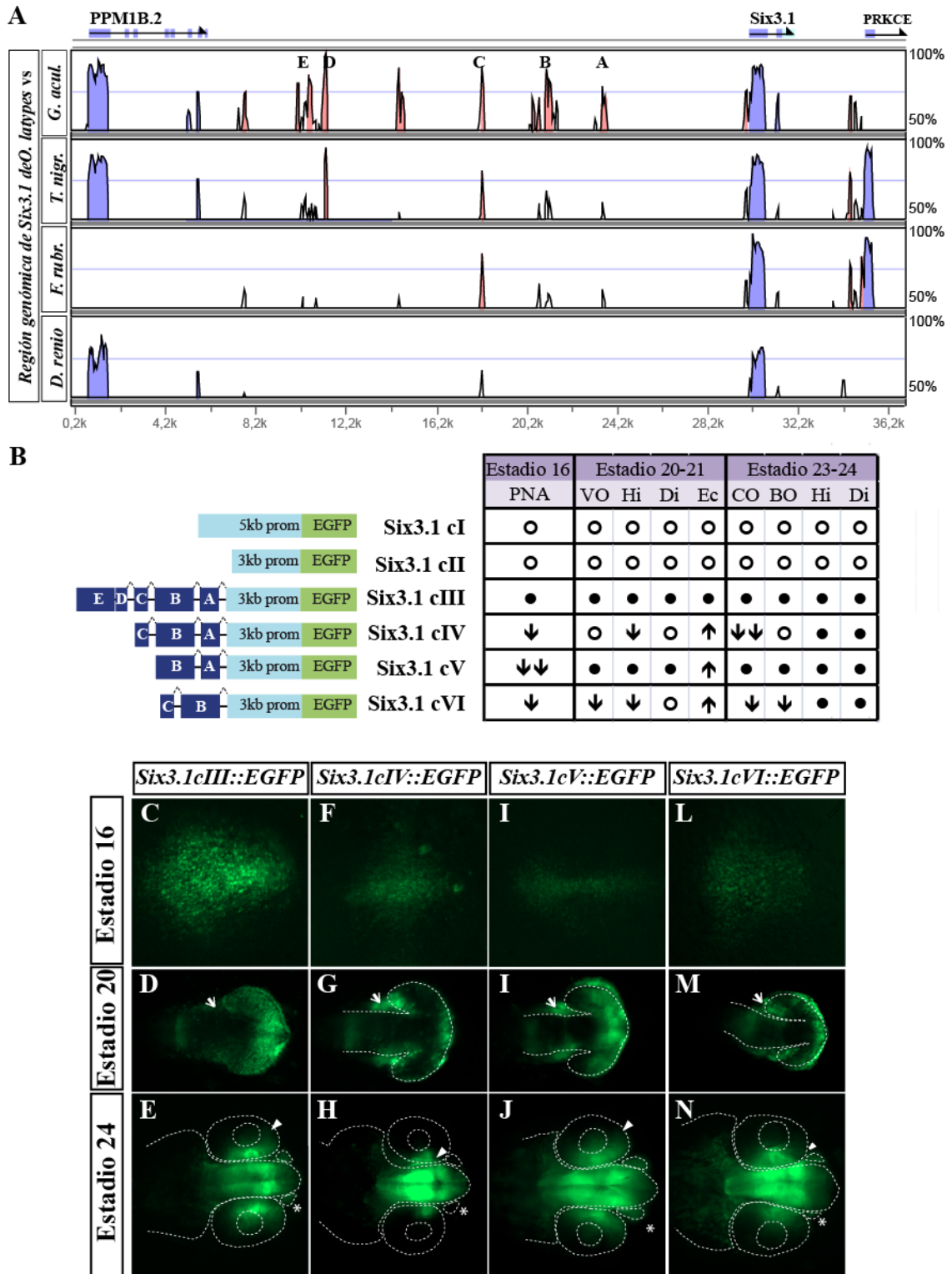


Figura 28. Un conjunto de 5 elementos no codificantes evolutivamente conservados reproduce el patrón de expresión del gen *Six3.1* de medaka. A) Alineamiento de la región genómica del gen *Six3.1* de medaka mediante comparaciones par a par de con diferentes especies de peces teleosteos (*G. aculeatus*, *T. nigroviridis*, *F. rubripes* y *D. rerio*). Las regiones codificantes y no codificantes conservadas (70% de homología sobre 100pb) se representan respectivamente en forma de picos azules y rosas. Los putativos módulos reguladores identificados se nombraron alfabéticamente A-E en función de su distancia al *locus* génico. B) Estos módulos se clonaron secuencialmente en el vector de transgénesis IScel-EGFP detrás de una región de 3kb situada inmediatamente 5' al inicio de transcripción del gen, generando las construcciones cIII-cVI. C-S) Las respectivas líneas transgénicas estables se analizaron mediante la expresión del reportero EGFP (B, C-N). La línea *Six3.1*-cIII recapituló el patrón de expresión de *Six3.1*, mientras que las otras líneas mostraron alteraciones en la expresión del reporte EGFP en las vesículas y copas ópticas, diencefalo, hipotálamo y bulbo olfatorio (asterisco), así como en el ectodermo de las futuras placodas craneales (fechas en D-M). El límite del dominio EGFP+ en el ojo se marca con una cabeza de flecha blanca. Barra de escala: 40uM.

Para caracterizar más en detalle la contribución de los diferentes módulos conservados al control de la expresión de *Six3.1*, realizamos una serie de construcciones con diferentes combinaciones de los mismos (**Fig. 28B**). Cuando se eliminaron los elementos conservados D y E (línea transgénica *Six3.1*-iIV) la expresión del reportero EGFP se vio drásticamente afectada (**Fig. 28B, F-H**). Así, la extensión e intensidad del dominio GFP positivo dentro de la placa neural resultaron notablemente reducidos en comparación con el de la línea transgénica *Six3.1*-III (**Fig. 28C,F**) y, a estadio 20, la expresión del reportero se perdió casi por completo en el diencéfalo y en las vesículas ópticas (cabeza de flecha en **Fig. 28G**) y se redujo considerablemente en el hipotálamo. En cambio, la señal GFP se observó de forma más intensa en el ectodermo de las placodas craneales (flecha en **Fig. 28G**). Además, a estadio 24, la actividad del reportero no se detectó en la copa óptica (a excepción de una pequeña región central, flecha en **Fig. 28H**), ni en el bulbo olfatorio, pero sí en hipotálamo y diencéfalo (**Fig. 28H**). Sin embargo, cuando, además de los elementos conservados D y E, se deleccionó también la región C (línea transgénica *Six3.1*-V), el patrón de expresión del reportero se recuperó en cierta medida (**Fig. 28B,I-K**): si bien a estadio 16 el dominio EGFP+ dentro de la placa neural resultó reducido con respecto a la línea transgénica *Six3.1*-III, a estadios más tardíos (19-24), su patrón de expresión fue muy similar al de esta, aunque con niveles más bajos en la porción posterior de las vesículas ópticas y más intensos en el ectodermo de las presuntivas placodas craneales (**Fig. 28J,J**). Esto sugiere que el elemento C actúa como un silenciador del gen *Six3.1* en dominios prosencefálicos, y que su actividad es antagonizada por el conjunto de los elementos D y E. De acuerdo con esta hipótesis, la línea transgénica *Six3.1*-VI, en la que se deleccionaron los módulos A, D y E, mostró niveles reducidos de EGFP en las vesículas ópticas, diencéfalo e hipotálamo a estadio 20, aunque mantuvo cierta expresión en la porción más anterior de la retina (**Fig. 28M**). Así mismo la expresión del reportero EGFP no se recuperó completamente en la retina y en el bulbo olfatorio a estadio 24, en comparación con la línea *Six3.1*-V (**Fig. 28N**), sugiriendo que el elemento A también contribuiría a regular negativamente la transcripción de *Six3.1* en estos dominios y que el módulo B sería el principal potenciador responsable de la expresión de *Six3.1* en estos estadios.

4.9. Identificación de factores reguladores en trans de la expresión de *Six3.1*

Con el fin de identificar FT candidatos a regular la expresión de *Six3.1* procedimos a realizar el mismo tipo de análisis descrito para el gen *Six3.2* en el apartado 4.1 de este trabajo. Sin embargo, en este caso, no se pudieron encontrar SU putativos conservados entre las diferentes especies de peces, probablemente debido al mayor grado de divergencia evolutiva entre las secuencias. Por tanto, tuvimos que emplear una aproximación diferente para identificar posibles factores reguladores de la transcripción del gen *Six3.1*. En primer lugar llevamos a cabo una búsqueda de SU putativos para FT en las secuencias de los elementos reguladores A-E y los SU putativos fueron filtrados en base a su conservación evolutiva mediante comparaciones par a par entre las secuencias de medaka y las de las

diferentes especies de peces teleósteos. Finalmente se escogieron aquellos candidatos funcionalmente relacionados con *Six3.2* y conservados entre el pez medaka y, al menos, otra de las especies de peces. Cabe destacar que, a excepción de la especie *Gasteopus aculeatus*, ninguna otra presentó conservación en todos los elementos reguladores definidos para el gen *Six3.1* de medaka (**Fig. 29A**). El pez cebra, al igual que lo observado en el caso del gen *Six3.2* resultó ser la especie más divergente, sin que se haya encontrado una conservación significativa con ninguno de los módulos reguladores de *Six3.1*. Las otras especies mostraron conservación solamente de alguno de los elementos reguladores, siendo el modulo C aquel con mayor grado de homología, al encontrarse SU para FT conservados en 3 de las 5 especies analizadas (**Fig. 29A**). Sin embargo, a pesar de esta gran divergencia evolutiva, se pudo identificar un número importante de FT candidatos (**Tabla XIV**).

Tabla XIV: SU para FT candidatos en los elementos reguladores del gen *Six3.1*

	E	D	C	B	A
SU para FT conservados entre especies	<i>Smad</i>	<i>Pou</i>	<i>Sox</i>	<i>Kaiso</i>	<i>E2f</i>
	<i>E2f</i>	<i>Smad</i>	<i>E2f</i>	<i>Lef</i>	<i>Maf</i>
	<i>Sox</i>	<i>Fox</i>	<i>Gata</i>	<i>Oct</i>	<i>Pax</i>
	<i>Pax</i>	<i>Lef</i>	<i>Mitf</i>	<i>Crx</i>	<i>Sox</i>
	<i>Titf</i>	<i>Pbx</i>	<i>Oct</i>	<i>Tbx</i>	<i>Msx</i>
	<i>Oct</i>	<i>Oct</i>	<i>Tbx</i>	<i>Gli</i>	<i>Gata</i>
	<i>Gata</i>	<i>Gata</i>	<i>Smad</i>	<i>Etf</i>	<i>Otx</i>
	<i>Tbx</i>	<i>Sox</i>		<i>Lhx</i>	<i>Oct</i>
	<i>Fox</i>	<i>Kaiso</i>		<i>Lmo</i>	<i>Nkx</i>
	<i>Pbx</i>	<i>Pax</i>		<i>Ebox</i>	<i>Fox</i>
	<i>Ebox</i>			<i>E2f</i>	
	<i>Mitf</i>			<i>Pbx</i>	
	<i>Atf</i>			<i>Pax</i>	
	<i>Meis</i>			<i>Tgif</i>	
	<i>Lmo</i>			<i>Otx</i>	
				<i>Msx</i>	

Algunos de los FT seleccionados en el análisis anterior se testaron en ensayos de luciferasa en células P19, utilizando como reportero una construcción con los elementos reguladores A, B y C clonados detrás del promotor mínimo de la TK (*Six3.1* A-Cluc). Un número importante de estos candidatos regularon la actividad del promotor de *Six3.1* (**Fig. 29B**). Entre ellos, los genes *Sox2* y *Tcf3ca* habían sido identificados como reguladores positivos del gen *Six3.2* en apartados anteriores de este trabajo (**Fig. 11**) lo que podría explicar, en parte, el solapamiento de los patrones de expresión de *Six3.1* y *Six3.2*. El FT *Msx2*, en cambio, parecía comportarse como un represor de la actividad transcripcional de *Six3.2* (**Fig. 11**) mientras que resultó activar la región reguladora del gen *Six3.1* (**Fig. 29**). Es posible que esta discrepancia se deba a diferencias en el contexto transcripcional de ambos promotores, puesto que la construcción reportera de *Six3.1* carece de los elementos D-E, encargados de modular la actividad del silenciador C. Por otra parte, los FT *Six6*, *NeuroD*, *Prox1* y el

propio *Six3.2* también activaron de forma significativa al reportero *Six3.1* A-Cluc (**Fig. 28**), mientras que habían resultado negativos en los ensayos de luciferasa sobre el promotor de *Six3.2* (**Fig. 28B**). Por el contrario, ni *Nkx2.2* ni *Pbx1*, identificados como reguladores positivos de *Six3.2* (**Fig. 28B**) ejercieron ningún efecto sobre la región reguladora de *Six3.1* (**Fig. 28B**) aunque no se excluye la posibilidad de que puedan requerir para su función la presencia de los elementos D-E, no presentes en dicha construcción. Así, estas discrepancias podrían justificar las diferencias observadas en los patrones de expresión de *Six3.1* y *Six3.2* y ponen de manifiesto la segregación evolutiva ocurrida entre en los elementos reguladores de ambos genes. En este sentido, el FT *Prox1* y el propio *Six3*, habían sido previamente identificados como reguladores del gen *Six3* de otros vertebrados (Lengler & Graw 2001; Manavathi et al 2007; Suh et al 2010) y resultaron regular la actividad transcripcional de la construcción *Six3.1* A.Cluc (**Fig. 29B**), al contrario de lo observado para la región reguladora de *Six3.2*

En conclusión, a través de este estudio hemos identificado una serie de reguladores de los genes *Six3.1* y/o *Six3.2*. Las diferencias observadas en las secuencias de sus regiones reguladoras y en los factores reguladores en *trans* identificados hasta el momento sugieren que se ha producido un proceso de segregación de los elementos genómicos que controlan la expresión de estos genes, aunque es posible identificar elementos comunes que reflejarían la existencia de un mecanismo ancestral de regulación común a ambos parálogos y que podría estar conservado también en el caso del gen *Six3* de tetrápodos. Por tanto, estos resultados contribuyen a expandir nuestro conocimiento sobre los elementos reguladores, en *cis* y en *trans* que controlan la expresión de los genes *Six3* en vertebrados.

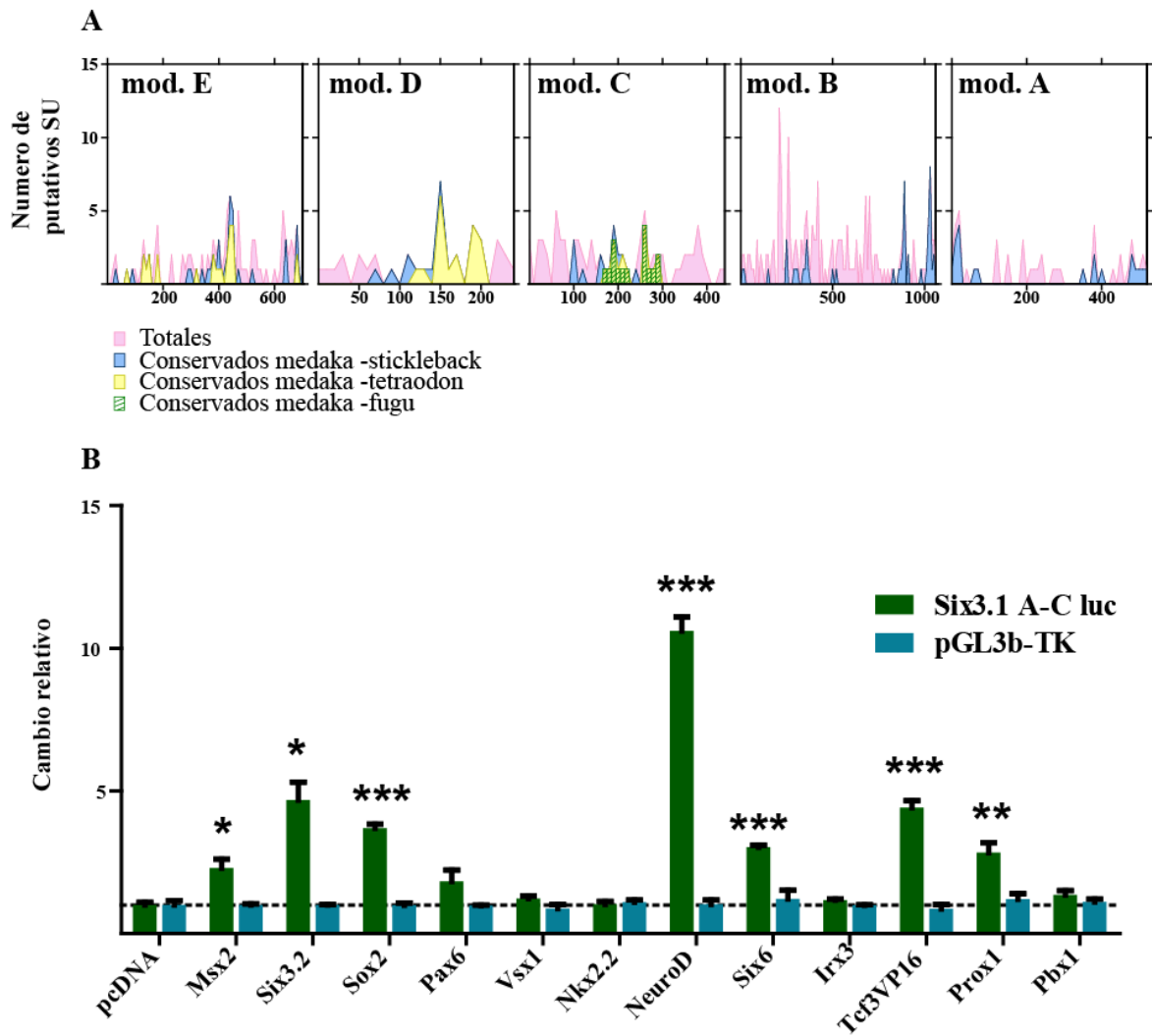


Figura 29. Identificación de factores reguladores en *trans* del gen *Six3.1*. A) Representación de la distribución de SU putativos a lo largo de los diferentes módulos reguladores del gen *Six3.1*. Se representan los SU para FT con patrones de expresión relacionados con el gen *Six3.1* (línea rosa). De estos aquellos SU conservados entre la secuencia de medaka y la de, al menos, otra especie se representan con distintos códigos de colores (ver leyenda). B) Ensayos de luciferasa mostrando el efecto de diferentes FT sobre la actividad transcripcional de la construcción reportera *Six3.1* A-Cluc. Los FT Msx2, Six3.2, Sox2, NeuroD, Six6 y Tcf3ca activaron significativamente la transcripción del reportero. *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,0001$.

4. RESULTADOS

BLOQUE IV

Estudio de la regulación a nivel genómico de los genes *Six3* de vertebrados

En los últimos años han ido aumentando las evidencias que apoyan la existencia de niveles superiores de regulación dentro del genoma. Éstos contemplan la coregulación de varios genes por uno o más elementos reguladores, así como la existencia de “barreras transcripcionales”, denominadas aisladores, que limitan el marco de actuación de dichos elementos reguladores a una región genómica determinada (ver apartado correspondiente de la introducción). Sin embargo, el tamaño y la enorme complejidad del genoma de vertebrados hacen difícil el abordaje de estas cuestiones y todavía son pocos los estudios que han conseguido demostrar regulaciones poligénicas y su papel funcional. En este apartado del trabajo presentamos evidencias preliminares de una posible regulación común entre los genes *Six3* y *Ppm1b*, situados en una misma región cromosómica sinténicamente conservada a lo largo de la evolución. Para ello combinamos diferentes aproximaciones *in silico* que incluyen el análisis de regiones cromosómicas sinténicamente conservadas y la predicción de elementos aisladores y reguladores con el fin de deducir hipotéticas relaciones funcionales entre los genes analizados. Así mismo, se presentan evidencias experimentales preliminares encaminadas a validar experimentalmente las conclusiones obtenidas con este análisis *in silico*.

4.10. Análisis in silico de la región cromosómica del gen Six3 y sus parálogos

Para determinar la posible existencia de dominios de regulación génica en el contexto cromosómico del gen *Six3* e intentar comprender sus posibles implicaciones funcionales, partimos de una serie de premisas que se enumeran a continuación:

1. Los genes supuestamente coregulados deben presentar patrones de expresión por lo menos parcialmente solapantes en el espacio y en el tiempo.
2. La existencia de relaciones de coregulación entre dos o más genes implica que su organización relativa dentro del genoma debe permanecer constante a lo largo de diferentes linajes evolutivos en comparación con otros genes no funcionalmente relacionados.
3. Debería ser posible identificar elementos aisladores en el genoma cuya posición sea consistente con la supuesta coregulación de los genes candidatos. Además la localización de dichos aisladores también debería estar evolutivamente conservada.
4. Debería ser posible identificar elementos reguladores conservados entre los genes supuestamente regulados que controlasen la expresión solapante de los mismos.

En este apartado del trabajo se presentan las evidencias obtenidas en relación con las premisas arriba mencionadas.

4.10.1. El gen Six3 se encuentra en una región genómica sinténicamente conservada

El genoma de vertebrados presenta un elevado grado de plasticidad evolutiva, habiéndose producido un gran número de translocaciones y reordenamientos génicos, así como procesos de duplicación genómica como en el caso de los peces teleósteos (Bourque 2009; Manning & Scheeff 2010). El gen *SIX3* de humanos se encuentra en el cromosoma 2p21, en una región con una densidad génica moderadamente elevada, que abarca aproximadamente 5Mb (Granadino et al 1999). La comparación sinténica entre la región 2p21 de humano y las correspondientes regiones de diferentes especies de vertebrados reveló la existencia de una serie de bloques sinténicos conservados a lo largo de los diferentes linajes evolutivos (**Fig. 30**). Así, el gen *Six3* resultó localizarse dentro de una región evolutivamente conservada que englobaría a los genes *Ppm1b*, *Slc3a*, *Prepl*, *C2orf34*, *Six3os1* (este último sólo dentro del linaje de mamíferos) y *Six2*.

Human Chr2:42104694-47797470

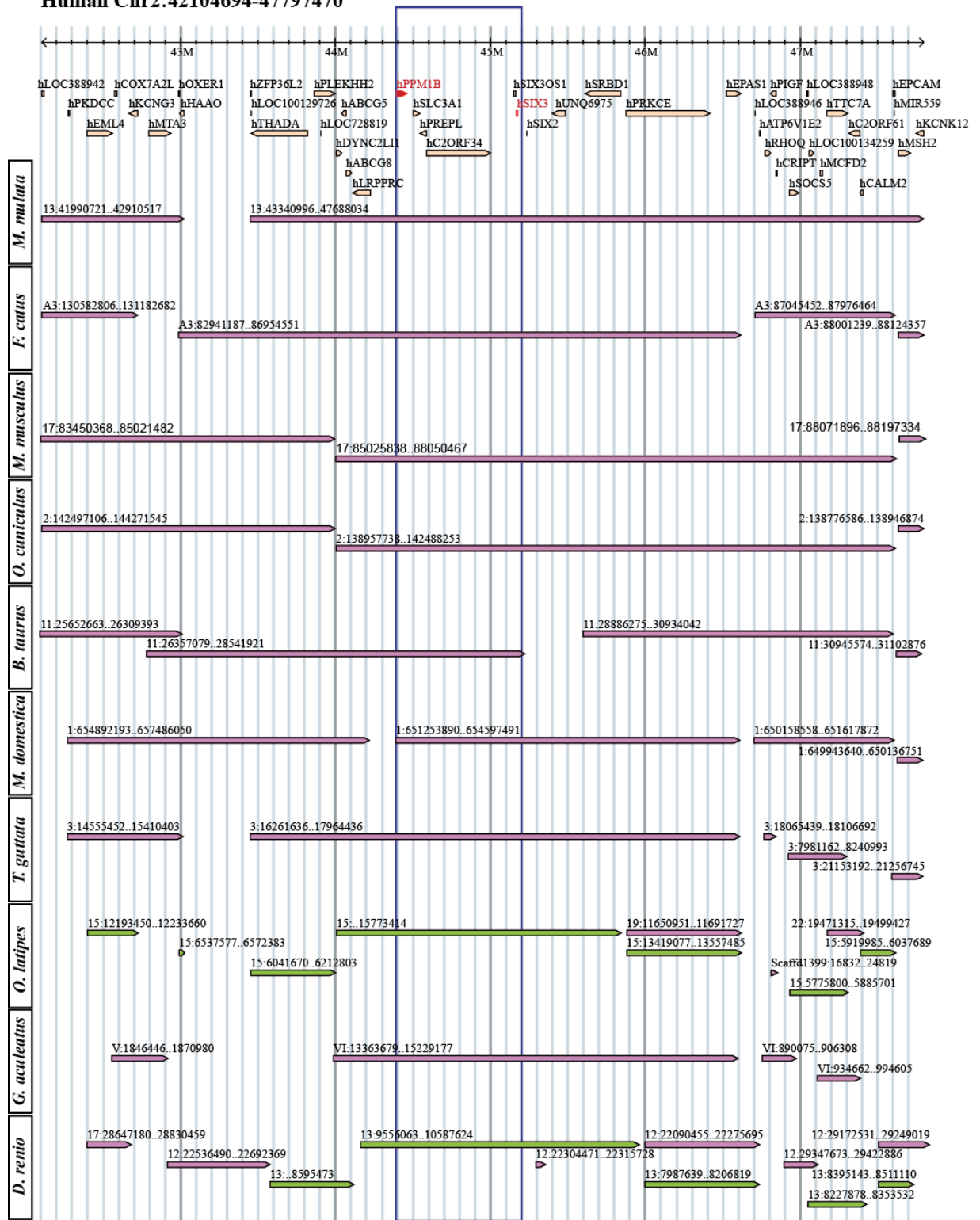


Figura 30. El gen *Six3* se localiza en una región cromosómica sinténicamente conservada. Las regiones cromosómicas contenientes el gen *Six3* de varias especies de vertebrados (*Homo sapiens*, *Macaca mulata*, *Felis catus*, *Mus musculus*, *Oryctolagus cuniculus*, *Bos taurus*, *Monodelphis domestica*, *Taeniopygia guttata*, *Oryzias latipes*, *Gasterosteus aculeatus* y *Danio rerio*) se analizaron con el programa Orthocluster utilizando el humano como especie de referencia. Los genes de humano anotados en la base de datos Refseq se representan como barras acabadas en punta de flecha y de color rosa pálido. Los bloques sinténicos y sus coordenadas genómicas se representan por barras de color rosa o verde acabadas en punta de flecha. La dirección de la flecha indica su orientación relativa. Algunos de los bloques sinténicos de tetrápodos aparecieron duplicados en los peces, probablemente debido al evento de duplicación genómica ocurrido en este linaje. En estos casos uno de los bloques sinténicos se marcó en color rosa, y el otro en verde. El gen *Six3* está comprendido en una región sinténicamente conservada (recuadro azul) en todas las especies analizadas y cuya unidad mínima consta de los genes *Ppm1a*, *Slc3a*, *Prepl*, *C2orf34* y *Six3*.

El estudio comparativo de los genomas de peces teleósteos resultó particularmente interesante a este respecto. En las tres especies analizadas, el parálogo más cercano al gen *Six3* de mamíferos se englobó en una región genómica con un elevado grado de conservación, (**Fig. 30 y Fig. 31**). En cambio, la otra duplicación del gen correspondió, en todos los casos, con una región cromosómica mucho menos conservada, en la que no se observó el bloque sinténico previamente mencionado (**Fig. 30 y Fig. 31**). Sin embargo, un análisis más detallado de estas regiones reveló la presencia, en todos los casos analizados, de un segundo parálogo del gen *Ppm1b*, localizado inmediatamente 5' a la duplicación del gen *Six3* y a una distancia muy inferior al caso descrito anteriormente. Así denominamos como *Ppm1b.1* al parálogo asociado con el gen *Six3.2*, al presentar un mayor grado de homología en su secuencia proteica con el gen *Ppm1b* de mamíferos, mientras que el parálogo localizado en proximidad del gen *Six3.1* fue identificado como *Ppm1b.2* (**Fig. 30**) Esta misma correlación entre parálogos de los genes *Six3* y *Ppm1b* se observó en todas las especies de peces analizadas, de forma que se pudo establecer una relación sinténicamente conservada a lo largo de los diferentes linajes de peces teleósteos (**Fig. 31**, datos no mostrados). Dicha relación no se observó para otros genes presentes en la misma región cromosómica.

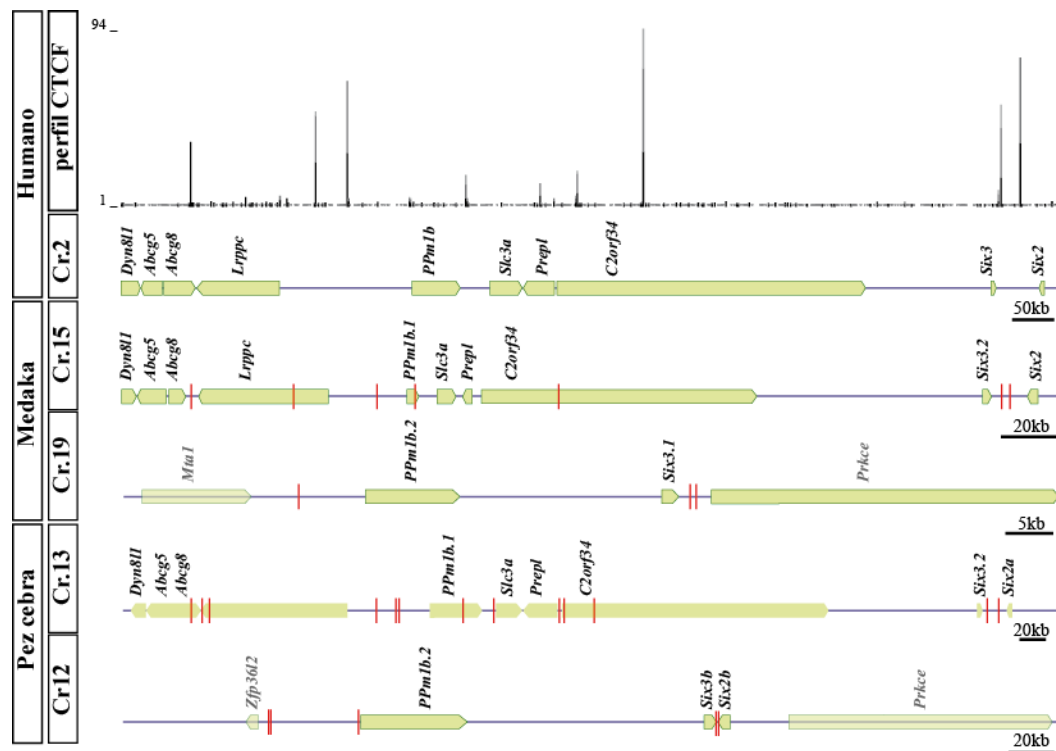


Figura 31. La posición de los elementos aisladores putativos está evolutivamente conservada entre humano, medaka y pez cebra. La posición y orientación de los genes contenidos en los bloques sinténicos de las diferentes especies se representan como barras verdes acabadas en punta de flecha. Las barras de color más pálido representan genes no sinténicamente conservados dentro del cromosoma de peces. Los perfiles de unión de CTFC en el cromosoma humano (Barski et al 2007) se representan en forma de picos y reflejan la posición de los elementos aisladores putativos. Los SU putativos para CTFC en los bloques sinténicos de los genes parálogos de los genes *Ppm1b* y *Six3* en medaka y pez cebra fueron identificados con el programa InsulatorDB tomando como referencia la localización de los sitios de unión de CTFC en el genoma humano y se representan con una barra vertical roja.

4.10.2. La distribución de elementos aisladores y módulos conservados no codificantes predice un marco de regulación común entre los genes *Six3* y *Ppm1b*

El análisis presentado en el apartado anterior establece relaciones sinténicas evolutivamente conservadas entre *Six3* y los genes *Ppm1b*, *Slc3a*, *Prepl*, *C2orf34* y *Six2* y en particular con el primero. De estos *Six3os1* se coexpresa con *Six3* en diferentes territorios prosencefálicos durante el desarrollo, estando la expresión de este último contenida en la del primero. Por tanto, sus patrones de expresión y su conservación sinténica dentro del linaje de tetrápodos, identifican estos 2 elementos como plausibles candidatos a ser coregulados. Por el contrario, la expresión divergente de los genes *Six3* y *Six2* (el primero se localiza en estructuras prosencefálicas, mientras que el segundo se expresa en ganglios craneales, placodas óticas y ópticas, mesenquima de la cabeza, los somitas y sus derivados, etc (Boucher et al 2000; Bovolenta et al 1998; Conte & Bovolenta 2007; Ghanbari et al 2001; Ohto et al 1998; Oliver et al 1995; Zhou et al 2000) parecen excluir la posibilidad de que estos compartan un mismo contexto de regulación. Por otra parte, deleciones en la región cromosómica que abarca los genes *Prepl*, *Slca3* y *C2orf34* en humanos (Chabrol et al 2008; Jaeken et al 2006; Parvari et al 2005) resultan en defectos no directamente relacionables con la función del gen *Six3*, aunque el patrón de expresión de estos genes durante el desarrollo no se conoce.

En cambio, aunque existe muy poca información disponible acerca del gen *Ppm1b*, se ha descrito que su parólogo *Ppm1a* actúa como un inhibidor de las vías de señalización de BMP y TGF- β , a través de mecanismos dependientes e independientes de la defosforilación de sus proteínas efectoras, y que se expresa desde estadios tempranos durante el desarrollo del SNC con niveles más intensos en el ojo. (Smad1, Smad2 y Smad3; (Dai et al 2010; Duan et al 2006; Kokabu et al 2010; Lin et al 2006; Schilling et al 2006; Wrighton et al 2006). Además, se ha visto que tanto *Ppm1a* como *Ppm1b* son capaces de defosforilar IKK β , un intermediario de la vía de señalización de NF-kappa β , lo que apoya la existencia de dianas comunes entre ambas proteínas (Sun et al 2009). Puesto que el gen *Six3* se expresa en un dominio de baja o nula actividad BMP (Chapman et al 2002) y que, a su vez, reprime la expresión de *Bmp4* (Gestri et al 2005), es posible que exista una relación funcional entre los genes *Ppm1b* y *Six3*. No obstante, para que dos genes compartan un mismo contexto regulador dentro del genoma, también es necesario que existan secuencias reguladoras que controlen la expresión de ambos genes, así como de la presencia de aisladores que delimiten el rango de actividad las mismas, impidiendo la interacción cruzada entre genes y elementos reguladores fuera de este hipotético contexto genómico.

Para intentar abordar estas cuestiones, realizamos una búsqueda de SU putativos para el factor CTCF en la región genómica que abarca los genes *Six3* y *Ppm1b*. Este factor se une a secuencias consenso dentro del ADN permitiendo la formación de bucles de cromatina que, a su vez, definirían los distintos dominios de regulación génica (Bell et al 1999; Hou et al 2008; Valadez-Graham et al 2004). Recientemente se ha descrito el perfil de unión de CTCF en el genoma humano a través de técnicas de ChIPseq en células T CD4⁺ (Barski et al 2007). En base a esta información analizamos

los perfiles de unión de CTCF en la región genómica correspondiente a los genes *PPM1B* y *SIX3* de humano (**Fig. 31**). Además, a través de la herramienta de predicción CTCFBS prediction tool (<http://insulatordb.uthsc.edu/storm.php>) analizamos las correspondientes regiones genómicas de peces, en busca de SU putativos para CTCF que pudiesen correlacionar con los perfiles de unión de este FT en el genoma humano. De esta forma, se encontraron regiones de unión de CTCF flanqueando a los genes *PPM1B* y *SIX3* de humano así como SU putativos para CTCF en posiciones equivalentes de los parálogos de estos genes en todas las especies de peces analizadas (**Fig. 31**), sugiriendo que estos elementos podrían estar delimitando un contexto regulador común para ambos genes. Además, también se encontraron SU putativos para CTCF flanqueando la región correspondiente a los genes *Slc3a1*, *Prepl* y una región intrónica del gen *C2orf34* en el genoma de los diferentes linajes de vertebrados, incluyendo las regiones cromosómicas de los ortólogos del gen *Six3* en peces (**Fig. 31**). Una posible interpretación para esta observación es que dichos genes podrían constituir un dominio de regulación independiente, contenido a su vez, dentro una región más amplia que abarcaría los genes *Six3* y *Ppm1b*.

Para intentar predecir la existencia de elementos conservados que pudiesen controlar la expresión de los genes *Six3* y *Ppm1b*, analizamos la región genómica correspondiente con el programa ANCORA que permite representar gráficamente la distribución y densidad de elementos conservados no codificantes dentro del genoma. Así la comparación de la región 2p21 de humanos con diferentes especies de vertebrados evidenció la existencia de un importante número de módulos reguladores putativos localizados entre los genes *Ppm1b* y *Six3*. Además, la máxima densidad de estos elementos conservados se observó en la región genómica 5' al gen *Six3*, mientras que su número fue significativamente inferior dentro del cluster de genes *Slc3a1-C2orf34* y en las regiones genómicas flanqueantes a los genes *Ppm1b* y *Six3* (**Fig. 32**).

De esta forma, el análisis conjunto de elementos reguladores y aisladores presentado anteriormente, revela la posible existencia de un complejo contexto genómico que permitiría la coregulación de los genes *Ppm1b* y *Six3*, de forma independiente del control de otros conjuntos génicos situados tanto dentro (bloque *Slc3a1-C2orf34*) como fuera (como el caso del gen *Six2*) del dominio delimitado por dichos genes.

Región cromosómica 2p21 Humano vs.

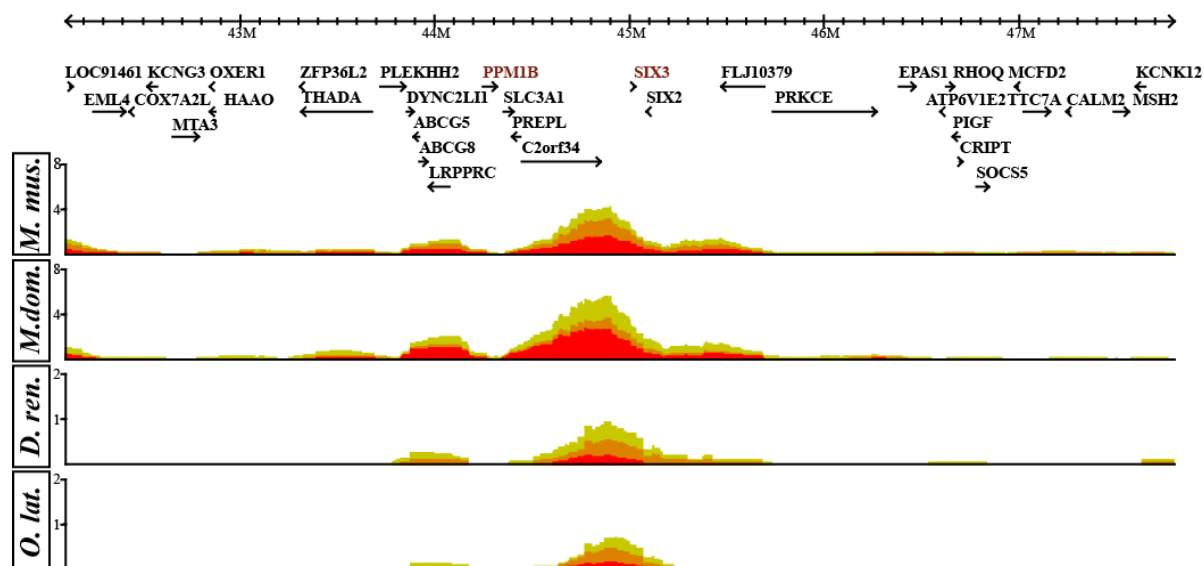


Figura 32: La región genómica comprendida entre los genes *Ppm1b* y *Six3* está enriquecida en módulos no codificantes conservados. Las secuencias genómicas de humano se alineó en comparaciones para par con diferentes especies de vertebrados como indicado en los paneles. Los genes humanos anotados en la base Refseq se representan con flechas negras. La densidad de módulos evolutivamente conservados entre pares de especies se representa en forma de picos. El color de los picos representa el grado de conservación de los módulos, (rojo: mayor conservación, amarillo menos conservados). Nótese como la mayor parte de los módulos conservados se localizaron en la región genómica comprendida entre los genes *Ppm1b* y *Six3*.

4.10.3. Validación experimental de los putativos elementos aisladores identificados in silico

Para corroborar la funcionalidad de estos SU clonamos, en colaboración con el Dr. Lluís Montoliu (Centro Nacional de Biotecnología-CSIC, Madrid), regiones de aproximadamente 500pb que incluyen las secuencias de reconocimiento de CTCF identificadas en el apartado anterior (**Fig. 33A,C**) y testamos su actividad en ensayos de luciferasa específicos. En estos ensayos, la región conteniente el SU para CTCF se clona entre el enhancer (E) del citomegalovirus (CMV) y su promotor mínimo. Si la región tiene actividad como aislador bloqueará la interacción entre ambos elementos resultando en una inhibición de la actividad luciferasa. Como control positivo se utilizó en todas las ocasiones el aislador de la α -globina de pollo que ha sido experimentalmente validado en tanto *in vitro* como *in vivo* (Furlan-Magaril et al 2011). Además, a modo de control negativo se generaron construcciones en las que el elemento aislador se clonó detrás del enhancer, de forma que no pudiese, al menos teóricamente, bloquear la interacción de este con el promotor mínimo. Como esperado, el enhancer CMV activó la transcripción de su respectivo promotor resultando en niveles consistentes de expresión basal. Esta actividad transcripcional se bloqueó en mas de 10 veces cuando, entre el potenciador y el promotor se clonó el elemento aislador de la α -globina de pollo, pero no cuando este se clonó 5' al enhancer (**Fig. 33A,B**). De forma similar tanto los elementos aisladores ensayados para el gen *Six3.2* (**Fig. 33A**), como los del gen *Six3.1* (**Fig. 33B**) inhibieron significativamente la actividad del reportero cuando se insertaron entre el promotor y el enhancer del CMV, aunque con distinto grado de inhibición de la actividad luciferasa, pero no cuando se clonaron 5' de ambos elementos.

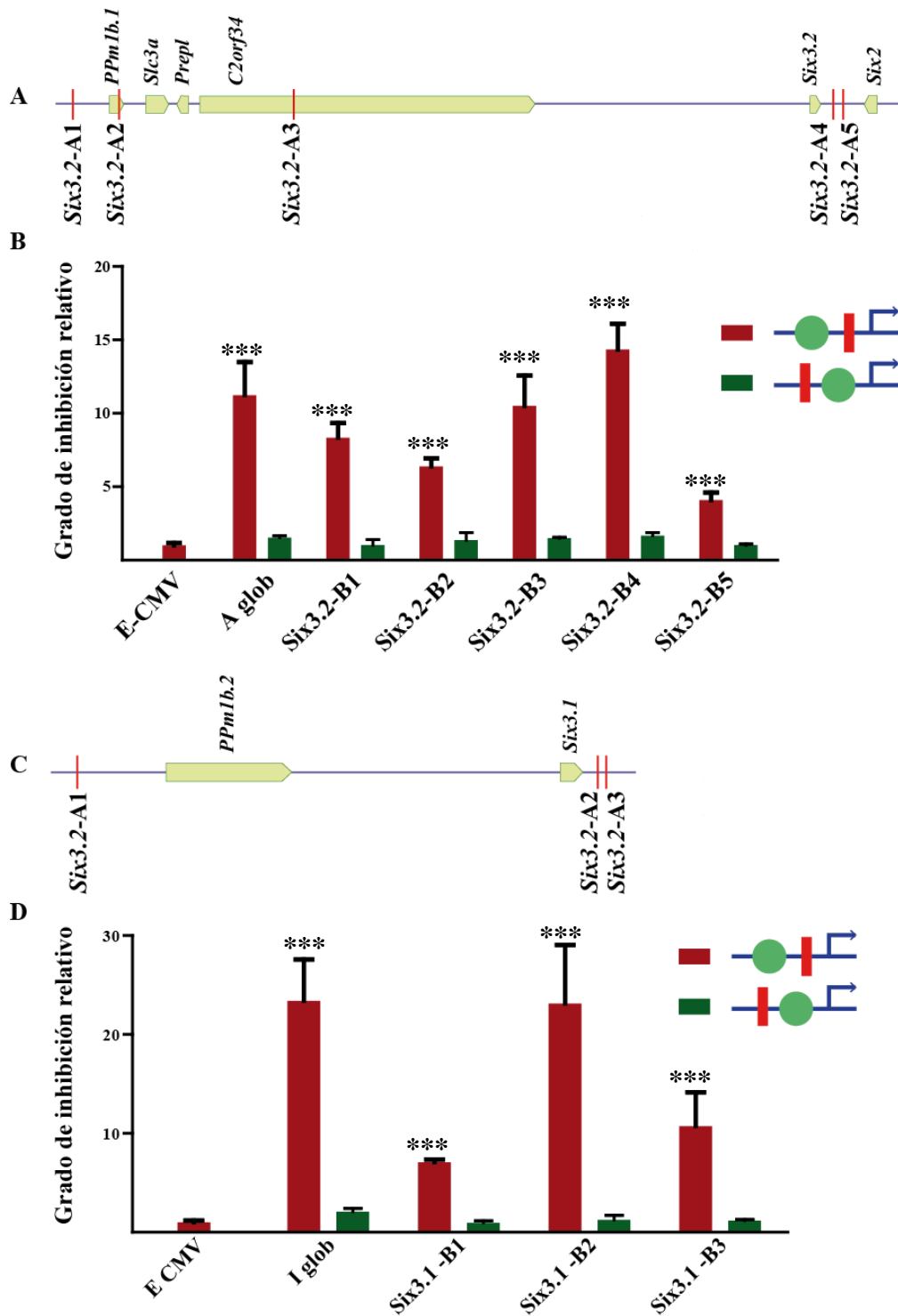


Figura 33. Los elementos aisladores putativos de los genes *Six3.1* y *Six3.2* presentan actividad bloqueante en ensayos de luciferasa. A,C) Representaciones esquemáticas de las regiones genómicas de los genes *Six3.2* y *Six3.1*. Las regiones de los *loci* génicos se representan como cajas de color verde. Los elementos aisladores putativos ensayados en este trabajo se representan con una línea vertical roja. B,D) Ensayos de luciferasa mostrando la inhibición de los diferentes elementos aisladores de los genes *Six3.2* (B) y *Six3.1* (D) en comparación con el del aislador de la α -globina (I glob) utilizado como control positivo.

Estos resultados demuestran que los elementos aisladores identificados para los genes *Six3.1* y *Six3.2* de medaka son funcionales y permiten formular un modelo de interacción entre dichos aisladores compatible con el establecimiento de un dominio de regulación común entre los genes *Six3* y *Ppm1b* (Fig. 34).

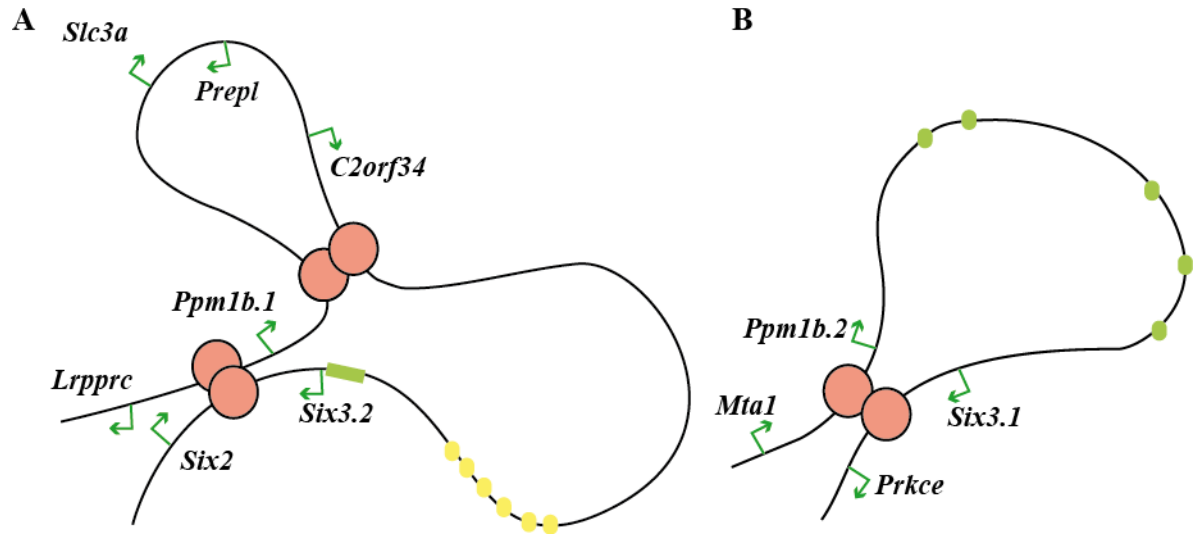


Figura 34. Modelo postulado de establecimientos de dominios reguladores en la región cromosómica de los genes *Six3* y *Ppm1b* en medaka. A) En este modelo los genes *Six3.2* y *Ppm1b.1* se aproximan espacialmente gracias a la interacción de los aisladores (círculos rojos) que los flanquean, de forma que la región reguladora del gen *Six3.2* (caja verde) y los elementos no codificantes conservados localizados 5' a este (círculos amarillos) podrían interactuar con los promotores (flechas verdes) de ambos genes. Al mismo tiempo los loci de *Slc3a*, *Prepl*, *C2orf34* y los genes que flanquean a *Ppm1b.1* y *Six3.2* quedarían en dominios de regulación independientes. B) Los genes *Six3.1* y *Ppm1b.2* quedarían, así mismo, englobados dentro de un mismo dominio de la cromatina, al igual que los elementos reguladores del gen *Six3.1* (círculos verdes), mientras que los genes que los flanquean quedarían excluidos del mismo.

5. DISCUSIÓN

5.1. Evolución diferencial de las regiones reguladoras de los genes *Six3.1* y *Six3.2*

La comparación de las secuencias codificantes y de los patrones de expresión de los genes *Six3.1* y *Six3.2* de medaka indican que este último es el ortólogo más cercano al gen *Six3* de mamíferos (Conte & Bovolenta 2007). En línea con estas observaciones, la región genómica del gen *Six3.2* mostró un mayor grado de conservación con la del gen *Six3* de tetrápodos que *Six3.1*, tanto a nivel sinténico, como a la hora de identificar secuencias no codificantes con función reguladora. No obstante, hemos podido identificar una serie de secuencias no codificantes relativamente conservadas capaces de reproducir la expresión del gen *Six3.1* en líneas transgénicas estables. A pesar de que aún queda mucho por profundizar en la caracterización funcional de estos 5 elementos reguladores putativos, nuestros datos sugieren que el elemento B sería el principal responsable de dirigir la expresión de *Six3.1* en estructuras prosencefálicas y que su actividad es modulada negativamente por los elementos A y C cuya actividad está, a su vez, controlada por el conjunto de los elementos D y E. Este tipo de regulación comparte cierta analogía con lo descrito para el gen *Six3.2*, para el cual el control de su expresión recae en la actividad de elementos potenciadores, silenciadores y antagonistas de silenciadores (Conte & Bovolenta 2007), aunque existen importantes diferencias en cuanto a la actividad espacio-temporal de los elementos reguladores de uno y otro gen. Por tanto, estos resultados podrían reflejar la existencia de un mecanismo ancestral de regulación, que se habría diversificado posteriormente durante el proceso que condujo a la segregación de los patrones de expresión de ambos parálogos. De acuerdo con esta hipótesis, hemos podido identificar FT capaces de controlar la actividad transcripcional de ambos parálogos, mientras que otros reguladores en *trans* resultaron regular específicamente uno solo de los ellos.

En este sentido, hemos identificado un número importante de reguladores en *trans* del gen *Six3.2* a través de dos aproximaciones diferentes a nivel conceptual que pero han proporcionado resultados complementarios en nuestro estudio. Entre estos reguladores se encuentran los FT *Sox2* (ver mas adelante), *Pax6*, *Tcf3*, *Msx2*, *Pbx1*, *Prdm1* y *Vsx1*. Aunque estos candidatos se encuentran todavía en diferentes etapas de validación, sus patrones de expresión, la localización de sus SU putativos dentro de los módulos reguladores de *Six3.2* y las funciones descritas en la literatura para los mismos sugieren que dichos FT podrían ser potenciales reguladores de la expresión de *Six3.2* en distintos territorios y/o fases del desarrollo. Además, gracias al rastreo masivo de reguladores del gen *Six3.2* hemos podido identificar un número de genes cuya relación funcional con *Six3.2* es menos evidente, pero que podría también regular la expresión del mismo *in vivo*.

Por otra parte, en este trabajo también hemos identificado un número importante de reguladores en *trans* del gen *Six3.1*. Algunos de estos factores (*Sox2* y *Tcf3*) han resultado además controlar transcripcionalmente la actividad del gen *Six3.2*, posiblemente reflejando mecanismos comunes de regulación entre ambos parálogos a pesar de la gran divergencia evolutiva de los elementos que

controlan su expresión. Otros factores regularon específicamente uno de los dos parálogos (*Six3.2*, *Six6*, *NeuroD*, *Prox1*, *Vsx1*, *Nkx2.2*, *Pbx1* y *Pax6*) posiblemente relacionados la expresión diferencial de estos genes aunque no se descarta la posibilidad de que, al menos parte de estos FT, puedan controlar la expresión de *Six3.2* a través de los módulos Dy E, no utilizados en nuestros ensayos de activación transcripcional. Además, algunos de los factores habían sido propuestos también como reguladores del gen *Six3* humano y/o sus parálogos en otras especies (Lengler & Graw 2001; Manavathi et al 2007; Zhu et al 2002). Esto sugiere la existencia de mecanismos de regulación conservados que se habrían segregado evolutivamente entre los dos parálogos, por lo que algunos de los reguladores en *trans* identificados en este trabajo podrían estar también implicados en el control transcripcional del gen *Six3* de mamíferos.

5.2. Papel de los genes Sox2 y Six3.2 en la especificación temprana de territorios prosencefálicos

La comprensión de los programas genéticos responsables de la especificación de los diferentes tipos celulares durante el desarrollo resulta difícil de abordar debido a diversos fenómenos, entre los que cabe destacar la utilización repetitiva de unos mismos genes en diversos procesos biológicos, la diversidad de funciones en los que éstos intervienen y su actividad diferencial en distintos tejidos. A través de la combinación de abordajes genómicos y funcionales, hemos demostrado cómo diferentes niveles de actividad de *Six3.2*, junto con su doble función transcripcional como activador y/o represor, cooperan en la especificación de diferentes dominios prosencefálicos. Además hemos visto cómo el gen *Sox2* es responsable, en gran medida, de la regulación de *Six3.2* a nivel transcripcional, implicando así al gen *Sox2* en la especificación diferencial de los territorios prosencefálicos. De esta forma, hemos delineado una jerarquía de 4 FT (*Sox2*, *Six3.2*, *Foxg1* y *Rx3*) que operan en la especificación de los dominios de telencéfalo, retina e hipotálamo dentro del prosencéfalo.

Sox2 ha sido intensamente estudiado por su capacidad de conferir pluripotencia a las células madre embrionarias (Avilion et al 2003; Masui et al 2007; Takahashi & Yamanaka 2006), pero la consecuente letalidad de los ratones nulos para este gen en fases tempranas del desarrollo (Avilion et al 2003) ha dificultado el estudio de sus funciones en el SNC. En este sentido se ha visto que la inactivación condicional de *Sox2* en el cerebro embrionario de ratón, una vez que la especificación de los territorios neurales ha tenido lugar, causa sólo leves defectos al nacimiento, pero afecta severamente a la neurogénesis postnatal en el hipocampo (Favaro et al 2009). Nuestros resultados apuntan a un nuevo papel de *Sox2* en fases tempranas del desarrollo del prosencéfalo. Además, los efectos de la pérdida y ganancia de función de *Sox2* en el telencéfalo revierten con la inyección de cantidades crecientes de ARNm o MO de *Six3.2*, respectivamente. Esto sugiere que *Six3.2* constituye una de las diana de *Sox2* en este territorio, y que altos niveles de ambos genes se requieren en condiciones normales para la especificación del mismo. En el territorio de retina, en cambio, la situación es ligeramente diferente. Si bien los experimentos de inyección de MO indican que *Sox2* y

Six3.2 son necesarios para la correcta especificación de este dominio, la sobreexpresión de los mismos, por encima de determinados niveles, resulta también en una disminución del territorio de retina, sugiriendo que ésta requiere menores niveles de actividad de *Sox2* y *Six3.2* en comparación con el telencéfalo. Estos resultados, junto con los datos obtenidos de los ensayos de luciferasa y de ChIP sugieren además que, en estos territorios, los niveles de actividad de *Six3.2* estarían controlados por *Sox2* directamente a nivel transcripcional. Esta interpretación, se fundamenta también en los patrones de expresión de *Sox2* y *Six3.2* *in vivo*, donde ambos genes se expresan de forma mucho más intensa en el telencéfalo que en las vesículas ópticas durante las fases tempranas del desarrollo del pez medaka. En apoyo a este modelo se han descrito varios ejemplos que relacionan los niveles de expresión génica con la correcta especificación de distintas estructuras embrionarias. Por ejemplo, alteraciones en la dosis génica del gen *Pax6* resultan en defectos en la formación de las vesículas ópticas, ya que la especificación de este territorio se encuentra comprometida tanto en los ratones nulos para *Pax6* como en ratones transgénicos con múltiples copias de este locus (Schedl et al 1996), y se sabe que distintos niveles de actividad de este gen son interpretados diferencialmente por los territorios de iris y cuerpo ciliar (Davis et al 2009). Así mismo, se ha descrito que el propio gen *Sox2* funciona de forma dosis dependiente en la especificación del esófago y tráquea, de forma que la ausencia de función de este gen afecta a la correcta formación de ambas estructuras (Gontan et al 2008; Que et al 2009; Williamson et al 2006), mientras que la disminución de sus niveles relativos resulta en la formación de un tracto esofágico con características de tráquea (Que et al 2007).

Se sabe que los territorios de retina y telencéfalo están, al menos inicialmente, estrechamente relacionados, puesto que alteraciones en la vía de Wnt afecta simultáneamente a ambos dominios (Wilson & Houart 2004) y que se requiere la activación de receptores Frizzled de la vía no canónica de Wnt, así como la expresión de *Sfrp1* y *Rx3*, para definir el dominio de retina, segregándolo del campo morfogenético de telencéfalo en modelos de peces teleósteos (Cavodeassi et al 2005; Esteve et al 2004; Lopez-Rios et al 2008; Stigloher et al 2006). Por tanto, apoyándonos en estas evidencias, proponemos que distintos niveles de actividad de *Six3.2*, promovidos a su vez por la función de *Sox2*, controlarían la especificación de los territorios de telencéfalo y retina de forma dosis dependiente, regulando la expresión diferencial de genes diana. En este sentido, nuestros resultados demuestran que *Six3.2* se une de forma directa a un elemento no codificante conservado localizado 5' al marcador telencefálico *Foxg1* activando su expresión *in vivo*, de acuerdo con lo propuesto en base a otras evidencias en pollo (Kobayashi et al 2002) y que *Sox2* y *Six3.2* también regulan directamente al gen *Rx3*. Sin embargo, mientras que se ha descrito que la unión directa de *Sox2* al promotor del gen *Rax* de *Xenopus* (ortólogo del gen *Rx3* de medaka) promovería su transcripción (Danno et al 2008), *Six3.2* parece regular negativamente la expresión de *Rx3*, por lo menos en la región hipotalámica prospectiva. Puesto que se ha descrito que *Rx3*, a su vez, actuaría reprimiendo la expresión de determinantes telencefálicos como *Foxg1* y *Fez1* y promoviendo la de genes de retina como *mab2112* (Stigloher et al 2006), nuestros resultados permiten postular una red de regulación en

la que altos niveles de actividad de *Six3.2*, mediados transcripcionalmente por *Sox2*, reprimirían la expresión de *Rx3* en telencéfalo y promoverían la expresión de *Foxg1*, mientras que en la retina, los menores niveles actividad de *Six3.2* permitirían la activación de *Rx3* y la consiguiente represión del destino telencefálico (Fig. 34).

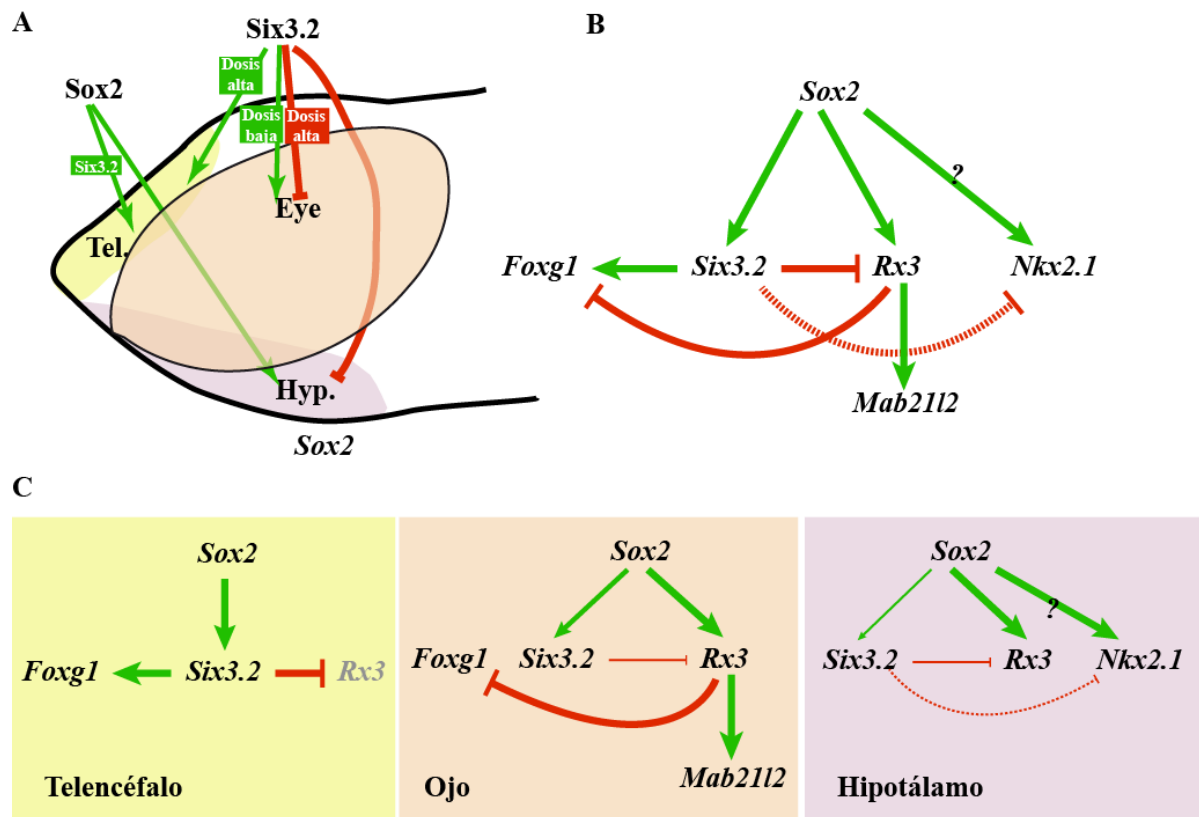


Figura 34. Modelización de la función de Sox2 y Six3.2 en la especificación de territorios prosencefálicos. A) Representación esquemática de los dominios de telencéfalo, ojo e hipotálamo en un embrión de medaka en estadio 20. La función de los genes *Sox2* y *Six3.2* en estos territorios se representa con líneas verde (regulador positivo) y rojas. Notese el distinto efecto de *Six3.2* sobre el territorio de ojo a dosis altas y bajas. B) Modelización de la red transcripcional en la que intervienen *Sox2* y *Six3.2*. Las flechas continuas indican relaciones de regulación directa, mientras que las discontinuas representan efectos indirectos. C) Modelización de los estados de actividad de dicha red en los territorios de telencéfalo, ojo e hipotálamo.

Esta doble función como activador y represor transcripcional se había descrito ya para otros ortólogos del gen *Six3* y podría deberse a interacciones con una variedad de cofactores, posiblemente dependiendo del contexto transcripcional del tejido en cuestión. De hecho se ha demostrado que *Six3* puede interactuar con una variedad de proteínas, incluyendo otros FT, corepresores transcripcionales de la familia Groucho (Kobayashi et al 2001; Lopez-Rios et al 2003; Tessmar et al 2002), coactivadores (Abe et al 2009) y componentes del complejo remodelador de cromatina, incluyendo los genes *MTA1* y *HDAC2* (Manavathi et al 2007). En concordancia con el papel propuesto para esta hipotética red transcripcional (Fig. 34), se ha visto que diferencias en el dominio de expresión del gen *Six3* correlacionan con el tamaño relativo del telencéfalo de diferentes especies de cíclidos (Sylvester et al 2010), sugiriendo que los niveles de actividad del mismo son importantes para definir la extensión de este territorio. Por otra parte, nuestros resultados indican que *Six3.1* y *Six3.2* habrían sido objeto de un proceso de subfuncionalización, de forma que *Six3.1* funcionaría

mayoritariamente en la especificación del territorio de ojo, de acuerdo con lo descrito en la literatura (Carl et al 2002; Loosli et al 1999), mientras que *Six3.2* tendría una fuerte implicación en el desarrollo telencefálico. Sin embargo, es posible que también se haya producido una diversificación de las actividades de ambos factores de transcripción, A este respecto, ambos genes presentan regiones homeodominio prácticamente idénticas sugiriendo que estos FT podrían reconocer las mismas secuencias dentro del genoma, pero presentan diferencias significativas en el dominio *Six* y en la región C-terminal de ambas proteínas, ambos implicados en la interacción con otras proteínas (Kumar 2009; Weasner & Kumar 2009), lo que sugiere que ambos parálogos podrían participar en la formación de diferentes complejos transcripcionales.

Además, nuestros datos sugieren también que *Sox2* podría regular diferencialmente los genes *Six3.1* y *Six3.2* ya que, aunque *Sox2* se requiere para la expresión de ambos parálogos y es capaz de activar transcripcionalmente las regiones reguladoras de estos, su sobreexpresión incrementa específicamente los niveles de *Six3.2*, reduciendo, en cambio, los de *Six3.1*. Así, la regulación diferencial de los genes *Six3.1* y *Six3.2*, y la actividad diferencial de estos parálogos en el telencéfalo y la retina estarían a la base de la expansión del telencéfalo y de la reducción de las vesículas ópticas observadas tras la sobreexpresión de *Sox2*. No obstante, también existen evidencias que apoyan una regulación recíproca de los genes *Six3.1* y *Six3.2*. En este sentido, la inyección del MO-*Six3.2* redujo significativamente los niveles de *Six3.1* y viceversa (datos no mostrados) y *Six3.2* reguló positivamente la actividad transcripcional del promotor de *Six3.1* en ensayos de luciferasa. Además, se sabe que el gen *Six3* regula su propia transcripción en otras especies (Lengler & Graw 2001; Manavathi et al 2007; Suh et al 2010). Este supuesto bucle de regulación explicaría la expansión de las vesículas ópticas a expensas del telencéfalo observada con la inyección de bajas dosis de *Six3.2*, posiblemente favoreciendo el mantenimiento de la expresión del gen *Rx3* por parte de *Six3.1* propuesto en la literatura (Carl et al 2002). No obstante se requiere realizar más experimentos, tanto *in vitro* como *in vivo* para demostrar la existencia de estos fenómenos de regulación entre los genes *Six3.1* y *Six3.2*

Se ha descrito que *Sox2* está implicado en el mantenimiento de los precursores neurales regulando negativamente la expresión de genes proneurales (Agathocleous et al 2009; Wen et al 2008) y que *Six3*, promueve la proliferación de los progenitores a través de efectos transcripcionales y no transcripcionales (Appolloni et al 2008; Del Bene et al 2004; Gestri et al 2005). De acuerdo con estas evidencias, nuestros resultados indican que los genes *Sox2* y *Six3.2* promoverían específicamente la proliferación de los precursores telencefálicos, aunque también regulan la de los progenitores de retina. Además, estos datos, apoyan la idea que *Sox2* y *Six3.2* están principalmente implicados en la especificación del dominio telencefálico.

En otros dominios prosencefálicos en cambio, *Sox2* y *Six3.2* parecen actuar de forma independiente. En hipotálamo ambos genes cumplen funciones opuestas. *Sox2* favorece la especificación de este dominio, posiblemente a través del control transcripcional de los genes *Rx3* y

Nkx2.1 en consonancia con los defectos en el eje hipotálamo-hipófisis causados por la mutación del gen *SOX2* en humanos (Hagstrom et al 2005; Kelberman et al 2006) y con los datos no publicados del laboratorio de Silvia Nicolis. En cambio *Six3.2* parece regular negativamente este dominio, posiblemente limitando su extensión en relación con los territorios de ojo y telencéfalo. Sin embargo, el ratón nulo para *Six3* presenta una clara disminución del hipotálamo (Lavado et al 2008). Existen, diferentes explicaciones para estas discrepancias, no necesariamente excluyentes entre sí. Por un lado, es posible que la función del gen *Six3* de mamíferos sea llevada a cabo por su parólogo en el pez medaka: el gen *Six3.1*. En línea con esta hipótesis la inyección del MO-*Six3.1* reduce significativamente la extensión del dominio hipotalámico (datos no mostrados) y resulta en defectos en la especificación de estructuras prosencefálicas ventrales (Carl et al 2002). Otra posibilidad es que *Six3.2* sea necesario a niveles muy bajos para la especificación del dominio hipotalámico, como sugerido por sus bajos niveles de expresión en este territorio, y que el incremento de este territorio observado con la inyección del MO *Six3.2* se deba a que la disminución de sus niveles de actividad resulte en una especificación aberrante de los precursores de telencéfalo y retina hacia progenitores hipotalámicos.

Por último, *Sox2* y *Six3.2* parecen actuar de forma independiente también en la especificación del dominio pretalámico. Ambos genes son necesarios para la formación de este territorio, en línea con la reducción observada en el tamaño del pretálamo de los embriones nulos para *Six3* (Lavado et al 2008) y con la expresión de *Six3.2* en el mismo. En cambio, *Sox2* no se expresa en el pretálamo presuntivo a estadio 20, aunque durante las fases de especificación temprana de la PNA. Por tanto, los efectos de las alteraciones en los niveles de *Sox2* podrían deberse a su expresión temprana en el dominio diencefálico presuntivo, o bien, a efectos indirectos, posiblemente a través de la regulación de vías de señalización en común con *Six3.2*. A este respecto se ha descrito que la actividad de *Shh* se requiere para la correcta especificación de los territorios diencefálicos y que tanto *Sox2* como *Six3.2* son capaces de regular la expresión de *Shh in vivo* (Bergeron et al 2011; Ericson et al 1995; Favaro et al 2009; Geng et al 2008; Ishibashi & McMahon 2002; Jeong et al 2008; Scholpp et al 2006).

Finalmente, poco se sabe acerca de la implicación de los niveles de actividad de *Sox2* y *Six3.2* sobre la especificación de estructuras prosencefálicas en mamíferos. La falta de función del gen *Six3* en humano y en ratón resulta en defectos severos en la formación de las estructuras cerebrales anteriores (Lacbawan et al 2009; Lagutin et al 2003; Ribeiro et al 2006) y la haploinsuficiencia de *Sox2* resulta en anoftalmia/microftalmia y en defectos del eje hipotálamo-hipofisis (Bakrania et al 2007; Kelberman et al 2006; Williamson et al 2006), pero no existen estudios que correlacionen la ganancia de función de estos genes con alteraciones de los territorios prosencefálicos. Sin embargo, se han descrito diferentes casos de trisomías parciales en humanos que conllevan la duplicación de las regiones genómicas de *SOX2* y *SIX3*. En un porcentaje importante de casos se ha visto que la ganancia de función tanto de *SOX2* como de *SIX3* conlleva anomalías oculares, hipertelorismo y

retraso mental (Grossmann et al 2009; Megarbane et al 1997). Aunque no existen *evidencias* que correlacionen directamente *SOX2* y *SIX3* con estas anomalías, al tratarse de duplicaciones de grandes regiones cromosómicas que comprenden un número importante de genes, es posible que variaciones en los niveles de actividad de los mismos estén relacionados, al menos en parte, con estos defectos y permiten plantear que *SOX2* podría estar controlando la expresión de *SIX3* también en los territorios de telencéfalo y retina de mamíferos.

En conclusión, nuestros resultados demuestran que *Sox2* es un regulador directo de los niveles de expresión del gen *Six3.2* y que la actividad relativa de ambos genes en diferentes territorios prosencefálicos regula diferencialmente la especificación de dichas estructuras a través de la regulación transcripcional diferencial de genes diana y del control de la proliferación de los precursores neurales. Así mismo, este trabajo pone de manifiesto la segregación de funciones ocurrida entre los genes *Six3.1* y *Six3.2* en la especificación de los territorios de telencéfalo, retina e hipotálamo, y sugiere que al menos parte de la red de regulación génica propuesta podría estar conservada en mamíferos.

5.3. Evidencias de la existencia de niveles superiores de regulación en el control transcripcional de los genes Six3

Finalmente, en este trabajo, se presentan evidencias que apoyan el papel de dominios de regulación a escala cromosómica implicados en el control transcripcional del gen *Six3*. En este sentido, hemos demostrado la existencia de elementos aisladores funcionales y evolutivamente conservados situado en la región cromosómica de los genes *Six3.1* y *Six3.2*. La distribución de dichos elementos aisladores, la conservación sinténica de los genes contenidos en dichas regiones cromosómicas, y la distribución de potenciales elementos reguladores conservados en las mismas, sugieren la existencia de un marco de regulación común entre los genes *Six3* y *Ppm1b*. Además, basados en evidencias publicadas en la bibliografía, proponemos que esta coregulación transcripcional putativa podría tener un papel funcional relevante en el control de la señalización de BMP en la especificación de las estructuras prosencefálicas. No obstante, todavía nos encontramos en fases muy preliminares de esta investigación y es necesario, en primer lugar, corroborar la correlación entre los patrones de expresión de los genes *Six3* y *Ppm1b* en medaka, así como demostrar el establecimiento de los dominios reguladores propuestos *in vivo*. A este último respecto pretendemos realizar, en colaboración con el laboratorio de José Luis Gómez-Skarmeta (Centro Andaluz de Biología del Desarrollo, Sevilla) experimentos de 3C en el pez cebra que nos confirmen la existencia *in vivo* de los bucles de cromatina propuestos en base a la distribución de los elementos aisladores en la región cromosómica de los genes *Six3.1* y *Six3.2*.

CONCLUSIONES

- I. La regulación de la expresión de *Six3.2* de medaka podría implicar la actividad de por lo menos 19 genes, identificados en este estudio y validados en ensayos de transactivación transcripcional en células. Entre estos destacan los FT *Sox2*, *Tcf3*, *Pbx1* y *Msx2*.
- II. *Sox2* regula directamente los niveles de expresión de *Six3.2* en el telencéfalo, ojo e hipotálamo.
- III. Los niveles de actividad de *Sox2* y *Six3.2* contribuyen diferencialmente y de forma dosis dependiente a la especificación de los dominios de telencéfalo y retina.
- IV. *Sox2* y *Six3.2* ejercen funciones independientes en los territorios de hipotálamo, pretálamo y mesencéfalo.
- V. *Six3.2* regula directamente la expresión de *Rx3* y *Foxg1*. En cambio, *Sox2* es un regulador directo de los genes *Rx3* y *Nkx2.1*
- VI. Los genes *Six3.1* y *Six3.2* ejercen funciones diferentes en la especificación del telencéfalo y retina en pez medaka.
- VII. La actividad combinatoria de 5 elementos reguladores conservados controla la expresión de *Six3.1*
- VIII. Los FT *Sox2*, *Tcf3*, *Msx2*, *Six3.2*, *Six6* y *Prox1* regulan la actividad transcripcional del gen *Six3.1* en ensayos de luciferasa.
- IX. Los genes *Six3* y *Ppm1b*, así como entre sus respectivos parálogos, se encuentran en un contexto genómico evolutivamente conservado, asilados de genes adyacentes, lo que sugiere su posible co-regulación transcripcional.

BIBLIOGRAFIA

- Abe Y, Oka A, Mizuguchi M, Igarashi T, Ishikawa S, et al. 2009. *EYA4, deleted in a case with middle interhemispheric variant of holoprosencephaly, interacts with SIX3 both physically and functionally*. Hum Mutat
- Agathocleous M, Iordanova I, Willardsen MI, Xue XY, Vetter ML, et al. 2009. *A directional Wnt/beta-catenin-Sox2-proneural pathway regulates the transition from proliferation to differentiation in the Xenopus retina*. Development 136:3289-99
- Ahsan B, Kobayashi D, Yamada T, Kasahara M, Sasaki S, et al. 2008. *UTGB/medaka: genomic resource database for medaka biology*. Nucleic Acids Res 36:D747-52
- Al-Saffar M, Lemyre E, Koenekoop R, Duncan AM, Der Kaloustian VM. 2000. *Phenotype of a patient with pure partial trisomy 2p(p23-->pter)*. Am J Med Genet 94:428-32
- Alonso ME, Pernaute B, Crespo M, Gomez-Skarmeta JL, Manzanares M. 2009. *Understanding the regulatory genome*. Int J Dev Biol 53:1367-78
- Amouyal M. 2010a. *Gene insulation. Part I: natural strategies in yeast and Drosophila*. Biochem Cell Biol 88:875-84
- Amouyal M. 2010b. *Gene insulation. Part II: natural strategies in vertebrates*. Biochem Cell Biol 88:885-98
- Appolloni I, Calzolari F, Corte G, Perris R, Malatesta P. 2008. *Six3 controls the neural progenitor status in the murine CNS*. Cereb Cortex 18:553-62
- Ashe HL, Briscoe J. 2006. *The interpretation of morphogen gradients*. Development 133:385-94
- Avilion AA, Nicolis SK, Pevny LH, Perez L, Vivian N, Lovell-Badge R. 2003. *Multipotent cell lineages in early mouse development depend on SOX2 function*. Genes Dev 17:126-40
- Bailey TJ, El-Hodiri H, Zhang L, Shah R, Mathers PH, Jamrich M. 2004. *Regulation of vertebrate eye development by Rx genes*. Int J Dev Biol 48:761-70
- Bakrania P, Robinson DO, Bunyan DJ, Salt A, Martin A, et al. 2007. *SOX2 anophthalmia syndrome: 12 new cases demonstrating broader phenotype and high frequency of large gene deletions*. Br J Ophthalmol 91:1471-6
- Barski A, Cuddapah S, Cui K, Roh TY, Schones DE, et al. 2007. *High-resolution profiling of histone methylations in the human genome*. Cell 129:823-37
- Baumann M, Pontiller J, Ernst W. 2010. *Structure and basal transcription complex of RNA polymerase II core promoters in the mammalian genome: an overview*. Mol Biotechnol 45:241-7
- Baumer N, Marquardt T, Stoykova A, Spieler D, Treichel D, et al. 2003. *Retinal pigmented epithelium determination requires the redundant activities of Pax2 and Pax6*. Development 130:2903-15
- Bell AC, West AG, Felsenfeld G. 1999. *The protein CTCF is required for the enhancer blocking activity of vertebrate insulators*. Cell 98:387-96
- Berger MF, Badis G, Gehrke AR, Talukder S, Philippakis AA, et al. 2008. *Variation in homeodomain DNA binding revealed by high-resolution analysis of sequence preferences*. Cell 133:1266-76
- Bergeron SA, Tyurina OV, Miller E, Bagas A, Karlstrom RO. 2011. *Brother of cdo (umleitung) is cell-autonomously required for Hedgehog-mediated ventral CNS patterning in the zebrafish*. Development 138:75-85
- Boucaut JC, Darribere T, Boulekbache H, Thiery JP. 1984. *Prevention of gastrulation but not neurulation by antibodies to fibronectin in amphibian embryos*. Nature 307:364-7

- Boucher CA, Winchester CL, Hamilton GM, Winter AD, Johnson KJ, Bailey ME. 2000. *Structure, mapping and expression of the human gene encoding the homeodomain protein, SIX2.* Gene 247:145-51
- Bourque G. 2009. *Transposable elements in gene regulation and in the evolution of vertebrate genomes.* Curr Opin Genet Dev 19:607-12
- Bovolenta P, Esteve P, Ruiz JM, Cisneros E, Lopez-Rios J. 2008. *Beyond Wnt inhibition: new functions of secreted Frizzled-related proteins in development and disease.* J Cell Sci 121:737-46
- Bovolenta P, Mallamaci A, Boncinelli E. 1996. *Cloning and characterisation of two chick homeobox genes, members of the six/sine oculis family, expressed during eye development.* Int J Dev Biol Suppl 1:73S-4S
- Bovolenta P, Mallamaci A, Puelles L, Boncinelli E. 1998. *Expression pattern of cSix3, a member of the Six/sine oculis family of transcription factors.* Mech Dev 70:201-3
- Bovolenta P, Rodriguez J, Esteve P. 2006. *Frizzled/RYK mediated signalling in axon guidance.* Development 133:4399-408
- Braun MM, Etheridge A, Bernard A, Robertson CP, Roelink H. 2003. *Wnt signaling is required at distinct stages of development for the induction of the posterior forebrain.* Development 130:5579-87
- Brownell I, Dirksen M, Jamrich M. 2000. *Forkhead Foxe3 maps to the dysgenetic lens locus and is critical in lens development and differentiation.* Genesis 27:81-93
- Brzezinski JAt, Lamba DA, Reh TA. 2010. *Blimp1 controls photoreceptor versus bipolar cell fate choice during retinal development.* Development 137:619-29
- Bulfone A, Kim HJ, Puelles L, Porteus MH, Grippo JF, Rubenstein JL. 1993. *The mouse Dlx-2 (Tes-1) gene is expressed in spatially restricted domains of the forebrain, face and limbs in midgestation mouse embryos.* Mech Dev 40:129-40
- Bumsted-O'Brien KM, Hendrickson A, Haverkamp S, Ashery-Padan R, Schulte D. 2007. *Expression of the homeodomain transcription factor Meis2 in the embryonic and postnatal retina.* J Comp Neurol 505:58-72
- Camus A, Davidson BP, Billiards S, Khoo P, Rivera-Perez JA, et al. 2000. *The morphogenetic role of midline mesendoderm and ectoderm in the development of the forebrain and the midbrain of the mouse embryo.* Development 127:1799-813
- Carl M, Loosli F, Wittbrodt J. 2002. *Six3 inactivation reveals its essential role for the formation and patterning of the vertebrate eye.* Development 129:4057-63
- Cavodeassi F, Carreira-Barbosa F, Young RM, Concha ML, Allende ML, et al. 2005. *Early stages of zebrafish eye formation require the coordinated activity of Wnt11, Fz5, and the Wnt/beta-catenin pathway.* Neuron 47:43-56
- Cohen MM, Jr. 2006. *Holoprosencephaly: clinical, anatomic, and molecular dimensions.* Birth Defects Res A Clin Mol Teratol 76:658-73
- Conte I, Bovolenta P. 2007. *Comprehensive characterization of the cis-regulatory code responsible for the spatio-temporal expression of olSix3.2 in the developing medaka forebrain.* Genome Biol 8:R137
- Conte I, Carrella S, Avellino R, Karali M, Marco-Ferrerres R, et al. 2010a. *miR-204 is required for lens and retinal development via Meis2 targeting.* Proc Natl Acad Sci U S A
- Conte I, Marco-Ferrerres R, Beccari L, Cisneros E, Ruiz JM, et al. 2010b. *Proper differentiation of photoreceptors and amacrine cells depends on a regulatory loop between NeuroD and Six6.* Development 137:2307-17
- Conte I, Marco-Ferrerres R, Beccari L, Cisneros E, Ruiz JM, et al. 2010c. *Proper differentiation of photoreceptors and amacrine cells depends on a regulatory loop between NeuroD and Six6.* Development

- Conte I, Morcillo J, Bovolenta P. 2005. *Comparative analysis of Six 3 and Six 6 distribution in the developing and adult mouse brain.* Dev Dyn 234:718-25
- Couly GF, Le Douarin NM. 1987. *Mapping of the early neural primordium in quail-chick chimeras. II. The prosencephalic neural plate and neural folds: implications for the genesis of cephalic human congenital abnormalities.* Dev Biol 120:198-214
- Chabrol B, Martens K, Meulemans S, Cano A, Jaeken J, et al. 2008. *Deletion of C2orf34, PREPL and SLC3A1 causes atypical hypotonia-cystinuria syndrome.* J Med Genet 45:314-8
- Chapman SC, Schubert FR, Schoenwolf GC, Lumsden A. 2002. *Analysis of spatial and temporal gene expression patterns in blastula and gastrula stage chick embryos.* Dev Biol 245:187-99
- Chassaing N, Vigouroux A, Calvas P. 2009. *Mutations in the newly identified RAX regulatory sequence are not a frequent cause of micro/anophthalmia.* Genet Test Mol Biomarkers 13:289-90
- Chow RL, Volgyi B, Szilard RK, Ng D, McKerlie C, et al. 2004. *Control of late off-center cone bipolar cell differentiation and visual signaling by the homeobox gene Vsx1.* Proc Natl Acad Sci U S A 101:1754-9
- Chuang JC, Raymond PA. 2002. *Embryonic origin of the eyes in teleost fish.* Bioessays 24:519-29
- Dai F, Duan X, Liang YY, Lin X, Feng XH. 2010. *Coupling of dephosphorylation and nuclear export of Smads in TGF-beta signaling.* Methods Mol Biol 647:125-37
- Danno H, Michiue T, Hitachi K, Yukita A, Ishiura S, Asashima M. 2008. *Molecular links among the causative genes for ocular malformation: Otx2 and Sox2 coregulate Rax expression.* Proceedings of the National Academy of Sciences 105:5408-13
- Davis N, Yoffe C, Raviv S, Antes R, Berger J, et al. 2009. *Pax6 dosage requirements in iris and ciliary body differentiation.* Dev Biol
- Decembrini S, Andreazzoli M, Vignali R, Barsacchi G, Cremisi F. 2006. *Timing the generation of distinct retinal cells by homeobox proteins.* PLoS Biol 4:e272
- Del Bene F, Tessmar-Raible K, Wittbrodt J. 2004. *Direct interaction of geminin and Six3 in eye development.* Nature 427:745-9
- Dillon N. 2006. *Gene regulation and large-scale chromatin organization in the nucleus.* Chromosome Res 14:117-26
- Dorsky RI, Itoh M, Moon RT, Chitnis A. 2003. *Two tcf3 genes cooperate to pattern the zebrafish brain.* Development 130:1937-47
- Duan X, Liang YY, Feng XH, Lin X. 2006. *Protein serine/threonine phosphatase PPM1A dephosphorylates Smad1 in the bone morphogenetic protein signaling pathway.* J Biol Chem 281:36526-32
- Dudley AT, Lyons KM, Robertson EJ. 1995. *A requirement for bone morphogenetic protein-7 during development of the mammalian kidney and eye.* Genes Dev 9:2795-807
- Dyer MA. 2003. *Regulation of proliferation, cell fate specification and differentiation by the homeodomain proteins Prox1, Six3, and Chx10 in the developing retina.* Cell Cycle 2:350-7
- Eisen JS, Smith JC. 2008. *Controlling morpholino experiments: don't stop making antisense.* Development 135:1735-43
- Ekker SC, Ungar AR, Greenstein P, von Kessler DP, Porter JA, et al. 1995. *Patterning activities of vertebrate hedgehog proteins in the developing eye and brain.* Curr Biol 5:944-55
- England SJ, Blanchard GB, Mahadevan L, Adams RJ. 2006. *A dynamic fate map of the forebrain shows how vertebrate eyes form and explains two causes of cyclopia.* Development 133:4613-7

- Ericson J, Muhr J, Jessell TM, Edlund T. 1995. *Sonic hedgehog: a common signal for ventral patterning along the rostrocaudal axis of the neural tube.* Int J Dev Biol 39:809-16
- Esteve P, Bovolenta P. 2006. *Secreted inducers in vertebrate eye development: more functions for old morphogens.* Curr Opin Neurobiol 16:13-9
- Esteve P, Lopez-Rios J, Bovolenta P. 2004. *SFRP1 is required for the proper establishment of the eye field in the medaka fish.* Mech Dev 121:687-701
- Favaro R, Valotta M, Ferri AL, Latorre E, Mariani J, et al. 2009. *Hippocampal development and neural stem cell maintenance require Sox2-dependent regulation of Shh.* Nat Neurosci 12:1248-56
- Feldman B, Dougan ST, Schier AF, Talbot WS. 2000. *Nodal-related signals establish mesendodermal fate and trunk neural identity in zebrafish.* Curr Biol 10:531-4
- Feldman B, Stemple DL. 2001. *Morpholino phenocopies of *sqt*, *oep*, and *ntl* mutations.* Genesis 30:175-7
- Fernandez-Garre P, Rodriguez-Gallardo L, Gallego-Diaz V, Alvarez IS, Puelles L. 2002. *Fate map of the chicken neural plate at stage 4.* Development 129:2807-22
- Ferri AL, Cavallaro M, Braida D, Di Cristofano A, Canta A, et al. 2004. *Sox2 deficiency causes neurodegeneration and impaired neurogenesis in the adult mouse brain.* Development 131:3805-19
- Foley AC, Skromne I, Stern CD. 2000. *Reconciling different models of forebrain induction and patterning: a dual role for the hypoblast.* Development 127:3839-54
- Foley AC, Stern CD. 2001. *Evolution of vertebrate forebrain development: how many different mechanisms?* J Anat 199:35-52
- Fougerousse F, Durand M, Lopez S, Suel L, Demignon J, et al. 2002. *Six and Eya expression during human somitogenesis and MyoD gene family activation.* J Muscle Res Cell Motil 23:255-64
- Fredman D, Engstrom PG, Lenhard B. 2009a. *Web-based tools and approaches to study long-range gene regulation in Metazoa.* Brief Funct Genomic Proteomic 8:231-42
- Fredman L, Doros G, Ensrud KE, Hochberg MC, Cauley JA. 2009b. *Caregiving intensity and change in physical functioning over a 2-year period: results of the caregiver-study of osteoporotic fractures.* Am J Epidemiol 170:203-10
- French CR, Erickson T, Callander D, Berry KM, Koss R, et al. 2007. *Pbx homeodomain proteins pattern both the zebrafish retina and tectum.* BMC Dev Biol 7:85
- Friberg M, von Rohr P, Gonnet G. 2005. *Scoring functions for transcription factor binding site prediction.* BMC Bioinformatics 6:84
- Fuhrmann S, Riesenberger AN, Mathiesen AM, Brown EC, Vetter ML, Brown NL. 2009. *Characterization of a transient TCF/LEF-responsive progenitor population in the embryonic mouse retina.* Invest Ophthalmol Vis Sci 50:432-40
- Furlan-Magaril M, Rebollar E, Guerrero G, Fernandez A, Molto E, et al. 2011. *An insulator embedded in the chicken alpha-globin locus regulates chromatin domain configuration and differential gene expression.* Nucleic Acids Res 39:89-103
- Furuta Y, Hogan BL. 1998. *BMP4 is essential for lens induction in the mouse embryo.* Genes Dev 12:3764-75
- Garcia-Lopez R, Vieira C, Echevarria D, Martinez S. 2004. *Fate map of the diencephalon and the zona limitans at the 10-somites stage in chick embryos.* Dev Biol 268:514-30
- Gaston-Massuet C, Andoniadou CL, Signore M, Sajedi E, Bird S, et al. 2008. *Genetic interaction between the homeobox transcription factors HESX1 and SIX3 is required for normal pituitary development.* Dev Biol 324:322-33
- Gaston-Massuet C, Kelberman D, Dattani M, Martinez-Barbera JP. 2009. *Absence of SIX3 mutations in patients with congenital hypopituitarism.* Am J Med Genet A 149A:2874-6

- Geng X, Speirs C, Lagutin O, Inbal A, Liu W, et al. 2008. *Haploinsufficiency of Six3 fails to activate Sonic hedgehog expression in the ventral forebrain and causes holoprosencephaly.* Dev Cell 15:236-47
- Germana A, Montalbano G, Guerrera MC, Amato V, Laura R, et al. 2010. *Developmental changes in the expression of sox2 in the zebrafish brain.* Microsc Res Tech
- Gestri G, Carl M, Appolloni I, Wilson SW, Barsacchi G, Andreazzoli M. 2005. *Six3 functions in anterior neural plate specification by promoting cell proliferation and inhibiting Bmp4 expression.* Development 132:2401-13
- Ghanbari H, Seo HC, Fjose A, Brandli AW. 2001. *Molecular cloning and embryonic expression of Xenopus Six homeobox genes.* Mech Dev 101:271-7
- Gontan C, de Munck A, Vermeij M, Grosveld F, Tibboel D, Rottier R. 2008. *Sox2 is important for two crucial processes in lung development: branching morphogenesis and epithelial cell differentiation.* Dev Biol 317:296-309
- Grabher C, Wittbrodt J. 2007. *Meganuclease and transposon mediated transgenesis in medaka.* Genome Biol 8 Suppl 1:S10
- Granadino B, Gallardo ME, Lopez-Rios J, Sanz R, Ramos C, et al. 1999. *Genomic cloning, structure, expression pattern, and chromosomal location of the human SIX3 gene.* Genomics 55:100-5
- Graw J. 2010. *Eye development.* Curr Top Dev Biol 90:343-86
- Greene ND, Copp AJ. 2009. *Development of the vertebrate central nervous system: formation of the neural tube.* Prenat Diagn 29:303-11
- Grinblat Y, Gamse J, Patel M, Sive H. 1998. *Determination of the zebrafish forebrain: induction and patterning.* Development 125:4403-16
- Gritsman K, Zhang J, Cheng S, Heckscher E, Talbot WS, Schier AF. 1999. *The EGF-CFC protein one-eyed pinhead is essential for nodal signaling.* Cell 97:121-32
- Grossmann V, Muller D, Muller W, Fresser F, Erdel M, et al. 2009. *"Essentially" pure trisomy 3q27 --> qter: further delineation of the partial trisomy 3q phenotype.* Am J Med Genet A 149A:2522-6
- Hagstrom SA, Pauer GJ, Reid J, Simpson E, Crowe S, et al. 2005. *SOX2 mutation causes anophthalmia, hearing loss, and brain anomalies.* Am J Med Genet A 138A:95-8
- Heintzman ND, Hon GC, Hawkins RD, Kheradpour P, Stark A, et al. 2009. *Histone modifications at human enhancers reflect global cell-type-specific gene expression.* Nature 459:108-12
- Homer N, Merriman B, Nelson SF. 2009. *Local alignment of two-base encoded DNA sequence.* BMC Bioinformatics 10:175
- Hoppler S, Kavanagh CL. 2007. *Wnt signalling: variety at the core.* J Cell Sci 120:385-93
- Hou C, Zhao H, Tanimoto K, Dean A. 2008. *CTCF-dependent enhancer-blocking by alternative chromatin loop formation.* Proc Natl Acad Sci U S A 105:20398-403
- Houart C, Caneparo L, Heisenberg C, Barth K, Take-Uchi M, Wilson S. 2002. *Establishment of the telencephalon during gastrulation by local antagonism of Wnt signaling.* Neuron 35:255-65
- Huang P, Zhang YJ, Huang Y, Zhao JJ, Jiang T, Zhang N. 2010. *[Effect of PKC signalling pathway and aldose reductase on expression of fibronectin induced by transforming growth factor-beta1 in human mesangial cells].* Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi 39:405-9
- Inbal A, Kim SH, Shin J, Solnica-Krezel L. 2007. *Six3 represses nodal activity to establish early brain asymmetry in zebrafish.* Neuron 55:407-15
- Inoue M, Kamachi Y, Matsunami H, Imada K, Uchikawa M, Kondoh H. 2007. *PAX6 and SOX2-dependent regulation of the Sox2 enhancer N-3 involved in embryonic visual system development.* Genes Cells 12:1049-61

- Inoue T, Hojo M, Bessho Y, Tano Y, Lee JE, Kageyama R. 2002. *Math3 and NeuroD regulate amacrine cell fate specification in the retina.* Development 129:831-42
- Inoue T, Nakamura S, Osumi N. 2000. *Fate mapping of the mouse prosencephalic neural plate.* Dev Biol 219:373-83
- Ishibashi M, McMahon AP. 2002. *A sonic hedgehog-dependent signaling relay regulates growth of diencephalic and mesencephalic primordia in the early mouse embryo.* Development 129:4807-19
- Ishibashi M, Saitsu H, Komada M, Shiota K. 2005. *Signaling cascade coordinating growth of dorsal and ventral tissues of the vertebrate brain, with special reference to the involvement of Sonic Hedgehog signaling.* Anat Sci Int 80:30-6
- Ishimura A, Maeda R, Takeda M, Kikkawa M, Daar IO, Maeno M. 2000. *Involvement of BMP-4/msx-1 and FGF pathways in neural induction in the Xenopus embryo.* Dev Growth Differ 42:307-16
- Iwamatsu T. 2004. *Stages of normal development in the medaka *Oryzias latipes*.* Mech Dev 121:605-18
- Jaeken J, Martens K, Francois I, Eyskens F, Lecointre C, et al. 2006. *Deletion of PREPL, a gene encoding a putative serine oligopeptidase, in patients with hypotonia-cystinuria syndrome.* Am J Hum Genet 78:38-51
- Jean D, Bernier G, Gruss P. 1999. *Six6 (Optx2) is a novel murine Six3-related homeobox gene that demarcates the presumptive pituitary/hypothalamic axis and the ventral optic stalk.* Mech Dev 84:31-40
- Jeong Y, Leskow FC, El-Jaick K, Roessler E, Muenke M, et al. 2008. *Regulation of a remote Shh forebrain enhancer by the Six3 homeoprotein.* Nat Genet 40:1348-53
- Juven-Gershon T, Kadonaga JT. 2010. *Regulation of gene expression via the core promoter and the basal transcriptional machinery.* Dev Biol 339:225-9
- Kage T, Takeda H, Yasuda T, Maruyama K, Yamamoto N, et al. 2004. *Morphogenesis and regionalization of the medaka embryonic brain.* J Comp Neurol 476:219-39
- Kamachi Y, Uchikawa M, Tanouchi A, Sekido R, Kondoh H. 2001. *Pax6 and SOX2 form a co-DNA-binding partner complex that regulates initiation of lens development.* Genes Dev 15:1272-86
- Kawakami K. 2007. *Tol2: a versatile gene transfer vector in vertebrates.* Genome Biol 8 Suppl 1:S7
- Kawakami K, Ohto H, Takizawa T, Saito T. 1996. *Identification and expression of six family genes in mouse retina.* FEBS Lett 393:259-63
- Kawakami K, Sato S, Ozaki H, Ikeda K. 2000. *Six family genes--structure and function as transcription factors and their roles in development.* Bioessays 22:616-26
- Kelberman D, de Castro SC, Huang S, Crolla JA, Palmer R, et al. 2008. *SOX2 Plays a Critical Role in the Pituitary, Forebrain, and Eye during Human Embryonic Development.* J Clin Endocrinol Metab 93:1865-73
- Kelberman D, Rizzoti K, Avilion A, Bitner-Glindzicz M, Cianfarani S, et al. 2006. *Mutations within Sox2/SOX2 are associated with abnormalities in the hypothalamo-pituitary-gonadal axis in mice and humans.* J Clin Invest 116:2442-55
- Keller R, Shih J, Sater A. 1992. *The cellular basis of the convergence and extension of the Xenopus neural plate.* Dev Dyn 193:199-217
- Kim CH, Oda T, Itoh M, Jiang D, Artinger KB, et al. 2000. *Repressor activity of Headless/Tcf3 is essential for vertebrate head formation.* Nature 407:913-6
- Kim HS, Shin J, Kim SH, Chun HS, Kim JD, et al. 2007. *Eye field requires the function of Sfrp1 as a Wnt antagonist.* Neurosci Lett 414:26-9
- Kim SH, Shin J, Park HC, Yeo SY, Hong SK, et al. 2002. *Specification of an anterior neuroectoderm patterning by Frizzled8a-mediated Wnt8b signalling during late gastrulation in zebrafish.* Development 129:4443-55

- Kobayashi D, Kobayashi M, Matsumoto K, Ogura T, Nakafuku M, Shimamura K. 2002. *Early subdivisions in the neural plate define distinct competence for inductive signals.* Development 129:83-93
- Kobayashi M, Nishikawa K, Suzuki T, Yamamoto M. 2001. *The homeobox protein Six3 interacts with the Groucho corepressor and acts as a transcriptional repressor in eye and forebrain formation.* Dev Biol 232:315-26
- Kobayashi M, Toyama R, Takeda H, Dawid IB, Kawakami K. 1998. *Overexpression of the forebrain-specific homeobox gene six3 induces rostral forebrain enlargement in zebrafish.* Development 125:2973-82
- Kodjabachian L, Dawid IB, Toyama R. 1999. *Gastrulation in zebrafish: what mutants teach us.* Dev Biol 213:231-45
- Kokabu S, Nojima J, Kanomata K, Ohte S, Yoda T, et al. 2010. *Protein phosphatase magnesium-dependent 1A-mediated inhibition of BMP signaling is independent of Smad dephosphorylation.* J Bone Miner Res 25:653-60
- Korzh V. 2007. *Transposons as tools for enhancer trap screens in vertebrates.* Genome Biol 8 Suppl 1:S8
- Kumar JP. 2009. *The sine oculis homeobox (SIX) family of transcription factors as regulators of development and disease.* Cell Mol Life Sci 66:565-83
- Lacbawan F, Solomon BD, Roessler E, El-Jaick K, Domene S, et al. 2009. *Clinical spectrum of SIX3-associated mutations in holoprosencephaly: correlation between genotype, phenotype and function.* J Med Genet 46:389-98
- Laflamme C, Filion C, Bridge JA, Ladanyi M, Goldring MB, Labelle Y. 2003. *The homeotic protein Six3 is a coactivator of the nuclear receptor NOR-1 and a corepressor of the fusion protein EWS/NOR-1 in human extraskelatal myxoid chondrosarcomas.* Cancer Res 63:449-54
- Lagutin O, Zhu CC, Furuta Y, Rowitch DH, McMahon AP, Oliver G. 2001. *Six3 promotes the formation of ectopic optic vesicle-like structures in mouse embryos.* Dev Dyn 221:342-9
- Lagutin OV, Zhu CC, Kobayashi D, Topczewski J, Shimamura K, et al. 2003. *Six3 repression of Wnt signaling in the anterior neuroectoderm is essential for vertebrate forebrain development.* Genes Dev 17:368-79
- Lako M, Lindsay S, Bullen P, Wilson DI, Robson SC, Strachan T. 1998. *A novel mammalian wnt gene, WNT8B, shows brain-restricted expression in early development, with sharply delimited expression boundaries in the developing forebrain.* Hum Mol Genet 7:813-22
- Lallier TE, DeSimone DW. 2000. *Separation of neural induction and neurulation in Xenopus.* Dev Biol 225:135-50
- Lavado A, Lagutin OV, Oliver G. 2008. *Six3 inactivation causes progressive caudalization and aberrant patterning of the mammalian diencephalon.* Development 135:441-50
- Lengler J, Graw J. 2001. *Regulation of the human SIX3 gene promoter.* Biochem Biophys Res Commun 287:372-6
- Leppert GS, Yang JM, Sundin OH. 1999. *Sequence and location of SIX3, a homeobox gene expressed in the human eye.* Ophthalmic Genet 20:7-21
- Lin X, Duan X, Liang YY, Su Y, Wrighton KH, et al. 2006. *PPM1A functions as a Smad phosphatase to terminate TGFbeta signaling.* Cell 125:915-28
- Liu W, Lagutin O, Swindell E, Jamrich M, Oliver G. 2010. *Neuroretina specification in mouse embryos requires Six3-mediated suppression of Wnt8b in the anterior neural plate.* J Clin Invest 120:3568-77
- Liu W, Lagutin OV, Mende M, Streit A, Oliver G. 2006. *Six3 activation of Pax6 expression is essential for mammalian lens induction and specification.* Embo J 25:5383-95

- Liu Y, Shen Y, Rest JS, Raymond PA, Zack DJ. 2001. *Isolation and characterization of a zebrafish homologue of the cone rod homeobox gene.* Invest Ophthalmol Vis Sci 42:481-7
- Loosli F, Koster RW, Carl M, Krone A, Wittbrodt J. 1998. *Six3, a medaka homologue of the Drosophila homeobox gene sine oculis is expressed in the anterior embryonic shield and the developing eye.* Mech Dev 74:159-64
- Loosli F, Winkler S, Wittbrodt J. 1999. *Six3 overexpression initiates the formation of ectopic retina.* Genes Dev 13:649-54
- Lopez-Rios J, Esteve P, Ruiz JM, Bovolenta P. 2008. *The Netrin-related domain of Sfrp1 interacts with Wnt ligands and antagonizes their activity in the anterior neural plate.* Neural Dev 3:19
- Lopez-Rios J, Gallardo ME, Rodriguez de Cordoba S, Bovolenta P. 1999. *Six9 (Optx2), a new member of the six gene family of transcription factors, is expressed at early stages of vertebrate ocular and pituitary development.* Mech Dev 83:155-9
- Lopez-Rios J, Tessmar K, Loosli F, Wittbrodt J, Bovolenta P. 2003. *Six3 and Six6 activity is modulated by members of the groucho family.* Development 130:185-95
- Maden M. 2007. *Retinoic acid in the development, regeneration and maintenance of the nervous system.* Nat Rev Neurosci 8:755-65
- Maeda RK, Karch F. 2011. *Gene expression in time and space: additive vs hierarchical organization of cis-regulatory regions.* Curr Opin Genet Dev
- Manavathi B, Peng S, Rayala SK, Talukder AH, Wang MH, et al. 2007. *Repression of Six3 by a corepressor regulates rhodopsin expression.* Proc Natl Acad Sci U S A 104:13128-33
- Manning G, Scheeff E. 2010. *How the vertebrates were made: selective pruning of a double-duplicated genome.* BMC Biol 8:144
- Marin O, Baker J, Puelles L, Rubenstein JL. 2002. *Patterning of the basal telencephalon and hypothalamus is essential for guidance of cortical projections.* Development 129:761-73
- Marti E, Bovolenta P. 2002. *Sonic hedgehog in CNS development: one signal, multiple outputs.* Trends Neurosci 25:89-96
- Martinez-Morales JR, Dolez V, Rodrigo I, Zaccarini R, Leconte L, et al. 2003. *OTX2 activates the molecular network underlying retina pigment epithelium differentiation.* J Biol Chem 278:21721-31
- Martinez S. 2001. *The isthmus organizer and brain regionalization.* Int J Dev Biol 45:367-71
- Martynoga B, Morrison H, Price DJ, Mason JO. 2005. *Foxg1 is required for specification of ventral telencephalon and region-specific regulation of dorsal telencephalic precursor proliferation and apoptosis.* Dev Biol 283:113-27
- Masui S, Nakatake Y, Toyooka Y, Shimosato D, Yagi R, et al. 2007. *Pluripotency governed by Sox2 via regulation of Oct3/4 expression in mouse embryonic stem cells.* Nat Cell Biol 9:625-35
- McCollum CW, Amin SR, Pauerstein P, Lane ME. 2007. *A zebrafish LMO4 ortholog limits the size of the forebrain and eyes through negative regulation of six3b and rx3.* Dev Biol 309:373-85
- Megarbane A, Souraty N, Prieur M, Theophile D, Chedid P, et al. 1997. *Interstitial duplication of the short arm of chromosome 2: report of a new case and review.* J Med Genet 34:783-6
- Millet S, Campbell K, Epstein DJ, Losos K, Harris E, Joyner AL. 1999. *A role for Gbx2 in repression of Otx2 and positioning the mid/hindbrain organizer.* Nature 401:161-4
- Miyagi S, Kato H, Okuda A. 2009. *Role of SoxB1 transcription factors in development.* Cell Mol Life Sci 66:3675-84

- Miyazawa K, Shinozaki M, Hara T, Furuya T, Miyazono K. 2002. *Two major Smad pathways in TGF-beta superfamily signalling.* Genes Cells 7:1191-204
- Miyazono K, Kusanagi K, Inoue H. 2001. *Divergence and convergence of TGF-beta/BMP signaling.* J Cell Physiol 187:265-76
- Moens CB, Selleri L. 2006. *Hox cofactors in vertebrate development.* Dev Biol 291:193-206
- Navratilova P, Fredman D, Hawkins TA, Turner K, Lenhard B, Becker TS. 2009. *Systematic human/zebrafish comparative identification of cis-regulatory activity around vertebrate developmental transcription factor genes.* Dev Biol 327:526-40
- Nelson CE, Hersh BM, Carroll SB. 2004. *The regulatory content of intergenic DNA shapes genome architecture.* Genome Biol 5:R25
- Ohlsson R, Bartkuhn M, Renkawitz R. 2010. *CTCF shapes chromatin by multiple mechanisms: the impact of 20 years of CTCF research on understanding the workings of chromatin.* Chromosoma 119:351-60
- Ohto H, Takizawa T, Saito T, Kobayashi M, Ikeda K, Kawakami K. 1998. *Tissue and developmental distribution of Six family gene products.* Int J Dev Biol 42:141-8
- Okuda Y, Ogura E, Kondoh H, Kamachi Y. 2010. *B1 SOX coordinate cell specification with patterning and morphogenesis in the early zebrafish embryo.* PLoS Genet 6:e1000936
- Okuda Y, Yoda H, Uchikawa M, Furutani-Seiki M, Takeda H, et al. 2006. *Comparative genomic and expression analysis of group B1 sox genes in zebrafish indicates their diversification during vertebrate evolution.* Dev Dyn 235:811-25
- Oliver G, Mailhos A, Wehr R, Copeland NG, Jenkins NA, Gruss P. 1995. *Six3, a murine homologue of the sine oculis gene, demarcates the most anterior border of the developing neural plate and is expressed during eye development.* Development 121:4045-55
- Paek H, Gutin G, Hebert JM. 2009. *FGF signaling is strictly required to maintain early telencephalic precursor cell survival.* Development 136:2457-65
- Papanayotou C, Mey A, Birot AM, Saka Y, Boast S, et al. 2008. *A mechanism regulating the onset of Sox2 expression in the embryonic neural plate.* PLoS Biol 6:e2
- Parvari R, Gonen Y, Alshafee I, Buriakovsky S, Regev K, Hershkovitz E. 2005. *The 2p21 deletion syndrome: characterization of the transcription content.* Genomics 86:195-211
- Pasquier L, Dubourg C, Gonzales M, Lazaro L, David V, et al. 2005. *First occurrence of aprosencephaly/atelencephaly and holoprosencephaly in a family with a SIX3 gene mutation and phenotype/genotype correlation in our series of SIX3 mutations.* J Med Genet 42:e4
- Passini MA, Levine EM, Canger AK, Raymond PA, Schechter N. 1997. *Vsx-1 and Vsx-2: differential expression of two paired-like homeobox genes during zebrafish and goldfish retinogenesis.* J Comp Neurol 388:495-505
- Patthey C, Edlund T, Gunhaga L. 2009. *Wnt-regulated temporal control of BMP exposure directs the choice between neural plate border and epidermal fate.* Development 136:73-83
- Pineda D, Salo E. 2002. *Planarian Gtsix3, a member of the Six/so gene family, is expressed in brain branches but not in eye cells.* Mech Dev 119 Suppl 1:S167-71
- Pombero A, Martinez S. 2009. *Telencephalic morphogenesis during the process of neurulation: an experimental study using quail-chick chimeras.* J Comp Neurol 512:784-97
- Puelles L, Kuwana E, Puelles E, Rubenstein JL. 1999. *Comparison of the mammalian and avian telencephalon from the perspective of gene expression data.* Eur J Morphol 37:139-50

- Puelles L, Rubenstein JL. 2003. *Forebrain gene expression domains and the evolving prosomeric model*. Trends Neurosci 26:469-76
- Que J, Luo X, Schwartz RJ, Hogan BL. 2009. *Multiple roles for Sox2 in the developing and adult mouse trachea*. Development 136:1899-907
- Que J, Okubo T, Goldenring JR, Nam KT, Kurotani R, et al. 2007. *Multiple dose-dependent roles for Sox2 in the patterning and differentiation of anterior foregut endoderm*. Development 134:2521-31
- Rembold M, Loosli F, Adams RJ, Wittbrodt J. 2006. *Individual cell migration serves as the driving force for optic vesicle evagination*. Science 313:1130-4
- Rhinn M, Picker A, Brand M. 2006. *Global and local mechanisms of forebrain and midbrain patterning*. Curr Opin Neurobiol 16:5-12
- Ribeiro LA, El-Jaick KB, Muenke M, Richieri-Costa A. 2006. *SIX3 mutations with holoprosencephaly*. Am J Med Genet A 140:2577-83
- Riethoven JJ. 2010. *Regulatory regions in DNA: promoters, enhancers, silencers, and insulators*. Methods Mol Biol 674:33-42
- Robu ME, Larson JD, Nasevicius A, Beiraghi S, Brenner C, et al. 2007. *p53 activation by knockdown technologies*. PLoS Genet 3:e78
- Rodriguez-Seguel E, Alarcon P, Gomez-Skarmeta JL. 2009. *The Xenopus Irx genes are essential for neural patterning and define the border between prethalamus and thalamus through mutual antagonism with the anterior repressors Fezf and Arx*. Dev Biol 329:258-68
- Rogers CD, Harafuji N, Archer T, Cunningham DD, Casey ES. 2009. *Xenopus Sox3 activates sox2 and geminin and indirectly represses Xvent2 expression to induce neural progenitor formation at the expense of non-neural ectodermal derivatives*. Mech Dev 126:42-55
- Rubenstein JL, Martinez S, Shimamura K, Puelles L. 1994. *The embryonic vertebrate forebrain: the prosomeric model*. Science 266:578-80
- Rubenstein JL, Puelles L. 1994. *Homeobox gene expression during development of the vertebrate brain*. Curr Top Dev Biol 29:1-63
- Rubenstein JL, Shimamura K, Martinez S, Puelles L. 1998. *Regionalization of the prosencephalic neural plate*. Annu Rev Neurosci 21:445-77
- Ruiz JM, Rodriguez J, Bovolenta P. 2009. *Growth and differentiation of the retina and the optic tectum in the medaka fish requires *olsfrp5**. Dev Neurobiol 69:617-32
- Russek-Blum N, Nabel-Rosen H, Levkowitz G. 2009. *High resolution fate map of the zebrafish diencephalon*. Dev Dyn 238:1827-35
- Sagerstrom CG. 2004. *PbX marks the spot*. Dev Cell 6:737-8
- Sanchez-Arrones L, Ferran JL, Rodriguez-Gallardo L, Puelles L. 2009. *Incipient forebrain boundaries traced by differential gene expression and fate mapping in the chick neural plate*. Dev Biol 335:43-65
- Sanchez-Camacho C, Rodriguez J, Ruiz JM, Trousse F, Bovolenta P. 2005. *Morphogens as growth cone signalling molecules*. Brain Res Brain Res Rev 49:242-52
- Sanchez-Sanchez AV, Camp E, Leal-Tassias A, Mullor JL. 2010. *Wnt signaling has different temporal roles during retinal development*. Dev Dyn 239:297-310
- Sanford LP, Ormsby I, Gittenberger-de Groot AC, Sariola H, Friedman R, et al. 1997. *TGFbeta2 knockout mice have multiple developmental defects that are non-overlapping with other TGFbeta knockout phenotypes*. Development 124:2659-70
- Sbrogna JL, Barresi MJ, Karlstrom RO. 2003. *Multiple roles for Hedgehog signaling in zebrafish pituitary development*. Dev Biol 254:19-35
- Schedl A, Ross A, Lee M, Engelkamp D, Rashbass P, et al. 1996. *Influence of PAX6 gene dosage on development: overexpression causes severe eye abnormalities*. Cell 86:71-82

- Schilling SH, Datto MB, Wang XF. 2006. *A phosphatase controls the fate of receptor-regulated Smads.* Cell 125:838-40
- Schoenwolf GC. 1991. *Cell movements driving neurulation in avian embryos.* Development Suppl 2:157-68
- Scholpp S, Wolf O, Brand M, Lumsden A. 2006. *Hedgehog signalling from the zona limitans intrathalamica orchestrates patterning of the zebrafish diencephalon.* Development 133:855-64
- Seo HC, Curtiss J, Mlodzik M, Fjose A. 1999. *Six class homeobox genes in drosophila belong to three distinct families and are involved in head development.* Mech Dev 83:127-39
- Seo HC, Drivenes, Ellingsen S, Fjose A. 1998a. *Expression of two zebrafish homologues of the murine Six3 gene demarcates the initial eye primordia.* Mech Dev 73:45-57
- Seo HC, Drivenes O, Ellingsen S, Fjose A. 1998b. *Transient expression of a novel Six3-related zebrafish gene during gastrulation and eye formation.* Gene 216:39-46
- Shimamura K, Hartigan DJ, Martinez S, Puellas L, Rubenstein JL. 1995. *Longitudinal organization of the anterior neural plate and neural tube.* Development 121:3923-33
- Sikorska M, Sandhu JK, Deb-Rinker P, Jezierski A, Leblanc J, et al. 2008. *Epigenetic modifications of SOX2 enhancers, SRR1 and SRR2, correlate with in vitro neural differentiation.* J Neurosci Res 86:1680-93
- Slack JM, Tannahill D. 1992. *Mechanism of anteroposterior axis specification in vertebrates. Lessons from the amphibians.* Development 114:285-302
- Smith AN, Miller LA, Radice G, Ashery-Padan R, Lang RA. 2009. *Stage-dependent modes of Pax6-Sox2 epistasis regulate lens development and eye morphogenesis.* Development 136:2977-85
- Souren M, Martinez-Morales JR, Makri P, Wittbrodt B, Wittbrodt J. 2009. *A global survey identifies novel upstream components of the Ath5 neurogenic network.* Genome Biol 10:R92
- Spemann H, Mangold H. 1924. *über Induktion von Embryonalanlagen durch Implantation artfremder Organisatoren.* Development Genes and Evolution 100:599-638
- Staudt N, Houart C. 2007. *The prethalamus is established during gastrulation and influences diencephalic regionalization.* PLoS Biol 5:e69
- Stern CD. 2002. *Induction and initial patterning of the nervous system - the chick embryo enters the scene.* Curr Opin Genet Dev 12:447-51
- Stigloher C, Ninkovic J, Laplante M, Geling A, Tannhauser B, et al. 2006. *Segregation of telencephalic and eye-field identities inside the zebrafish forebrain territory is controlled by Rx3.* Development 133:2925-35
- Storm EE, Garel S, Borello U, Hebert JM, Martinez S, et al. 2006. *Dose-dependent functions of Fgf8 in regulating telencephalic patterning centers.* Development 133:1831-44
- Stoykova A, Fritsch R, Walther C, Gruss P. 1996. *Forebrain patterning defects in Small eye mutant mice.* Development 122:3453-65
- Suh CS, Ellingsen S, Austbo L, Zhao XF, Seo HC, Fjose A. 2010. *Autoregulatory binding sites in the zebrafish six3a promoter region define a new recognition sequence for Six3 proteins.* FEBS J 277:1761-75
- Sun W, Yu Y, Dotti G, Shen T, Tan X, et al. 2009. *PPM1A and PPM1B act as IKKbeta phosphatases to terminate TNFalpha-induced IKKbeta-NF-kappaB activation.* Cell Signal 21:95-102
- Sylvester JB, Rich CA, Loh YH, van Staaden MJ, Fraser GJ, Streelman JT. 2010. *Brain diversity evolves via differences in patterning.* Proc Natl Acad Sci U S A 107:9718-23
- Takahashi K, Yamanaka S. 2006. *Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors.* Cell 126:663-76

- Takeda H, Shimada A. 2010. *The art of medaka genetics and genomics: what makes them so unique?* Annu Rev Genet 44:217-41
- Tessmar K, Loosli F, Wittbrodt J. 2002. *A screen for co-factors of Six3.* Mech Dev 117:103-13
- Thermes V, Grabher C, Ristoratore F, Bourrat F, Choulika A, et al. 2002. *I-SceI meganuclease mediates highly efficient transgenesis in fish.* Mech Dev 118:91-8
- Tian E, Kimura C, Takeda N, Aizawa S, Matsuo I. 2002. *Otx2 is required to respond to signals from anterior neural ridge for forebrain specification.* Dev Biol 242:204-23
- Turner N, Grose R. 2010. *Fibroblast growth factor signalling: from development to cancer.* Nat Rev Cancer 10:116-29
- Valadez-Graham V, Razin SV, Recillas-Targa F. 2004. *CTCF-dependent enhancer blockers at the upstream region of the chicken alpha-globin gene domain.* Nucleic Acids Res 32:1354-62
- Varga ZM, Wegner J, Westerfield M. 1999. *Anterior movement of ventral diencephalic precursors separates the primordial eye field in the neural plate and requires cyclops.* Development 126:5533-46
- Vassetzky Y, Gavrilov A, Eivazova E, Priozhkova I, Lipinski M, Razin S. 2009. *Chromosome conformation capture (from 3C to 5C) and its ChIP-based modification.* Methods Mol Biol 567:171-88
- Vieira C, Martinez S. 2006. *Sonic hedgehog from the basal plate and the zona limitans intrathalamica exhibits differential activity on diencephalic molecular regionalization and nuclear structure.* Neuroscience 143:129-40
- Vriz S, Lovell-Badge R. 1995. *The zebrafish Zf-Sox 19 protein: a novel member of the Sox family which reveals highly conserved motifs outside of the DNA-binding domain.* Gene 153:275-6
- Wallis DE, Roessler E, Hehr U, Nanni L, Wiltshire T, et al. 1999. *Mutations in the homeodomain of the human SIX3 gene cause holoprosencephaly.* Nat Genet 22:196-8
- Wargelius A, Seo HC, Austbo L, Fjose A. 2003. *Retinal expression of zebrafish six3.1 and its regulation by Pax6.* Biochem Biophys Res Commun 309:475-81
- Weasner BP, Kumar JP. 2009. *The non-conserved C-terminal segments of Sine Oculis Homeobox (SIX) proteins confer functional specificity.* Genesis
- Wei Z, Yaguchi J, Yaguchi S, Angerer RC, Angerer LM. 2009. *The sea urchin animal pole domain is a Six3-dependent neurogenic patterning center.* Development 136:1179-89
- Wells J, Boyd KE, Fry CJ, Bartley SM, Farnham PJ. 2000. *Target gene specificity of E2F and pocket protein family members in living cells.* Mol Cell Biol 20:5797-807
- Wen J, Hu Q, Li M, Wang S, Zhang L, et al. 2008. *Pax6 directly modulate Sox2 expression in the neural progenitor cells.* Neuroreport 19:413-7
- Wilson SW, Houart C. 2004. *Early steps in the development of the forebrain.* Dev Cell 6:167-81
- Williams A, Spilianakis CG, Flavell RA. 2010. *Interchromosomal association and gene regulation in trans.* Trends Genet 26:188-97
- Williamson KA, Hever AM, Rainger J, Rogers RC, Magee A, et al. 2006. *Mutations in SOX2 cause anophthalmia-esophageal-genital (AEG) syndrome.* Hum Mol Genet 15:1413-22
- Wills AE, Choi VM, Bennett MJ, Khokha MK, Harland RM. 2010. *BMP antagonists and FGF signaling contribute to different domains of the neural plate in Xenopus.* Dev Biol 337:335-50
- Wolpert L. 1996. *One hundred years of positional information.* Trends Genet 12:359-64

- Wrighton KH, Willis D, Long J, Liu F, Lin X, Feng XH. 2006. *Small C-terminal domain phosphatases dephosphorylate the regulatory linker regions of Smad2 and Smad3 to enhance transforming growth factor-beta signaling.* J Biol Chem 281:38365-75
- Wullimann MF, Puelles L. 1999. *Postembryonic neural proliferation in the zebrafish forebrain and its relationship to prosomeric domains.* Anat Embryol (Berl) 199:329-48
- Wullimann MF, Puelles L, Wicht H. 1999. *Early postembryonic neural development in the zebrafish: a 3-D reconstruction of forebrain proliferation zones shows their relation to prosomeres.* Eur J Morphol 37:117-21
- Yaguchi S, Yaguchi J, Burke RD. 2006. *Specification of ectoderm restricts the size of the animal plate and patterns neurogenesis in sea urchin embryos.* Development 133:2337-46
- Yoshida M, Suda Y, Matsuo I, Miyamoto N, Takeda N, et al. 1997. *Emx1 and Emx2 functions in development of dorsal telencephalon.* Development 124:101-11
- Zeltser LM. 2005. *Shh-dependent formation of the ZLI is opposed by signals from the dorsal diencephalon.* Development 132:2023-33
- Zhang X, Friedman A, Heaney S, Purcell P, Maas RL. 2002. *Meis homeoproteins directly regulate Pax6 during vertebrate lens morphogenesis.* Genes Dev 16:2097-107
- Zhou X, Hollemann T, Pieler T, Gruss P. 2000. *Cloning and expression of xSix3, the Xenopus homologue of murine Six3.* Mech Dev 91:327-30
- Zhu CC, Dyer MA, Uchikawa M, Kondoh H, Lagutin OV, Oliver G. 2002. *Six3-mediated auto repression and eye development requires its interaction with members of the Groucho-related family of co-repressors.* Development 129:2835-49