



UNIVERSIDAD DE SEVILLA

TRABAJO FIN DE GRADO

Generación de una línea mutante CRISPR-Cas9 para el gen *rx3* y estudio del papel de *Wnt2* y *Wnt8b* durante el desarrollo del ojo en zebrafish

GRADO EN BIOQUÍMICA
7/2023

Autor Daniel Segura Nebot

Tutoras María Almuedo Castillo,
María Olmedo López

A María, Ana y el lab. 241, por la oportunidad, el tiempo y la paciencia.

-

A mis amigos por la escucha y el cariño.

A CD122 por el aire fresco.

-

A mi madre, a mi padre, a mi hermana, y a la familia que formamos,

en la que nos apoyamos y nos permite amortiguar los golpes,

siguiendo hacia delante de la mano.

-

Gracias a todos.

Índice

Resumen.....	4
Introducción	5
Objetivos.....	8
Resultados	9
1. Generación de una línea mutante para el gen <i>rx3</i> de zebrafish empleando tecnologías CRISPR-Cas9	9
2. Sobreexpresión de Wnt2 y Wnt8b para su estudio funcional	10
a. Preparación de los vectores de expresión para los genes <i>wnt2</i> y <i>wnt8b</i>	10
b. Inyección del mRNA de los genes <i>wnt2</i> y <i>wnt8b</i>	11
3. Creación de constructo Wnt8b-GFP	14
Discusión	18
Materiales y Métodos	21
1. Generación de una línea mutante para el gen <i>rx3</i> de zebrafish empleando tecnologías CRISPR-Cas9	21
2. Sobreexpresión de Wnt2 y Wnt8b.....	21
3. Creación de constructo Wnt8b-GFP	27
Bibliografía.....	31

Resumen

El scaling en la morfogénesis se refiere al proceso por el cual los tejidos y órganos mantienen proporciones y patrones invariantes a medida que crecen en tamaño. El ojo es una estructura muy conservada entre los vertebrados y estudiar su mecanismo de scaling tiene el potencial de generar un impacto significativo en varias disciplinas, abarcando desde una mejor comprensión de sistemas biológicos hasta la medicina regenerativa. Este trabajo cumple con el inicio de una investigación a mayor escala para estudiar y generar un modelo de scaling del ojo en zebrafish. Estudiamos el papel de los morfógenos Wnt2 y Wnt8b, los cuales se sospecha que cumplen una función en el scaling. Nos centramos además en la creación de la F0 de una línea mutante para el gen *rx3* de zebrafish incapaz de desarrollar ojos con el fin de utilizarla en un escenario experimental. Los mutantes *rx3* homocigotos mueren a las 2 semanas de vida no siendo viables para la generación de línea de interés. Se plantea, por tanto, la elección de los individuos heterocigotos portadores de la mutación para la creación de la línea. En el estudio de los morfógenos, nuestros resultados demostraron la implicación de Wnt8b y Wnt2 en la formación del ojo confirmando el papel del último en la diferenciación de la población celular de RPE. Además, con el fin de caracterizar con mayor exactitud propiedades biofísicas de Wnt2 y Wnt8b planteamos la generación de constructos de ADN codificantes para proteínas fusión Wnt-GFP. La creación del constructo Wnt8b-GFP resultó exitosa; sin embargo, su expresión no se da de forma adecuada probablemente debido a fallos en el plegamiento ante lo cual proponemos el uso de un linker distinto para la unión de los dominios Wnt y GFP.

Introducción

El ojo es una de las estructuras más finamente conservadas entre los vertebrados, así como su proceso de formación y desarrollo. El proceso de morfogénesis de este comienza tras la formación de la placa neural con la diferenciación de un grupo de células colocadas en la parte central anterior de esta, dando lugar al campo retinal u ocular. Estas comienzan a presentar características distintas al resto de la placa neural migrando hacia la zona externa mientras que el resto converge formando el tubo neural (1) Esto ocurre en peces cebra, *Danio rerio* (zebrafish) entorno a las 11h tras la fecundación del huevo (embriones 11 hfp) (2). De este movimiento surgen dos vesículas ópticas formadas por un neuroepitelio aparentemente homogéneo que, a medida que se produce el engrosamiento del ectodermo suprayacente en la placoda del cristalino, sufrirá un proceso de plegamiento dando lugar a una bicapa que formará la copa óptica. Conforme se da este plegamiento el neuroepitelio dará lugar a tres dominios principales que serán la retina neural (NR), el epitelio retinal pigmentario (RPE) y el tallo óptico separado dorsal y ventral (dOS y vOS) (1) . En zebrafish esta vesícula óptica se encuentra originalmente aplanada formando una bicapa compuesta por la capa lateral (LL), más gruesa, y la capa medial (ML), ligeramente más delgada, las cuales darán lugar a NR y RPE respectivamente tras el plegamiento (3). En estos organismos la formación de la copa óptica ocurre de forma simultánea a los cambios morfológicos en los distintos grupos celulares de forma que las células de la ML comienzan su diferenciación a células aplanadas formando un epitelio escamoso extendiéndose gradualmente mientras la LL aumenta su engrosamiento y sus células adquieren una conformación columnar (3).

La formación de la copa óptica, fundamental en la correcta estructuración del órgano estableciendo las bases para el desarrollo y la función adecuada de las diferentes estructuras del ojo, se encuentra orquestada por la acción de morfógenos. Los morfógenos, entre los cuales encontramos Hh, Wnt o FG, son agentes activadores de vías de señalización implicados en el desarrollo embrionario y brindan información sobre la posición relativa de las células individuales dentro del embrión. Los morfógenos generan gradientes en el medio celular llevando a cabo su función a concentraciones concretas de forma que una alteración de estas o del equilibrio entre distintos morfógenos provocan fallos en la organogénesis (4).

Es esencial que este proceso de formación se dé de forma ordenada, y proporcional independientemente de su tamaño, lo cual se conoce como patrón de escala invariable o scaling, siendo un proceso crucial en el desarrollo (5–7). Estas propiedades invariantes de

escala permiten que los tejidos y órganos se adapten a los cambios de tamaño, y es necesaria para otorgar plasticidad al sistema, atributo esencial para procesos como la homeostasis o la regeneración de órganos. De esta forma estudiar estos procesos de escala durante la morfogénesis del ojo podría tener un amplio impacto en diversos campos que van desde la biología de sistemas hasta la medicina regenerativa. Durante el desarrollo estos patrones de escala invariable se establecen gracias a los morfógenos comentados anteriormente (7).

En 2018 se publicó un estudio describiendo un modelo de mecanismo de escala invariable en zebrafish basado en la capacidad de la señalización Nodal para detectar el tamaño del embrión y ajustar las propiedades de los tejidos. Para la creación del modelo se llevó a cabo un screening computacional tomando como referencia topologías de la red Nodal-Lefty restringidas con parámetros biofísicos medidos in vivo. Observaron como resultado que las propiedades de escala del embrión dependían de las concentraciones precisas del inhibidor nodal altamente difusivo, Lefty (5). Curiosamente, se requiere una topología de red de activador-inhibidor muy similar a Nodal-Lefty para formar el patrón regional de la copa óptica: el activador Wnt de baja difusión y sus inhibidores, DKK y SFRP (8). Además, al igual que el sistema Nodal-Lefty, se ha demostrado que el inhibidor SFRP también es activado por el activador Wnt (9) y afecta la distribución extracelular del gradiente Wnt (10).

Wnt engloba a un grupo de glicoproteínas ricas en cisteína, cuyo nombre proviene del gen en *Drosophila wingless* y su homólogo en vertebrados *integrated*, que, tras la unión al extremo N-terminal de receptores de la familia Frizzled (Fz) (11), median señales extracelulares activando dos posibles vías de transcripción principales, la vía canónica o dependiente β -catenina o la no canónica o independiente de β -catenina (12). Las funciones de la familia Wnt engloban una gran cantidad de procesos como la diferenciación celular, movilidad, polaridad, replicación y renovación de células madre. Debido a su papel esencial en el desarrollo embrionario su expresión se encuentra fuertemente regulada y restringida tanto temporal como espacialmente (13). Además, estos ligandos presentan una limitada difusión y actúan en la misma región donde son secretados. Esto se encuentra probablemente influenciado por la interacción que estas glicoproteínas, altamente modificadas, presentan con elementos de la matriz celular como heparán sulfato y proteoglicanos como Dally y glypican 3 (14).

Nuestra idea es comenzar un proyecto a largo plazo en el que obtengamos como meta final un modelo de patrón de escala invariable para la formación del ojo aplicando la estrategia de screening computacional ajustada a las propiedades biofísicas de los morfógenos implicados

en el contexto de la copa óptica. Para ello nos centraremos en el estudio del modelo de escala invariable más probable, las interacciones de señales biestables entre las capas LL y ML en la vesícula óptica para la formación del RPE y NR. Hay evidencias positivas que demuestran papel de Wnt como responsable de la diferenciación de RPE en zebrafish (15), así como el de FGF (morfógeno) de promover la diferenciación de la NR (16). Además, datos de sc-RNAseq generados en nuestro laboratorio demostraron que son Wnt2 y Wnt8b, dentro de la familia Wnt, aquellos que se expresan de forma exclusiva en la subpoblación de RPE del ojo.

Para llevar a cabo el desarrollo del proyecto es necesario empezar identificando los posibles morfógenos responsables del scaling, así como medir las propiedades biofísicas (difusión y aclaramiento) de estos y sus inhibidores en el primordio del ojo (embriones 16 hpf). Las proteínas difunden desde sus fuentes de producción a medida que también se eliminan del espacio extracelular por absorción o degradación celular. Por lo tanto, tanto la difusividad como la estabilidad influyen en los gradientes de proteínas (17). Además, para analizar el scaling del ojo y comprobar las predicciones del modelo matemático es necesario la creación de un escenario experimental en el cual obtengamos peces con ojos de distintos tamaños manteniendo la escala de los tejidos que lo conforman. La estrategia que emplearemos para la generación de este escenario consiste en la implantación de células precursoras de ojo provenientes de organismos WT en estado de pre-gástrula (18) sobre embriones de peces de una línea mutante no formadora de ojo.

El gen *chokh*, ortólogo del gen *rax* en mamíferos, codifica para Rx3, un factor de transcripción de homeodominio. Rx3 cumple una función muy específica del ojo y regula gran cantidad de genes para la formación de este. Mab2112, Rx1 y Rx2, principales factores de transcripción promovidos por Rx3, parecen ser responsables de la evaginación de la vesícula óptica del primordio, fase limitante y primordial en la formación del ojo (19,20). Además, la expresión de *Vsx2* y *Ath5*, factores expresados por las células progenitoras de la retina, se vuelve indetectable en mutantes *chokh*^{-/-} (21). A su vez Rx3 promueve la diferenciación de RPE (22) y regula el desarrollo del cerebro mediante la bajada de expresión de genes implicados en las vías de señalización de Wnt (20) así como ha demostrado un papel fundamental en el desarrollo del hipotálamo dorso-anterior y la diferenciación de neuronas y núcleos esenciales formados en este, así como de la glándula pineal (23). Mutantes doble negativo del gen *chokh* presentan un como fenotipo anoftalmia bilateral (ausencia de ojos) además de malformaciones

en el lóbulo frontal (19,20) lo cual lo hace una diana interesante para el desarrollo de una línea mutante que utilizar para el desarrollo de nuestro modelo experimental.

Objetivos

Los objetivos de este trabajo experimental fueron:

1. El estudio del papel de los morfógenos Wnt2 y Wnt8b en la formación del ojo, concretamente en la diferenciación del RPE, con el fin de comprobar la hipótesis de estos siendo morfógenos responsables en el scaling del ojo. Para esto llevaremos a cabo dos ensayos:
 - a. Sobreexpresión de Wnt2 y Wnt8b en embriones de zebrafish WT.
 - b. Generación de constructos de ADN para la expresión de proteínas fusión Wnt2-GFP y Wnt8b-GFP. Esto nos permitiría observar el comportamiento de Wnt2 y Wnt8b, confirmar su sitio de actuación y estudiar sus propiedades.
2. Generación de la F0 de una línea de zebrafish mutante de *rx3* incapaz de desarrollar ojos mediante el uso de la técnica CRISPR-Cas9.

Resultados

1. Generación de una línea mutante para el gen *rx3* de zebrafish empleando tecnologías CRISPR-Cas9

Con el objetivo de generar una línea mutante de zebrafish que presente el fenotipo de anoftalmia decidimos llevar a cabo la creación de una línea mutante del gen *chokh/rx3* mediante el uso de la técnica de edición genética CRISPR-Cas9. A las 24h tras la inyección (embriones 24 hfp) los embriones presentaron 4 fenotipos principales: fenotipo WT, anoftalmia bilateral, ojos de menor tamaño, y anoftalmia unilateral, siendo este último el menos frecuente (Fig. 1). Llevamos a cabo un conteo y clasificación de los embriones en función de su fenotipo, así como un seguimiento de supervivencia las siguientes 72h. Agrupamos bajo el término ‘malformaciones oculares’ a los embriones que presentaban ojos de menor tamaño y anoftalmia unilateral.

Fenotipo	n° de embriones. N=80	%
Anoftalmia bilateral	35	43,75
Malformaciones oculares	22	27,5
Fenotipo WT	23	28,75
	Efectividad del ensayo	71,25

Fenotipo	% supervivencia, 48 hfp (n°)	% supervivencia, 72 hfp (n°)
Anoftalmia bilateral	91,4 (32)	74,28 (26)
Malformaciones oculares	95,45 (21)	90,9 (20)
Fenotipo WT	91,3 (21)	91,3 (21)

Hipotetizamos que los individuos que presentaban anoftalmia biltateral eran homocigotos para la mutacion del gen *rx3*, mientras que las malformaciones oculares indicarían heterocigosis, y fenotipo WT, ausencia de la mutacion. Previamente, los embriones homocigotos para la mutación del gen *rx3*, han sido probados como no viables, muriendo antes de completar su desarrollo a fase de adultez, probablemente debido a fallos en el desarrollo cerebral (19,20,23). Dado que nuestro interés es generar una linea mutante viable, decidimos crecer aquellos individuos que presetaron fenotipo de malformaciones oculares: ojos pequeños y anoftalmia unilateral. Estos, sin embargo, murieron también a las 2 semanas.

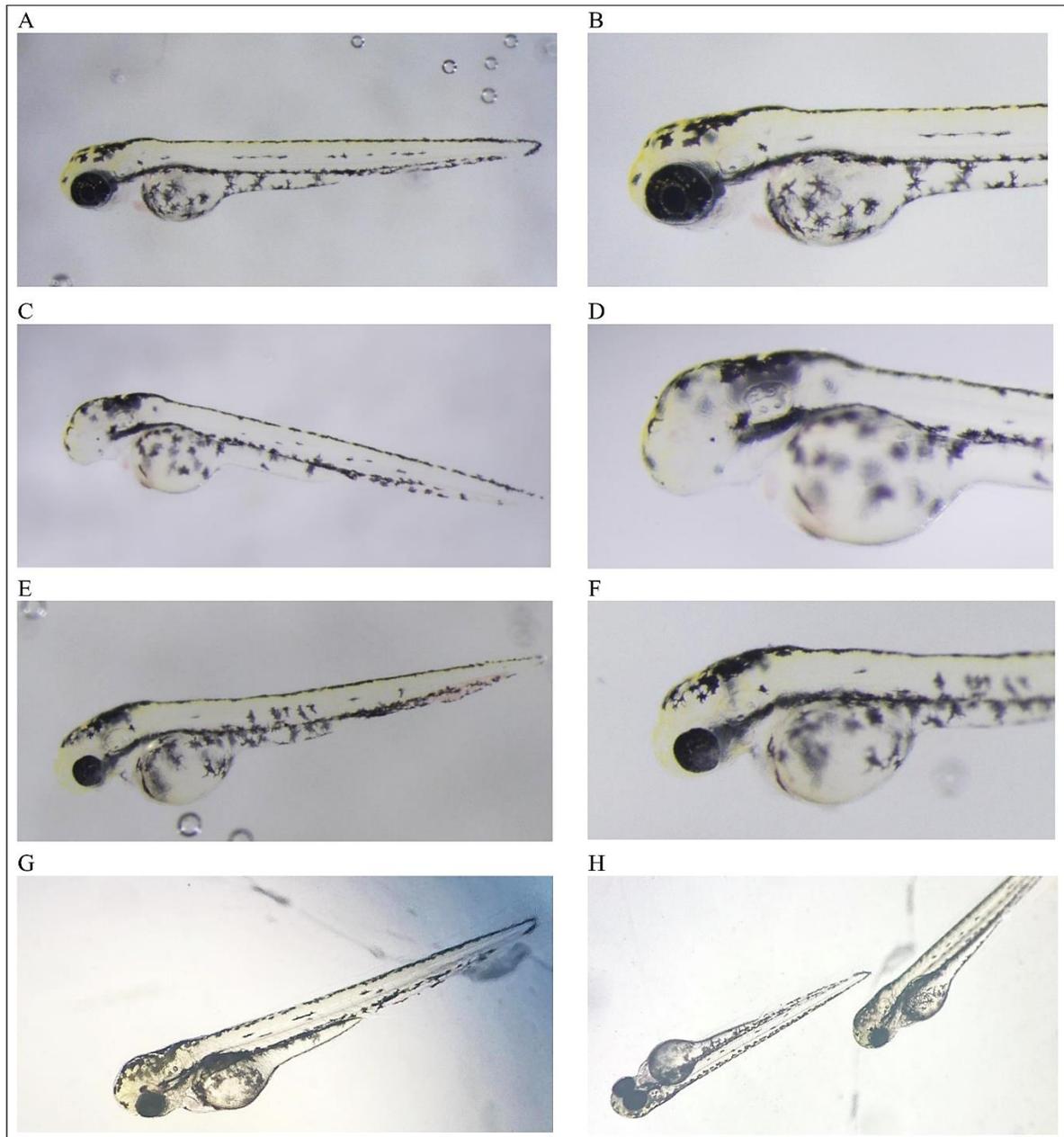


Figura 1: Fenotipos presentes en los embriones 72 hfp tras el ensayo de mutación de *rx3* con CRISPR-Cas9. (A,B) Fenotipo WT. (C,D) Fenotipo de anoftalmia bilateral. (E,F) Fenotipo de ojos pequeños. (G,H) Fenotipo de anoftalmia unilateral.

2. Sobreexpresión de Wnt2 y Wnt8b para su estudio funcional

a. Preparación de los vectores de expresión para los genes *wnt2* y *wnt8b*

Comenzamos llevando a cabo la clonación de los genes *wnt2* y *wnt8b* en el plásmido de expresión pCS2+ para poder llevar a cabo la síntesis *in vitro* de mRNA y su posterior inyección en los embriones. Para ello, empleamos bacterias competentes que acojan y amplifiquen los plásmido para su uso en técnicas de biología molecular. Después de cultivar las bacterias, escogemos 3 colonias para cada plásmido correspondientemente y extrajimos el

ADN realizando minipreps, para después llevar a cabo una PCR y una digestión del ADN que comprobarán la presencia de los genes de interés. La electroforesis del producto de la digestión mostró solo la presencia del gen de interés en el caso de *wnt8b* (Fig. 2). La PCR sin embargo mostró ambos genes, *wnt2* y *wnt8b* en las miniprep provenientes de las 3 colonias para cada gen correspondientemente (Fig.3). En ocasiones las enzimas de restricción no pueden acceder a su sitio de corte debido a la conformación que toma el plásmido, conociendo esto tomamos como fiables los resultados de la PCR. Llevamos a cabo la síntesis de mRNA el cual fue posteriormente inyectado en los embriones en estadio de una célula a dos concentraciones distintas, 20 ng/μL y 15 ng/μL.

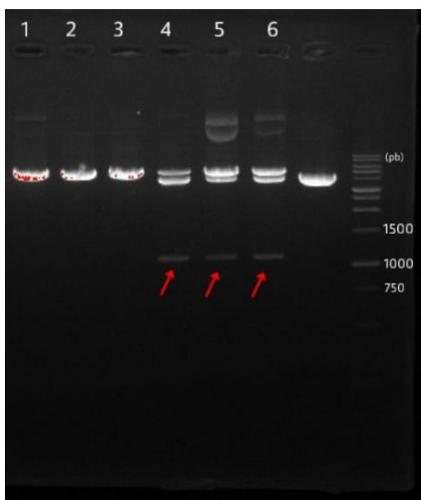


Figura 2: Electroforesis muestra los resultados de la reacción de digestión catalítica del ADN extraído de la clonación de *wnt2* y *wnt8b*. Los resultados muestran una banda a 1100 pb en las columnas 4, 5 y 6 correspondiente al gen *wnt8b*. No aparecen bandas en las columnas 1, 2 y 3 correspondiente al gen *wnt2*.

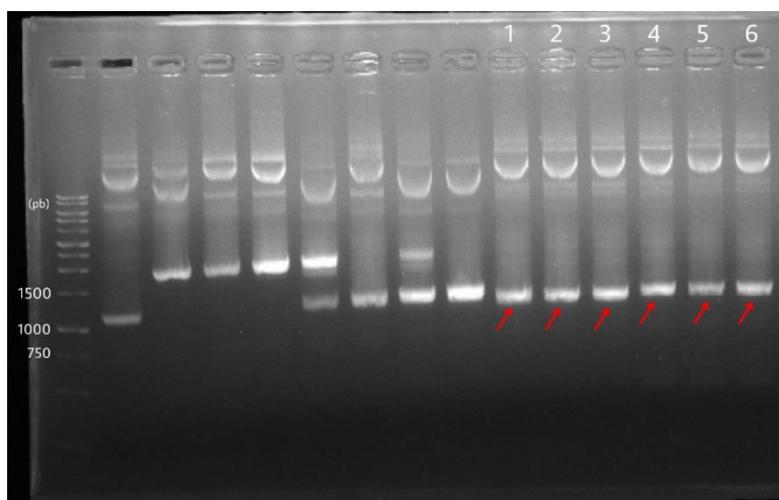


Figura 3: Electroforesis muestra los resultados de PCR sobre el ADN obtenido en la clonación de *wnt2* y *wnt8b*. Las columnas 1, 2 y 3 muestran una banda a 1100 pb correspondiente al gen *wnt2*. Las columnas 4, 5 y 6 muestran una banda a 1100 pb correspondiente al gen *wnt8b*.

b. Inyección del mRNA de los genes *wnt2* y *wnt8b*

La sobreexpresión de *wnt8b* resultó en embriones con un amplio rango de fenotipos. En su mayoría presentaron alto grado de retraso en el desarrollo, así como deformaciones severas, que imposibilitaron caracterizar problemas en el desarrollo de ojos de forma específica. Una minoría presentó un fenotipo más suave caracterizado por la anoftalmia bilateral; estos mantenían un claro retraso en el desarrollo con respecto a individuos WT si bien no tan marcado. Los resultados fueron consistentes a ambas concentraciones, tanto 20 ng/μL como a 15 ng/μL (Fig. 4A-E).

Por otro lado, la sobreexpresión de *wnt2* manifestó unos resultados más prometedores en relación al estudio del desarrollo del ojo. Con respecto a la inyección a 20 ng/μL encontramos un fenotipo similar al presente en la sobreexpresión de *wnt8b* con la diferencia de haber una menor proporción de individuos deformes y una mayor de aquellos con un leve retraso del desarrollo y anoftalmia bilateral (Fig. 4F-H). Sin embargo, repitiendo el ensayo a 15 ng/μL, encontramos un nuevo fenotipo: embriones con anoftalmia bilateral pero que no presentan retraso en el desarrollo al compararlo con el control WT (Fig. 4I, J). Este es el fenotipo más interesante para nuestro estudio, ya que no es un fenotipo general de problemas en el desarrollo embrionario, sino que es un fenotipo específico de desarrollo de ojo, indicando que *wnt2* cumple un papel específico en este proceso. A la vista de los resultados repetimos el ensayo para calcular la estadística:

Fenotipo	n° de embriones (N=155)	%
Anoftalmia bilateral	21	13,55
Anoftalmia bilateral + leve retraso del desarrollo	76	49,03
Deformaciones + alto retraso del desarrollo	42	27,10
WT	16	10,32
Efectividad del ensayo		89,68

Decidimos llevar a cabo un ensayo de hibridación *in situ* con el fin de caracterizar mejor el fenotipo, marcando las poblaciones celulares de RPE y NR con *tfec* y *vsx*, respectivamente. No obtuvimos resultados claros debido a que los animales empleados para este experimento fueron inyectados con concentraciones de *wnt2* mRNA mayores de 15 ng/μL y por lo tanto la mayoría presentaban el fenotipo más extremo, que es el de formación de las vesículas ópticas muy pequeñas. Aun así, pudimos apreciar un dato interesante, y es que la vesícula óptica, aunque marcadamente más pequeña que en el WT, tiene expresión exclusiva del marcador de RPE, *tfec*, y nada de expresión del marcador de NR, *vsx*, indicando que la sobreexpresión de *Wnt2* conlleva a la especificación de las células del RPE y la inhibición de NR (Fig. 5).

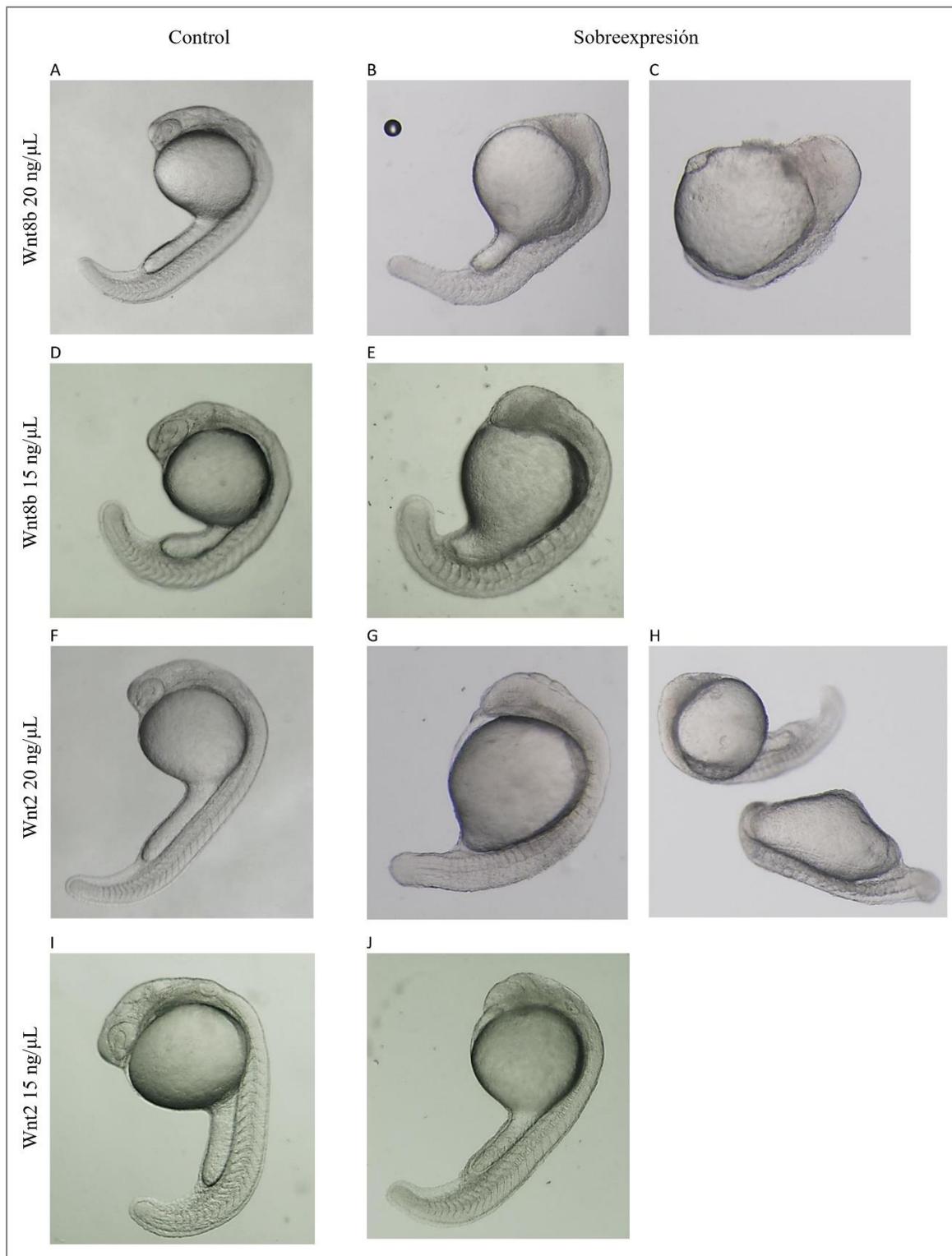


Figura 4: Fenotipos presentes en embriones 24 hfp tras la inyección de mRNA *wnt2/wnt8b* para su sobreexpresión. (A-E) La sobreexpresión de Wnt8b (20 y 15 ng/ μ L) y Wnt2 (20 ng/ μ L) ofrece resultados similares. (C, H) En mayor proporción los embriones muestran deformidades y fuerte retraso del desarrollo. (B, E, G) también presentes en menor proporción observamos embriones con anofthalmia bilateral y un retraso del desarrollo más leve. (I, J) La sobreexpresión de Wnt2 a 15 ng/ μ L da lugar a un nuevo fenotipo caracterizado con anofthalmia bilateral sin muestras de retraso del desarrollo.

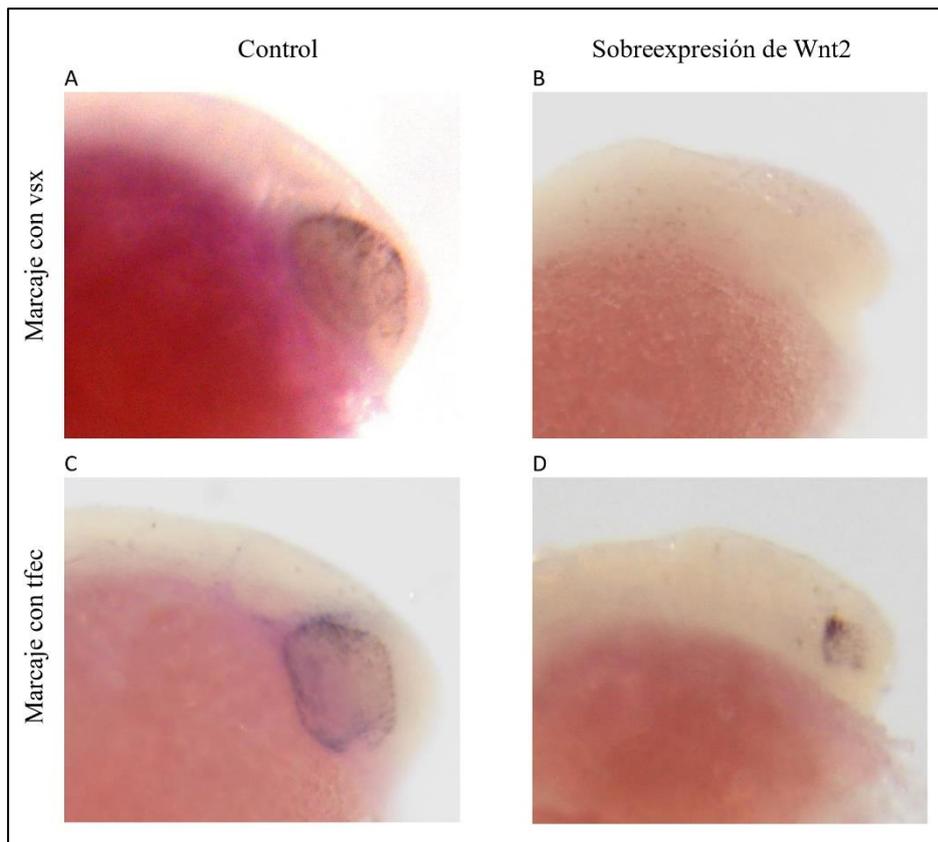


Figura 5: Poblaciones de RPE y NR en embriones tras la inyección de mRNA *wnt2* a una concentración >20 ng/ μ L. (A,B) El marcaje con *vsx* muestra la población de NR, la cual se ve ausente bajo la sobreexpresión de *Wnt2*. (C,D) *tfec* marca las células de RPE. Estas si se ven presentes bajo condiciones de sobreexpresión de *Wnt2*.

3. Creación de constructo *Wnt8b*-GFP

El objetivo es generar dos secuencias de ADN que codifiquen para proteínas fusión *Wnt2*-GFP y *Wnt8b*-GFP respectivamente, la cuales están compuestas de las secuencias codificantes de *Wnt* y GFP unidas por un segmento linker. Para la producción del constructo generamos previamente los fragmentos de ADN correspondientes a los genes codificantes de *Wnt* y GFP unidos a la secuencia linker (Fig. 6). Para ello realizamos una PCR utilizando primers que contengan este segmento. Los resultados de la PCR mostraron éxito en la amplificación solo de los fragmentos GFP-link y *Wnt8b*-link, quedando el *Wnt2*-link sin sintetizar (Fig. 7). La amplificación de *Wnt2* sin el link (empleando primers canon) resultaba con éxito, lo cual nos hace deducir que el problema reside en el primer *Wnt2* linker Rv utilizado, por lo tanto, decidimos seguir con el ensayo centrándonos únicamente en *Wnt8b*.

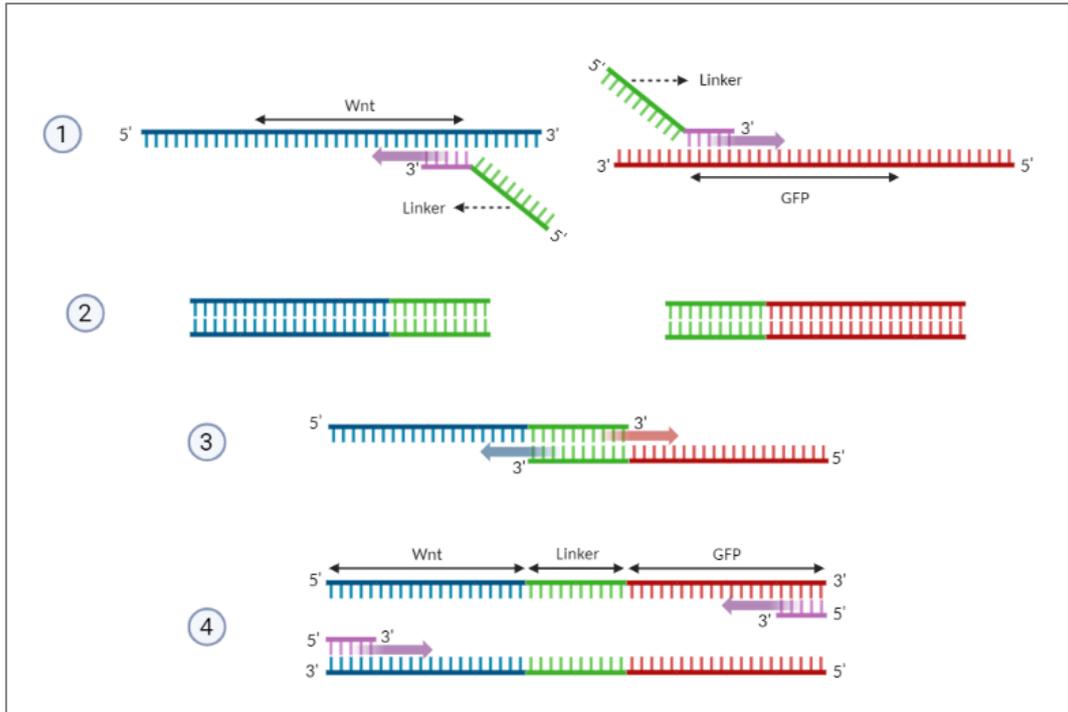


Figura 6: Procedimiento seguido para la generación de constructo Wnt-GFP. (1, 2) Síntesis de los fragmentos Wnt-link y GFP-link. (3, 4) Annealing PCR. Created with BioRender.com.

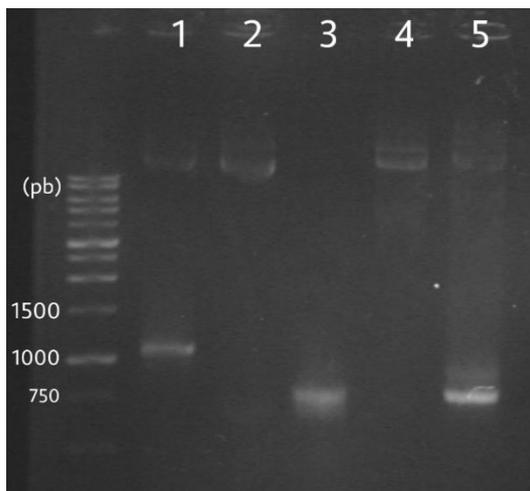


Figura 7: Electroforesis muestra los resultados en la construcción de los fragmentos Wnt-Linker. Llevamos a cabo la reacción utilizando dos polimerasas distintas: iProof™ (2, 3) y Advantage Polymerase (4, 5). Los resultados mostraron únicamente la síntesis del fragmento Wnt8b-linker (3, 5). La banda en el carril 1 a 1100 pb corresponde a la amplificación del gen *wnt2*.

Utilizando ambos fragmentos, Wnt8b-link y GFP-link, llevamos a cabo una “Annealing PCR” para la combinación de estos en nuestra secuencia de interés (Fig. 6), la cual insertamos en el plásmido pCS2+. Tras la clonación de este en bacterias competentes y el aislamiento del ADN de 8 colonias, realizamos una reacción de digestión y una PCR. Los resultados de estas señalaron las muestras identificadas con los números 2, 3 y 4 como aquellas que presentaban el fragmento de interés amplificado y clonado (Fig. 8, 9). La secuenciación en una empresa confirmó la creación del constructo de interés.

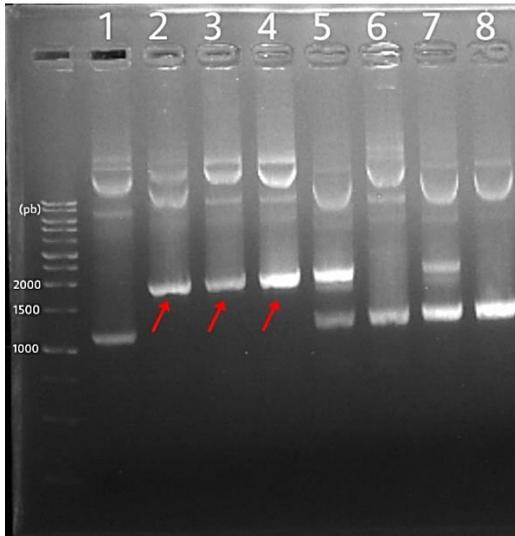


Figura 8: Electroforesis muestra los resultados de PCR sobre el ADN obtenido en la clonación del constructo Wnt8b-GFP. Las muestras 2, 3 y 4 presentan una banda a 1800 bp correspondiente al constructo de interés probando su obtención.

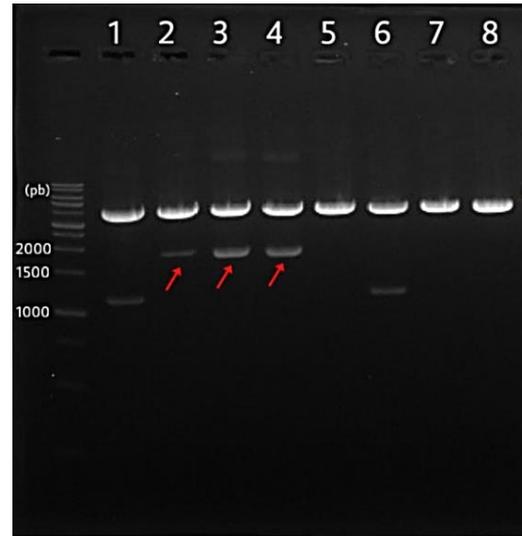


Figura 9: Electroforesis muestra los resultados tras la reacción de digestión sobre el ADN obtenido en la clonación del constructo Wnt8b-GFP. La banda presente en las muestras 2, 3 y 4 1800 bp indican la presencia del constructo de interés.

Sin embargo, la expresión del fragmento mediante la inyección de mRNA en el cigoto de zebrafish no condujo a los resultados esperados. 24 h tras la inyección a una concentración de 20 ng/ μ L, los embriones mostraron un fenotipo similar al presente en la sobreexpresión de Wnt8b, un alto porcentaje mostró un fuerte retraso del desarrollo y deformaciones, si bien también encontramos embriones caracterizados por la anoftalmia bilateral y retraso del desarrollo (Fig. 10A, B). En ninguno de los dos casos estos presentaron fluorescencia. Ante estos resultados repetimos la síntesis de mRNA y la inyección, esta vez aumentando la concentración a 80 ng/ μ L. Decidimos hacer una primera observación a las 5 h tras la inyección y una segunda pasadas 24 h. Los embriones 24 hfp presentaron, prácticamente en su totalidad, paralización del desarrollo en la fase de segmentación y/o deformidades, probablemente asociadas a la alta expresión de *wnt8b* (Fig. 10C-E), estos sin embargo siguieron sin mostrar fluorescencia en ninguna de las dos observaciones (5 h y 24 h).

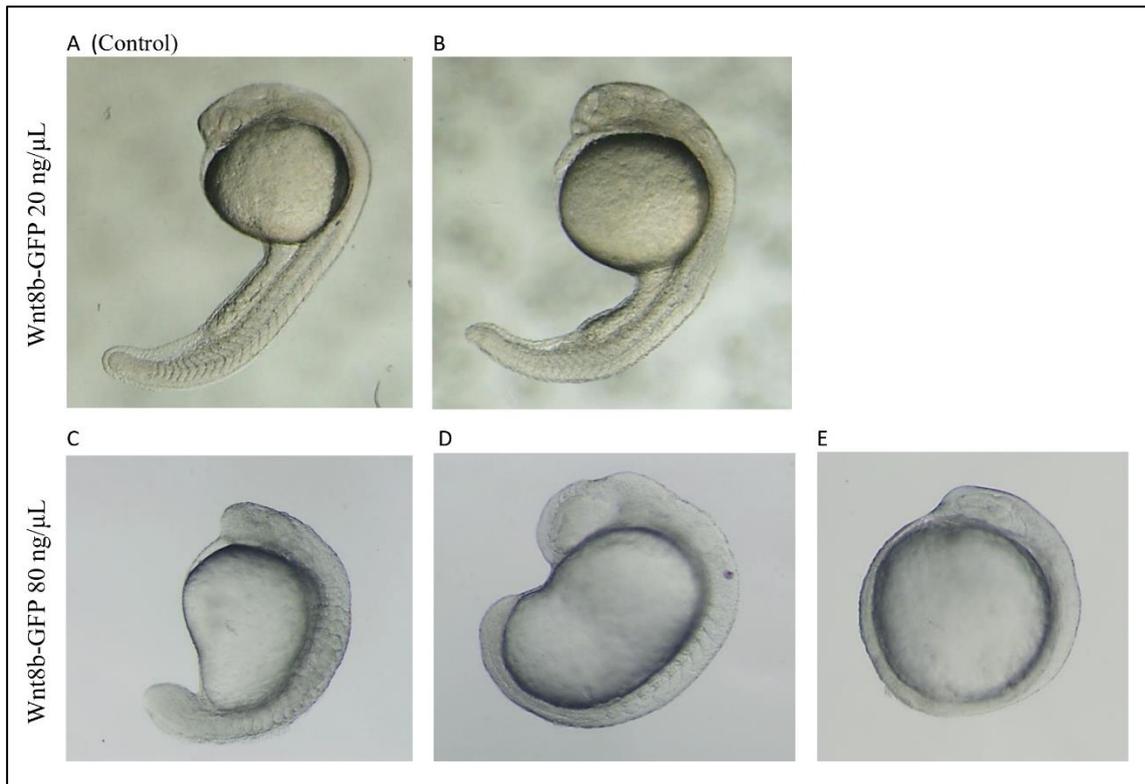


Figura 10: Expresión de proteína fusión Wnt8b-GFP en embriones, 24 h tras la inyección de mRNA. (A, B) La expresión tras la inyección a 20 ng/μL presenta un fenotipo similar al obtenido en la sobreexpresión de Wnt8b, caracterizado por anoftalmia bilateral y retraso del desarrollo. No hubo efecto de fluorescencia. (C, D, E) La inyección a 80 ng/μL resulta en la paralización del desarrollo en la fase de segmentación. De igual forma estos no muestran fluorescencia.

Discusión

El ensayo de edición genómica CRISPR-Cas9 para la mutación Rx3 resultó exitoso obteniendo individuos con el fenotipo de interés, anoftalmia bilateral. Solo los homocigotos muestran este fenotipo, sin embargo, mueren tras los 10-12 días de vida (19), probablemente a causa de malformaciones a nivel del lóbulo frontal y glándula pineal (19,20,23) si bien otros estudios proponen la inanición como causa de la muerte (19). Esto hace que los individuos homocigotos para la mutación no sean viables para la creación de una línea genéticamente estable. Es por esto que decidimos seguir el crecimiento de los individuos heterocigotos los cuales hipotetizamos que serían aquellos que mostraban formación del ojo alterada, sin llegar a la anoftalmia; sin embargo, murieron también alrededor de las 2 semanas de vida. Una posterior revisión de la literatura mostró que otros investigadores han caracterizado el fenotipo de heterocigotos *chokh*^{+/-} como WT, definiendo la mutación de Rx3 como una mutación recesiva (20,22). Probablemente los organismos que definimos como heterocigotos durante el experimento fueran en realidad homocigotos *chokh*^{-/-} con un fenotipo atípico, explicando así su muerte inesperada. Con el fin de llevar a cabo la creación de la línea mutante por tanto habría que repetir el experimento esta vez creciendo los embriones con fenotipo WT, genotipar los individuos seleccionando los heterocigotos portadores de la mutación y mantener la línea en heterocigosis, siendo necesario repetir el genotipado para cada generación.

El estudio de sobreexpresión de *wnt2* y *wnt8b* mostró anoftalmia bilateral demostrando el papel de estos en la formación del ojo en zebrafish, algo hasta ahora no caracterizado experimentalmente. Sin embargo, contrariamente a como preveíamos, encontramos un fenotipo más extremo y con afectaciones a otros tejidos. Si bien esperábamos observar alteraciones únicamente en el plegamiento de la copa óptica, apreciamos cambios más allá de esto, afectando al desarrollo general del pez y generando malformaciones, especialmente a altas concentraciones. Como sabemos Wnt engloba a una familia de ligandos los cuales controlan múltiples procesos biológicos como la proliferación, diferenciación, apoptosis, migración, etc. mediante la activación de múltiples vías transcripcionales tras la unión a su receptor que se encuentra en la membrana plasmática (11). Las interacciones y acciones Wnt-receptor y sus acciones son específicas para cada miembro de la subfamilia, si bien los mecanismos responsables de la especificidad de señal se mantienen desconocidos a día de hoy (24,25). Es posible que la gran sobreexpresión de Wnt, sumado a su baja difusividad (14) y unido a la pérdida de la regulación de expresión, normalmente fuertemente regulada temporal

y espacialmente (13), estén produciendo interacciones inespecíficas activando vías de señalización no fisiológicas para Wnt2 y Wnt8b alterando el desarrollo a varios niveles creándose un mecanismo de forma que a mayor expresión, mayor presencia de Wnt, mayor probabilidad de interacciones inespecíficas y por tanto mayores afectaciones del desarrollo. Wnt cumple funciones en la formación del cerebro (26,27) y parece competir con la formación de la vesícula óptica a altas concentraciones. Recordemos que, mientras Rx3 es esencial para la formación de la vesícula, cumple entre sus otras funciones la regulación a la baja de las vías de señalización Wnt, las cuales se ven sobreexpresadas en mutantes de Rx3 (20). Por otro lado, los datos obtenidos inyectando bajas concentraciones de *wnt2* mRNA, que afectan exclusivamente al desarrollo de la copa óptica son muy prometedores, por lo que los futuros ensayos se centrarán en experimentos de sobreexpresión con estos parámetros. A su vez, los resultados de la hibridación *in situ* muestran que en aquellos embriones que presentaban tejido óptico expresaban únicamente RPE sin mostrar nada de NR, indicando que efectivamente Wnt2 puede ser un morfógeno que lidere la diferenciación del tejido óptico en RPE inhibiendo la formación de NR. De cara a futuros experimentos parece interesante seguir investigando el papel de Wnt2 y Wnt8b comenzando por repetir el ensayo de hibridación *in situ*, esta vez sobre embriones inyectados con una menor concentración de Wnt y poder caracterizar sus efectos a niveles más cercanos a los fisiológicos para reafirmar su rol en la formación del ojo y la diferenciación de las distintas poblaciones neurales.

Con respecto a la generación del constructo Wnt8b-GFP, los resultados de la digestión y amplificación por PCR de las muestras de ADN obtenidas tras la clonación del fragmento mostraban una banda a 1800 pb correspondiente al fragmento Wnt8b-GFP. Esto unido a los resultados de la secuenciación de las muestras 2, 3 y 4 confirman la creación del constructo de interés Wnt8b-GFP. La expresión de la proteína fusión provoca un fenotipo en los embriones consistente con el observado bajo la sobreexpresión de Wnt8b, embriones con anoftalmia bilateral y retraso del desarrollo, y mayores afectaciones al desarrollo al aumentar la concentración del mRNA de Wnt8b-GFP. Sin embargo, no presentan fluorescencia. Estos resultados parecen indicar que si bien el dominio correspondiente a Wnt8b se está traduciendo y plegando con éxito esto se ve interrumpido para el dominio de GFP, dando como resultado una proteína que conserva su función como morfógeno, uniéndose con éxito a su receptor (Frizzled) pero que no es fluorescente. La interrupción o fallos en el plegamiento 3D de la cadena aminoacídica pueden deberse a las características del linker utilizado, tanto la longitud como el grado de flexibilidad de este podría resultar en fallos del plegamiento correcto de los

dos dominios enlazados (28). En nuestro caso el linker utilizado fue GSLPAVT, un linker largo y muy flexible, favoreciendo el movimiento independiente de los dominios, importante cuando uno de los dominios de la proteína fusión debe formar interacciones. Sin embargo, linkers muy flexibles pueden fallar a la hora de mantener una separación entre los dominios viéndose reflejado en niveles de expresión muy pobre (28). De cara a repetir el ensayo con el objetivo de crear un constructo que conservara la doble función de Wnt y de GFP probaríamos utilizando un linker con distintas propiedades que sí permita el plegamiento correcto de ambos dominios, como por ejemplo el linker GS, que también tiene propiedades flexibles pero es más corto y puede entonces no interferir con el plegamiento del GFP.

Materiales y Métodos

1. Generación de una línea mutante para el gen *rx3* de zebrafish empleando tecnologías CRISPR-Cas9

Para la generación de la línea mutante *rx3* usando CRISPR-Cas9, utilizamos sgRNA con diana en *rx3* que fueron diseñados utilizando la herramienta online CRISPRscan (<https://www.crisprscan.org/>) (29) estos fueron después sintetizados siguiendo el protocolo descrito (30). Se inyectaron los sgRNA junto con la nucleasa Cas9 a una concentración de 80 ng/ μ L y 300 ng/ μ L respectivamente en el yolk del embrión del zebrafish en el estadio de una célula, inyectándose un total de 1 nL de la solución final con dichas concentraciones en cada embrión.

Para ello utilizamos un inyector previamente calibrado y agujas elaboradas con un micropipette puller colocando los huevos previamente sobre una placa con agarosa 1,2% en E3 preparada con un molde para generar rafiles en esta y poder inmovilizar los huevos fecundados en la placa para la inyección. Para esto primero cortamos la aguja para ajustar el grosor de la punta de esta, cargamos la aguja con aproximadamente 2 μ L de la solución que procederemos a inyectar y la colocamos en el inyector. A continuación, calibramos el inyector para asegurarnos de inyectar la cantidad de 1 nL por inyección, pasamos los huevos fecundados a la placa de Petri con agarosa preparada con el molde y podemos proceder a la inyección de estos.

A continuación, se incubaron los embriones 24 h a 28 °C, se analizaron entonces y se hizo cuenta de la estadística, hizo un seguimiento de las distintas poblaciones por fenotipo a las 48 y 72 horas. A las 72 h se fotografiaron los embriones con una lupa durmiendo los peces con un par de gotas de triclaína 3% en la placa de Petri e introduciéndolos después en una solución de metilcisteína 3% para poder colocarlos correctamente y hacer la foto.

2. Sobreexpresión de Wnt2 y Wnt8b

- Retransformación de bacterias competentes (ampliación del plásmido):

Incubamos en un tubo eppendorf 50 μ L de solución de bacterias competentes con 1 μ L del plásmido pCS2+ Wnt2 // Wnt8b (250 ng/ μ L). Para dar la transformación las bacterias se expusieron entonces a un choque térmico, 30' en hielo y 1' a 42 °C. Posteriormente las bacterias se incubaron 1h a 37 °C en 250 μ L de medio rico para que estas expresaran el gen de

resistencia a ampicilina en el plásmido. Pasada esta hora sembramos 30 μL en placas de agar+ampicilina e incubamos 24h a 37 °C.

Pasadas las 24 h seleccionamos una colonia de la placa, la picamos e incubamos en medio líquido + ampicilina (100 $\mu\text{L}/\text{mL}$) 24h a 37 °C.

- Extracción y preparación de Miniprep

Para la extracción del plásmido utilizamos el GeneElute™ Plasmid Miniprep kit de Sigma-Aldrich siguiendo su protocolo:

1. Precipitar de la muestra y resuspensión del pellet en 200 μL de Resuspension Solution del kit, añadir 200 μL de Lysis Solution e incubar la reacción de lisis 5'.
2. Añadir 350 μL de Neutralizing Solution y precipitar el pellet centrifugando a máxima velocidad durante 10'.
3. Preparar la columna del kit con 500 μL de Column Preparation Solution, centrifugar 1' a 12000x g.
4. Transferir el sobrenadante del lisado a la columna y dar un spin 30'' a 12000x g y descartar el eluyente.
5. Lavar la columna con 750 μL de Wash Solution, 30'' 12000x g. Secar la columna repitiendo la centrifugación 1' a 12000x g esta vez sin añadir solución.
6. Añadir 50 μL de Elution Solution y centrifugar 1' a 12000x g para obtener la Miniprep.

Medimos la concentración de la miniprep utilizando un espectrofotómetro Nanodrop asegurándonos que del valor 260/280 se encontrará alrededor de 2 (por encima de 1,85).

Para la comprobación de que el plásmido contenía nuestra secuencia de *wnt2* y *wnt8b* realizamos una PCR de comprobación. Para esto utilizamos el kit iProof™ High Fidelity DNA Polymerase.

PCR mix: 1 μL de Miniprep, 10 μL de 5x iProof™ Buffer, 2,5 μL de Fw primer (10 mM), 2,5 μL de Rv primer (10 mM), 1 μL de solución de dNTPs (10 mM), 1 μL de DMSO, 0,5 μL de Polimerasa iProof, 31,5 μL de H₂O.

En la PCR de *Wnt8b* y *Wnt2* utilizamos los primers Fw *Wnt8b* y Rv *Wnt8b*, y Fw *Wnt2* y Rv *Wnt2* respectivamente. Llevamos a cabo la reacción de PCR en un termociclador siguiendo el programa propio de la enzima.

Además, llevamos a cabo una digestión con enzimas de restricción para mayor comprobación.

Restriction digest mix: 4 μL de Miniprep, 2 μL de Buffer M, 1 μL de EcoRI, 1 μL de XbaI, 12 μL de H_2O .

Incubamos 1 h 30' a 37 °C.

Observamos el resultado de la PCR llevando a cabo una electroforesis con los productos de la reacción en gel de agarosa 1,2%.

- Síntesis de mRNA

Para la síntesis de mRNA partimos del plásmido, este se encontrará inicialmente supercoiled impidiendo el acceso de la polimerasa por lo que el protocolo comienza con una reacción de restricción de este plásmido con la enzima NotI:

Restriction digest mix: 6 μg de plásmido (en nuestro caso 12,9 μL de Miniprep), 2 μL de BSA, 3 μL de solución de NotI (concentración), 5 μL de Buffer H, 27,1 μL de H_2O (hasta 50 μL).

Dejamos incubar la reacción 1h 30' a 37 °C.

Una vez terminada la reacción limpiamos la muestra de los restos de la reacción utilizando el kit Nucleospin^R Gel and PCR Clean-up.

A continuación procedemos a la reacción de síntesis de mRNA utilizando el mMACHINETM SP6 kit.

Reaction mix: 10 μL de solución 2x NTP/CAP, 2 μL de Buffer, 2 μL de enzyme mix, 1 μg de DNA molde (hasta un máximo de 6 μL de solución), H_2O hasta llegar a 20 μL (si hiciera falta).

Incubamos la reacción 2h a 37 °C.

Una vez terminada añadimos 1 μL de mix de TURBO DNase e incubamos de nuevo esta reacción 15''

Precipitamos el mRNA añadiendo 30 μL de LiCl Precipitation Solution e incubando 1h a -20 °C. A continuación, centrifugamos 15' a máxima velocidad, cuidadosamente quitamos el sobrenadante y lavamos el pellet con 1 mL de etanol 70% y volvemos a centrifugar. Quitamos el etanol y dejamos secar en la campana de extracción. Una vez seco resuspendemos en 24 μL de H_2O sigma. Volvemos entonces a medir la concentración usando el nanodrop.

- Inyección

Inyectamos un volumen de 1 nL en la célula de los embriones en el estadio de una célula, para ello utilizamos las mismas herramientas y técnicas descritas en el apartado del ensayo de transformación con CRISPR-Cas9. Inyectamos el mRNA a 2 concentraciones distintas, 20 ng/ μ L y 15 ng/ μ L tanto para Wnt2 como Wnt8b.

Mix de inyección: 0,2 μ L//0,15 μ L de mRNA (500 ng/ μ L), 0,4 μ L de Fenol Red, 4,4 μ L de H₂O.

Incubamos a 28 °C.

- Fijación de los embriones

Tras 24h de incubación a 28 °C clasificamos los embriones según su fenotipo y calculamos la estadística. A continuación, para fijar los embriones primero los debemos decoronar, para ello añadimos pronasa en la placa donde estos se encuentran en E3 y removemos suavemente durante 10'. Procedemos entonces a lavar los embriones de la pronasa y de los restos de corion haciendo consecutivos lavados con E3. Una vez lavados se introducen en un tubo eppendorf con 1 mL de formaldehído 4% en PBS 1x para fijarlos.

Antes de fijarlos realizamos las fotos siguiendo el mismo protocolo explicado anteriormente.

- Hibridación *in situ*

Llevamos a cabo una hibridación *in situ* para el marcaje de los grupos celulares que conforman la retina neural (NR) y el epitelio pigmentario de la retina (RPE) usando dos sondas: vsx FITC y tfec DIG respectivamente. Para ello seguimos el siguiente protocolo:

Día 1: Hibridación.

- Rehidratar las muestras fijadas: 5' RT con agitación en 1 mL de MetOH al 66 % en PBSTw al 0,1 % y 5' RT con agitación en 33 % de MetOH en PBST al 0,1 %.

- Lavar 3x 10' RT agitando en 1 mL PBSTw 0.1%

- Para embriones mayores de 24 hpf, se necesita tratamiento con proteinasa K. 10' (24 hpf) con 1 mL de solución de proteinasa K (10 microg/mL de proteinasa K) a 37°C.

- Lavar 3x 10' RT agitando en 1 mL de PBSTw

- Post-fijación: 30' RT agitando en 500 μ L de solución de formaldehído al 4% recién preparada en PBS.

- Lavar 4x 10' RT agitando en 1 mL PBSTw 0,1%.

- Prehibridación: 1-2 h a 70 °C en 250 L de solución de prehibridación (50% formamida desionizada, 5X SSC, 0,5 mg/mL ARN de levadura torula, 0,05 mg/mL Heparina, 0,1% Tween20, en H₂O libre de nucleasas)
- Hibridación con ribosonda (RB): 16 h a 70 °C con sondas diluidas en 100 µL Solución de hibridación (Solución de prehibridación + 5% de sulfato de dextrano (DS)).
- Desnaturalizar RB a 80 °C por 10'.
- Debería ser adecuada una concentración final de RB de 3-4 ng/µL para FISH.

Día 2: Incubación de anticuerpos (Ab).

- Lavar la solución RB: 5' 70 °C en 1 mL Solución Posthibridación 100% (50% Formamida, 5X SSC, 0.1% Tween20), 10' 70 °C en 1 mL Solución Posthyb 66% en SSC 2X y 10' 70 °C en 1 ml de solución de Posthyb al 33 % en SSC 2X.
- 3x 15' 70 °C en 1 mL SSC 2X.
- 2x 15' 70 °C en 1 mL SSC 0.2X.
- Transferencia a PBSTw: 5' RT en 1 mL 66% SSC 0.2X en PBSTw 0.1% y 5' RT en 1 mL 33% SSC 0.2X en PBSTw 0.1%.
- 4x 10' RT en 1 ml de PBSTw al 0,1 %.
- Bloqueo: 1-2 h a TA en 250 µL de solución de bloqueo (2 % de NGS, 2 mg/mL de BSA en PBSTw al 0,1 % para ISH y 2 % de reactivo de bloqueo en MABTw 1X para FISH)
- Incubación Ab: Agitación O/N a 4 °C en 200 µL de Solución de Anticuerpos (1/100 de anti-DIG-AP).

Día 3 para FISH: reacción NBT:BCIP.

- Lavar 6x 15' RT en agitación con 1 mL de PBSTw 0,1 %.
- Lavar 2x 5' RT en 500 µL de solución de tinción (borate buffer 100 mM, Tween al 0,1 %).
- Revelar con 100 µL de solución NBT:BCIP durante 1 h a temperatura ambiente. Sin movimiento.
- A partir de ahora, las muestras se mantienen en oscuridad.
- Lavar 6x 10' RT en agitación con 1 mL de PBSTw 0,1 %.
- 1° Enfriamiento: Incubar durante 20' a temperatura ambiente en 1 mL de H₂O₂ al 3 %. Sin movimiento.
- Lavar 3x 15' RT en agitación con 1 mL de PBST al 0,1 %.
- 2° Enfriamiento: Lavar brevemente con 1 mL de solución de glicina 0,1 M y luego incubar durante 20' a temperatura ambiente en 1 mL de solución de glicina 0,1 M. Sin movimiento.

- Lavar 3x 15' RT en agitación con 1 mL de PBST al 0,1 %.
- Bloqueo: 1 h RT en 250 µL de Solución de Bloqueo.
- Incubación del 2° Ab: En agitación O/N a 4°C en 120 µL de Solución de 2° Anticuerpo (1/100 anti-FITC-AP).

Día 4: segunda reacción NBT:BCIP

- Lavar 6x 20' RT agitando con 1 mL de PBSTw 0,1 %.
- Lavar 2x 5' RT en 500 µL de solución de tinción (borate buffer 100 mM, Tween al 0,1 %).
- Revelar con 100 µL de solución NBT:BCIP durante 1 h a temperatura ambiente en la oscuridad. Sin movimiento.
- Lavar 4x 10' RT en agitación con 1 mL de PBSTw 0,1 %.
- Lavar O/N a 4°C en agitación con 1 mL de PBSTw 0,1 % (con 1:5000 DAPI).

SOLUCIONES

- Proteinasa K: 10 µL de stock de proteinasa K de 10 mg/mL hasta 10 mL de PBST al 0,1 %.
- Solución de prehibridación: 25 mL de formamida desionizada, 12,5 mL de SSC 20X, 25 mg de ARN de levadura, 0,05 mL de stock de heparina de 50 mg/mL, 0,25 mL de Tween20 al 20 % hasta 50 mL de mqH₂O.
- Solución de hibridación: 2,5 gr de stock de Sulfato de Dextrano hasta 50 mL de Solución de prehibridación. Disolver a 70 °C.
- Solución posthibridación: 25 mL formamida, 12,5 mL SC 20X, 0,25 mL Tween20 20% hasta 50 mL de mqH₂O.
- Solución de Bloqueo: Para FISH: 10 mL MAB5X, 0,25 mL Tween20 20%, 1 gr Reactivo de Bloqueo ROCHE hasta 50 mL de mqH₂O.
- Seroalbúmina (BSA) hasta 40 mL de PBTw 0,1%. Para FISH: 10 mL MAB5X, 0,25 mL Tween20 20%, 1 g Reactivo de Bloqueo ROCHE hasta 50 mL H₂O mg.
- Solución de Anticuerpos: 1/150 de anti-DIG-AP en Solución de Bloqueo para FISH.
- Solución de tinción FISH: 50 µL de borate buffer 200 mM pH 8,5, 0,5 mL de Tween20 al 20 % hasta 100 mL de mqH₂O.
- Tampón de amplificación: 1 mL de DS al 2 % en solución de tinción FISH, 10 µL de H₂O₂ al 0,3 % y 5 µL de 4-yodofenol a 100 mg/mL.

- H₂O₂ al 3 %: 1 mL de solución madre de H₂O₂ al 30 % en 10 mL de PBSTw al 0,1 %.
- Solución de Glicina 0,1 M: 1,5 gr de Glicina hasta 200 mL de m^qH₂O. Lleve a pH 2,2 agregando gradualmente 1 mL de HCl 37%.
- 2° Solución de Anticuerpos: 1/150 de anti-DNP o anti-FITC-AP en Solución de Bloqueo para FISH.
- Solución NBT:BCIP: 5 mL buffer de fosfatasa alcalina (100 mM Tris-HCl [pH 9.0], 150 mM NaCl, 1 mM MgCl₂), 33 µL NBT (50mg/mL) en dimetilformaldehido 100% y 16.5 µL BCIP (50mg/mL) en dimetilformaldehido 75%

3. Creación de constructo Wnt8b-GFP

- Elaboración de los fragmentos Wnt2-linker, Wnt8b-linker y GFP-linkers

Comenzamos con la elaboración de las secuencias Wnt2-linker, Wnt8b-linker y GFP-linkers. Para ello realizamos ensayos de PCR utilizando primers con la secuencia linker. Para asegurarnos del éxito del ensayo llevamos a cabo dos protocolos de PCR con enzimas distintas, iProof y Advantage^R 2 Polymerase.

PCR mix iProof: 1 µL de Miniprep/Plásmido (200 ng/µL), 10 µL de 5x iProofTM Buffer, 2,5 µL de Fw primer (10 mM), 2,5 µL de Rv primer (10 mM), 1 µL de solución de dNTPs (10 mM), 2 µL de DMSO, 0,5 µL de Polimerasa iProof, 30,5 µL de H₂O.

PCR mix Advantage Polymerase: 1 µL de Miniprep/Plásmido (200 ng/µL), 5 µL de 10X Advantage[®] 2 SA PCR Buffer, 1 µL de Fw primer (10 mM), 1 µL de Rv primer (10 mM), 1 µL de solución de dNTPs (10 mM), 1 µL de Advantage 2 Polymerase Mix , 40 µL de H₂O.

Los primers usados fueron:

Fragmento	Fw Primer	Rv Primer
Wnt2-linker	Wnt2 Fw	Wnt2 linker R long
Wnt8b-linker	Wnt8b Fw	Wnt8b linker R long
GFP-linker Wnt2	linker Wnt2 GFP F long	GFP Rv
GFP-linker Wnt8b	linker Wnt8b GFP F long	GFP Rv

- Annealing PCR

Para la unión de los fragmentos previamente sintetizados mediante la PCR y la formación del constructo llevamos a cabo una Annealing PCR. De nuevo realizamos dos protocolos de PCR, iProof y Advantage^R 2 Polymerase.

PCR mix iProof: 10 µL de Miniprep 1 (Wnt8b-linker), 10 µL de Miniprep 2 (GFP-linker wnt8b), 10 µL de 5x iProofTM Buffer, 5 µL de Fw primer (10 mM), 5 µL de Rv primer (10 mM), 2 µL de solución de dNTPs (10 mM), 1 µL de DMSO, 1 µL de Polimerasa iProof, 16 µL de H₂O.

PCR mix Advantage Polymerase: 10 µL de Miniprep 1 (Wnt8b-linker), 10 µL de Miniprep 2 (GFP-linker wnt8b), 5 µL de 10X Advantage[®] 2 SA PCR Buffer, 5 µL de Fw primer (10 mM), 5 µL de Rv primer (10 mM), 2 µL de solución de dNTPs (10 mM), 1 µL de Advantage 2 Polymerase Mix , 1 µL de DMSO, 17 µL de H₂O.

Para realizar la annealing PCR primero introducimos la PCR mix en el termociclador sin añadir los primers y damos 10 ciclos de esta forma dejamos que durante estos 10 ciclos se formen los constructos completos sintetizando el DNA a ambos extremos del linker llenándose los huecos dejados cuando se da la unión de los dos fragmentos a través del linker. Luego añadimos los primers y damos otros 35 ciclos más para ahora si amplificar el fragmento. El programa utilizado fue el propio de cada enzima modificando la T^a de annealing a 68 °C y el tiempo de extensión a 10'.

- Inclusión en el plásmido

Incluimos el constructo en un plásmido pCS2+ para poder replicarlo y amplificarlo. Para ello llevamos a cabo primero una digestión del constructo y del plásmido para posteriormente ligarlos en una reacción permitiendo que el constructo se incluya dentro del plásmido.

Restriction digest mix de Wnt8b-GFP: 19 µL de constructo Wnt8b-GFP (53,3 ng/µL), 5 µL de 10x Buffer K, 2 µL de mix de enzima BamH1, 2 µL de enzima XhoI, 22 µL de H₂O.

Restriction digest mix de pCS2+: 15 µL de plásmido pCS2+ (196,6 ng/µL), 5 µL de 10x Buffer K, 4 µL de mix de enzima BamH1, 4 µL de enzima XhoI, 22 µL de H₂O.

Incubamos 1h 30' a 37 °C.

Para llevar a cabo la inclusión del constructo en el plásmido hacemos una reacción con una proporción cantidad numérica de inserto:plásmido de 3:1.

Ligation mix: 0,51 μL de plásmido, 2,47 μL de inserto, 2 μL de 10x Buffer, 1 μL de ligasa T4, 14,02 μL de H_2O .

Dejamos actuar la reacción a RT durante 2 h. Posteriormente inactivamos la enzima incubando 10' a 64 °C.

- Retransformación de bacterias y amplificación del plásmido

Para la retransformación en bacterias llevamos a cabo el mismo protocolo seguido en la retransformación de estas con Wnt2 y Wnt8b con algunas diferencias. Para asegurarnos una mayor efectividad de la transformación añadimos 10 μL del plásmido a los 50 μL de bacterias (en vez de 1 μL), además a la hora de sembrar las bacterias ya transformadas en placas sembraremos 2 placas, una con 60 μL y otra con 240 μL (en vez de 30 μL). En este caso utilizamos como solución de plásmido la muestra resultado del proceso anterior de ligación del constructo al plásmido pCS2+. Generamos 8 cultivos a partir de 8 colonias independientes.

- Extracción y Miniprep

Llevamos a cabo la extracción y purificación del plásmido siguiendo el mismo protocolo descrito para la sobreexpresión de Wnt2 y Wnt8b.

- PCR y digestión de comprobación

Para comprobar cuáles de los plásmidos extraídos y purificados presentaban el constructo llevamos a cabo una PCR y una digestión de comprobación.

PCR mix: 1 μL de Miniprep, 10 μL de 5x iProof™ Buffer, 2,5 μL de Wnt8b Fw Primer (10 mM), 2,5 μL de GFP Rv Primer (10 mM), 1 μL de solución de dNTPs (10 mM), 1 μL de DMSO, 0,5 μL de Polimerasa iProof, 31,5 μL de H_2O .

Llevamos a cabo la PCR en el termociclador.

Restriction digest mix: 4 μL de Miniprep, 2 μL de Buffer K, 1 μL de BamH1, 1 μL de XhoI, 12 μL de H_2O .

Incubamos 1 h 30' a 37 °C.

Observamos los resultados de la PCR y la digestión llevando a cabo una electroforesis con los productos de la reacción en gel de agarosa 1,2%.

- Síntesis de mRNA

Llevamos a cabo la síntesis de mRNA siguiendo el mismo protocolo descrito para síntesis de mRNA de *wnt2* y *wnt8b*. Este se hizo inicialmente con la Miniprep 3 y posteriormente ante la sospecha de un fallo en este paso se repitió utilizando la Miniprep 4.

- Inyección

Inyectamos un volumen de 1 nL en la célula de los embriones en el estadio de una célula, siguiendo el mismo protocolo previamente descrito.

Realizamos dos ensayos de inyección a distintas concentraciones, 20 y 80 ng/μL.

Mix de inyección 1 (20 ng/μL): 0,5 μL de mRNA (Miniprep 3) (200 ng/μL), 0,4 μL de Fenol Red, 4,4 μL de H₂O.

Mix de inyección 2 (80 ng/μL): 0,8 μL de mRNA (Miniprep 4) (500 ng/μL), 0,4 μL de Fenol Red, 4,4 μL de H₂O.

Incubamos a 24 h a 28 °C y observamos los resultados, esta vez en una lupa con emisión excitadora para capturar fluorescencia.

Bibliografía

1. Cardozo MJ, Almuedo-Castillo M, Bovolenta P. Patterning the Vertebrate Retina with Morphogenetic Signaling Pathways. Vol. 26, *Neuroscientist*. SAGE Publications Inc.; 2020. p. 185–96.
2. Kimmel CB, Ballard WW, Kimmel SR, Ullmann B, Schilling TF. Stages of embryonic development of the zebrafish. *Developmental Dynamics*. 1995;203(3):253–310.
3. Li Z, Joseph NM, Easter SS. The morphogenesis of the zebrafish eye, including a fate map of the optic vesicle. *Developmental Dynamics*. 2000;218(1):175–88.
4. Rojas M, Iskra ;, Signore A, Mejías R. Morfógenos Durante el Desarrollo Embrionario de Vertebrados Morphogens During Embryonic Development of Vertebrates. Vol. 32, *Int. J. Morphol.* Ashe & Briscoe; 2001.
5. Almuedo-Castillo M, Bläßle A, Mörsdorf D, Marcon L, Soh GH, Rogers KW, et al. Scale-invariant patterning by size-dependent inhibition of Nodal signalling. *Nat Cell Biol*. 2018 Sep 1;20(9):1032–42.
6. Marshall WF. A Dilution Model for Embryonic Scaling. Vol. 46, *Developmental Cell*. Cell Press; 2018. p. 529–30.
7. Garric L, Bakkers J. Shaping up with morphogen gradients. *Nat Cell Biol*. 2018 Sep 1;20(9):998–9.
8. Sasai Y. Cytosystems dynamics in self-organization of tissue architecture. Vol. 493, *Nature*. 2013. p. 318–26.
9. Lescher B, Haenig B, Kispert A. sFRP-2 is a target of the Wnt-4 signaling pathway in the developing metanephric kidney. *Developmental Dynamics*. 1998;213(4).
10. Esteve P, Sandonis A, Ibañez C, Shimono A, Guerrero I, Bovolenta P. Secreted frizzled-related proteins are required for Wnt/ β -catenin signalling activation in the vertebrate optic cup. *Development*. 2011;138(19).
11. Komiya Y, Habas R. Wnt signal transduction pathways. Vol. 4, *Organogenesis*. 2008.
12. Habas R, Dawid IB. Dishevelled and Wnt signaling: Is the nucleus the final frontier? *J Biol*. 2005;4(1).
13. Yamaguchi TP. Heads or tails: Wnts and anterior-posterior patterning. *Current Biology*. 2001;11(17).
14. Lin X. Functions of heparan sulfate proteoglycans in cell signaling during development. Vol. 131, *Development*. 2004.
15. Veien ES, Rosenthal JS, Kruse-Bend RC, Chien C Bin, Dorsky RI. Canonical Wnt signaling is required for the maintenance of dorsal retinal identity. *Development*. 2008;135(24):4101–11.
16. Martínez-Morales JR, Rodrigo I, Bovolenta P. Eye development: A view from the retina pigmented epithelium. Vol. 26, *BioEssays*. 2004. p. 766–77.
17. Wartlick O, Kicheva A, González-Gaitán M. Morphogen gradient formation. Vol. 1, *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 2009.

18. Kimmel CB, Warga RM, Schilling TF. Origin and organization of the zebrafish fate map. Vol. 108, *Development*. 1990.
19. Kennedy BN, Stearns GW, Smyth VA, Ramamurthy V, Van Eeden F, Ankoudinova I, et al. Zebrafish rx3 and mab21l2 are required during eye morphogenesis. *Dev Biol*. 2004 Jun 15;270(2):336–49.
20. Yin J, Morrissey ME, Shine L, Kennedy C, Higgins DG, Kennedy BN. Genes and signaling networks regulated during zebrafish optic vesicle morphogenesis. *BMC Genomics*. 2014;15(1).
21. Loosli F, Staub W, Finger-Baier KC, Ober EA, Verkade H, Wittbrodt J, et al. Loss of eyes in zebrafish caused by mutation of chokh/rx 3. *EMBO Rep*. 2003;4(9).
22. Rojas-Muñoz A, Dahm R, Nüsslein-Volhard C. chokh/rx3 specifies the retinal pigment epithelium fate independently of eye morphogenesis. *Dev Biol*. 2005 Dec 15;288(2):348–62.
23. de Souza FSJ, Placzek M. Conserved roles of Rax/rx3 genes in hypothalamus and pituitary development. *International Journal of Developmental Biology*. 2021;65(5–6):195–205.
24. Schulte G. Frizzleds and WNT/ β -catenin signaling - The black box of ligand-receptor selectivity, complex stoichiometry and activation kinetics. *Eur J Pharmacol*. 2015 Sep 15;763:191–5.
25. Kikuchi A, Yamamoto H, Sato A. Selective activation mechanisms of Wnt signaling pathways. Vol. 19, *Trends in Cell Biology*. 2009. p. 119–29.
26. Kim SH, Shin J, Park HC, Yeo SY, Hong SK, Han S, et al. Specification of an anterior neuroectoderm patterning by Frizzled8a-mediated Wnt8b signalling during late gastrulation in zebrafish. *Development*. 2002;129(19).
27. Kelly GM, Moon RT. Involvement of Wnt1 and Pax2 in the formation of the midbrain-hindbrain boundary in the zebrafish gastrula. Vol. 17, *Developmental Genetics*. 1995.
28. Chen X, Zaro JL, Shen WC. Fusion protein linkers: Property, design and functionality. Vol. 65, *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2013. p. 1357–69.
29. Moreno-Mateos MA, Vejnar CE, Beaudoin JD, Fernandez JP, Mis EK, Khokha MK, et al. CRISPRscan: Designing highly efficient sgRNAs for CRISPR-Cas9 targeting in vivo. *Nat Methods*. 2015;12(10).
30. Vejnar CE, Moreno-Mateos MA, Cifuentes D, Bazzini AA, Giraldez AJ. Optimization strategies for the CRISPR-Cas9 genome-editing system. *Cold Spring Harb Protoc*. 2016;2016(10).