



Universidad de Concepción
Dirección de Postgrado
Facultad de Ciencias Biológicas -Programa de Magíster en Bioquímica y
Bioinformática

**ROL TRANSCRIPCIONAL DE SECUENCIAS REPETIDAS
INSERTAS EN UN ENHANCER OSTEoblÁSTICO DEL GEN
COL1A1 DE *XENOPUS TROPICALIS*.**

Tesis para optar al grado de Magíster en Bioquímica y Bioinformática

PEDRO FELIPE CONTRERAS OVIEDO
CONCEPCIÓN-CHILE
2017

Profesor Guía: Dr. Sylvain Marcellini Liotaud
Dpto. de Biología Celular y Molecular, Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

Esta tesis ha sido realizada en el Departamento de Biología Celular y Molecular de la Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción.

Profesor tutor

Dr. Sylvain Marcellini L.
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

Comisión Evaluadora:

Dr. Fernando Cruzat C.
Facultad de Ciencias Naturales y
Oceanográficas
Universidad de Concepción

Dra. Marcela Torrejón Q.
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

Director de Programa

Dra. Violeta Morín M.
Facultad de Ciencias Biológicas

AGRADECIMIENTOS

Mis agradecimientos al tutor de esta tesis el Dr. Sylvain Marcellini, por recibirme en su laboratorio siendo solo un estudiante de pre-grado con ganas de aprender, además de entregarme su confianza y apoyo a lo largo de estos años de trabajo en el LADE.

También agradezco de manera general a todo el equipo del LADE, que día a día generan un ambiente de trabajo que no se encuentra en todas partes y que fue fundamental para mantener la motivación durante todo el proceso de desarrollo de esta tesis.

Tesis Financiada por:

Proyecto FONDECYT REGULAR # 1151196



TABLA DE CONTENIDO

ÍNDICE DE FIGURAS	vi
ÍNDICE DE TABLAS	vii
ABREVIATURAS	viii
RESUMEN	x
ABSTRACT	xi
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Regulación Transcripcional	1
1.1.1. Promotores Basales	1
1.1.2. Los Enhancers	2
1.2. Secuencias Repetidas	7
1.2.1. Características generales	7
1.2.2. Secuencias repetidas y función regulatoria	9
1.3. Desarrollo óseo	14
1.3.1. Origen evolutivo de los tejidos esqueléticos	14
1.3.2. Bases celulares y moleculares de la osteogénesis	15
1.4. <i>Xenopus tropicalis</i> como modelo de estudio	18
1.4.1. Características generales	18
1.4.2. Secuencias repetidas en <i>X. tropicalis</i>	19
1.5. Contexto de estudio y resultados previos	20
2. HIPÓTESIS	22
3. OBJETIVOS	23
3.1. Objetivo General:	23
3.2. Objetivos específicos:	23
4. MATERIALES Y METODOS	24
4.1. Mantenimiento de animales y eutanasia	24
4.2. Transformación de plásmidos en bacterias competentes y purificación	24
4.3. Electroforesis en gel de agarosa	25
4.4. Amplificación por PCR	25
4.5. Clonamiento de productos de PCR	27

4.6. Recombinación mediante tecnología GATEWAY™	27
4.7. Análisis mediante enzimas de restricción	27
4.8. Cultivo primario de osteoblastos	27
4.9. Electroporación de osteoblastos mediante sistema Neon™	29
4.10. Análisis mediante citometría de flujo.....	29
5. RESULTADOS	30
5.1. Estandarización de condiciones de electroporación y cuantificación por citometría de flujo para osteoblastos primarios de <i>X. tropicalis</i>	30
5.2. Medición de actividad transcripcional para el Enhancer-1073 sin secuencia repetida mediante citometría de flujo.....	34
5.3. Amplificación por PCR y clonamiento de la secuencia repetida presente en el Enhancer-1073	38
5.4. Medición de actividad transcripcional para secuencia repetida por si sola mediante citometría de flujo.	42
6. DISCUSIÓN	45
6.1. El sistema de electroporación/Citometría representa una mejora significativa respecto a la metodología FuGENE/microscopía.....	45
6.2. Las repeticiones del enhancer 1073 coinciden precisamente con un contexto adecuado de marcas de histona.....	48
6.3. La región repetida presente en el Enhancer-1073 es necesaria y suficiente para la actividad transcripcional de este elemento regulatorio.	50
6.4. La actividad transcripcional de secuencias repetidas podría estar asociada a la diversificación de células esqueléticas en vertebrados.....	53
7. CONCLUSIONES	60
8. PROYECCIONES	61
8.1. Validación del modelo propuesto	61
8.2. Análisis <i>in vivo</i>	61
9. REFERENCIAS	62

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Impacto de una secuencia repetida sobre la función regulatoria del enhancer nPE1	13
Figura 2: Primer análisis de fluorescencia por citometría de flujo.....	33
Figura 3: Graficas de citometría de flujo para el análisis de la actividad transcripcional para el Enhancer-1073 sin secuencia repetida.....	36
Figura 4: Análisis estadístico de la actividad transcripcional para el Enhancer-1073 sin secuencia repetida.....	37
Figura 5: Amplificación por PCR y clonamiento de la repetición presente en el Enhancer-1073.....	40
Figura 6: Estrategia de clonamiento para la generación del vector de expresión con la secuencia repetida por si sola.....	41
Figura 7: Graficas de citometría de flujo para el análisis de la actividad transcripcional para secuencia repetida por sí sola.....	43
Figura 8: Análisis estadístico de la actividad transcripcional para la secuencia repetida presente en el Enhancer-1073.....	44
Figura 9: La secuencia repetida del Enhancer-1073 presenta un contexto cromatínico compatible con una función de enhancer activo.....	49
Figura 10: Modelos propuestos para la función de la secuencia repetida presente en el Enhancer-1073.....	52
Figura 11: Modelo propuestos para el rol que puede cumplir la movilización de secuencias repetida en la evolución de tipos celulares esqueléticos.....	58

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Comparación en los niveles de las marcas de histonas de promotores basales y enhancers	6
Tabla 2: Resumen de secuencias repetidas presentes en elementos <i>cis</i> -regulatorios.....	11
Tabla 3: Resumen de enhancers osteoblásticos caracterizados en la literatura.....	17
Tabla 4: Partidores generados para la amplificación mediante PCR.....	26
Tabla 5: Cuantificación de eficiencias de electroporación con el sistema Neon™ en osteoblastos primarios de <i>X. tropicalis</i>	32



ABREVIATURAS

ADN: Ácido Desoxirribonucleico.

ADNr: ADN ribosomal.

ADNt: ADN de transferencia.

ARN: Ácido Ribonucleico.

ARN polIII: ARN Polimerasa dos.

ARN-seq: Secuenciación de Ácidos Ribonucleicos.

BLAST: Herramienta Básica de Búsqueda de Alineación Local.

BLAT: Herramienta similar a BLAST.

ChIP-seq: Inmunoprecipitación de cromatina acoplada a secuenciación.

CMV: Promotor ubicuo de Citomegalovirus.

GFPn: Proteína Fluorescente Verde nuclear.

H3K4me1: Mono metilación de lisina cuatro de la histona tres.

H3K4me3: Tri metilación de lisina cuatro de la histona tres.

H3K27ac: Acetilación de lisina veintisiete de la histona tres.

H3K27me3: Tri metilación de lisina veintisiete de la histona tres.

LADE: Laboratorio de Desarrollo y Evolución.

NF: Nieuwkoop y Faber.

PB: Promotor Basal

pb: Pares de bases

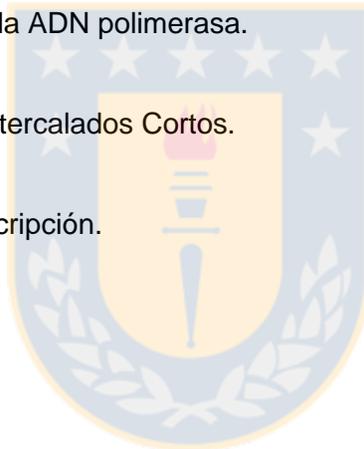
kb: Kilo pares de bases

mb: Mega pares de bases

PCR: Reacción en cadena de la ADN polimerasa.

SINE: Elementos Nucleares Intercalados Cortos.

SIT: Sitio de Inicio de la Transcripción.



RESUMEN

Los enhancers son elementos regulatorios que actúan sobre un promotor basal diana para controlar la transcripción génica. Por otra parte, las secuencias repetidas resultan de múltiples re-arreglos genómicos acumulados a través del tiempo evolutivo. Existe evidencia de su potencial rol en la regulación transcripcional cuando se encuentran presentes en enhancers o promotores. No obstante, dichos estudios se encuentran restringidos en su mayoría a modelos mamíferos y a unos pocos tejidos, principalmente neurales y placenta. Hasta la fecha dicho fenómeno no ha sido estudiado ni en anfibios ni en tejido óseo.

En el presente trabajo, nos enfocamos en un enhancer óseo del gen *Col1a1* de la rana africana *X. tropicalis* el cual se encuentra invadido por una región repetida cuyas copias se encuentran presentes en cientos de otras regiones genómicas. Estudios previos de nuestro laboratorio revelaron que este elemento regulatorio, denominado Enhancer-1073, es capaz de activar la expresión del reportero GFPn en osteoblastos primarios de *X. tropicalis*, y que además, esta actividad transcripcional es dependiente de la presencia de secuencias repetidas que lo invaden.

Hemos desarrollado un protocolo experimental novedoso y más eficiente, el cual combina la electroporación de osteoblastos primarios de *X. tropicalis* con un posterior análisis de intensidad de fluorescencia mediante citometría de flujo. Estas mejoras experimentales no solo permitieron validar los resultados obtenidos en los estudios previos, sino también, permitieron demostrar que la región repetida del Enhancer-1073 es suficiente para recapitular la actividad transcripcional del enhancer completo. Este es un estudio único en su clase, el cual además de expandir el espectro de enhancers invadidos por secuencias repetidas a un nuevo tejido (hueso) y modelo experimental (*Xenopus*), es el primero en demostrar el rol funcional de las secuencias repetidas en enhancers activos de hueso. Adicionalmente, entregamos un aporte conceptual al campo de la diversificación de los distintos tipos celulares esqueléticos. Proponemos un modelo para explicar cómo la movilización de secuencias repetidas incluidas en enhancers permitió co-optar el programa genético involucrado en formación de matriz cartilaginosa mineralizada presente en un vertebrados ancestral, para facilitar la emergencia evolutiva de los osteoblastos y, por ende, del tejido óseo *per se*.

ABSTRACT

Enhancers are regulatory elements acting upon their target basal promoters to exert a transcription control on gene expression. Repeated sequences result from complex series of genomic rearrangements accumulating over evolutionary time. Experimental evidence has demonstrated that, at least in some instances, repeated sequences included within enhancers and promoters contribute to transcriptional control. However, in vertebrate models, such studies are restricted to a few mammalian tissues such as the brain and placenta.

In the present work, we focus in an bone enhancer of the *Col1a1* gene from the african frog *X. tropicalis* which is invaded by a highly repeated region whose copies are present in hundreds of other genomic locations. Previous studies of our laboratory revealed that this regulatory element, named Enhancer-1073, is able to drive the expression of the reporter protein GFPn in primary osteoblasts of *X. tropicalis*, and that its transcriptional activity depends on the presence of repeated sequences it contains.

Here, we have developed a novel and more efficient experimental protocol, which combines the electroporation of *X. tropicalis* primary osteoblasts with a posterior fluorescence intensity analysis by flow citometry. These improvements not only allowed the validation of our previous results, but also allowed us to demonstrate that the repeated region of the Enhancer-1073 is sufficient to recapitulate the transcriptional activity from the whole enhancer. This is the first study, which, in addition to expanding the range of enhancers invaded by repeated sequences to a new tissue (Bone) and experimental model (*Xenopus*), is the first to demonstrate the functional role of repeated sequences included within active bone enhancers. Additionally, we provide a conceptual input to the field of skeletal cell type evolution. We propose a model to explain how the mobilization of repeated sequences embedded within enhancers allowed the co-option of the genetic program involved in cartilage matrix mineralization present in an ancient vertebrate, to facilitate the evolutionary emergence of osteoblast and, thus, of the bone tissue *per se*.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Regulación Transcripcional

La regulación de la proliferación y de la diferenciación celular, y por ende del desarrollo en animales y plantas depende de la correcta producción de ARNm específicos por parte de la ARN polimerasa II (ARNp_oII). Los mecanismos que rigen dicha regulación han sido objeto de intensos estudios genéticos, bioquímicos y computacionales. La estructura génica de los vertebrados es compleja, normalmente se encuentra compuesta por la unidad transcripcional y distintos elementos cis-reguladores que controlan su expresión espacio-temporal. Dentro de los dos diferentes tipos de elementos cis-reguladores conocidos, los promotores basales y los enhancers cumplen un rol preponderante en los fenómenos de activación transcripcional y serán descritos a continuación.

1.1.1. Promotores Basales

El promotor basal (también conocido como “core promoter” en inglés) (Atkinson y Halfon, 2014), abarca aproximadamente 35 a 40 pb tanto río arriba como río abajo desde el sitio de inicio de la transcripción (SIT) (Smale y Kadonaga, 2003) y se encuentra compuesto por una serie de motivos característicos como la caja TATA, el elemento Inr (elemento iniciador), islas CpG, el motivo TCT (motivo iniciador de polipirimidina), BRE (elemento de reconocimiento para TFIIB), DPE (elemento río abajo del promotor), MTE (elemento motivo diez) y DCE 1, 2 y 3 (elementos esenciales corriente abajo) (Juven-Gershon y col., 2008). Estos motivos característicos le permiten al promotor basal reclutar tanto a los factores asociados a la transcripción como a la ARN polimerasa II (Goodrich y Tjian, 2010). Así, es posible definir distintas categorías de promotores basales en función de los motivos asociados al sitio de inicio de transcripción. Un ejemplo es el cambio en el transcriptoma desde la etapa maternal a la etapa de cigoto en vertebrados, el cual está regulado por el uso de dos tipos distintos de motivos en los promotores basales

siendo este acompañado por un cambio en el posicionamiento de nucleosomas (Haberle y col., 2014). El promotor basal no tiene la capacidad de gatillar el proceso de transcripción por sí solo, para que esto ocurra se necesita la presencia de elementos regulatorios externos al promotor basal los cuales se denominan enhancers (Harmston y Lenhard, 2013). En este trabajo emplearemos la palabra inglesa “enhancer” para referirse a este tipo de elementos cis-regulatorios, dado que es la más comúnmente utilizada en la literatura científica y para la cual no existe traducción directa al castellano.

1.1.2. Los Enhancers

En general, se puede definir un enhancer como una región de ADN que tiene la capacidad de potenciar la actividad mínima de un promotor basal para activar la transcripción, independiente a su orientación y ubicación en el cromosoma (Smallwood y Ren, 2013). El tamaño de los enhancers puede variar desde los 200 pb a 1 kb (Levine, 2010), se ha descrito que su ubicación puede ser cercana o muy alejada del promotor basal, llegando incluso a distancias de hasta 1 mb (Bulger y Groudine, 2011). Los enhancers que se encuentran ubicados hasta 5kb río arriba del promotor basal son denominados enhancers proximales y constituyen aproximadamente el 15% de los casos (Rada-Iglesias y col., 2011). El 85% de los casos corresponde a enhancers que se encuentran ubicados a más de 5 kb del promotor basal, estos se denominan enhancer distales (Barolo, 2012; Buecker y Wysocka, 2012). Es frecuente encontrarse con el término “promotor” haciendo referencia al conjunto formado por el promotor basal y su respectivo enhancer proximal.

Una de las principales características de los enhancer es que contienen conjuntos de sitios de unión a factores de transcripción (Eeckhoute y col., 2009). Cada enhancer tiene la capacidad de reclutar factores de transcripción específicos, por lo que cumplen un rol fundamental en distintos procesos celulares, como por ejemplo,

durante la diferenciación celular (Ong y Corces, 2012; Rister y Desplan, 2010; Spitz y Furlong, 2012). Esto último se debe más precisamente a la participación de distintas vías de señalización en el correcto funcionamiento de enhancers, un ejemplo de esto son las vías Notch, TGF- β y Wnt cuyos efectores citoplasmáticos convergen sobre enhancers específicos para la correcta expresión de los genes blancos de dichas vías (Barolo y Posakony, 2002). Del punto de vista mecánico, se ha propuesto que los enhancers distales reclutan combinaciones específicas de factores de transcripción, lo que facilita la interacción con el promotor basal mediante la formación de un bucle de ADN, gatillando así la elongación transcripcional mediada por la ARN polimerasa II (Krivega y Dean, 2012; Smallwood y Ren, 2013; Bulger y Groudine, 2011).

Algunos genes presentan más de un enhancer que los regula. Su actividad puede ser modular, puesto que un enhancer puede estar asociado a la expresión de un gen en un tejido determinado y otro enhancer regular la expresión del mismo gen en otro tejido o en otro momento del desarrollo. Un ejemplo de esto es el gen *Bmp2*, cuyo patrón de expresión fue analizado mediante el uso de dos cromosomas bacterianos artificiales (BAC), abarcando 392.5kb alrededor de la unidad transcripcional del gen, asociados al gen reportero *lacZ* y una posterior generación de ratones transgénicos para cada BAC (Chandler, 2007). El análisis de los transgénicos reveló patrones de expresión diferenciales, estando la región 5' de *Bmp2* relacionada con la expresión en tejidos cartilagosos, mientras que la región 3' del gen conduce la expresión en tejidos óseos. Un análisis más detallado de la región 3' permitió la identificación de un enhancer específico de progenitores osteoblásticos ubicado 156kb corriente abajo del promotor.

Como hemos mencionado, la mayor parte de los enhancers se encuentran alejados del sitio de inicio de la transcripción del gen que regulan, dificultando su identificación (Harmston y Lenhard, 2013; Rada-Iglesias y col., 2011). En la última década, técnicas como la inmunoprecipitación de cromatina acoplada a ensayos de

microarreglo (ChIP-chip) o secuenciación masiva (ChIP-seq) han ayudado a resolver este problema (Zinzen y col., 2009). Se ha demostrado que los enhancers distales poseen marcas o patrones epigenéticos característicos que los diferencian de otros elementos regulatorios tales como los insuladores, silenciadores o promotores basales (Rada-Iglesias y col., 2011; Rando, 2012). Los enhancers distales presentan marcas que corresponden a modificaciones post-traduccionales en las colas de la Histona 3 (H3). De manera más específica, hablamos de un fuerte enriquecimiento de la mono-metilación de la lisina 4 (H3K4me1) y de la acetilación de la lisina 27 (H3K27ac), de una moderada tri-metilación de la Lisina 4 (H3K4me3), además de una depleción de la tri-metilación en la lisina 27 (marca represiva H3K27me3) (ver Tabla 1 y Andersson y col., 2014; Creighton y col., 2010; Pekowska y col., 2011). Este tipo de modificaciones se generan mediante la actividad de enzimas especializadas que son capaces de agregar y remover grupos metilos y acetilos, entre otros (Chen y Dent, 2014).

Recientemente se ha descubierto que no solo es necesaria la presencia de las marcas H3K4me1 (para enhancers) y H3K4me3 (para promotores), estas también deben presentar un patrón local específico. El patrón denominado pico-valle-pico se encuentra enriquecido en enhancers y promotores activos, este consiste en dos picos asimétricos en la marca. Los enhancers que presentan H3K4me1 sin el patrón “pico-valle-pico” generalmente son inactivos (Pundhir y col., 2016). La capacidad de los enhancer para reclutar a factores de transcripción está asociada a la concentración de sitios de unión de factores de transcripción y a una densidad de histonas en la cromatina relativamente baja a nivel del “valle”, lo cual de alguna manera es coherente con el patrón de modificación de las histonas presente en estas regiones (Buecker y Wysocka, 2012).

Recientemente se ha descubierto que no solo es necesaria la presencia de las marcas H3K4me1 (para enhancers) y H3K4me3 (para promotores), estas también deben presentar un patrón local específico. El patrón denominado pico-valle-pico se encuentra enriquecido en enhancers y promotores activos, este consiste en dos picos asimétricos en la marca. Los enhancers que presentan H3K4me1 sin el patrón “pico-valle-pico” generalmente son inactivos (Pundhir y col., 2016). La capacidad de los enhancer para reclutar a factores de transcripción está asociada a la concentración de sitios de unión de factores de transcripción y a una densidad de histonas en la cromatina relativamente baja a nivel del “valle”, lo cual de alguna manera es coherente con el patrón de modificación de las histonas presente en estas regiones (Buecker y Wysocka, 2012).



Marca de histona	Promotor			Enhancer		
	Activo	Inactivo	Bivalente	Activo	Inactivo	Poised
H3K4me1	Bajo	Alto	Variable	Alto	Alto	Alto
H3K4me3	Alto	Variable	Alto	Moderado	Bajo	Variable
H3K27ac	Variable	Bajo	Variable	Alto	Bajo	Variable
H3K27me3	Ausente	Alto	Alto	Ausente	Alto	Alto

Tabla 1. Comparación en los niveles de las marcas de histonas de promotores basales y enhancers. Según estas marcas, para que un promotor se considere activo debe tener bajos niveles de H3K4me1 la cual se considera una marca represora en promotores, caso contrario a la H3K4me3 la cual debe encontrarse en niveles altos. Existen también los promotores denominados Bivalentes, presentan tanto las marcas de un promotor activo (H3K4me3), como de uno inactivo (H3K27me3) (Voigt y col. 2013). En el caso de los enhancers, para considerarse activos deben tener altos niveles de las marcas H3K4me1, H3K27ac y ausencia de la marca represora H3K27me3. Existen enhancers que presentan altos niveles de H3K27me3 junto con las marcas características de un enhancer activo, estos se denominan “poised enhancers” y hacen referencia a un estado inactivo pero con potencial de activación rápida y fuerte de parte de este elemento regulatorio (Creyghton y col., 2010). Fuente: Elaboración propia.

1.2. Secuencias Repetidas

1.2.1. Características generales

El genoma se puede clasificar en secuencias únicas y secuencias repetidas, según el nivel de redundancia de cada una de ellas. Las secuencias repetidas son el resultado de múltiples re-arreglos genómicos acumulados a través del tiempo y presentan diferentes grados de conservación, donde en general, las que poseen un origen evolutivo más antiguo son más divergentes debido a que han tenido más tiempo para acumular mutaciones (Richard y col., 2008). Los elementos repetitivos se encuentran clasificados en dos grandes grupos, las repeticiones dispersas y las repeticiones organizadas en tándem. Dentro de las repeticiones dispersas encontramos a los genes parálogos, los pseudogenes, los retro genes (provenientes de la transcripción reversa de un ARNm), los ADNt (que dan origen a los ARNt) y los transposones (Richard y col., 2008). Dentro de los transposones de ADN encontramos distintas sub-clasificaciones:

- A. Clase I o retrotransposones:** estos elementos se replican usando un intermediario de ARN y una transcriptasa reversa. Dentro de esta clase de repeticiones encontramos tres grupos de elementos, clasificados según su estructura:
- LTR (long terminal repeat): codifican para las proteínas GAG y POL. En ambos extremos presentan LTRs con actividad promotora.
 - LINE (long interspersed nuclear element): presentan un 5' UTR con actividad promotora, 2 marcos de lectura abiertos y un 3' UTR con una cola de poli A.
 - SINE (short interspersed nuclear element): son elementos no autónomos, poseen un promotor interno para la polimerasa III. Alu es el SINE más común en el genoma humano y consiste en dos fragmentos ricos en CG unidos por una secuencia rica en A y terminan con una cola de poli A.

B. Clase II o transposones de ADN: normalmente codifican para su propia transposasa, la que reconoce las repeticiones terminales invertidas (TIR) presentes en estos elementos, para luego escindirlos e integrarlos en un nuevo lugar del genoma. Dentro de esta clase de repeticiones encontramos tres grupos de elementos, clasificados según su mecanismo de replicación:

- Elementos que se escinden como doble hebra de ADN y se insertan en el genoma por un clásico mecanismo de “cortar y pegar”. Un ejemplo de esto son los elementos P de *Drosophila*.
- Elementos que utilizan el mecanismo de círculo rodante. Un ejemplo son los elementos Helitrons.
- Elementos cuyo mecanismo de replicación no se comprende por completo y que además codifican para su propia ADN polimerasa. Un ejemplo son los elementos Mavericks.

Las secuencias repetidas se encuentran en distintos tipos de organismos, sin embargo, los porcentajes que representan en cada genoma son diferentes (Kramerov y Vassetzky, 2011). Por ejemplo, en rana constituyen aproximadamente un 33% del genoma (Hellsten y col., 2010), en pollo un 11% (International Chicken Genome Sequencing, 2004), en ratón un 37,5% (Mouse Genome Sequencing y col., 2002) y en humano un 46% (Lander y col., 2001).

1.2.2 Secuencias repetidas y función regulatoria

Ya en los años 60 se acuñaba el término “ADN Basura”, haciendo referencia a secuencias de ADN con la capacidad de acumular mutaciones libremente y que no presentan ningún rol funcional en el desarrollo, la fisiología o cualquier otra función de un organismo (Palazzo y Gregory, 2014). La base de datos ENCODE (enciclopedia de elementos de ADN) ha hecho quizás el esfuerzo más grande por encontrar regiones funcionales en genomas eucariontes. Sus autores señalan que al menos un 80% del genoma humano posee alguna función bioquímica y dan casi por descartada la existencia del “ADN basura” (Penissi, 2012.).

Sin embargo, esta afirmación no ha estado exenta de polémicas, las críticas a los resultados de ENCODE vienen desde varias partes de la comunidad científica, particularmente de los especialistas en evolución. Estos últimos señalan que ENCODE desprecia muchos de los principios evolutivos asociados a la dinámica de la estructura de genomas (Doolittle, 2013 y Graur y col., 2013). En general, resulta muy difícil encontrar regiones que cumplan una función regulatoria dentro de la fracción repetida del genoma, a pesar de esto, algunos trabajos han podido asociar dichas secuencias con la generación de nuevos sitios de corte y empalme (Lev-Maor y col., 2003), la amplificación de genes involucrados en la adaptación a cambios ambientales (Ubeda y col., 2014), generación de variabilidad genética en algunos tipos de células somáticas (Akagi y col., 2013), expansión de regiones que funcionan como insuladores en mamíferos (Schmidt y col., 2012), e incluso tienen la capacidad de dar lugar a nuevos genes a partir de otros pre existentes debido a la capacidad de algunas de estas secuencias (principalmente elementos transposables) para propagarse dentro del genoma (Volf, 2006). Además, se ha demostrado que mutaciones en secuencias repetidas dentro de intrones y regiones no traducidas (UTR) de algunos genes pueden derivar en patologías, como el caso del síndrome de Escalante (síndrome frágil X), la Ataxia de Friedreich y las distrofias miotónicas 1 y 2 (Gemayel y col., 2010).

Por otra parte, algunos estudios han encontrado presencia de secuencias repetidas insertas en distintos elementos regulatorios, demostrando además, que estas secuencias tienen incidencia en su función regulatoria (Tabla 2). Un ejemplo de esto, es el caso de uno de los enhancers que controla la expresión del gen *Pomc* mamíferos. *Pomc* es un gen expresado en el núcleo arqueado del hipotálamo en todos los mamíferos con mandíbula (Fig. 1A), su expresión es dirigida por dos enhancers ubicados río arriba del gen denominados nPE1 y nPE2, ambos altamente conservados en mamíferos. El enhancer nPE1 tiene un tamaño de 630 pb y posee un “core” de 144 pb que deriva de un retrotransposón de la familia de los SINE cuya secuencia es altamente conservada entre mamíferos placentarios. Con el fin de probar la hipótesis de que este “core” de 144 pb contiene secuencias funcionales críticas para la actividad transcripcional de nPE1 se realizaron análisis de expresión de reportero utilizando ratones transgénicos.

Para estos análisis se utilizó un constructo que contenía solo el “core” controlando la expresión de eGFP (Proteína Fluorescente Verde Potenciada) como reportero. Los resultados demostraron que esta secuencia de 144 pb por si sola era suficiente para recrear los patrones de expresión de *Pomc* en el núcleo arqueado del hipotálamo (Fig. 1B). En paralelo a este ensayo se utilizó un constructo con nPE1 carente del “core” controlando la expresión de eGFP, en este caso la versión mutada de nPE1 no fue capaz de reproducir los patrones de expresión de *Pomc*, demostrando así, que este “core” de 144 pb además de ser suficiente es necesario para la correcta expresión del gen *Pomc* (Franchini y col., 2011).

Especies	Repetición	Región	Efecto en regulación transcripcional	Ref.
Mamíferos	Transposones de ADN	PB, Enhancer	Creación de un enhancer proximal y PB del gen <i>Prolactin</i> .	(Gerlo y col., 2006)
		Enhancer	Propagación a escala genómica de enhancers activadores de genes relacionados con el embarazo.	(Lynch y col., 2011)
		Enhancer	Generación de enhancers involucrados en procesos biológicos relacionados con la eritropoyesis.	(Jjing y col., 2014)
	Retrovirus	Enhancer	Propagación a escala genómica de enhancer respondiendo a una lógica de regulación trofoblástica.	(Chuong y col., 2013)
		PB, Enhancer	Integración preferencial de CMV en enhancers activos y promotores.	(Lafave y col., 2014)
	Retrotransposones	Enhancer distal	Contribución a los enhancers involucrados en la mantención de la pluripotencia.	(Fort y col., 2014)
		Enhancer distal	Evolución del enhancer regulador para el gen <i>Pomc</i> .	(Franchini y col., 2011)
		Enhancer distal	Creación de un enhancer distal específico del gen neural <i>Islet1</i> .	(Bejerano y col., 2006)
		Enhancer distal	Creación de un enhancer específico del gen SATB2.	(Dong y col., 2010)
		PB, Enhancer	Elementos <i>Alu</i> promueven diferenciación celular en células de carcinoma humano.	(Morales-Hernández y col., 2016)
		Enhancer distal	Creación de un enhancer específico del gen Fgf8.	(French-Constant y col., 2006)
	Repeticiones en tándem	PB, Enhancer	Modulación en ciertas modificaciones de histonas y enriquecimiento de estas secuencias en varias condiciones clínicas relevantes.	(Gymrek y col., 2016)
	Pez	Pseudogenes	Enhancer distal	Antiguos exones de pseudogenes pueden transformarse en enhancer.
Moscas	Transposones de ADN	Enhancer proximal	Incrementa la expresión de un gen involucrado en resistencia a pesticidas.	(Gerlo y col., 2006)
Levadura	Repeticiones en tándem	Enhancer proximal	Los números de copias afectan la posición del nucleosoma y la producción de transcritos.	(Lynch y col., 2011)

Tabla 2. Resumen de secuencias repetidas presentes en elementos *cis*-regulatorios. Como se puede observar, la mayoría de estos estudios están realizados en modelos mamíferos (en los casos de modelos vertebrados), especialmente en ratón. Además, están generalmente enfocados a secuencias reguladoras asociadas a genes neurales o placentarios. PB: Promotor Basal. Fuente: Elaboración propia.



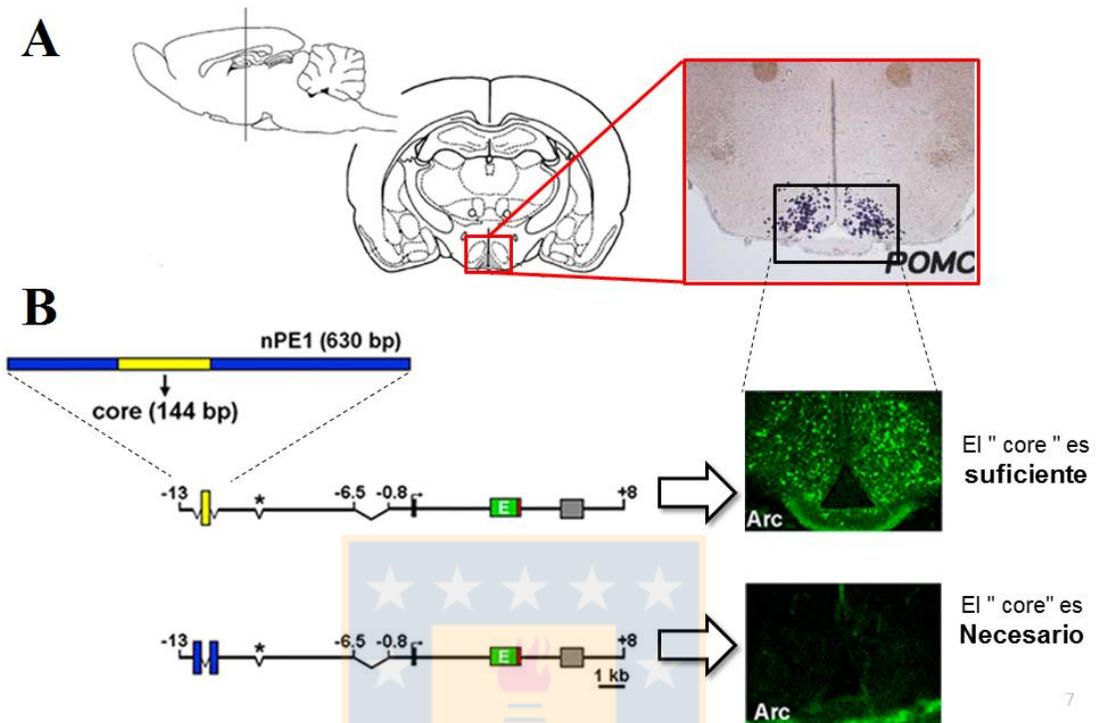


Figura 1. Impacto de una secuencia repetida sobre la función regulatoria del enhancer nPE1. **(A)** Patrón de expresión del gen *Pomc* en el núcleo arqueado del hipotálamo de ratón (recuadro rojo). **(B)** Estructura del enhancer nPE1 (azul), destacando el “core” de 144 pb (amarillo). Se muestran los constructos ocupados para obtener los ratones transgénicos, el primero solo con el “core” controlando la expresión del reportero eGFP logra repetir el patrón de expresión de *Pomc*, demostrando que el “core” es suficiente para la actividad regulatoria de nPE1. El segundo constructo que contiene nPE1 sin el “core” no es capaz de repetir el patrón de expresión de *Pomc*, por lo que se concluye que el “core” es necesario para la actividad de nPE1. Fuente: Modificado de Franchini y col., 2011.

A pesar de estos hallazgos, cabe destacar que las secuencias repetidas que se han encontrado dentro de enhancers o promotores basales, y que tienen alguna función regulatoria asociada a estos elementos cis-regulatorios están limitadas a unos pocos tejidos (neural y placenta), y además, están restringidos solo a modelos mamíferos y peces. No obstante, datos no publicados del Laboratorio de Desarrollo y Evolución (LADE), indican que existe una alta presencia de diversos tipos de repeticiones en enhancers óseos activos del anfibio *Xenopus tropicalis* (Hanna, 2014). Estos datos permiten expandir el espectro de enhancers invadidos por secuencias repetidas con un potencial rol regulador a un nuevo modelo experimental como los anfibios y a un nuevo tejido como es el hueso.

1.3. Desarrollo óseo

1.3.1 Origen evolutivo de los tejidos esqueléticos

El esqueleto vertebrado está compuesto de hueso y cartílago (Hall, 2005). La formación de tejido óseo mineralizado puede ocurrir mediante dos mecanismos: la osificación endocondral y la intramembranosa (Olsen y col., 2000). La Osificación endocondral consiste en la formación de un molde de cartílago que es posteriormente invadido por osteoblastos durante el proceso de osificación, este mecanismo es sobrellevado por los huesos largos. La mayor parte de los tejidos del esqueleto tienen un origen más ancestral, sin embargo el hueso endocondral parece tener un origen más reciente en los osteíctios (Contreras y col., 2017). Evidencia fósil, histológica, celular y genética, como por ejemplo, experimentos de rastreo de linaje celular que demuestran la existencia de grupos de condrocitos hipertróficos que evaden la apoptosis y se transdiferencian a osteoblastos en huesos largos de ratón, sumado a la presencia de hueso endocondral en elementos esqueléticos cartilagosos de distintos osteíctios han llevado a nuestro grupo de trabajo a plantear una nueva hipótesis con respecto al origen evolutivo de la osificación endocondral. En ella se plantea que la transdiferenciación de condrocitos

hipertróficos a osteoblastos podría haber tenido un rol importante en la aparición de este mecanismo de osificación (Contreras y col., 2017).

1.3.2 Bases celulares y moleculares de la osteogénesis

El esqueleto es una novedad evolutiva de los vertebrados, cuya aparición requirió del surgimiento de tipos celulares nuevos involucrados en la formación de cartílago (condroblastos y condrocitos), hueso (osteoblastos y osteocitos) y dientes (ameloblastos y odontoblastos) (Gomez-Picós y Eames. 2015; Hirasawa y Kuratani. 2015; Enault y col. 2015; Contreras y col., 2017). El origen de los vertebrados y las bases moleculares que están involucradas en la aparición de estos nuevos tipos celulares es un tema que genera muchas discusiones y del cual no se ha llegado a una conclusión que sea ampliamente aceptada por la comunidad científica. Una mejor comprensión de los mecanismos que permiten la diferenciación de las células óseas permitiría grandes avances en la prevención, diagnóstico y tratamiento de enfermedades relacionadas con este tejido que afectan al ser humano.

Los huesos planos son formados mediante osificación intramembranosa, en este proceso la mesénquima se diferencia directamente a hueso, proceso iniciado por la condensación de las células mesenquimales progenitoras, las cuales darán origen a las células osteoprogenitoras, que una vez comprometidas con el linaje osteoblástico generarán el osteoide, correspondiente a la matriz ósea inicialmente secretada sin mineralizar. Estas células darán origen a los osteoblastos maduros, encargados de formar la matriz extracelular ósea mediante la secreción de diversas proteínas y precursores que se depositarán a su alrededor. Finalmente, estas células se diferenciarán a osteocitos, el tipo celular más abundante del tejido óseo, las cuales, una vez completamente diferenciadas, se encuentran totalmente embebidas en la matriz mineralizada y se conectan entre ellas, y con las demás células óseas, a través de largas prolongaciones citoplasmáticas, formando una verdadera red celular dentro del hueso (Long, 2011; Marcellini y col., 2012; Fritz y col., 2016). Este es un fenómeno altamente regulado, donde las células activan una serie de genes en un

orden temporal definido. Por ejemplo, activación del factor de transcripción Runx2 es necesaria para que otros factores de transcripción óseo-específicos como Osterix puedan ser activados de manera sucesiva, formando así, una cascada de señalización necesaria para la correcta regulación del proceso osteogénico (Huycke y col., 2012; Marcellini y col., 2012; Nakashima y col., 2002). Se ha demostrado que ratones mutantes para Runx2 (Komori y col., 1997) y Osterix (Nakashima y col., 2002) son desprovistos de osteoblastos.

La diferenciación osteoblástica depende de la activación de numerosas vías de señalización como Wnt (Wingless/invested1), BMP (Bone Morphogenic Proteins), Hh (Hedgehog), FGF (Fibroblast Growth Factor) y Notch (Marcellini y col., 2012). La necesidad de comprender la secuencia de sucesos que llevan a la formación del tejido óseo ha precisado la búsqueda de regiones regulatorias que coordinen la expresión de los genes responsables de este proceso. La Tabla 3 presenta un resumen de los enhancers caracterizados en hueso. Como se puede apreciar, la información sobre la regulación transcripcional durante el desarrollo óseo en vertebrados fuera de los mamíferos es bastante escasa. Es por esto, que se hace llamativa la búsqueda de nuevos modelos de estudio que permitan tener una visión más amplia y completa sobre la regulación del desarrollo óseo.

Gen	Especie	Distancia del SIT (kb)	Ref.
<i>Tnfsf11</i>	Ratón	23	(Onal y col., 2016)
<i>Mmp13</i>	Ratón	-10, -20 y -30	(Meyer y col., 2015)
<i>Runx2</i>	Ratón	-3	(Kawane y col., 2014)
<i>BMP5</i>	Ratón	+128.9	(Guenther y col., 2008)
<i>BMP2</i>	Ratón	-185.4 y +207.1	(Chandler y col., 2007)
<i>DMP1</i>	Ratón	-8	(Kalajzic y col., 2004)
<i>Col1a1</i>	Ratón	-3.6	(Kalajzic y col., 2002)
<i>Col1a2</i>	Ratón	-19.5	(Bou-Gharios y col., 1996)
<i>BSP</i>	Ratón	-2.7	(Chen y col. 1996)
<i>Osteocalcina</i>	Humano, rata y pez	-1.7	(Renn y Winkler, 2009)
<i>Osx</i>	Pez	-4.1	(Inohaya y col., 2007)

Tabla 3. Resumen de enhancers osteoblásticos caracterizados en la literatura. Los enhancers óseos están caracterizados casi en su totalidad en mamíferos, con la excepción de los enhancers de Osterix (*Osx*) y Osteocalcina, ambos caracterizados también en pez. Los enhancers se muestran ordenados por especie y por año de caracterización. SIT: Sitio de Inicio de Transcripción. Fuente: Elaboración propia.

1.4. *Xenopus tropicalis* como modelo de estudio.

1.4.1 Características generales

Los anfibios en general presentan las ventajas de tener órganos internos similares a los mamíferos, como por ejemplo, su esqueleto. Además, se pueden obtener una gran cantidad de huevos controlando hormonalmente el momento de ovulación. La embriogénesis se produce *ex vivo* lo cual facilita el estudio de procesos dinámicos tales como la osteogénesis. Los embriones anfibios son muy resistentes a distintos procesos quirúrgicos como ablaciones y microinyecciones. Desde finales de la década de los 50s, *Xenopus laevis* ha sido el modelo de estudio anfibio más usado, lo cual es apoyado por una descripción de su desarrollo temprano que es precisa, elaborada y altamente reproducible (Kashiwagi y col., 2010). *Xenopus tropicalis*, pariente cercano de *X. laevis*, poco a poco ha ido ganando notoriedad como modelo de estudio, esto es debido a que presenta varias ventajas experimentales. *X. tropicalis* es un organismo diploide mientras que *X. laevis* es tetraploide por lo que posee un genoma mucho más grande y complejo (Graf y Fischberg , 1986; Hughes y Hughes, 1993; Wells y col., 2011). *X. tropicalis* posee un tiempo de crecimiento menor, el cual se hace tremendamente notorio en hembras, siendo de 30 semanas para *X. tropicalis* y entre 10 a 24 meses para *X. laevis* (Olmstead y col., 2009). Otro aspecto importante, es que muchos de los sistemas experimentales para *X. laevis* son aplicables para *X. tropicalis* tales como experimentos de mutagénesis (Goda y col., 2006), edición de genoma mediada por Cas-9 (Guo y col., 2014), transgénesis estable (Lane y col., 2013). Por último, al igual que *X. laevis*, *X. tropicalis* cuenta con un genoma completamente secuenciado, cuya versión 4.1 fue liberada en 2010 teniendo un tamaño aproximado de 1,7 Giga pb distribuido en 10 cromosomas. Se ha estimado, mediante el uso de métodos de predicción basados en similitud de secuencia, que contiene más de 20 mil genes que codifican para proteínas, incluyendo 1.700 genes asociados a enfermedades humanas (Hellsten y col., 2010).

1.4.2 Secuencias repetidas en *X. tropicalis*

Cerca de un 30% del genoma de *Xenopus tropicalis* corresponde a secuencias repetidas (Pollet y Mazabraud, 2006). La mayoría de las repeticiones identificadas en *X. tropicalis* corresponden a transposones de ADN (72%), mientras que sólo el 1% corresponde a retrotransposones LTR (Repetición Terminal Larga), 9% a retrotransposones no-LTR y 9% a repeticiones no transposables (Shen y col., 2013). Algunas secuencias repetidas presentes en el genoma de *X. tropicalis* son tan abundantes que pueden llegar a ser encontradas 1 millón de veces en el genoma, como es el caso de Xstir, un transposon de ADN de la familia MITE (Elementos de Transposición Repetidos-Invertidos en Miniatura) (Hikosaka y col., 2000).

A pesar de la evidencia mostrada sobre el contenido de secuencias repetidas en el genoma de *X. tropicalis*, estas nunca se han asociado con algún tipo de función o región reguladora en esta especie. Como se mencionó anteriormente, la única evidencia de presencia de estas secuencias en elementos cis-reguladores está en los datos generados en el LADE (Hanna, 2014). Estos datos abren la interrogante de si estas secuencias repetidas, al igual que en mamíferos y peces, tienen algún tipo de incidencia en la actividad transcripcional de estos elementos regulatorios. Es por esto que desde el punto de vista de la regulación transcripcional ósea, específicamente en la función transcripcional de secuencias repetidas presentes en enhancers óseos, *X. tropicalis* podría transformarse en una potente herramienta de estudio.

Entonces, de acuerdo con la información expuesta respecto a las secuencias repetidas, su implicancia en fenómenos regulatorios y su presencia en enhancers osteoblásticos de *X. tropicalis*, se ha considerado pertinente estudiar la relación directa que hay entre estas secuencias repetidas y la actividad transcripcional de estos elementos regulatorios. **De manera específica, se pretende dilucidar si estas secuencias son necesarias y/o suficientes para controlar la actividad**

transcripcional de un enhancer óseo en osteoblastos de *X. tropicalis*. Este es un estudio único en su clase, el cual además de expandir el espectro de enhancers invadidos por secuencias repetidas a un nuevo tejido (hueso) y modelo experimental (*Xenopus tropicalis*), será el primero en analizar el rol funcional de las secuencias repetidas en enhancers activos de hueso.

1.5 Contexto de estudio y resultados previos

Este trabajo está basado en un estudio previo en el cual se analizó un enhancer óseo denominado Enhancer-1073. Este es un enhancer de 1347 pb se encuentra aproximadamente a 63 kb río abajo del gen *Col1a1* de *X. tropicalis*. Previamente se había demostrado que en conjunto con el promotor basal del gen *Col1a1*, el Enhancer-1073 tiene la capacidad de activar el reportero GFP nuclear en osteoblastos primarios de *X. tropicalis* (Muñoz, 2015). Este enhancer presenta dos regiones altamente repetidas a escala genómica, las cuales se encuentran de manera colindante por lo que, para efectos experimentales, se les consideró como una sola repetición. Vista de esta manera, la repetición correspondería a una secuencia de 640 pb de largo, ubicada a 392 pb desde el inicio de la secuencia del enhancer.

Con el fin de demostrar que estas secuencias repetidas son necesarias para la función transcripcional del Enhancer-1073, se realizaron ensayos funcionales en un cultivo primario de osteoblastos de *X. tropicalis*. Estos tenían por propósito comparar la capacidad de activar un reportero fluorescente (GFPn) de dos versiones del Enhancer-1073, completo y carente de repeticiones. Los resultados indican que la fluorescencia generada por la actividad del Enhancer-1073 sin las secuencias repetidas se encuentra a niveles basales en comparación con el enhancer completo, confirmando la necesidad de estas repeticiones para la actividad transcripcional del enhancer (Contreras, 2016).

Un problema de estos resultados es su baja robustez estadística, dado principalmente por las aproximaciones metodológicas utilizadas. Por ejemplo, la transfección de los vectores de expresión mediante el reactivo FuGENE HD presenta una baja eficiencia en osteoblastos primarios de *X. tropicalis* (Bertin y col., 2015). Otro problema metodológico, corresponde a la cuantificación de la intensidad de fluorescencia total desde fotografías obtenidas por microscopía confocal, la cual depende mucho del estado de la muestra que está siendo fotografiada (Contreras, 2016).

Es por esto que en el presente trabajo de tesis hemos decidido dar solución a estas problemáticas, planteando nuevos ensayos funcionales mediante la electroporación de osteoblastos primarios con el sistema Neon™ y haciendo un posterior análisis de fluorescencia a través de citometría de flujo. Este es un acercamiento experimental nunca antes realizado en células de estas características, y constituye un gran avance en la optimización de estos ensayos tanto en robustez de los resultados como en costo operacional y tiempo de realización. Con estos avances pretendemos no solo validar los resultados obtenidos en los ensayos previamente mencionados, sino también, analizar la actividad transcripcional de la porción repetida del Enhancer-1073 por si sola, y dilucidar si esta contiene todos los elementos necesarios para reproducir la actividad transcripcional del enhancer completo.

2. HIPÓTESIS

Dado que las secuencias repetidas poseen un potencial rol regulatorio en enhancers de organismos vertebrados, sumado a la poca información existente a la fecha en cuanto a las regiones reguladoras de genes óseos durante el desarrollo, en este trabajo se plantea la siguiente hipótesis:

“El enhancer osteoblástico 1073 del gen *Col1a1* de *X. tropicalis* contiene secuencias repetidas que son necesarias y suficientes para su actividad transcripcional.”



3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo General:

Analizar si el enhancer osteoblástico 1073 del gen *Col1a1* de *X. tropicalis* contiene secuencias repetidas que son necesarias y suficientes para su actividad transcripcional.

3.2. Objetivos específicos:

3.2.1. Mejorar el sistema de co-expresión y cuantificación de proteínas fluorescentes verdes y rojas.

3.2.2. Determinar si la secuencia repetida presente en el Enhancer-1073 es necesaria para la actividad transcripcional de este elemento regulatorio.

3.2.3. Determinar si la secuencia repetida presente en el Enhancer-1073 es suficiente para la actividad transcripcional de este elemento regulatorio. 29



4. MATERIALES Y METODOS

4.1. Mantenimiento de animales y eutanasia

Esta tesis contempló el uso del anfibio *Xenopus tropicalis* como modelo experimental. Los adultos y los renacuajos de *X. tropicalis* se mantienen en agua limpia y filtrada constantemente en un bioterio localizado en la Facultad de Ciencias Biológicas. Allí se conservan altos estándares de higiene. La salinidad, la temperatura, pH y niveles de nitratos son monitoreados periódicamente y mantenidos constantes. Los adultos son alimentados dos veces por semana con pellets Reptomin (Aqualandia).

Todos los protocolos empleados fueron aprobados por el comité de Bioética de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad de Concepción, eutanasia fue realizada respetando estándares nacionales e internacionales de bioética (Close y col. 1996). Los renacuajos (estadios 59-61 según la tabla de desarrollo de *Xenopus* de Nieuwkoop & Faber) fueron anestesiados mediante incubación en una solución de 0.2g/l de la sal etil 3-aminobenzoato metanosulfonato (MS222, Sigma) diluida en buffer de bicarbonato antes de realizar el proceso de eutanasia por decapitación (Ramlochansingh y col. 2014; Close y col., 1996).

4.2. Transformación de plásmidos en bacterias competentes y purificación

Todas las transformaciones de plásmidos en bacterias se realizaron en la cepa *Escherichia coli* DH5- α (Invitrogen). Se utilizaron entre 3 y 5 μ l de reacción de ligación o recombinación para 50 μ l de bacterias recién descongeladas. Estas fueron incubadas en hielo por 30 min y luego sometidas a shock térmico, calentándolas en agua a 42°C por 45 s, a continuación se pusieron en hielo por 2 min. Se agregaron 200 μ l de medio SOC (caldo súper óptimo con represión de catabolitos) y se incubaron por 1 hora a 37°C con agitación a 200 rpm. Finalmente, entre 5 y 50% del volumen de bacterias transformadas se plaquearon directamente en placas de agar Luria-Bertani (LB) con 100 μ g/ml de ampicilina (USBiological) para vectores de

expresión o 100µg/ml de Kanamicina (USBiological) para vectores Entry. Las placas con bacterias se dejaron incubando a 37°C toda la noche.

Al día siguiente se aislaron las colonias que crecieron en las placas y se sometieron a PCR para analizar la presencia del inserto deseado, esto se realizó utilizando 5µl de GoTaq Green Master Mix (Promega), 0.4 µl de partidores 10 mM específicos para el inserto, 0.5 µl de colonia (la colonia estar diluida en una gota de medio LB con el antibiótico correspondiente) y 4.1 µl de agua nanopure. Las colonias que amplificaron de manera correcta se dejaron creciendo en medio LB con antibiótico toda la noche a 37°C con agitación a 200 rpm. Al día siguiente los plásmidos fueron purificados mediante el kit de purificación Midi prep (Quiagen) según las especificaciones del fabricante.

4.3. Electroforesis en gel de agarosa

Las electroforesis fueron realizadas en geles de agarosa al 1% en buffer TAE 1x (Tris-acetato 40mM y EDTA 1mM), teñidos con Bromuro de Etidio 0.1µg/ml. Se utilizó el buffer de carga 6x que contiene glicerol 30%, azul de bromofenol 0.5% en buffer TE (Tris-HCl 10mM, EDTA 1mM a pH 8). Se utilizaron 0.5µg de marcador de tamaños moleculares 2-Log (BioLabs), en 11µl totales en buffer de carga 1x, como estándar de peso molecular el cual abarca tamaños de ADN entre 0.1-10kpb. Las muestras fueron sometidas a un campo eléctrico de 90V por 40 minutos, sumergidos en buffer TAE 1x en una cámara de electroforesis. Los fragmentos de ADN fueron visualizados mediante transiluminador de luz ultravioleta acoplado a un equipo de fotodocumentación de geles (Vilber Lourmat) para la captura de imágenes.

4.4. Amplificación por PCR

Las PCR se realizaron en una reacción de 10 µl utilizando 5 µl del mix KOD HotStart Mix (Merck) (polimerasa de alta fidelidad), 20 ng de ADN genómico de renacuajo de *X. tropicalis* como templado, 0.6 µl de partidores específicos para los productos de PCR deseados (Tabla 4) a una concentración de 10 mM y agua nanopure hasta

completar el volumen. Los partidores fueron diseñados manualmente buscando un porcentaje de CG cercano al 60% y una longitud de aproximadamente 20 pb.

Los productos de PCR fueron purificados desde gel de agarosa 0.8% para utilizando el kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) según indicaciones del fabricante. Posteriormente los productos fueron cuantificados por absorciometría y almacenados a -80°C.

Nombre	Propósito	Secuencia (5' a 3')
Rep. 1073 Forward	Amplificar secuencia repetida	TTAAAGGAAAAGTAACACTAACATT
Rep. 1073 Reverse	Amplificar secuencia repetida	AAGGAAAATATCTTTAGGGCTCTG

Tabla 4. Partidores generados para la amplificación mediante PCR. Fuente: Elaboración propia.

4.5. Clonamiento de productos de PCR

Todos los productos PCR fueron clonados en el vector P.B Col1a1-Entry mediante corte y ligación. Esto se realizó en una sola reacción de 20 μ L utilizando 50 ng del vector, 200 ng de producto de PCR, 1 μ l de ATP 10mM, 0.2 μ l de la enzima SmaI, 1 μ l de ligasa T4 (Promega), 2 μ l de buffer universal KGB 10X y agua nanopure hasta completar el volumen. La reacción se incubó a 25° por 4 hrs, 5 μ l de cada reacción fueron transformadas en bacterias competentes para luego realizar las correspondientes purificaciones.

4.6. Recombinación mediante tecnología GATEWAY™

Todos los plásmidos “Enhancer-Entry” fueron recombinados mediante una reacción GATEWAY™ LR utilizando 2 μ l de clonasa LR (Invitrogen), 2 μ l de Buffer LR 5X, 75 ng de plásmido Entry, 75 ng de un vector destino y T.E pH 8.0 hasta completar un volumen de 10 μ l. La reacción se incubó 2 hrs a 25°C, 5 μ l de cada reacción fueron transformadas en bacterias competentes, al día siguiente se realizó la correspondiente purificación.

4.7. Análisis mediante enzimas de restricción

Todos los vectores generados fueron comprobados mediante ensayos de restricción. Las digestiones analíticas se realizaron digiriendo 200-300 ng de plásmidos, en una solución de buffer para enzimas de restricción 1x, BSA 1x, y 0,2 μ l de enzimas en 10 μ l de reacción. Las incubaciones de digestión se realizaron siguiendo las instrucciones del fabricante por un mínimo de 60 minutos.

4.8. Cultivo primario de osteoblastos

Se seleccionaron 30 renacuajos en estadio 59-61 (según la tabla de desarrollo de *Xenopus* de Nieuwkoop & Faber) los cuales fueron eutanasiados por decapitación. El cráneo fue disectado en una placa con CMFM 1X (88 mM NaCl; 1 mM KCl; 2,4 mM NaHCO₃ y 7,5 mM Tris, pH 7,6) y transferido a una placa con HBSS 0,6X (HyClone)

en la que se extrajo el hueso fronto-parietal (calvaria). Las muestras fueron separadas de a 10 en un tubo Eppendorf de 2 ml con 500 μ l de HBSS 0,6X, suplementado con 1 % de antibiótico Penicilina/Estreptomina (P/S - HyClone). 33

Las muestras de hueso se sometieron a digestiones sucesivas con colagenasa P y tripsina, con el propósito de eliminar otros tipos celulares tales como células pigmentadas y eritrocitos, hasta obtener una población enriquecida en osteoblastos. Luego el medio de disección se cambió por 200 μ l de colagenasa P (ROCHE) al 0,1 % p/v en HBSS 0.6X suplementado con 1 % P/S. Las muestras se incubaron por 40 min a temperatura ambiente con agitación suave (Mini Labroller). Transcurrido el tiempo de incubación, se tomó el sobrenadante y se traspasó a una placa de 35 mm con 1ml de medio de cultivo L-15 Leibowitz 0.6X (denominado en adelante como L-15) (Gibco), suplementado con 10% suero bovino fetal (Gibco); 1% L-Glutamina (HyClone); 1% P/S (HyClone); 0.25 μ g/ml Fungizona (Gibco); 25 μ g/ml Gentamicina (HyClone), denominado en adelante como medio de crecimiento L-15 0.6X (Gibco). Esto se denominó población celular 1, esta población sirve como un indicador de que todos estos componentes residuales están siendo eliminados. A continuación Se agregaron 200 μ l de tripsina 0,125 % p/v (Gibco) y colagenasa P 0,1 % p/v en HBSS 0.6X suplementado con 1% P/S, se incubó por 10 min a temperatura ambiente con agitación suave. Se tomó el sobrenadante y se traspasó a una placa de 35 mm con 1 ml de medio de crecimiento L-15 0.6X. Esto corresponde a la población celular 2, la cual tiene una utilidad similar a la población 1. Luego, se agregaron 200 μ l de tripsina 0,25 % p/v, colagenasa P 0,1 % p/v en HBSS 0.6X suplementado con 1 % P/S y se incubó por 15 min, a temperatura ambiente con agitación suave. El sobrenadante se traspasó a un tubo con 5 ml de medio de crecimiento L-15 0,6X. Este procedimiento se repitió dos veces y se juntaron los sobrenadantes en el mismo tubo, se centrifugó a 1100 rpm por 5 min y las células fueron resuspendidas en 2 ml de medio de crecimiento L-15 0.6X (Gibco). Una vez finalizadas las digestiones, se tomaron 10 μ l de células en cultivo y 10 μ l de Azul tripán para contarlas en una cámara de Neubauer. En placas de 35 mm se sembraron 90.000 a 100.000 células por placa en medio de crecimiento L-15 0,6X. Las células se dejaron incubando a 28 °C, el medio

de cultivo fue cambiado a las 16 hrs y posteriormente día por medio hasta que alcanzaron un 80 - 90 % de confluencia. 34

4.9. Electroporación de osteoblastos mediante sistema Neon™

Para la electroporación con sistema Neon™ (Invitrogen) se tripsinizaron osteoblastos según lo indicado anteriormente. Una vez recolectadas las células fueron contadas en cámara Newbauer. Se preparó una solución Buffer R/ADN agregando el volumen necesario para alcanzar los 10 µg de ADN por cada 100 µl de mezcla con buffer R (buffer de resuspensión Neon™, Invitrogen). Se agregó aproximadamente 750.000 células a un tubo Eppendorf de 1.5 ml para cada condición, luego se Centrifugó a 1100 rpm por 5 minutos a 28°C, se descartó el sobrenadante y las células fueron resuspendidas en 100 µl de solución Buffer R/ADN. Se tomó 100 µl de la solución osteoblastos/buffer R/ADN para cada condición y se electroporó con 1230V, 30 ms y 2 pulsos. Las células electroporadas fueron pasadas a placas p35 con medio L-15 de crecimiento previamente preparado.

4.10. Análisis mediante citometría de flujo.

Se tripsinizaron osteoblastos previamente electroporados con los vectores correspondientes según protocolo indicado anteriormente. Las células fueron resuspendidas en 200 µl de MMR 1X y se pasaron a un tubo de citometría sin filtro diferente para cada condición. Las intensidades de fluorescencia de 2000 eventos fueron medidas con el citometro de flujo Fortessa X20, bajo los siguientes parámetros: FSC=150, SSC=150, GFP=300, mCherry=345. Mediante el software Flowjo se determinó la población correspondiente a osteoblastos, posteriormente y usando células sin transfectar como parámetro negativo se establecieron los umbrales de fluorescencia tanto para GFPn como para mCherry. Los datos de fluorescencia total de cada célula fueron graficados con el software Prism 5. Con el mismo software los datos fueron sometidos a un test estadístico no paramétrico de Kruskal-Wallis a posteriori.

5. RESULTADOS

5.1. Estandarización de condiciones de electroporación y cuantificación por citometría de flujo para osteoblastos primarios de *X. tropicalis*.

Con el fin de lograr un mayor porcentaje de osteoblastos primarios de *X. tropicalis* que expresen un constructo de interés. Se decidió estandarizar el sistema de electroporación Neon™ para su uso en estas células. Para esto se probaron 20 combinaciones distintas de voltaje, amplitud de onda y cantidad de pulsos. Como condición de electroporación de referencia se utilizaron 1230 v, 10 ms y 4 pulsos, condición de electroporación óptima recomendada por el fabricante para electroporar a células de la línea inmortalizada U-2 OS, una línea celular ósea humana. El resto de condiciones probadas se extrapoló a partir de la anteriormente mencionada. Se electroporó un vector que contiene el promotor CMV controlando a mCherry como control interno de transfección. Para cuantificar la eficiencia de transfección de las distintas condiciones se fotografiaron mediante un microscopio de epifluorescencia 10 campos visuales al azar por condición, en ellos se contabilizó las células totales y las células que presentaban fluorescencia roja. Se logró generar una eficiencia de electroporación que en promedio es cercana a un 25%, esto representa una mejora substancial con respecto al reactivo FuGENE HD el cual, con la misma metodología de determinación, arroja una eficiencia menor al 10% (Bertin y col., 2015). La condición con mejor eficiencia fue 1230v, 30 ms y 2 pulsos (Tabla 5).

Ya habiendo mejorado la eficiencia de transfección de osteoblastos se procedió a optimizar el método de cuantificación de fluorescencia utilizando citometría de flujo. Se esperaba que la mayor eficiencia y cantidad de células utilizadas en la electroporación (en comparación con el reactivo FuGENE HD) permitiesen un análisis coherente mediante citometría. Se electroporaron aproximadamente 750.000 osteoblastos primarios de *X. tropicalis* mediante sistema Neon™ con la condición seleccionada previamente utilizando el vector CMV/mCherry-CMV/GFPn, estas células fueron pasadas posteriormente por citómetro de flujo. Los resultados

muestran que es posible detectar la fluorescencia de GFPn y mCherry de los osteoblastos primarios mediante citometría, esto de manera clara y robusta (Fig. 2). Esta metodología además de acoplar la transfección mediante sistema 36 Neon™ con la citometría de flujo, redujo el tiempo de realización del ensayo completo desde cinco o más días a solo tres.



Condición	Prom. Cel. totales por campo	Prom. Eficiencia de transfección
1050 v, 10 ms, 4 pulsos	46	18.6 %
1050 v, 20 ms, 3 pulsos	52	11%
1050 v, 30 ms, 2 pulsos	17	16.5%
1050 v, 40ms, 1 pulsos	69	13.3%
1150 v, 10 ms, 4 pulsos	81	13.7%
1150 v, 20 ms, 3 pulsos	113	15.2%
1150 v, 30 ms, 2 pulsos	93	15.8%
1150 v, 40ms, 1 pulsos	115	13.3%
1230 v, 10 ms, 4 pulsos	77	14.6%
1230 v, 20 ms, 3 pulsos	57	23.3%
1230 v, 30 ms, 2 pulsos	54	49%
1230 v, 40ms, 1 pulsos	60	29.3%
1300 v, 10 ms, 4 pulsos	39	23.1%
1300 v, 20 ms, 3 pulsos	38	34.6%
1300 v, 30 ms, 2 pulsos	32	35.7%
1300 v, 40ms, 1 pulsos	26	28.9%
1450 v, 10 ms, 4 pulsos	38	12.1%
1450 v, 20 ms, 3 pulsos	40	39%
1450 v, 30 ms, 2 pulsos	24	42.9%
1450 v, 40ms, 1 pulsos	11	31%

Tabla 5. Cuantificación de eficiencias de electroporación con el sistema NeonTM en osteoblastos primarios de *X. tropicalis*. Se probaron 20 condiciones distintas de voltaje (v), amplitud de onda (ms) y número de pulsos. La cuantificación se realizó mediante microscopía de epifluorescencia, analizando 10 campos visuales elegidos al azar por condición. Luego, se calculó el porcentaje de células electroporadas respecto a la cantidad de células totales en cada foto. En rojo se muestra la condición de referencia utilizada, la cual corresponde a una utilizada para electroporar células de fenotipo óseo U-2 OS, en verde se muestra la condición con mayor eficiencia de transfección la cual se utilizó en todos los ensayos posteriores. Fuente: Elaboración propia.

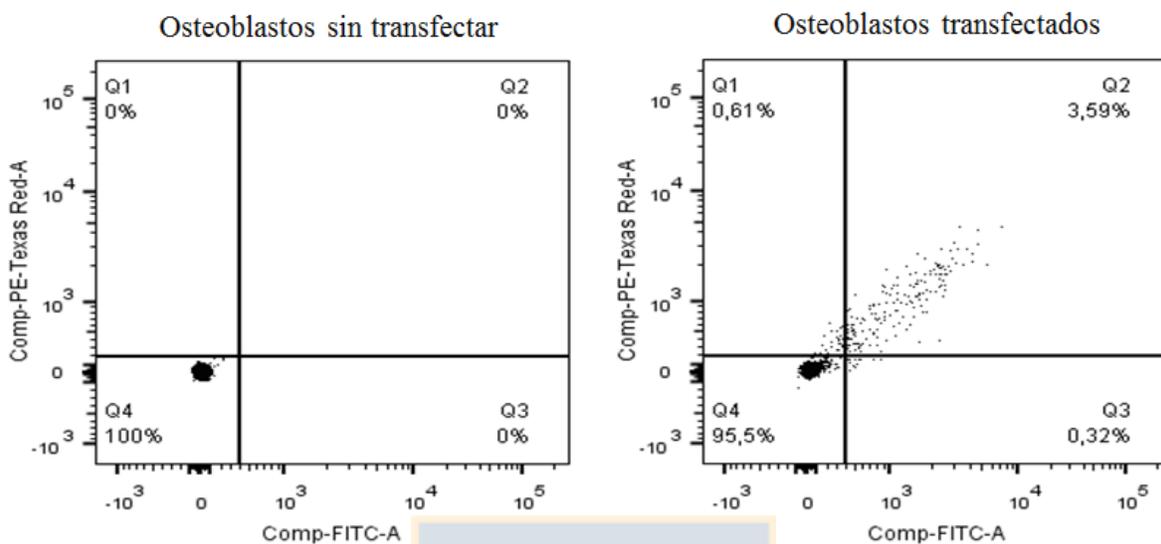


Figura 2. Primer análisis de fluorescencia por citometría de flujo. Se electroporaron osteoblastos primarios con el vector de expresión dual CMV-Cherry/CMV-GFPn mediante el sistema Neon™ cuyos niveles de fluorescencia fueron analizados posteriormente mediante citometría de flujo. En los esquemas cada cuadrante corresponde a distintas subpoblaciones celulares, Q1 corresponde a células que solo presentan fluorescencia verde, Q2 corresponde a células que presentan fluorescencia roja y verde, Q3 son células que solo presentan fluorescencia roja y Q4 son células sin fluorescencia (no electroporadas). Los osteoblastos electroporados presentan una subpoblación enriquecida en el cuadrante Q2, lo cual confirma la co-expresión de los reporteros Cherry y GFPn.

5.2. Medición de actividad transcripcional para el Enhancer-1073 sin secuencia repetida mediante citometría de flujo.

Con el fin de validar los resultados obtenidos previamente mediante microscopía confocal, en los cuales se demuestra que la secuencia repetida inserta en el Enhancer-1073 es necesaria para la actividad transcripcional de este elemento regulatorio (Contreras, 2016), se realizaron nuevos ensayos funcionales en cultivo primario de osteoblastos de *X. tropicalis* mediante electroporación y análisis por citometría de flujo. En este ensayo funcional se transfectaron, mediante el sistema de electroporación Neon™, vectores de expresión que contienen al Enhancer-1073 completo y sin repetición, ambos previamente disponibles en el LADE (Muñoz, 2015; Contreras, 2016). Dos días después de la electroporación los osteoblastos fueron sometidos a un análisis mediante citometría de flujo. Con esto se esperaba comparar la capacidad que tienen estas dos versiones del enhancer para potenciar la actividad transcripcional del promotor basal de *Col1a1* y comprobar que la secuencia repetida presente en el enhancer 1073 es necesaria para la actividad de este elemento regulatorio.

Este análisis arrojó como resultado que del total de eventos medidos para cada condición, en promedio un 87.44% corresponde a células con características de osteoblastos, de ellas un 8% corresponde a células transfectadas. Estas son las células presentes en los cuadrantes Q2 y Q3 (Fig. 3). Los análisis estadísticos de intensidad de fluorescencia total demuestran que la fluorescencia generada por la actividad del Enhancer-1073 sin repetición es equivalente a la del promotor basal de *Col1a1*. Al comparar las intensidades de fluorescencia verde generadas por estos dos constructos con estas dos versiones del Enhancer-1073 se pueden apreciar diferencias estadísticas significativas ($p > 0.05$) (Fig. 4). Estos resultados complementan a los obtenidos previamente mediante microscopía confocal (Contreras, 2016), confirmando así que efectivamente existe una merma en la actividad transcripcional del Enhancer-1073 cuando la secuencia repetida es

removida. Con estos resultados se comprobaría una parte de la hipótesis, existen secuencias repetidas presentes en enhancers osteoblásticos activos necesarias para la actividad transcripcional normal de estos elementos regulatorios.



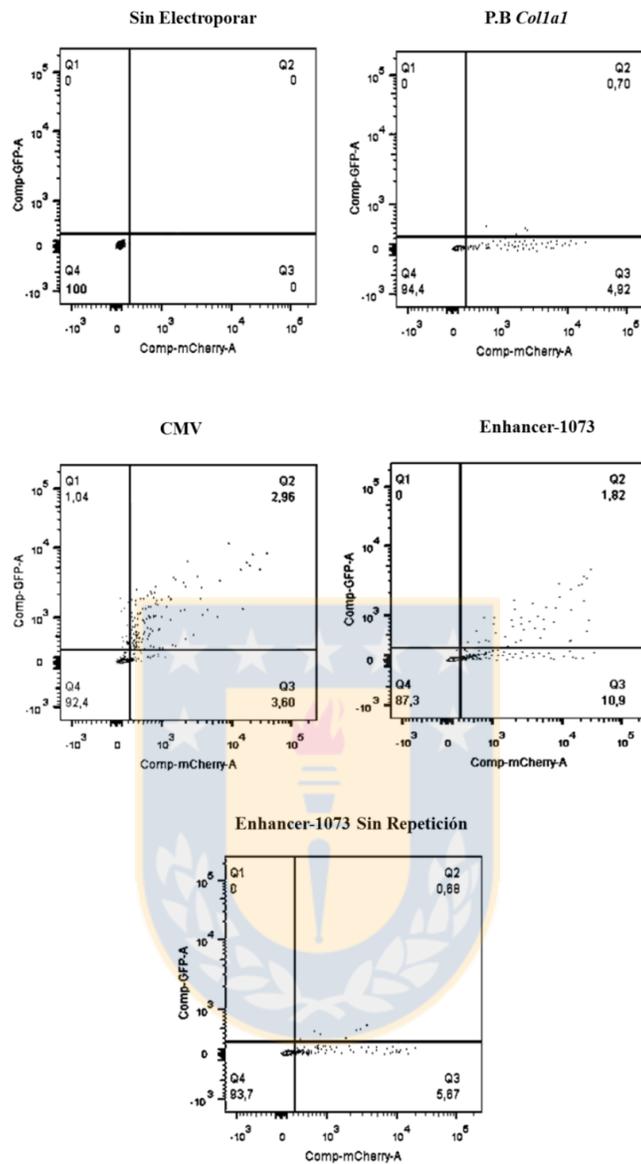


Figura 3. Graficas de citometría de flujo para el análisis de la actividad transcripcional para el Enhancer-1073 sin secuencia repetida. En los esquemas cada cuadrante corresponde a distintas subpoblaciones celulares, Q1 corresponde a células que solo presentan fluorescencia verde, Q2 corresponde a células que presentan fluorescencia roja y verde, Q3 son células que solo presentan fluorescencia roja y Q4 son células sin fluorescencia (no electroporadas). Fuente: Elaboración propia.

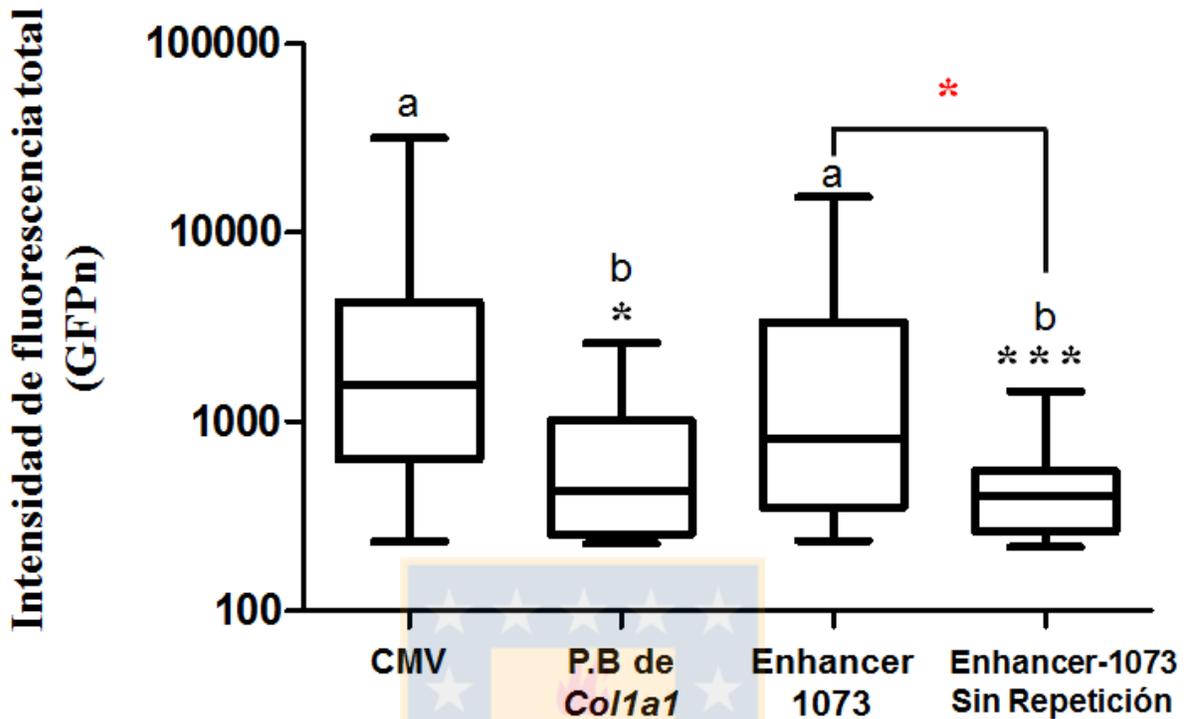


Figura 4. Análisis estadístico de la actividad transcripcional para el Enhancer-1073 sin secuencia repetida. Gráfico de cajas que muestra la distribución de los valores correspondientes a las distintas intensidades de fluorescencia total para cada una de las condiciones. El asterisco representa las diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) obtenidas mediante el test no paramétrico de comparaciones múltiples Kruskal-Wallis a posteriori. Los asteriscos negros representan las diferencias estadísticamente significativas con respecto CMV (control positivo), el asterisco rojo representa la diferencia estadísticamente significativa entre las dos versiones del Enhancer-1073. Las condiciones marcadas con la letra (a) no presentan diferencia estadísticamente significativa entre ellas, pero si con las marcadas con la letra (b), los que a su vez no presentan diferencia estadísticamente significativa entre ellas. La caja representa el 50% de los datos centrados en la mediana, la línea negra dentro de la caja indica el promedio y las líneas que sobresalen de la caja representan los cuartiles Q1 (25% de los datos) y Q3 (75% de los datos). Fuente: Elaboración propia.

5.3. Amplificación por PCR y clonamiento de la secuencia repetida presente en el Enhancer-1073

Una vez corroborado que la secuencia repetida presente en el Enhancer-1073 es necesaria para la actividad transcripcional de este elemento regulatorio, se propuso investigar si también es suficiente para potenciar la actividad basal del promotor de *Col1a1*. Para esto se generó un vector de expresión de arquitectura similar a los anteriormente utilizados, pero en el cual la secuencia repetida del Enhancer-1073 se clonó corriente arriba del promotor basal de *Col1a1*.

Para generar estos vectores de expresión el primer paso fue amplificar la secuencia completa de la repetición presente en el Enhancer-1073. Esto se realizó a través de una PCR con una enzima de alta fidelidad, con lo cual se consiguió amplificar de manera correcta dicha repetición (Fig. 5B). A continuación, el producto de PCR de 640 pb fue clonado en un vector de recombinación mediante corte y ligación. Este vector de recombinación lleva por nombre P.B Col1a1-Entry y tiene la característica de poseer un sitio de clonamiento múltiple con el sitio para la endonucleasa *Sma*I seguido por el promotor basal de *Col1a1*. Toda esta región se encuentra flanqueada por secuencias attR de recombinación sitio-específica para el sistema de clonamiento GATEWAY™ (Fig. 6A). Al insertar la repetición en el sitio de clonamiento múltiple se generó una región reguladora artificial compuesta del promotor basal de *Col1a1* potenciado por la secuencia repetida del Enhancer-1073 (Fig. 6B). De acuerdo a distintos patrones de digestión se pudo comprobar que la repetición quedó clonada con la misma orientación en la cual se encuentra de manera nativa en el Enhancer-1073 (Fig. 5C). El vector generado se denominó como Repetición-1073- Entry.

Finalmente este vector fue recombinado mediante una reacción GATEWAY™ LR para obtener el vector de expresión final. Durante la reacción LR el vector Repetición-1073- Entry fue recombinado con un vector destino, este vector incluye el gen *Ccdb* (gen suicida bacteriano) flanqueado por dos sitios attL seguido por el

marco de lectura correspondiente al gen reportero GFPn (Proteína Fluorescente Verde Nuclear) (Fig. 6C). La reacción LR recombina de manera específica los sitios attR y attL, generando así que se intercambie el gen suicida por la región promotora artificial contenida en el vector Entry. Con esto se logró generar un nuevo vector de expresión que tiene al gen reportero GFPn controlado por el promotor basal de *Col1a1* potenciado por la repetición del Enhancer-1073 (Fig. 5D y 6D). Los vectores de expresión además cuentan con un control interno de transfección. Este corresponde a la proteína mCherry nuclear cuya expresión es controlada por el promotor ubicuo de citomegalovirus (CMV). Este control permite identificar las células que fueron correctamente transfectadas.



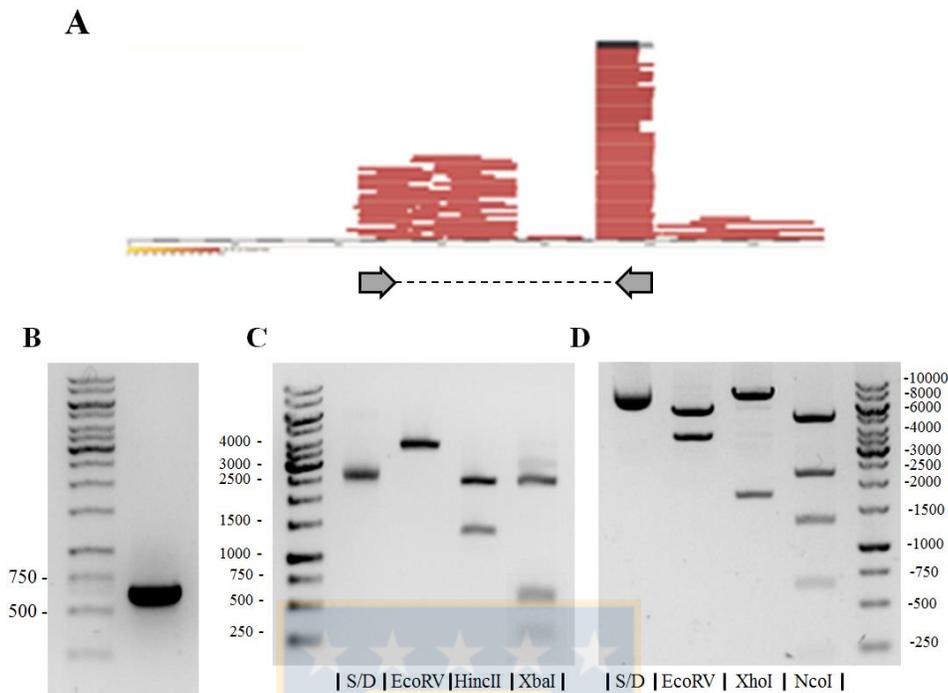


Figura 5. Amplificación por PCR y clonamiento de la repetición presente en el Enhancer-1073. **(A)** Esquema que muestra la región del enhancer correspondiente a la repetición amplificada. La línea principal representa la secuencia completa del Enhancer-1073, en rojo se muestra el lugar de la secuencia que está repetido en el genoma, las flechas grises indican la región amplificada. **(B)** Electroforesis en gel de agarosa 1% en el cual se ve la amplificación de la secuencias repetida, su tamaño corresponde a 640 pb. **(C)** Electroforesis en gel de agarosa 1% en los cuales se muestran los ensayos de digestión realizados para comprobar que el plásmido Entry haya sido generado de manera correcta. Los fragmentos esperados en el ensayo son (dirección de inserto en su orientación nativa con respecto al enhancer completo): EcoRV 3778 pb, HincII 2384 y 1394 pb, XbaI 2342, 593, 540 y 303 pb. **(D)** Electroforesis en geles de agarosa 1% en los cuales se muestran los ensayos de digestión realizados al vector de expresión. Los fragmentos esperados en el ensayo son: EcoRV 5514 y 3547 pb, para XhoI 7336 y 1725 pb, para NcoI 4913, 2220, 1292 y 636 pb. S/D: Sin Digerir. Fuente: Elaboración propia.

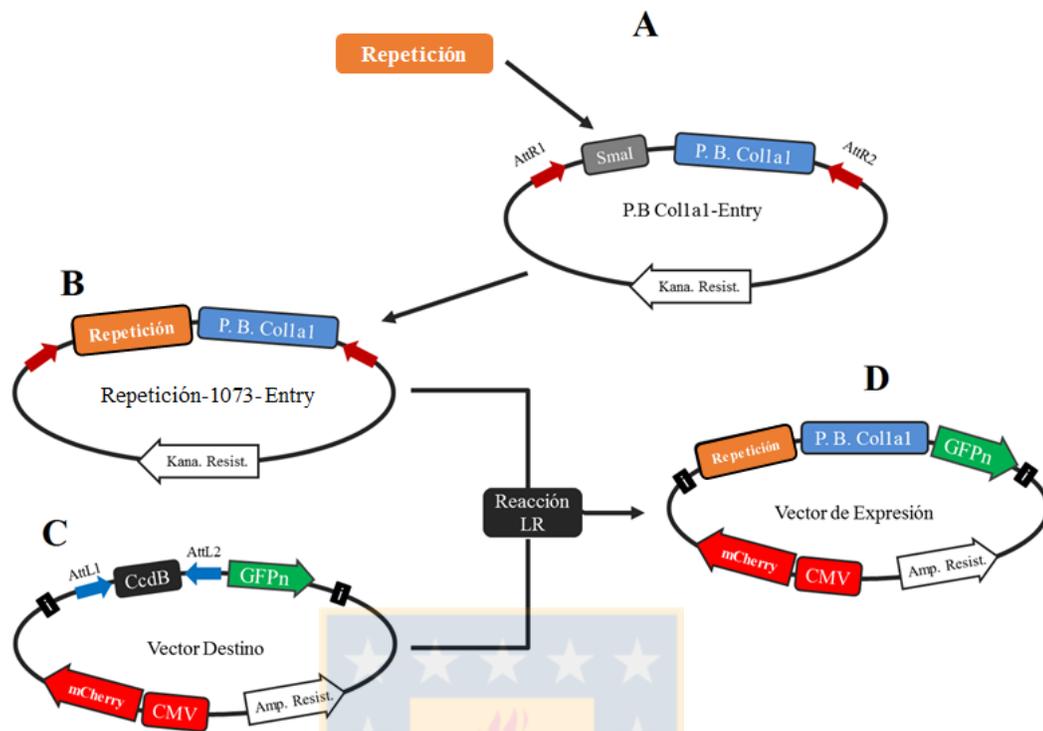


Figura 6. Estrategia de clonamiento para la generación del vector de expresión con la secuencia repetida por si sola. **(A)** La repetición amplificados por PCR fue clonada en el vector P.B Col1a1-Entry, este vector contiene un único sitio de corte para *SmaI* (recuadro gris) seguido por el promotor basal del gen *Col1a1* (recuadro azul) toda esta región se encuentra flanqueada por los sitios de recombinación específica *AttR1* y *AttR2* (flechas pequeñas rojas). **(B)** De la reacción anterior se obtuvo el vector denominado “Repetición-1073- Entry”, este vector contiene la repetición en conjunto con el promotor basal formando una región regulatoria artificial flanqueada por los sitios *AttR1* y *AttR2*. **(C)** El vector destino contiene un sitio con el gen suicida *CcdB* flanqueado por los sitios de recombinación *AttL1* y *AttL2* (flechas pequeñas azules) seguido del reportero GFP nuclear (flecha verde), todo este cassette se encuentra está rodeado por insuladores (rectángulos negros). Además, como control interno, este vector contiene el gen de la proteína fluorescente roja mCherry (flecha roja) controlada por el promotor ubicuo CMV (cuadro rojo) **(D)** Mediante una reacción GATEWAY™ LR se recombinó el vector Entry con el vector destino para generar el vector de expresión que contienen la región reguladora. Los sitios *AttR* y *AttL* permiten mantener la direccionalidad de la recombinación. Las resistencias de cada vector esta esquematizada como una flecha blanca. Fuente: Elaboración propia.

5.4. Medición de actividad transcripcional para secuencia repetida por si sola mediante citometría de flujo.

Con el fin de demostrar que la secuencia repetida presente en el Enhancer-1073 es suficiente para la actividad transcripcional de este elemento regulatorio se realizaron nuevos ensayos funcionales en cultivo primario de osteoblastos de *X. tropicalis*. En este ensayo se transfectó el vector de expresión que contienen a la secuencia repetida junto al promotor basal de *Col1a1* en paralelo al que contiene el Enhancer-1073 completo, esto mediante el sistema de electroporación Neon™. Al igual que en el ensayo funcional anterior, dos días después de la transfección los osteoblastos fueron sometidos a un análisis mediante citometría de flujo. Con esto se pretende comparar la capacidad que tienen estas dos versiones del enhancer para potenciar la actividad transcripcional del promotor basal de *Col1a1* y demostrar que la secuencia repetida por si sola puede ser suficiente para recrear la actividad transcripcional del Enhancer-1073 completo.

Este análisis arrojó como resultado que del total de eventos medidos para cada condición, en promedio un 90% corresponde a células con características de osteoblastos, de ellas un 10.23% corresponde a células transfectadas (Fig. 7). Los análisis estadísticos de intensidad de fluorescencia total demuestran que la fluorescencia generada por la actividad transcripcional de repetición por sí sola no presenta diferencia significativa con la fluorescencia producida por el Enhancer-1073 completo (Fig. 8). Estos resultados demuestran que la repetición genómica que se encuentra presente en el Enhancer-1073 contiene todos los elementos necesarios para reproducir la actividad transcripcional del enhancer completo. Con esto se ha demostrado que existen secuencias repetidas presentes en enhancers osteoblásticos activos de *X. tropicalis* que son suficientes para la actividad transcripcional normal del enhancer 1073 del gen *Col1a1*.

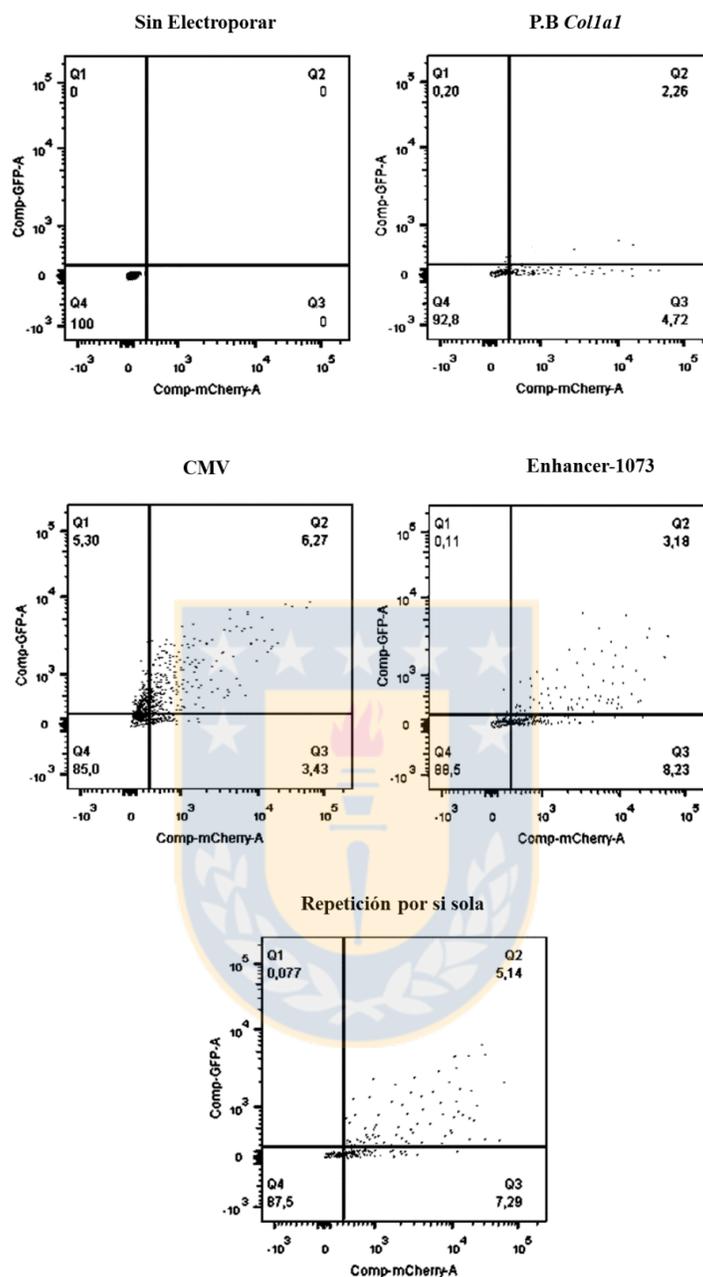


Figura 7. Graficas de citometría de flujo para el análisis de la actividad transcripcional para secuencia repetida por sí sola. En los esquemas cada cuadrante corresponde a distintas subpoblaciones celulares, Q1 corresponde a células que solo presentan fluorescencia verde, Q2 corresponde a células que presentan fluorescencia roja y verde, Q3 son células que solo presentan fluorescencia roja y Q4 son células sin fluorescencia (no electroporadas). Fuente: Elaboración propia.

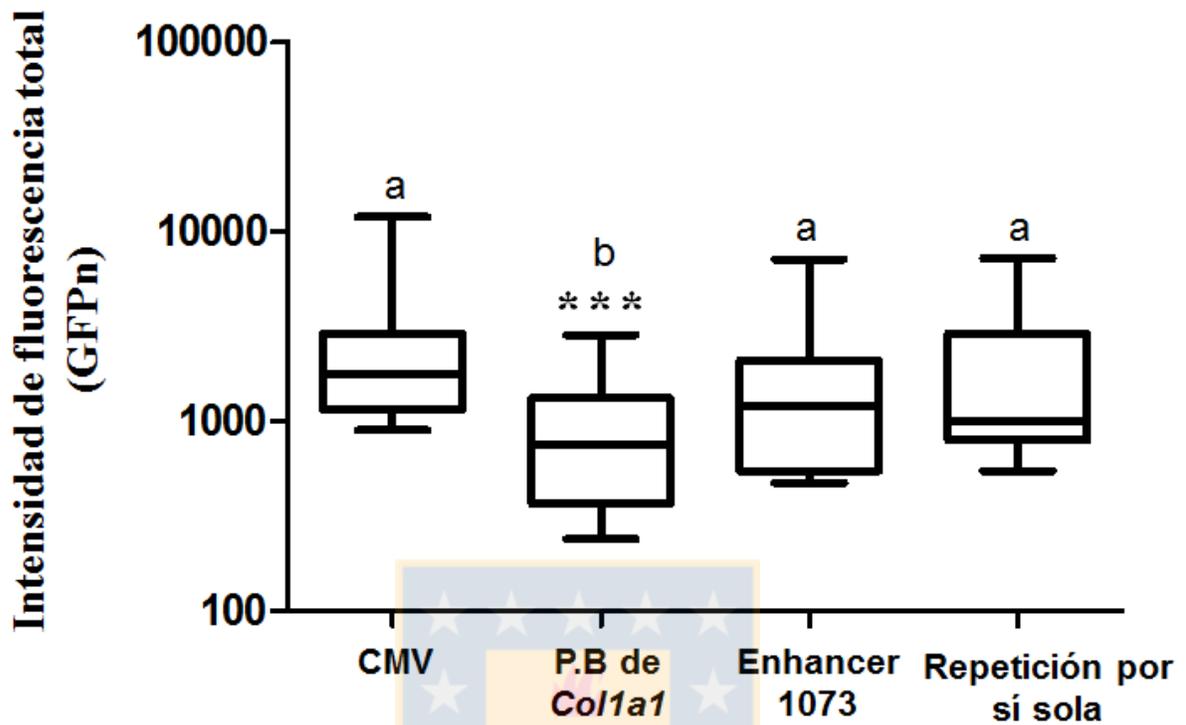


Figura 8. Análisis estadístico de la actividad transcripcional para la secuencia repetida presente en el Enhancer-1073. Gráfico de cajas que muestra la distribución de los valores correspondientes a las distintas intensidades de fluorescencia total para cada una de las condiciones. El asterisco representa las diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) con respecto al control positivo CMV, estas fueron obtenidas mediante el test no paramétrico de comparaciones múltiples Kruskal-Wallis a posteriori. Las condiciones marcadas con la letra (a) no presentan diferencia estadísticamente significativa entre ellas, pero si con respecto a la marcada con la letra (b). La caja representa el 50% de los datos centrados en la mediana, la línea negra dentro de la caja indica el promedio y las líneas que sobresalen de la caja representan los cuartiles Q1 (25% de los datos) y Q3 (75% de los datos). Fuente: Elaboración propia.

6. DISCUSIÓN

6.1. El sistema de electroporación/Citometría representa una mejora significativa respecto a la metodología FuGENE/microscopía

Estudios anteriores del Enhancer-1073 y de sus repeticiones se basaban en transfecciones de las células y en su posterior análisis por microscopía confocal, lo que presentaba una serie de limitaciones metodológicas que le quitaban robustez a los resultados (Contreras, 2016). Acoplar electroporación con citometría de flujo ha entregado una solución a estos inconvenientes.

En primer lugar, el sistema de electroporación Neon™ permitió mejorar la eficiencia de transfección con respecto al reactivo FuGENE HD. Este último presenta una eficiencia una eficiencia relativamente baja (menos de 10%) en este tipo de células (Bertin y col., 2015), además este método acota la cantidad de células que se pueden transfectar a un máximo aproximado de 300.000 células (cantidad de osteoblastos disponibles en una placa p35), lo cual limita la cantidad de células útiles para análisis. La electroporación mediante sistema Neon™ permite obtener un promedio cercano o superior a un 10% de eficiencia de transfección, permitiendo además aumentar a más del doble la cantidad de células electroporadas por condición. Este aumento de la población de células transfectadas permitió acoplar un análisis de intensidad de fluorescencia mediante citometría de flujo, algo que previamente era imposible debido a la baja cantidad de células disponibles para análisis.

En segundo lugar, desde el punto de vista de la manipulación de la muestra, la citometría de flujo permite medir la fluorescencia natural de GFPn, y entrega un valor de fluorescencia mucho más fidedigno que en el caso de una célula fijada en PFA y montada en un porta objeto de vidrio. Además, la GFPn de células fijadas y montadas puede perder su actividad en el tiempo (en el caso que se deba almacenar la muestra antes de tener acceso a un microscopio confocal) o sufrir un fenómeno de

“bleaching” durante la observación. Por lo tanto, la citometría constituye un resultado más confiable y cercano a la realidad biológica.

En tercer lugar, realizar el análisis mediante citometría de flujo permite examinar una población celular mayor y de forma mucho más rápida de lo que se puede pretender por microscopía. Los análisis realizados mediante microscopía confocal previos, en los cuales se establece a el Enhancer-1073 como enhancer activo (Muñoz, 2015) y en los que se demuestra una dependencia funcional con su secuencia repetida (Contreras, 2016), fueron realizados analizando alrededor de 20 núcleos por condición. En cambio, los análisis realizados por citometría de flujo fueron trabajados con una cantidad no menor a 100 células, esto representa un gran avance en términos de robustez en los resultados, los cuales ahora son menos sujetos a artefactos causados por un efecto de muestreo. Esto está directamente relacionado con los métodos de transfección utilizados en cada caso, por una parte tenemos al reactivo FuGENE HD el cual, como se mencionó anteriormente, presenta una eficiencia menor a la electroporación. Este es el primer trabajo en el cual se electroporan osteoblastos primarios con sistema Neon™, previo a este trabajo solo se habían electroporado osteoblastos inmortalizados (línea celular NOS-1) mediante electrodos directamente en la placa de cultivo (Igawa y col. 2014), por lo tanto estos porcentajes de eficiencia y cantidad total de células electroporadas aún pueden mejorar. La estandarización de este procedimiento tiene todavía una serie de variables por desarrollar, entre ellas encontramos la viabilidad de las células post electroporación. Para estos ensayos se electroporaron 750.000 células por condición, sin embargo cerca del 50% de ellas sobrevivía al proceso de electroporación (datos no mostrados), si logramos mejorar este parámetro veremos aumentado de manera notable el total de células mediadas por citometro, haciendo aún más robusto el ensayo. Por otra parte, la estandarización de las condiciones de electroporación (voltaje, amplitud y cantidad de pulsos) fue desarrollada a partir de los parámetros recomendados por el fabricante para una línea inmortalizada derivada de hueso humano (U-2 OS), esto es lo más cercano que hay en la literatura con

respecto a electroporación de células óseas con Neon™. Es probable que los parámetros que estamos utilizando para electroporar osteoblastos primarios de rana no sean los óptimos todavía. A pesar de esto, y como se mencionó anteriormente, hemos realizado una mejora notable en este aspecto con respecto a la metodología previamente utilizada.

Por último lugar, al realizar estos ensayos con citometría de flujo acoplada a electroporación, hemos reducido de manera notable, la cantidad de pasos experimentales y por ende el tiempo de realización del ensayo. Al utilizar el reactivo FuGENE HD acoplado a microscopía confocal, se tardaba un tiempo de 4 a 5 días desde el comienzo de la transfección hasta el paso de adquisición de imágenes. Posteriormente a esto era necesario delimitar los núcleos, cuantificar la fluorescencia, realizar análisis estadísticos e interpretar los resultados. En cambio, al utilizar electroporación con sistema Neon™ acoplado a citometría de flujo tardamos solo 3 días desde el comienzo del experimento hasta tener todos los datos analizados de manera completa, incluyendo la obtención de los gráficos y las pruebas estadísticas correspondientes. En resumen, hemos desarrollado una nueva metodología de punta que nos permite analizar la actividad de distintos enhancers de manera eficiente, robusta y rápida.

6.2. Las repeticiones del enhancer 1073 coinciden precisamente con un contexto adecuado de marcas de histona.

Para detectar enhancers activos, es necesario buscar ciertos patrones de marcas epigenéticas que se pueden obtener experimentalmente a partir de ensayos de ChIP-seq, tales como enriquecimiento o depleción de las marcas H3K4me1, H3K4me3, H3K27ac, H3K27me3 anteriormente descritas (Andersson y col., 2014; Creighton y col., 2010; Pekowska y col., 2011). Se ha descubierto que los enhancers activos presentan un enriquecimiento de H3K4me1, la cual sigue un patrón local específico. En particular, el patrón denominado pico-valle-pico, se encuentra enriquecido en enhancers activos y consiste en dos picos asimétricos de la marca H3K4me1 separados por un valle desprovisto de histonas en el cual se unen preferentemente combinaciones de factores de transcripción (Pundhir y col., 2016). Es interesante comparar nuestro trabajo con los análisis de Pundhir y colaboradores, dado que también encontramos un doble pico asimétrico de H3K4me1 a nivel del Enhancer-1073 (Fig. 9A). Un punto importante es que este patrón pico-valle-pico se encuentra ubicado precisamente dentro de la región que nosotros marcamos como repetición genómica (Fig. 9B). La excelente correlación topográfica entre repeticiones y marcas de histona apoya fuertemente la idea que la región más repetida, ubicada a nivel del valle, es portadora de sitios de unión para factores de transcripción. Esta observación nos dio pie para profundizar estudios funcionales de la región repetida embebida en el Enhancer-1073 del gen de *colágeno 1a1*.

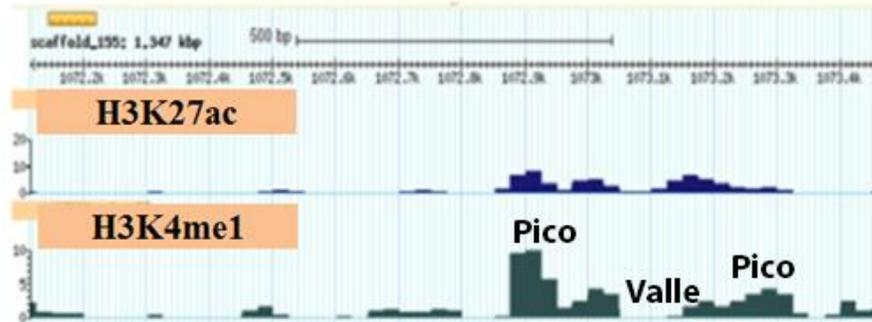
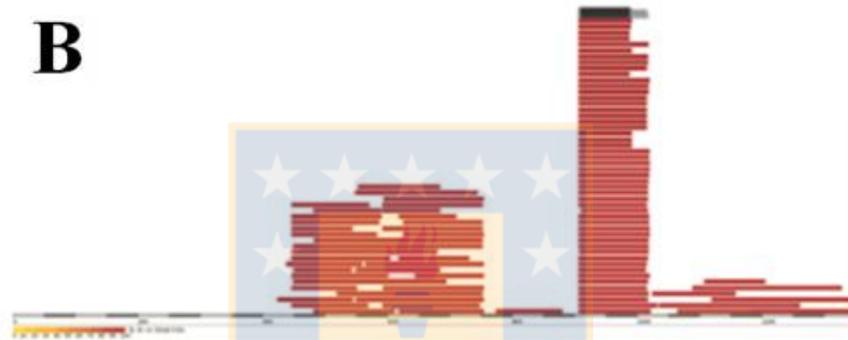
A**Enhancer-1073****B**

Figura 9. La secuencia repetida del Enhancer-1073 presenta un contexto cromatínico compatible con una función de enhancer activo. **(A)** Región del enhancer amplificada por PCR, se muestran las marcas de ChIP-seq H3K27ac (arriba) y H3K4me1 (abajo). **(B)** Resultados de un alineamiento mediante la herramienta BLAT de la secuencia completa del Enhancer-1073 contra el genoma completo de *X. tropicalis*. La línea horizontal esquematiza la secuencia completa del enhancer (1347 pares de bases), en rojo se muestra el lugar de la secuencia que esta repetido en el genoma, cada línea roja representa una repetición en otro lugar del genoma (por un tema de claridad de la figura se decidió mostrar un máximo de 100 repeticiones). Fuente: Elaboración propia.

6.3. La región repetida presente en el Enhancer-1073 es necesaria y suficiente para la actividad transcripcional de este elemento regulatorio.

Nuestros resultados reafirman una disminución en la actividad transcripcional del Enhancer-1073 cuando este carece de secuencia repetida y además demuestran que la secuencia repetida por si sola posee todos los elementos necesarios para comportarse como un enhancer activo de hueso de manera independiente. Un enhancer puede potenciar la actividad transcripcional de un promotor basal gracias a su capacidad de reclutar factores de transcripción (Eeckhoute y col., 2009). Estudios previos donde se analizó la secuencia repetida presente a nivel del valle de la marca H3K4me1 del Enhancer-1073, se encontró en la base de datos TRANSFAC (a través del software PROMO) distintos sitios de unión a factores de transcripción con alguna función conocida en células óseas (Contreras, 2016). Dos de ellos son particularmente interesantes, el primero es un sitio de unión para el factor de transcripción Msx-1, esta es una proteína fundamental para el correcto desarrollo craneal, más específicamente para la expansión apical de los huesos frontal y parietal (Han y col., 2007; Roybal y col. 2013). La presencia de un sitio de unión para Msx-1 es particularmente llamativo considerando que los osteoblastos utilizados para realizar el ChIP-seq que permitió identificar al Enhancer-1073 son osteoblastos de hueso fronto-parietal de *X. tropicalis* (Muñoz, 2015; Hanna, 2014). El otro sitio potencialmente importante corresponde a un sitio de unión para VDR, el cual corresponde a un gen que es altamente expresado en osteoblastos de *X. tropicalis* y que además se sabe que es importante para el desarrollo general del esqueleto (Lee y col., 2015).

En este trabajo también se propusieron dos modelos para explicar la pérdida de actividad cuando al Enhancer-1073 se le removía la secuencia repetida (Contreras, 2016). Según el primer modelo, la secuencia repetida presente en el Enhancer-1073 actuaría como un espaciador molecular, el cual estaría separando dos o más sitios de unión a factores de transcripción permitiendo que estos activen la transcripción en forma óptima. En este caso eliminar la secuencia repetida afectaría en forma

negativa la actividad del enhancer, la cercanía de los sitios de unión sería incompatible con la función de los factores de transcripción, por ejemplo como consecuencia de impedimento estérico (Fig. 10A). Por otro lado, según el segundo modelo, la secuencia repetida sería portadora directamente de uno o varios de los sitios de unión a factores de transcripción fundamentales para la actividad transcripcional del Enhancer-1073. Al remover la repetición se perderían estos sitios de unión, impidiendo que estos factores se puedan unir para activar la transcripción (Fig. 10B).

Nuestros resultados apoyan al segundo modelo propuesto. El hecho de que la región repetida tenga actividad por sí sola, no es compatible con un simple rol de espaciador molecular, y sugiere que dicha región contiene todas las combinaciones de sitios de unión a factores de transcripción que confieren actividad transcripcional al Enhancer-1073.

Un punto interesante de este modelo es que una parte de la repetición más corta del Enhancer-1073 se encuentra ubicada justo en el valle del motivo pico-valle-pico de la marca H3K4me1, un lugar con el contexto cromatínico idóneo para la unión de factores de transcripción (Shlyueva y col., 2014). Es precisamente en este valle donde identificamos un sitio de unión putativo para el factor de transcripción Msx-1. Hemos decidido proponer a este factor de transcripción como el responsable del cambio en la actividad normal del Enhancer-1073 dado que su función ha sido asociada al correcto desarrollo craneal en organismos vertebrados (Han y col., 2007) (Fig. 10C). Por lo tanto, este factor de transcripción podría tener una función no descrita en el desarrollo óseo, mediante la activación directa del gen de *Col1a1*, un componente fundamental de la matriz extracelular mineralizada.

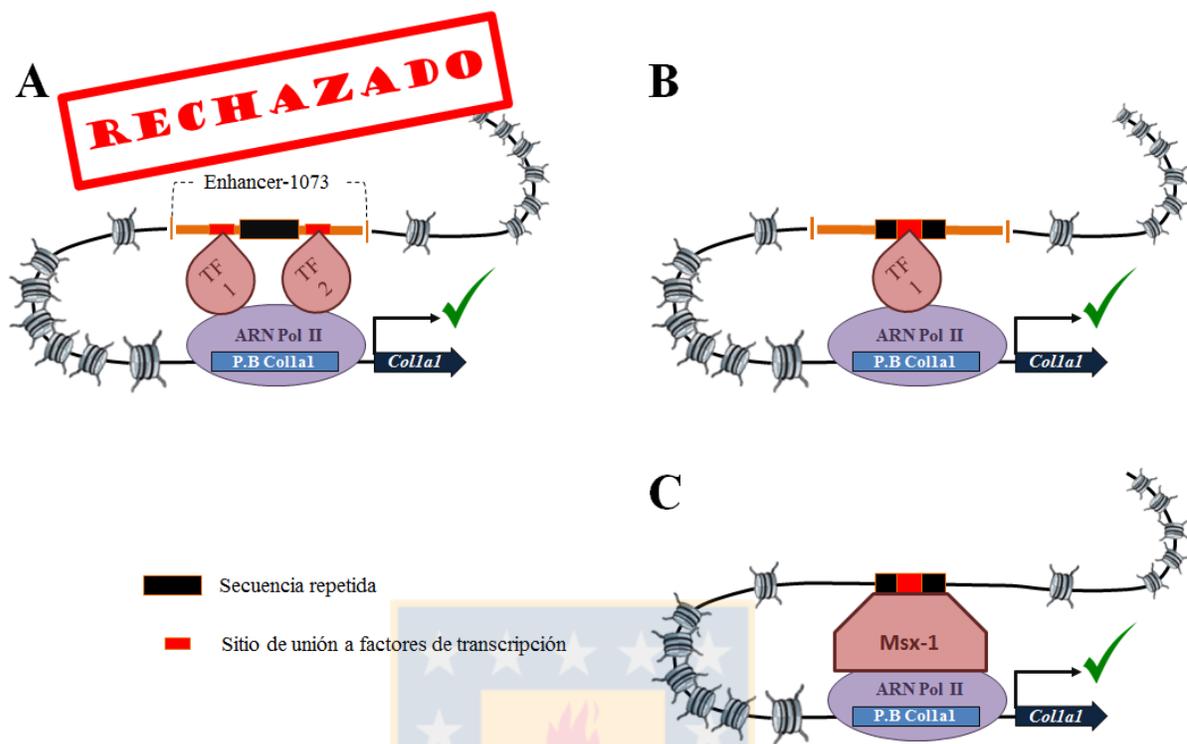


Figura 10. Modelos propuestos para la función de la secuencia repetida presente en el Enhancer-1073. **(A)** El primer modelo propone a la repetición como un espaciador molecular el cual permite la unión de dos factores de transcripción con sus correspondientes sitios de unión ubicados de cada lado de dicha repetición. En ausencia de repetición estos factores de transcripción no pueden interactuar con los sitios de unión debido a un impedimento estérico, evitando que la transcripción ocurra de manera correcta. **(B)** El segundo modelo propone a la repetición como portador de un sitio de unión para un factor de transcripción clave en la función del Enhancer-1073. Al eliminar la repetición el sitio de unión se pierde, impidiendo el correcto reclutamiento de la maquinaria transcripcional e inhibiendo el proceso de transcripción. **(C)** Al tener evidencia que apoya al segundo modelo propuesto, se propone al factor de transcripción Msx-1 como el principal responsable de la función transcripcional de la secuencia repetida inserta en el Enhancer-1073. Fuente: Elaboración propia.

6.4. La actividad transcripcional de secuencias repetidas podría estar asociada a la diversificación de células esqueléticas en vertebrados.

En el transcurso de esta tesis se ha hecho un aporte conceptual al campo de la evolución de la osteogénesis (Contreras y col. 2017), que proponemos re-analizar aquí en un contexto de repeticiones genómicas.

La transdiferenciación ocurre cuando células diferenciadas cambian su identidad a otro tipo diferenciado de células (Merrell y Stanger 2016). La transdiferenciación puede ocurrir en condiciones fisiológicas, como ha sido descrito en el desarrollo del páncreas de *X. laevis* y el corazón de *D. melanogaster* (Mukhi y Brown 2011; Schaub y col. 2015). Estos casos naturales de transdiferenciación entregan ejemplos de plasticidad en la diferenciación celular, sin embargo, estos eventos no han sido asociados a una transición evolutiva importante.

Un ejemplo de transdiferenciación en condiciones fisiológicas ocurre en el esqueleto de ratón. Para contextualizar, es importante mencionar que la esquelotogénesis en ratón ocurre por dos rutas de desarrollo distintas de acuerdo a la ubicación anatómica de los elementos esqueléticos. Por una parte, los huesos del cráneo y parte de la clavícula se forman por osificación intermembranosa, un proceso que consiste en la diferenciación directa de mesénquima a osteoblastos. Por otra parte, el desarrollo de elementos esqueléticos endocondrales, como por ejemplo huesos de las extremidades, costillas y vertebras requieren la diferenciación de condrocitos (las células formadoras de cartílago) desde condensaciones mesenquimales para formar una molde cartilaginoso, el cual pasa por un proceso de maduración que involucra la hipertrofia de condrocitos para luego ser eventualmente reemplazado por hueso (Hartmann, 2009). En este punto, es importante hacer una distinción entre el hueso pericondral y hueso endocondral. El hueso pericondral, es un tipo compacto de hueso depositado por osteoblastos cuya diferenciación desde el pericondrio (una capa de mesénquima que circunda el molde de cartilago). En contraste el hueso

endocondral, consiste en el depósito inicial de trabécula de matriz ósea sobre los remanentes de cartílago dentro de la cavidad medular.

Cuatro estudios recientes con sofisticados experimentos de rastreo de linaje en *M. musculus* han sellado el asunto, demostrando que un grupo de condrocitos transdiferencian en osteoblastos endocondrales durante las etapas tempranas del desarrollo esquelético y crecimiento postnatal, así como también reparación de fracturas (Park y col. 2015; Tsang y col. 2015; Yang y col. 2014a; Yang y col. 2014b; Zhou y col. 2014). Estando restringidos a solo un representante mamífero, estos hallazgos proponen preguntarse el origen de la transdiferenciación de condrocitos en osteoblastos y sus implicaciones en función de la aparición evolutiva de la osificación endocondral.

De acuerdo a restos fósiles, el hueso endocondral evolucionó de manera relativamente reciente, en el linaje que lleva a los osteíctios y luego diverge desde los condriictios (Donoghue y Sansom, 2002; Hirasawa y Kuratani, 2015). Según el escenario anterior, evidencia del hueso endocondral ha sido reportada en elementos esqueléticos cartilaginosos de todos los grupos de osteíctios analizados hasta ahora. Las extremidades de los anfibios *X. tropicalis* y *P. waltl* (un urodelo) también albergan hueso endocondral, aunque en menor medida que los mamíferos (Castanet y col. 2003; Miura y col. 2008; Quilhac y col. 2014). Igualmente, peces teleósteos como *A. elegans*, *C. carpio* y *D. rerio* exhiben una moderada cantidad de hueso endocondral (Benjamin y col. 1992; Bruneel y Witten 2015; Huysseune y Verraes 1986; Witten y Huysseune 2009). En resumen, diversas especies de organismos sugieren que el hueso endocondral representa una característica compartida entre sacopteringios y actinopteringios, por lo que debe ser considerado como una sinapomorfia de los osteíctios. Es por esto que consideramos pertinente preguntarnos ¿cuales cambios celulares y genéticos que llevan aparición de esta novedad evolutiva?

La evidencia anteriormente mencionada abre la posibilidad de que la transdiferenciación de condrocito hipertróficos en osteoblastos juega un rol

fundamental en la evolución de la osificación endocondral. Como grupo hemos decidido proponer que los condrocitos hipertróficos adquieren la habilidad de transdiferenciar a osteoblastos en especies pertenecientes al linaje osteíctio, luego de que estos se separaron evolutivamente de los condriictios, contribuyendo de este modo al origen del hueso endocondral.

En la década pasada, una serie de estudios han hecho difícil establecer el límite entre las identidades moleculares de condrocitos y osteoblastos. Dentro de los genes que han sido inicialmente reconocidos como “específicos de condrocitos”, *colágeno 2a1*, *colágeno 10a1* y *sox9* se han encontrado expresados en osteoblastos osteíctios, aunque variando en qué grado de acuerdo a las especies, locación anatómica y estadio del desarrollo (Abzhanov y col. 2007; Albertson y col. 2010; Aldea y col. 2013; Bertin y col. 2015; Eames y col. 2012; Enault y col. 2015; Hilton y col. 2007). Igualmente, se ha descrito que genes supuestamente “específicos de osteoblastos” están expresados (ej., *Colageno 1a1* y *osteocalcina*) y son requeridos funcionalmente (ej., *runx2*, *sp7*) durante la osteogénesis osteictía (Chen y col. 2014; Gavaia y col. 2006; Hammond y Schulte-Merker 2009; Kerney y col. 2007; Kirsch y col. 1997; Nishimura y col. 2012; Viegas y col. 2013). En adición a la mezcla de patrones de expresión descritos previamente, existen muchos casos de tipos celulares esqueléticos híbridos que han sido reportados. Por ejemplo, el fibrocartílago que es depositado por fibrocondrocitos, produciendo formaciones densamente empaquetadas de Colágeno 1a1 y mineralizando su matriz en capas sucesivas (Dyment y col. 2015). El hueso condroide, que consiste en células similares a condrocitos embebidas en una matriz mineralizada ósea y co-expresando altos niveles de genes osteoblásticos y condrocíticos (Benjamin y col. 1992; Huysseune and Sire 1990; Mizoguchi y col. 1997; Paul y col. 2016; Vickaryous and Hall 2008).

Es en este punto donde los resultados obtenidos en este trabajo, donde demostramos que una secuencia repetida posee por si sola los elementos necesarios para actuar como un enhancer óseo activo, podrían adquirir una

relevancia funcional y evolutiva. Ya se ha mencionado la capacidad que tienen las secuencias repetidas para propagarse a través del genoma, generando así en muchos casos nuevos genes, o nuevos elementos regulatorios (Gerlo y col., 2006; Lynch y col., 2011; Jjingo y col., 2014; Volff, 2006).

El modelo propuesto en la figura 11 presupone que el esqueleto del vertebrado ancestral estaba compuesto principalmente por una matriz mineralizada de cartílago hialino, como lo sugiere nuestra revisión de la literatura reciente en el tema (Contreras y col. 2017). A la fecha, no hay hipótesis clara o explícita respecto a los cambios genéticos que podrán haber permitido el origen del osteoblasto y, por ende, del tejido óseo. Como marco teórico, y en directa relación con el presente trabajo, proponemos que una secuencia repetida conteniendo los elementos necesarios para regular un gen de tejido conectivo, como *Col1a1* por ejemplo (tal es el caso de la secuencia repetida inserta en el Enhancer-1073), se haya propagado en el genoma de un vertebrado primitivo y se haya insertado en un contexto cromatínicamente favorable en la cercanía de un gen involucrado en la mineralización de la matriz cartilaginosa (Fig. 11A y 11B). Proponemos que estos cambios moleculares permitieron un fenómeno de exaptación funcional para esta secuencia regulatoria, de tal forma que el nuevo enhancer confirió la capacidad de mineralizar la matriz extracelular secretada por los fibroblastos (Fig. 11C). Estos últimos años se ha puesto énfasis en las impactantes similitudes que existen entre las identidades moleculares de las células esqueléticas como los osteoblastos, odontoblastos, ameloblastos y condrocitos (Contreras y col. 2017; Fisher y Franz-Odenaal, 2012; Gomez-Picós y Eames. 2015). Es posible que estas similitudes se den por un cambio en los elementos regulatorios como enhancers y promotores que regulan las redes de expresión génicas de dichas células. Como grupo postulamos que los cambios que afectan los nodos corriente debajo de estas redes regulatorias podrían modificar aspectos discretos de la fisiología celular y dar lugar a tipos celulares “híbridos” entre osteoblastos y condorcitos, mientras que los cambios regulatorios que afectan a genes ubicados en la cima de la cascada genética se podrían encontrar involucrados

en el fenómeno de trándiferenciación recientemente reportado durante la osificación endocondral del ratón (Contreras y col., 2017). El presente trabajo de tesis, al ser el primero en demostrar el rol de una secuencia repetida en el control de la expresión de genes esqueléticos, abre la posibilidad que la propagación de elementos móviles haya cumplido un rol preponderante en los fenómenos evolutivos que acompañaron la diversificación de células esqueléticas.



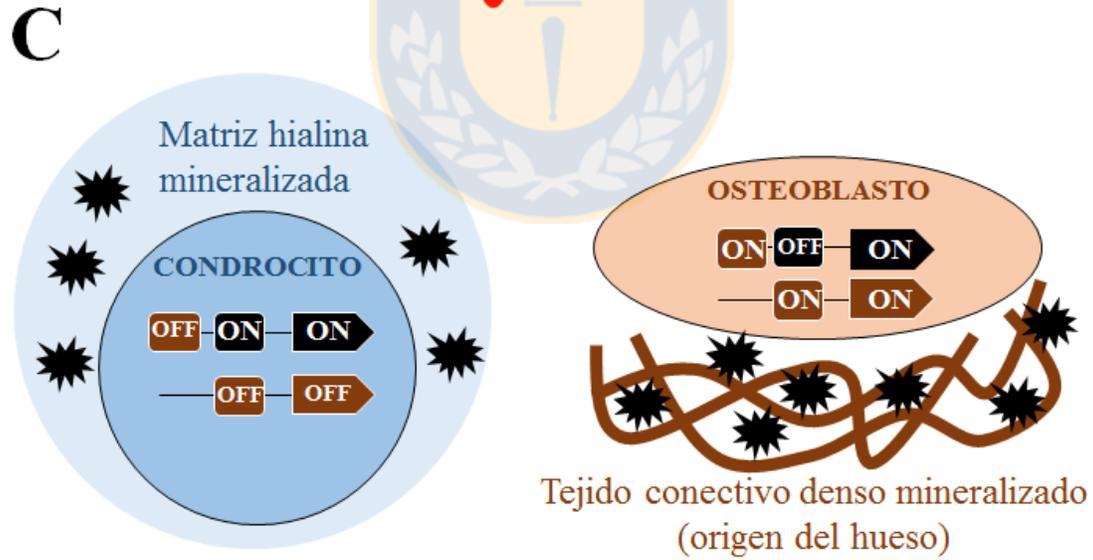
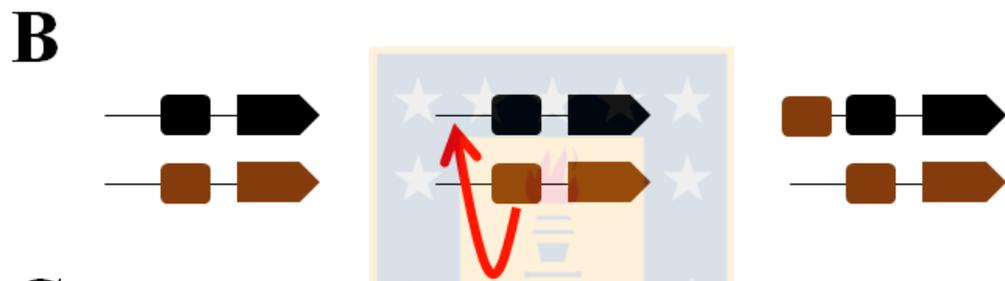
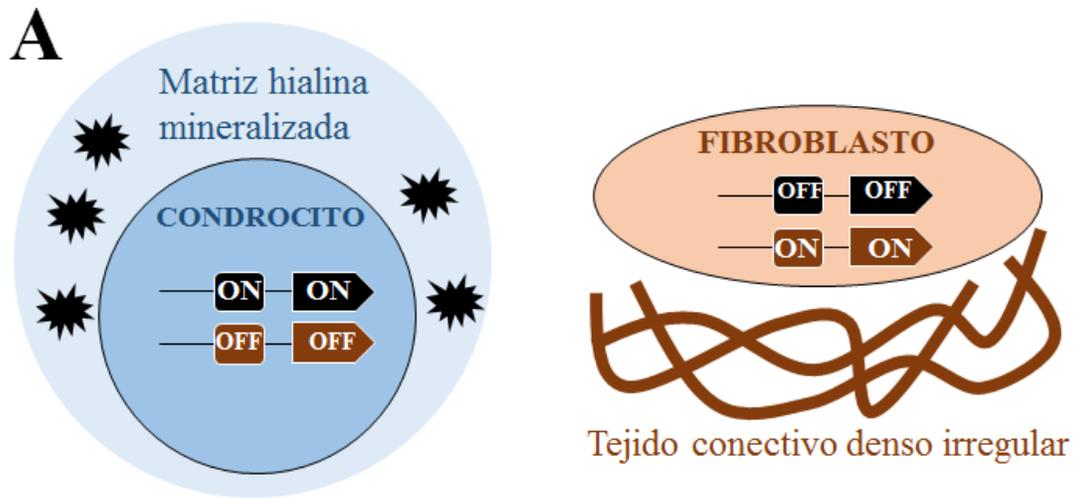


Figura 11. Modelo propuestos para el rol que puede cumplir la movilización de secuencias repetida en la evolución de tipos celulares esqueléticos. **(A)** Situación hipotética en el vertebrado ancestral, cuyo esqueleto maduro se componía de cartílago hialino mineralizado. A la izquierda se muestra un condrocito hipertrófico capaz de generar cristales de hidroxiapatita (estrellas negras) en su matriz extracelular. A la derecha se muestra un fibroblasto, capaz de producir una matriz de tejido conectivo denso irregular muy rica en fibras de colágeno (líneas gruesas). Para cada célula se muestra un gen involucrado en la formación de hidroxiapatita y su enhancer específico de condrocito (flecha y rectángulo negras, respectivamente) y un gen involucrado en la producción de fibras de colágeno y su enhancer específico de fibroblasto (flecha y rectángulo cafés, respectivamente). “ON” se refiere a un enhancer activo y a un gen expresado. “OFF” se refiere a un enhancer inactivo y a un gen apagado. **(B)** Izquierda: vista de los 2 loci en la situación inicial. Centro: el enhancer de fibroblasto, contenido en una secuencia repetida, se moviliza (flecha roja) y se inserta en la proximidad del gen de condrocito. Derecha: el gen de condrocito queda bajo el control del enhancer de fibroblasto, y por lo tanto adquirió el potencial para expresarse en ambos tipos celulares. **(C)** La movilización de la secuencia repetida que contiene el enhancer de fibroblasto permite a este tipo celular “hackear” el programa genético involucrado en la formación de cristales de hidroxiapatita y mineralizar su matriz extracelular colagenosa, dando origen al tejido óseo producido por osteoblastos, un tipo celular exclusivo de los vertebrados. Fuente: Elaboración propia.

7. CONCLUSIONES

1. La combinación de electroporación con citometría de flujo permitió realizar grandes mejoras metodológicas para ensayos de actividad transcripcional en osteoblastos primarios de *X. tropicalis*, generando un ensayo más rápido y eficiente.
2. Los resultados obtenidos en este trabajo concuerdan con los resultados previos y se revalida la necesidad de la secuencia repetida presente en el Enhancer-1073 para la actividad transcripcional de este elemento regulatorio.
3. La secuencia repetida presente en el Enhancer-1073 es suficiente por si sola para potenciar la actividad del promotor basal de *Col1a1*.



8. PROYECCIONES

8.1. Validación del modelo propuesto

Para un análisis más detallado sería interesante eliminar cada una de las dos repeticiones contenidas en el Enhancer-1073 por separado. Favorecemos la posibilidad que la secuencia repetida ubicada entre los picos de H3K4me1 es la que realmente contiene sitios de unión a factores de transcripción fundamentales, esto debido a su ubicación en una región de cromatina más relajada y donde generalmente se unen dichos factores (Shlyueva y col., 2014).

De confirmarse esto, sería muy informativo realizar una mutación dirigida al sitio de unión al factor de transcripción Msx-1 para definir si este es realmente el factor de transcripción asociado a la actividad transcripcional de la repetición del Enhancer-1073. De resultar positivo, se encontraría una nueva función de este actor de transcripción en anfibios posiblemente asociada a la regulación del gen *Col1a1*.

Cómo perspectiva más ambiciosa, se podría explorar si otras copias de la repetición incluida en el Enhancer-1073 actúan como enhancers también, en cuyo caso será fundamental conocer cuales es son los genes blancos y cual rol cumplen en la osteogénesis.

8.2. Análisis *in vivo*

Será importante comprobar que todos los resultados obtenidos en un sistema de cultivo *in vitro* son reproducibles *in vivo*. Para esto se generarían larvas de *X. tropicalis* transgénicas mediante la técnica de la transposasa Tol2. En el caso de las secuencias repetidas estos ensayos podrían generar una perspectiva más amplia y más fisiológica de su función. En los ensayos con células en cultivo solo se puede cuantificar la actividad del enhancer en presencia, ausencia e independencia de secuencias repetidas. En cambio, en larvas transgénicas es posible analizar múltiples tejidos simultáneamente, y por lo tanto se podrá evaluar si estas

secuencias están relacionadas con la especificidad del enhancer y/o con el patrón de expresión espacio-temporal que este genera en organismos completos.

9. REFERENCIAS

Abzhanov A, Rodda SJ, McMahon AP, Tabin CJ (2007) Regulation of skeletogenic differentiation in cranial dermal bone. *Development* 134:3133–3144.

Albertson RC et al (2010) Molecular pedomorphism underlies craniofacial skeletal evolution in Antarctic notothenioid fishes. *BMC Evol Biol* 10:4.

Aldea D et al (2013) Evolution of the vertebrate bone matrix: an expression analysis of the network forming collagen paralogues in amphibian osteoblasts. *J Exp Zool B Mol Dev Evol* 320:375–384.

Akagi, K., Li, J. and Symer, D.E., 2013. How do mammalian transposons induce genetic variation? A conceptual framework: the age, structure, allele frequency, and genome context of transposable elements may define their wide-ranging biological impacts. *Bioessays*. 35, 397-407.

Andersson, R., Gebhard, C., Miguel-Escalada, I., Hoof, I., Bornholdt, J., Boyd, M., Chen, Y., Zhao, X., Schmidl, C., Suzuki, T., Ntini, E., Arner, E., Valen, E., Li, K., Schwarzfischer, L., Glatz, D., Raithel, J., Lilje, B., Rapin, N., Bagger, F.O., Jorgensen, M., Andersen, P.R., Bertin, N., Rackham, O., Burroughs, A.M., Baillie, J.K., Ishizu, Y., Shimizu, Y., Furuhashi, E., Maeda, S., Negishi, Y., Mungall, C.J., Meehan, T.F., Lassmann, T., Itoh, M., Kawaji, H., Kondo, N., Kawai, J., Lennartsson, A., Daub, C.O., Heutink, P., Hume, D.A., Jensen, T.H., Suzuki, H., Hayashizaki, Y., Muller, F., Consortium, F., Forrest, A.R., Carninci, P., Rehli, M. and Sandelin, A., 2014. An atlas of active enhancers across human cell types and tissues. *Nature*. 507, 455-61.

Atkinson TJ, Halfon MS. 2014. Regulation of gene expression in the genomic context. *Comput Struct Biotechnol J*. 9 -13.

- Bacallao R., Kiai K., Jesaitis L. 1995. Guiding Principles of Specimen Preservation for Confocal Fluorescence Microscopy. Handbook of Biological Confocal Microscopy. pp 311-325 65
- Barolo, S. and Posakony, J.W., 2002. Three habits of highly effective signaling pathways: principles of transcriptional control by developmental cell signaling. Genes Dev. 16: 1167-81.
- Benjamin M, Ralphs JR, Eberewariye OS. 1992. Cartilage and related tissues in the trunk and fins of teleosts. J Anat 181(Pt 1):113–118
- Bertin A., Hanna P., Otarola G., Fritz A., Henriquez J.P., Marcellini S. 2015. Cellular and molecular characterization of a novel primary osteoblast culture from the vertebrate model organism *Xenopus tropicalis*. Histochem Cell Biol. 143:431–442
- Bou-Gharios, G., Garrett LA, Rossert J, Niederreither K, Eberspaecher H, Smith C, Black C, Crombrughe B., 1996. A Potent Far-Upstream Enhancer in the Mouse Pro alpha2(I) Collagen Gene Regulates Expression of Reporter Genes in Transgenic Mice. J Cell Biol, 134(5): p. 1333-44.
- Bejerano, G., Lowe, C.B., Ahituv, N., King, B., Siepel, A., Salama, S.R., Rubin, E.M., Kent, W.J. and Haussler, D., 2006. A distal enhancer and an ultraconserved exon are derived from a novel retroposon. Nature. 441, 87-90.
- Berman S., Yuan T., Miller E., Lee E., Caron A., Lees J., 2008. The retinoblastoma protein tumor suppressor is important for appropriate osteoblast differentiation and bone development. Mol Cancer Res. 6(9):1440-51.
- Bruneel B, Witten PE. 2015. Power and challenges of using zebrafish as a model for skeletal tissue imaging. Connect Tissue Res 56:161–173.

- Buecker, C. and Wysocka, J., 2012. Enhancers as information integration hubs in development: lessons from genomics. *Trends Genet.* 8, 276-84.
- Bulger M., Groudine M., 2011 Functional and mechanistic diversity of distal transcription enhancers. *Cell.* 2011; 144:327–339.
- Butler, J.E. y Kadonaga J.T., 2001. Enhancer–promoter specificity mediated by DPE or TATA core promoter motifs. *Genes Dev.* 15(19): p. 2515-2519. 66
- Castanet J, Francillon-Vieillot H, De Ricqlès A, Zylberberg L. 2003. The skeletal histology of the Amphibia. In: H. h (ed) *Amphibian Biology*, vol 5. Chipping Norton, NSW, Australia, pp 1598–1683
- Chandler, R.L., Chandler K.J., McFarland K.A., Mortlock D.P., 2007. Bmp2 transcription in osteoblast progenitors is regulated by a distant 3' enhancer located 156.3 kilobases from the promoter. *Mol Cell Biol.* 27(8): p. 2934-51.
- Chen, J., Thomas HF, Jin H, Jiang H, Sodek J., 1996. Expression of rat bone sialoprotein promoter in transgenic mice. *J Bone Miner Res.* 11(5): p. 654-64.
- Chen T., Dent S. 2014. Chromatin modifiers and remodellers: regulators of cellular differentiation. *Nat Rev Genet.* 15(2):93-106.
- Chen H, Ghori-Javed FY, Rashid H, AdhamiMD, Serra R, Gutierrez SE, Javed A. 2014. Runx2 regulates endochondral ossification through control of chondrocyte proliferation and differentiation. *J Bone Miner Res* 29:2653–2665.
- Chuong, E.B., Rumi, M.A., Soares, M.J. and Baker, J.C., 2013. Endogenous retroviruses function as species-specific enhancer elements in the placenta. *Nat Genet.* 45, 325-9.
- Close B., Banister K., Baumans V., Bernoth E.M., Bromage N., Bunyan J., Erhardt W., Flecknell P., Gregory N., Hackbarth H., Morton D., Warwick C. 1996.

Recommendations for euthanasia of experimental animals: Part 1. DGXI of the European Commission. Lab Anim. 30(4): p. 293-316.

Contreras P. 2016. Función transcripcional de secuencias repetidas insertas en enhancers osteoblásticos de *Xenopus tropicalis*. Tesis para optar al grado de Bioingeniero. Universidad de Concepción.

Contreras P.*, Cervantes-Diaz F.*, Marcellini S. 2017. Evolutionary origin of endochondral ossification: the transdifferentiation hypothesis. Dev Genes Evol. 227(2):121-127 (* igual contribución)

Creyghton, M.P., Cheng, A.W., Welstead, G.G., Kooistra, T., Carey, B.W., Steine, E.J., Hanna, J., Lodato, M.A., Frampton, G.M., Sharp, P.A., Boyer, L.A., Young, R.A. and 67

Jaenisch, R., 2010. Histone H3K27ac separates active from poised enhancers and predicts developmental state. Proc Natl Acad Sci U S A. 107, 21931-6.

Dong, X., Navratilova, P., Fredman, D., Drivenes, O., Becker, T.S. and Lenhard, B., 2010. Exonic remnants of whole-genome duplication reveal *cis*-regulatory function of coding exons. Nucleic Acids Res. 38, 1071-85.

Donoghue PC, Sansom IJ. 2002. Origin and early evolution of vertebrate skeletonization. Microsc Res Tech 59:352–372.

Doolittle, W.F., 2013. Is junk DNA bunk? A critique of ENCODE. Proc Natl Acad Sci U S A. 110, 5294-300.

Dyment NA et al. 2015. Gdf5 progenitors give rise to fibrocartilage cells that mineralize via hedgehog signaling to form the zonal enthesis. Dev Biol 405:96–107.

Eames BF, Amores A, Yan YL, Postlethwait JH. 2012. Evolution of the osteoblast: skeletogenesis in gar and zebrafish. BMC Evol Biol 12: 27.

- Eeckhoutte, J., Metivier, R. and Salbert, G., 2009. Defining specificity of transcription factor regulatory activities. *J Cell Sci.* 122, 4027-34.
- Enault S., Muñoz D., Silva W., Borday-Birraux V., Bonade M., Oulion S., Ventéo S., Marcellini S., Debais-Thibaud M., 2015. Molecular footprinting of skeletal tissues in the catshark *Scyliorhinus canicula* and the clawed frog *Xenopus tropicalis* identifies conserved and derived features of vertebrate calcification. *Front Genet.* <http://dx.doi.org/10.3389/fgene.2015.00283>
- Fort, A., Hashimoto, K., Yamada, D., Salimullah, M., Keya, C.A., Saxena, A., Bonetti, A., Voineagu, I., Bertin, N., Kratz, A., Noro, Y., Wong, C.H., de Hoon, M., Andersson, R., Sandelin, A., Suzuki, H., Wei, C.L., Koseki, H., Consortium, F., Hasegawa, Y., Forrest, A.R. and Carninci, P., 2014. Deep transcriptome profiling of mammalian stem cells supports a regulatory role for retrotransposons in pluripotency maintenance. *Nat Genet.* 46, 558-66. 68
- Fish M., Nakayama T., Grainger R. 2012. Simple, fast, tissue-specific bacterial artificial chromosome transgenesis in *Xenopus*. *Genesis.* (3):307-15.
- Fisher S., Franz-Odenaal T. 2012. Evolution of the bone gene regulatory network. *Curr Opin Genet Dev.* 22(4):390-7.
- Franchini, L.F., Lopez-Leal, R., Nasif, S., Beati, P., Gelman, D.M., Low, M.J., de Souza, F.J. and Rubinstein, M., 2011. Convergent evolution of two mammalian neuronal enhancers by sequential exaptation of unrelated retroposons. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 108, 15270-5.
- French-Constant, R., Daborn, P. and Feyereisen, R., 2006. Resistance and the jumping gene. *Bioessays.* 28, 6-8.
- Fritz A., Bertin A., Hanna P., Nualart F., Marcellini S. 2016. A Single Chance to Contact Multiple Targets: Distinct Osteocyte Morphotypes Shed Light on the

Cellular Mechanism Ensuring the Robust Formation of Osteocytic Networks. *J Exp Zool B Mol Dev Evol.* 326(5):280-9.

Gavaia PJ et al. 2006. Osteocalcin and matrix Gla protein in zebrafish (*Danio rerio*) and Senegal sole (*Solea senegalensis*): comparative gene and protein expression during larval development through adulthood. *Gene Expr Patterns* 6:637–652.

Gehrig, J., M. Reischl, E. Kalmar, M. Ferg, Y. Hadzhiev, A. Zaucker, C. Song, S. Schindler, U. Liebel and F. Muller., 2009. Automated high-throughput mapping of promoter-enhancer interactions in zebrafish embryos. *Nat Methods.* 6(12): p. 911-916.

Gemayel, R., Vinces, M.D., Legendre, M. and Verstrepen, K.J., 2010. Variable tandem repeats accelerate evolution of coding and regulatory sequences. *Annu Rev Genet.* 44, 445-77.

Gerlo, S., Davis, J.R., Mager, D.L. and Kooijman, R., 2006. Prolactin in man: a tale of two promoters. *Bioessays.* 28, 1051-5. 69

Goda T, Abu-Daya A, Carruthers S, Clark MD, Stemple DL, Zimmerman LB. 2006. Genetic screens for mutations affecting development of *Xenopus tropicalis*. *PLoS Genet* 2:e91.

Gomez-picos P., Eames B., 2015. On the evolutionary relationship between chondrocytes and osteoblasts. *Front Genet.* 6:297

Goodrich, J.A. y Tjian, R., 2010. Unexpected roles for core promoter recognition factors in cell-type-specific transcription and gene regulation. *Nat Rev Genet.* 11, 549-58.

Gottesman S., 1981. Lambda site-specific recombination: The att site. *Cell, Vol. 25.* 585-586.

- Graf JD y Fischberg M., 1986. Albumin evolution in polyploid species of the genus *Xenopus*. *Biochem Genet.* 24(11-12):821-37.
- Graur, D., Zheng, Y., Price, N., Azevedo, R.B., Zufall, R.A. and Elhaik, E., 2013. On the immortality of television sets: "function" in the human genome according to the evolution-free gospel of ENCODE. *Genome Biol Evol.* 5, 578-90.
- Guenther C., L. Pantalena-Filho, and D.M. Kingsley, 2008. Shaping skeletal growth by modular regulatory elements in the *Bmp5* gene. *PLoS Genet.* 4(12): p. e1000308.
- Guo X, Zhang T, Hu Z, Zhang Y, Shi Z, Wang Q, Cui Y, Wang F, Zhao H, Chen Y. 2014. Efficient RNA/Cas9-mediated genome editing in *Xenopus tropicalis*. *Development* 141:707-714.
- Gymrek M., Willems T., Guilmatre A., Zeng H., Markus B., Georgiev S., Daly M., Price A., Pritchard J., Sharp A., Erlich Y. 2016. Abundant contribution of short tandem repeats to gene expression variation in humans. *Nat Genet.* 48(1):22-9.
- Haberle, V., Li, N., Hadzhiev, Y., Plessy, C., Previti, C., Nepal, C., Gehrig, J., Dong, X., Akalin, A., Suzuki, A.M., van, I.W.F., Armant, O., Ferg, M., Strahle, U., Carninci, P., Muller, F. and Lenhard, B., 2014. Two independent transcription initiation codes overlap on vertebrate core promoters. *Nature.* 507, 381-5. 70
- Hall, B.K. (Ed.) 2005, *Bones And Cartilage: Developmental And Evolutionary Biology*, Academic Press.
- Hammond CL, Schulte-Merker S. 2009. Two populations of endochondral osteoblasts with differential sensitivity to Hedgehog signalling. *Development* 136:3991–4000.

- Han, J., Ishii, M., Bringas Jr., P., Maas, R.L., Maxson Jr., R.E., Chai, Y., 2007. Concerted action of Msx1 and Msx2 in regulating cranial neural crest cell differentiation during frontal bone development. *Mech. Dev.* 124, 729–745.
- Hanna P., 2014. Control transcripcional óseo y repeticiones genómicas en *Xenopus tropicalis*: un análisis por RNA-seq y ChIP-seq in vivo. Tesis para optar al grado de Doctor en Biología Celular y Molecular. Universidad de Concepción.
- Harmston, N. and Lenhard, B., 2013. Chromatin and epigenetic features of long-range gene regulation. *Nucleic Acids Res.* 41, 7185-99.
- Hartmann C. 2009. Transcriptional networks controlling skeletal development. *Curr Opin Genet Dev* 19:437–443.
- Heinz S., Romanoski C.E., Benner C., Glass C.K. 2015. The selection and function of cell type-specific enhancers. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 16(3):144-54.
- Hellsten, U., Harland, R.M., Gilchrist, M.J., Hendrix, D., Jurka, J., Kapitonov, V., Ovcharenko, I., Putnam, N.H., Shu, S., Taher, L., Blitz, I.L., Blumberg, B., Dichmann, D.S., Dubchak, I., Amaya, E., Detter, J.C., Fletcher, R., Gerhard, D.S., Goodstein, D., Graves, T., Grigoriev, I.V., Grimwood, J., Kawashima, T., Lindquist, E., Lucas, S.M., Mead, P.E., Mitros, T., Ogino, H., Ohta, Y., Poliakov, A.V., Pollet, N., Robert, J., Salamov, A., Sater, A.K., Schmutz, J., Terry, A., Vize, P.D., Warren, W.C., Wells, D., Wills, A., Wilson, R.K., Zimmerman, L.B., Zorn, A.M., Grainger, R., Grammer, T., Khokha, M.K., Richardson, P.M. and Rokhsar, D.S., 2010. The genome of the Western clawed frog *Xenopus tropicalis*. *Science.* 328, 633-6. 71
- Hewitt J., Lu X., Gilbert L., Nanes M., 2008. The muscle transcription factor MyoD promotes osteoblast differentiation by stimulation of the Osterix promoter. *Endocrinology.* 149(7):3698-707.

- Hikosaka, A. and Kawahara, A., 2010. A systematic search and classification of T2 family miniature inverted-repeat transposable elements (MITEs) in *Xenopus tropicalis* suggests the existence of recently active MITE subfamilies. *Mol Genet Genomics*. 283, 49-62.
- Hikosaka, A., Yokouchi, E. and Kawahara, A., 2000. Extensive amplification and transposition of a novel repetitive element, *xstir*, together with its terminal inverted repeat in the evolution of *Xenopus*. *J Mol Evol*. 51, 554-64.
- Hilton MJ, Tu X, Long F. 2007. Tamoxifen-inducible gene deletion reveals a distinct cell type associated with trabecular bone, and direct regulation of PTHrP expression and chondrocyte morphology by *Ihh* in growth region cartilage. *Dev Biol* 308:93–105.
- Hirasawa T, Kuratani S. 2015. Evolution of the vertebrate skeleton: morphology, embryology, and development. *Zoological Letters* 1. doi:10.1186/s40851-014-0007-7
- Hozumi A., Yoshida R., Horie T., Sakuma T., Yamamoto T., Sasakura Y. 2013. Enhancer activity sensitive to the orientation of the gene it regulates in the chordate genome. *Dev Biol*. 375(1):79-91.
- Hughes MK and Hughes AL., 1993. Evolution of duplicate genes in a tetraploid animal, *Xenopus laevis*. *Mol Biol Evol*. 10(6):1360-9.
- Huycke, T.R., Eames, B.F. and Kimmel, C.B., 2012. Hedgehog-dependent proliferation drives modular growth during morphogenesis of a dermal bone. *Development*. 139, 2371-80.
- Huyseune A, Sire JY. 1990. Ultrastructural observations on chondroid bone in the teleost fish *Hemichromis bimaculatus*. *Tissue Cell* 22: 371–383. 72

- Huysseune A, Verraes W. 1986. Chondroid bone on the upper pharyngeal jaws and neurocranial base in the adult fish *Astatotilapia elegans*. *Am J Anat* 177:527–535.
- Igawa K., Ohara N., Kawakubo A., Sugimoto K., Yanagiguchi K., Ikeda T., Yamada S., Hayashi Y1. 2014. D-glucosamine promotes transfection efficiency during electroporation. *Biomed Res Int*. 2014:485867. doi: 10.1155/2014/485867.
- Inohaya, K., Y. Takano, and A. Kudo, 2007. The teleost intervertebral region acts as a growth center of the centrum: in vivo visualization of osteoblasts and their progenitors in transgenic fish. *Dev Dyn*. 236(11): p. 3031-46.
- International Chicken Genome Sequencing, C., 2004. Sequence and comparative analysis of the chicken genome provide unique perspectives on vertebrate evolution. *Nature*. 432, 695-716.
- Jeong H., Choi Y., Lee S., Lee K., 2013. YY1 represses the transcriptional activity of Runx2 in C2C12 cells. *Mol Cell Endocrinol*. 383(1-2):103-10.
- Jjingo D., Conley A., Wang J., Mariño-Ramírez L., Lunyak V., Jordan I., 2014. Mammalian-wide interspersed repeat (MIR)-derived enhancers and the regulation of human gene expression. *Mob DNA*. 5:14.
- Juven-Gershon, T., Hsu, J.Y., Theisen, J.W. and Kadonaga, J.T., 2008. The RNA polymerase II core promoter - the gateway to transcription. *Curr Opin Cell Biol*. 20, 253-9.
- Kawane, T., Komori H, Liu W, Moriishi T, Miyazaki T, Mori M, Matsuo Y, Takada Y, Izumi S, Jiang Q, Nishimura R, Kawai Y, Komori T., 2014. Dlx5 and mef2 regulate a novel runx2 enhancer for osteoblast-specific expression. *J Bone Miner Res*. 29(9): p. 1960-9.

- Kalajzic, I., Braut A, Guo D, Jiang X, Kronenberg MS, Mina M, Harris MA, Harris SE, Rowe DW., 2004. Dentin matrix protein 1 expression during osteoblastic differentiation, generation of an osteocyte GFP-transgene. *Bone*,. 35(1): p. 74-82.
- Kalajzic, Z., Liu P, Kalajzic I, Du Z, Braut A, Mina M, Canalis E, Rowe DW., 2002. Directing the expression of a green fluorescent protein transgene in differentiated 73 osteoblasts: comparison between rat type I collagen and rat osteocalcin promoters. *Bone*. 31(6): p. 654-60.
- Kashiwagi K, Kashiwagi A, Kurabayashi A, Hanada H, Nakajima K, Okada M, Takase M, Yaoita Y, 2010. *Xenopus tropicalis*: an ideal experimental animal in amphibia. *Exp Anim*. 59(4):395-405.
- Kalogeropoulos M., Varanasi S., Olstad O., Sanderson P., Gautvik V., Reppe S., Francis R., Gautvik K., Birch M., Datta H., 2010. Zic1 transcription factor in bone: neural developmental protein regulates mechanotransduction in osteocytes. *FASEB J*. 8: 2893-903.
- Kerney R, Gross JB, Hanken J. 2007. Runx2 is essential for larval hyobranchial cartilage formation in *Xenopus laevis*. *Dev Dyn* 236: 1650–1662.
- Kirsch T, Nah HD, Shapiro IM, Pacifici M. 1997. Regulated production of mineralization-competent matrix vesicles in hypertrophic chondrocytes. *J Cell Biol* 137:1149–1160.
- Komori, T., Yagi, H., Nomura, S., Yamaguchi, A., Sasaki, K., Deguchi, K., Shimizu, Y., Bronson, R.T., Gao, Y.H., Inada, M., Sato, M., Okamoto, R., Kitamura, Y., Yoshiki, S. and Kishimoto, T., 1997. Targeted disruption of *Cbfa1* results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts. *Cell*. 89, 755-64.

- Kidwell M. 2002. Transposable elements and the evolution of genome size in eukaryotes. *Genetica*.115(1):49-63.
- Kramerov, D.A. and Vassetzky, N.S., 2011. Origin and evolution of SINEs in eukaryotic genomes. *Heredity (Edinb)*. 107, 487-95.
- Krivega, I. and Dean, A., 2012. Enhancer and promoter interactions-long distance calls. *Curr Opin Genet Dev*. 22, 79-85.
- Lafave, M.C., Varshney, G.K., Gildea, D.E., Wolfsberg, T.G., Baxevanis, A.D. and Burgess, S.M., 2014. MLV integration site selection is driven by strong enhancers and active promoters. *Nucleic Acids Res*. 42, 4257-69. 74
- Lander, E.S., Linton, L.M., Birren, B., Nusbaum, C., Zody, M.C., Baldwin, J., Devon, K., Dewar, K., Doyle, M., FitzHugh, W., Funke, R., Gage, D., Harris, K., Heaford, A., Howland, J., Kann, L., Lehoczky, J., LeVine, R., McEwan, P., McKernan, K., Meldrim, J., Mesirov, J.P., Miranda, C., Morris, W., Naylor, J., Raymond, C., Rosetti, M., Santos, R., Sheridan, A., Sougnez, C., Stange-Thomann, N., Stojanovic, N., Subramanian, A., Wyman, D., Rogers, J., Sulston, J., Ainscough, R., Beck, S., Bentley, D., Burton, J., Clee, C., Carter, N., Coulson, A., Deadman, R., Deloukas, P., Dunham, A., Dunham, I., Durbin, R., French, L., Grafham, D., Gregory, S., Hubbard, T., Humphray, S., Hunt, A., Jones, M., Lloyd, C., McMurray, A., Matthews, L., Mercer, S., Milne, S., Mullikin, J.C., Mungall, A., Plumb, R., Ross, M., Shownkeen, R., Sims, S., Waterston, R.H., Wilson, R.K., Hillier, L.W., McPherson, J.D., Marra, M.A., Mardis, E.R., Fulton, L.A., Chinwalla, A.T., Pepin, K.H., Gish, W.R., Chissoe, S.L., Wendl, M.C., Delehaunty, K.D., Miner, T.L., Delehaunty, A., Kramer, J.B., Cook, L.L., Fulton, R.S., Johnson, D.L., Minx, P.J., Clifton, S.W., Hawkins, T., Branscomb, E., Predki, P., Richardson, P., Wenning, S., Slezak, T., Doggett, N., Cheng, J.F., Olsen, A., Lucas, S., Elkin, C., Uberbacher, E., Frazier, M. et al., 2001. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*. 409, 860-921.

- Lane MA, Kimber M, Khokha MK. 2013. Breeding Based Remobilization of Tol2 Transposon in *Xenopus tropicalis*. PLoS One 8:e76807.
- Lee S., Meyer M., Benkusky N., O'Brien C., Pike J., 2015. Mechanisms of Enhancer-mediated Hormonal Control of Vitamin D Receptor Gene Expression in Target Cells. J Biol Chem. 290(51):30573-86.
- Lee Y., Nimura K., Lo W., Saga K., Kaneda Y., 2014. Histone H3 lysine 36 methyltransferase Whsc1 promotes the association of Runx2 and p300 in the activation of bone-related genes. PLoS One. e106661.
- Lerat, E., 2010. Identifying repeats and transposable elements in sequenced genomes: how to find your way through the dense forest of programs. Heredity (Edinb). 104, 520-33.
- Lev-Maor, G., Sorek, R., Shomron, N. and Ast, G., 2003. The birth of an alternatively spliced exon: 3' splice-site selection in Alu exons. Science. 300, 1288-91. 75
- Levine M., 2010. Transcriptional enhancers in animal development and evolution. Curr Biol. 2010; 20:754–763.
- Long, F., 2011. Building strong bones: molecular regulation of the osteoblast lineage. Nat Rev Mol Cell Biol. 13, 27-38.
- Lynch, V.J., Leclerc, R.D., May, G. and Wagner, G.P., 2011. Transposon-mediated rewiring of gene regulatory networks contributed to the evolution of pregnancy in mammals. Nat Genet. 43, 1154-9.
- Marcellini, S., Henriquez, J.P. and Bertin, A., 2012. Control of osteogenesis by the canonical Wnt and BMP pathways in vivo: cooperation and antagonism between the canonical Wnt and BMP pathways as cells differentiate from osteochondroprogenitors to osteoblasts and osteocytes. Bioessays. 34, 953-62.

- Meijome T., Hooker R., Cheng Y., Walker W., Horowitz M., Fuchs R., Kacena M., 2015. GATA-1 deficiency rescues trabecular but not cortical bone in OPG deficient mice. *J Cell Physiol.* 230(4):783-90.
- Meyer M., Benkusky N., Pike J., 2015. Selective Distal Enhancer Control of the Mmp13 Gene Identified through Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat (CRISPR) Genomic Deletions. *J Biol Chem.* 290(17):11093-107.
- Mingchao Xie, Chibo Hong, Bo Zhang, Rebecca Lowdon, Xiaoyun Xing, Daofeng Li, Xin Zhou, Hyung Joo Lee, Cecile L. Maire, Keith L. Ligon, Philippe Gascard, Mahvash Sigaroudinia, Thea D. Tlsty, Theresa Kadlecsek, Arthur Weiss, Henriette O'Geen, Peggy J. Farnham, Pamela A.F. Madden, Andrew J. Mungall, Angela Tam, Baljit Kamoh, Stephanie Cho, Richard Moore, Martin Hirst, Marco A. Marra, Joseph F. Costello, Ting Wang., 2013. DNA hypomethylation within specific transposable element families associates with tissue-specific enhancer landscape. *Nat Genet.* 45(7): 836–841.
- Miura S, Hanaoka K, Togashi S. 2008. Skeletogenesis in *Xenopus tropicalis*: characteristic bone development in an anuran amphibian. *Bone* 43:901–909
- Mizoguchi I, Takahashi I, Sasano Y, Kagayama M, Kuboki Y, Mitani H. 1997. Localization of types I, II and X collagen and osteocalcin in intramembranous, endochondral and chondroid bone of rats. *Anat Embryol (Berl)* 196:291–297. 76
- Merrell AJ, Stanger BZ. 2016. Adult cell plasticity in vivo: dedifferentiation and transdifferentiation are back in style. *Nat Rev Mol Cell Biol* 17:413–425.
- Mouse Genome Sequencing, C., Waterston, R.H., Lindblad-Toh, K., Birney, E., Rogers, J., Abril, J.F., Agarwal, P., Agarwala, R., Ainscough, R., Alexandersson, M., An, P., Antonarakis, S.E., Attwood, J., Baertsch, R., Bailey, J., Barlow, K., Beck, S., Berry, E., Birren, B., Bloom, T., Bork, P., Botcherby, M., Bray, N.,

Brent, M.R., Brown, D.G., Brown, S.D., Bult, C., Burton, J., Butler, J., Campbell, R.D., Carninci, P., Cawley, S., Chiaromonte, F., Chinwalla, A.T., Church, D.M., Clamp, M., Clee, C., Collins, F.S., Cook, L.L., Copley, R.R., Coulson, A., Couronne, O., Cuff, J., Curwen, V., Cutts, T., Daly, M., David, R., Davies, J., Delehaunty, K.D., Deri, J., Dermitzakis, E.T., Dewey, C., Dickens, N.J., Diekhans, M., Dodge, S., Dubchak, I., Dunn, D.M., Eddy, S.R., Elnitski, L., Emes, R.D., Eswara, P., Eyras, E., Felsenfeld, A., Fewell, G.A., Flicek, P., Foley, K., Frankel, W.N., Fulton, L.A., Fulton, R.S., Furey, T.S., Gage, D., Gibbs, R.A., Glusman, G., Gnerre, S., Goldman, N., Goodstadt, L., Grafham, D., Graves, T.A., Green, E.D., Gregory, S., Guigo, R., Guyer, M., Hardison, R.C., Haussler, D., Hayashizaki, Y., Hillier, L.W., Hinrichs, A., Hlavina, W., Holzer, T., Hsu, F., Hua, A., Hubbard, T., Hunt, A., Jackson, I., Jaffe, D.B., Johnson, L.S., Jones, M., Jones, T.A., Joy, A., Kamal, M. et al., 2002. Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. *Nature*. 420, 520-62.

Morales-Hernández A., González-Rico F., Román A., Rico-Leo E., Alvarez-Barrientos A., Sánchez L., Macía Á., Heras S., García-Pérez J., Merino J., Fernández-Salguero P., 2016. Alu retrotransposons promote differentiation of human carcinoma cells through the aryl hydrocarbon receptor. *Nucleic Acids Res.* 44(10):4665-83.

Mukhi S, Brown DD. 2011. Transdifferentiation of tadpole pancreatic acinar cells to duct cells mediated by Notch and stromelysin-3. *Dev Biol* 351:311–317.

Muñoz D., 2015. Expresión esquelética y regulación transcripcional de los genes de colágenos fibrilares de los grupos A y B en *Xenopus tropicalis*. Tesis para optar al grado de Magister en Bioquímica y Bioinformática. Universidad de Concepción. 77

Nakashima, K., Zhou, X., Kunkel, G., Zhang, Z., Deng, J.M., Behringer, R.R. and de Crombrughe, B., 2002. The novel zinc finger-containing transcription factor

osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation. *Cell*. 108, 17-29.

Nieuwkoop y Faber, 1994. Normal Table of *Xenopus laevis* (Daudin). Garland Publishing Inc, New York ISBN 0-8153-1896-0.

Nishimura R et al. 2012. Osterix regulates calcification and degradation of chondrogenic matrices through matrix metalloproteinase 13 (MMP13) expression in association with transcription factor Runx2 during endochondral ossification. *J Biol Chem* 287:33179– 33190.

Olmstead AW, Korte JJ, Woodis KK, Bennett BA, Ostazeski S, Degitz SJ. 2009. Reproductive maturation of the tropical clawed frog: *Xenopus tropicalis*. *Gen Comp Endocrinol*. 160(2):117-23. doi: 10.1016/j.ygcen.2008.10.025.

Olsen B, Reginato A, Wang W. 2000. Bone development. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2000;16:191-220.

Onal M., St John H., Danielson A., Pike J., 2016. Deletion of the Distal Tnfsf11 RL-D2 Enhancer That Contributes to PTH-Mediated RANKL Expression in Osteoblast Lineage Cells Results in a High Bone Mass Phenotype in Mice. *J Bone Miner Res*. 31(2):416-29.

Ong, C.T. y Corces, V.G., 2012. Enhancers: emerging roles in cell fate specification. *EMBO Rep*. 13, 423-30.

Ortuño M., Susperregui A., Artigas N., Rosa J., Ventura F., 2013. Osterix induces Col1a1 gene expression through binding to Sp1 sites in the bone enhancer and proximal promoter regions. *Bone*. 52(2):548-56.

Palazzo, A.F. y Gregory, T.R., 2014. The case for junk DNA. *PLoS Genet*. 10, e1004351.

- Panda, D.K., Miao, D., Bolivar, I., Li, J., Huo, R., Hendy, G.N. and Goltzman, D., 2004. Inactivation of the 25-hydroxyvitamin D 1 α -hydroxylase and vitamin D receptor demonstrates independent and interdependent effects of calcium and vitamin D on skeletal and mineral homeostasis. *J Biol Chem.* 279, 16754-66. 78
- Park J. et al. 2015. Dual pathways to endochondral osteoblasts: a novel chondrocyte-derived osteoprogenitor cell identified in hypertrophic cartilage. *Biol Open.* doi:10.1242/bio.201411031
- Paul S, Schindler S, Giovannone D, de Millo TA, Mariani FV, Crump JG. 2016. Ihha induces hybrid cartilage-bone cells during zebrafish jawbone regeneration. *Development* 143:2066–2076.
- Pekowska, A., Benoukraf, T., Zacarias-Cabeza, J., Belhocine, M., Koch, F., Holota, H., Imbert, J., Andrau, J.C., Ferrier, P. and Spicuglia, S., 2011. H3K4 trimethylation provides an epigenetic signature of active enhancers. *EMBO J.* 30, 4198-210.
- Pennisi, E., 2012. Genomics. ENCODE project writes eulogy for junk DNA. *Science.* 337, 1159, 1161.
- Pollet, N. and Mazabraud, A., 2006. Insights from *Xenopus* Genomes, in: Volff, J. (Ed.), *Vertebrate Genomes*. Karger, Basel, pp. 138-53.
- Pundhir S., Bagger F., Lauridsen F., Rapin N., Porse B., 2016. Peak-valley-peak pattern of histone modifications delineates active regulatory elements and their directionality. *Nucleic Acids Res.* 44(9):4037-51.
- Quilhac A, de Ricqlès A, Lamrous H, Zylberberg L. 2014. Globuli ossei in the long limb bones of *Pleurodeles waltl* (Amphibia, Urodela, Salamandridae). *J Morphol* 275:1226–1237.

- Rada-Iglesias, A., Bajpai, R., Swigut, T., Brugmann, S.A., Flynn, R.A. and Wysocka, J., 2011. A unique chromatin signature uncovers early developmental enhancers in humans. *Nature*. 470, 279-83.
- Ramlochansingh C., Branoner F., Chagnaud B.P., Straka H. 2014. Efficacy of tricaine methanesulfonate (MS-222) as an anesthetic agent for blocking sensory-motor responses in *Xenopus laevis* tadpoles. *PLoS One*. 9(7):e101606
- Rando, O.J., 2012. Combinatorial complexity in chromatin structure and function: revisiting the histone code. *Curr Opin Genet Dev*. 22, 148-55. 79
- Renn, J. and C. Winkler, 2009. Osterix-mCherry transgenic medaka for in vivo imaging of bone formation. *Dev Dyn*. 238(1): p. 241-8.
- Richard, G.F., Kerrest, A. and Dujon, B., 2008. Comparative genomics and molecular dynamics of DNA repeats in eukaryotes. *Microbiol Mol Biol Rev*. 72, 686-727.
- Rister, J. and Desplan, C., 2010. Deciphering the genome's regulatory code: the many languages of DNA. *Bioessays*. 32, 381-4.
- Roybal P., Wu N., Sun J, Ting M., Schafer C., Maxson R., 2010. Inactivation of Msx1 and Msx2 in neural crest reveals an unexpected role in suppressing heterotopic bone formation in the head. *Dev Biol* 343: 28–39.
- Schmidt, D., Schwalie, P.C., Wilson, M.D., Ballester, B., Goncalves, A., Kutter, C., Brown, G.D., Marshall, A., Flicek, P. and Odom, D.T., 2012. Waves of Retrotransposon Expansion Remodel Genome Organization and CTCF Binding in Multiple Mammalian Lineages. *Cell*. 148, 335-48.
- Schaub C, Marz J, Reim I, Frasch M. 2015. Org-1-dependent lineage reprogramming generates the ventral longitudinal musculature of the *Drosophila* heart. *Curr Biol* 25:488–494.

- Shen, J.J., Dushoff, J., Bewick, A.J., Chain, F.J. and Evans, B.J., 2013. Genomic dynamics of transposable elements in the western clawed frog (*Silurana tropicalis*). *Genome Biol Evol.* 5, 998-1009.
- Shlyueva, D., G. Stampfel, and A. Stark. , 2014. Transcriptional enhancers: from properties to genome-wide predictions. *Nat Rev Genet.* 15(4): p. 272-86.
- Sive H., G.R., Harland R., 2000. Early Development of *Xenopus laevis*. A Laboratory Manual. Vol. 9. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Smale ST, Kadonaga JT., 2003.The RNA polymerase II core promoter. *Annu Rev Biochem* 2003, 72:449–479. 80
- Smallwood, A. y Ren, B., 2013. Genome organization and long-range regulation of gene expression by enhancers. *Curr Opin Cell Biol.* 25, 387-94.
- Sosnoski D. y Gay C. 2008. NCX3 is a major functional isoform of the sodium-calcium exchanger in osteoblasts. *J Cell Biochem.* 103(4):1101-10.
- Spitz, F. y Furlong, E.E., 2012. Transcription factors: from enhancer binding to developmental control. *Nat Rev Genet.* 13, 613-26.
- Sundaram V., Cheng Y., Ma Z., Li D., Xing X., Edge P., Michael P., 2014. Widespread contribution of transposable elements to the innovation of gene regulatory networks. *Genome Res.* 24(12): 1963–1976. Thurman R., Rynes E., Humbert R., Vierstra J. 2012. The accessible chromatin landscape of the human genome. *Nat Cell Biol.* 489: 75–82.
- Thurman R., Rynes E., Humbert R., Vierstra J., Maurano M., Haugen E., Sheffield N., Stergachis A., Wang H., Vernot B., Garg K., John S., Sandstrom R., Bates D., Boatman L., Canfield T., Diegel M., Dunn D., Ebersol A., Frum T., Giste E., Johnson A., Johnson E., Kutuyavin T., Lajoie B., Lee B., Lee K., London D., Lotakis D., Neph S., Neri F., Nguyen E., Qu H., Reynolds A., Roach V., Safi A.,

- Sanchez M., Sanyal A., Shafer A., Simon J., Song L., Vong S., Weaver M., Yan Y., Zhang Z., Zhang Z., Lenhard B., Tewari M., Dorschner M., Hansen R., Navas P., Stamatoyannopoulos G., Iyer V., Lieb J., Sunyaev S., Akey J., Sabo P., Kaul R., Furey T., Dekker J., Crawford G., Stamatoyannopoulos J. 2012. The accessible chromatin landscape of the human genome. *Nature*. 489(7414):75-82.
- Tsang KY, Chan D, Cheah KS. 2015. Fate of growth plate hypertrophic chondrocytes: death or lineage extension? *Develop Growth Differ* 57:179–192.
- Ubeda, J.M., Raymond, F., Mukherjee, A., Plourde, M., Gingras, H., Roy, G., Lapointe, A., Leprohon, P., Papadopoulou, B., Corbeil, J. and Ouellette, M., 2014. Genome-wide stochastic adaptive DNA amplification at direct and inverted DNA repeats in the parasite leishmania. *PLoS Biol*. 12, e1001868.
- Vickaryous MK, Hall BK. 2008. Development of the dermal skeleton in *Alligator mississippiensis* (Archosauria, Crocodylia) with comments on the homology of osteoderms. *J Morphol* 269:398–422. 81
- Viegas CS, Simes DC, Williamson MK, Cavaco S, Laize V, Price PA, CancelaML. 2013. Sturgeon osteocalcin shares structural features with matrix Gla protein: evolutionary relationship and functional implications. *J Biol Chem* 288:27801–27811.
- Vinces, M.D., Legendre, M., Caldara, M., Hagihara, M. and Verstrepen, K.J., 2009. Unstable tandem repeats in promoters confer transcriptional evolvability. *Science*. 324, 1213-6.
- Voigt, P., W.W. Tee, and D. Reinberg, A double take on bivalent promoters. *Genes Dev*, 2013. 27(12): p. 1318-38
- Volff, J.N., 2006. Turning junk into gold: domestication of transposable elements and the creation of new genes in eukaryotes. *Bioessays*. 28, 913-22.

- Weber S., Saftig P., 2012. Ectodomain shedding and ADAMs in development. *Development*. 139(20):3693-709.
- Wells DE, Gutierrez L, Xu Z, Krylov V, Macha J, Blankenburg KP, Hitchens M, Bellot LJ, Spivey M, Stemple DL, Kowis A, Ye Y, Pasternak S, Owen J, Tran T, Slavikova R, Tumova L, Tlapakova T, Seifertova E, Scherer SE, Sater AK. 2011. A genetic map of *Xenopus tropicalis*. *Dev Biol* 354:1-8.
- Wessely O., Kim J., Tran U., Fuentealba L., De Robertis E.M. 2005. xBtg-x regulates Wnt/beta-Catenin signaling during early *Xenopus* development. *Dev Biol*. 283(1):17-28.
- Witten PE, Huysseune A. 2009. A comparative view on mechanisms and functions of skeletal remodelling in teleost fish, with special emphasis on osteoclasts and their function. *Biol Rev Camb Philos Soc* 84: 315–346.
- Yang, X., Matsuda, K., Bialek, P., Jacquot, S., Masuoka, H.C., Schinke, T., Li, L., Brancorsini, S., Sassone-Corsi, P., Townes, T.M., Hanauer, A. and Karsenty, G., 2004. ATF4 is a substrate of RSK2 and an essential regulator of osteoblast biology; implication for Coffin-Lowry Syndrome. *Cell*. 117, 387-98.
- Yang G et al. 2014a. Osteogenic fate of hypertrophic chondrocytes. *Cell Res* 24:1266–1269.
- Yang L, Tsang KY, Tang HC, Chan D, Cheah KS. 2014b. Hypertrophic chondrocytes can become osteoblasts and osteocytes in endochondral bone formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111:12097–12102. 82
- Yoshizawa, T., Handa, Y., Uematsu, Y., Takeda, S., Sekine, K., Yoshihara, Y., Kawakami, T., Arioka, K., Sato, H., Uchiyama, Y., Masushige, S., Fukamizu, A., Matsumoto, T. y Kato, S., 1997. Mice lacking the vitamin D receptor exhibit impaired bone formation, uterine hypoplasia and growth retardation after weaning. *Nat Genet*. 16, 391-6.

Zabidi M., Schernhuber K., Pagani M., Rath M., Frank O., & Stark A., 2015
Enhancer–core-promoter specificity separates developmental and housekeeping
gene regulation. *Nature*. 518: p. 556-559.

Zhou X, von derMarkK, Henry S, NortonW, AdamsH, de Crombrughe B. 2014.
Chondrocytes transdifferentiate into osteoblasts in endochondral bone during
development, postnatal growth and fracture healing in mice. *PLoS Genet*
10:e1004820.

Zinzen, R.P., Girardot, C., Gagneur, J., Braun, M. and Furlong, E.E., 2009.
Combinatorial binding predicts spatio-temporal *cis*-regulatory activity. *Nature*.
462, 65-70.

