



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Fisiología, Biología Molecular y Celular

Función de la proteína Furry en el establecimiento del plan corporal de *Xenopus laevis*

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el
área de Ciencias Biológicas

Ailen Soledad Cervino

Directora de tesis: Dra. María Cecilia Cirio

Consejera de Estudios: Dra. Paula Vissio

Lugar de trabajo: Instituto de Fisiología, Biología Molecular y Neurociencias
(UBA-CONICET)

Buenos Aires, Noviembre 2021

Función de la proteína Furry en el establecimiento del plan corporal de *Xenopus laevis*

Resumen

El plan corporal de un animal se elabora durante el desarrollo embrionario temprano y es el resultado de la adquisición de distintos destinos celulares y de movimientos coordinados de gastrulación, que en conjunto establecen los ejes embrionarios y las regiones de las futuras capas germinales: endodermo, ectodermo y mesodermo. El gen *FRY microtubule binding protein (fry)* codifica para una proteína evolutivamente conservada llamada Furry (Fry) que presenta una amplia variedad de funciones celulares, principalmente asociadas a polarización celular, división celular y morfogénesis. Sin embargo, en vertebrados, poco se conoce sobre su función en estos eventos del desarrollo embrionario.

En este trabajo, nos propusimos estudiar la función de la proteína Fry en el establecimiento del plan corporal embrionario, focalizándonos en los movimientos de gastrulación. Empleamos a la rana africana *Xenopus laevis*, uno de los vertebrados más utilizados para el estudio de vías moleculares involucradas en el establecimiento de los ejes embrionarios y los procesos morfogenéticos que le dan forma al embrión. Esto se debe a las ventajas experimentales únicas del sistema modelo, entre ellas: rápido desarrollo embrionario, gran tamaño de los embriones y células, tolerancia a la extensa manipulación, conservación evolutiva de los procesos celulares y alto grado de conservación genómica con mamíferos.

Caracterizamos el patrón de expresión de *fry* en oocitos y embriones de *Xenopus* durante la gastrulación, revelando la distribución espacial de su ARNm y sugiriendo un rol de esta proteína en el desarrollo temprano. Mediante ensayos de pérdida de función, demostramos que Fry está involucrada en diversos e importantes eventos durante la embriogénesis de *Xenopus*. Por un lado, Fry regula la adquisición de destino celular en el organizador dorsal de la gástrula, particularmente en células del

mesodermo precordial que darán origen a estructuras anteriores del embrión. Por otro lado, pusimos en evidencia la importancia de esta proteína durante los procesos morfológicos que tienen lugar durante la gastrulación, afectando el cierre del blastoporo y la elongación de la línea media dorsal. La pérdida de función de Fry compromete la correcta ejecución de varios movimientos gastrulatorios: la involución del mesodermo axial prospectivo, la extensión convergente del cordamesodermo y la migración colectiva del mesodermo precordial. A nivel celular, Fry regula el movimiento y la morfología polarizada de las células mesodérmicas dorsales, como así también la formación de la matriz extracelular de fibronectina fibrilar, esencial para los movimientos gastrulatorios.

Finalmente, teniendo en cuenta que muchas de las funciones previamente descritas de Fry están relacionadas con su rol como andamiaje y activadora de quinasas de la familia NDR (*nuclear Dbf2-related*), exploramos la participación de NDR1 en el fenotipo de pérdida de función de Fry. Demostramos que una variante constitutivamente-activa de NDR1 humana es capaz de rescatar parcialmente la ejecución de movimientos gastrulatorios y la elongación eje dorsal en embriones *fry*-deplecionados, sugiriendo una interacción funcional y un rol evolutivamente conservado de Fry/NDR en morfogénesis. A partir de nuestros resultados, proponemos que Fry posee funciones NDR1-dependientes e independientes durante el desarrollo temprano de *Xenopus*.

Palabras clave:

Furry, NDR1, morfogénesis, desarrollo, *Xenopus*, gastrulación, plan corporal

The role of the protein Furry in the establishment of the body plan of *Xenopus laevis*

Abstract

During early development, the animal body plan is elaborated as the result of cellular fate acquisition and coordinated gastrulation movements that establish the embryonic axes and the future germ layers: endoderm, ectoderm and mesoderm. The *FRY microtubule binding protein (fry)* gene encodes an evolutionarily conserved protein called Furry (Fry) that exhibits a wide variety of cellular functions, mainly associated with cell polarization, cell division, and morphogenesis. However, little is known about its role in these processes during vertebrate embryogenesis.

In the present work, we aimed to study the role of Fry protein in the establishment of the embryonic body plan, focusing on the morphogenetic movements of gastrulation. We chose the African clawed frog *Xenopus laevis* as a model system, which has been one of the most used vertebrate organisms to study molecular pathways involved in embryonic axes establishment and morphogenetic processes that shape the embryo. The unique experimental advantage of this model system include: rapid embryonic development, large embryos and cells size, tolerance to extensive manipulation, evolutionary conservation of cellular processes, and high degree of genomic conservation with mammals.

We characterized *fry* expression pattern in *Xenopus* oocytes and gastrulating embryos, revealing the spatial distribution of its mRNA and suggesting an important role of this protein in early development. Through loss-of-function assays, we demonstrate that Fry is involved in several important events during *Xenopus* embryogenesis. Fry regulates cell fate acquisition in the gastrula dorsal organizer, particularly in prechordal mesoderm cells that give rise to anterior head structures. Additionally, Fry regulates morphogenetic processes during gastrulation, affecting blastopore closure and dorsal midline elongation. Fry loss-of-function compromises the correct execution of several gastrulation movements: prospective axial mesoderm

involution, chordamesoderm convergent extension and prechordal mesoderm collective migration. At the cellular level, Fry regulates the movement and polarized morphology of dorsal mesodermal cells, as well as the formation of fibronectin extracellular matrix, essential for gastrulation.

Finally, considering that many of Fry cellular functions are related to its role as a scaffolding factor and activator of NDR (*nuclear Dbf2-related*) kinases, we explored the participation of NDR1 in Fry loss-of-function phenotype. We show that a constitutively-active variant of human NDR1 partially rescues the execution of gastrulating movements and dorsal axis elongation in *fry*-depleted embryos, suggesting a functional interaction and evolutionarily conserved role of Fry/NDR in morphogenesis. Taking together our results, we propose that Fry possesses NDR1-dependent and independent functions during *Xenopus* early development.

Key words:

Furry, NDR1, morphogenesis, development, *Xenopus*, gastrulation, body plan

Publicaciones

- Parte de los resultados de esta tesis fueron publicados en el siguiente trabajo:

Cervino, AS; Moretti, B; Stuckenholtz, C; Grecco, HE; Davidson, LA; Cirio, MC. "Furry is required for cell movements during gastrulation and functionally interacts with NDR1". *Scientific Reports* (2021). doi:10.1038/s41598-021-86153-x

- Resultados no mostrados en esta tesis forman parte de los siguientes trabajos:

EB Espiritu, AE Crunk, A Bais, D Hochbaum, AS Cervino, YL Phua, MB Butterworth, T Goto, J Ho, NA Hukriede, MC Cirio. "The Lhx1-Ldb1 complex interacts with Furry to regulate microRNA expression during pronephric kidney development". *Scientific Reports*. 2018 Oct 30;8(1):16029. doi: 10.1038/s41598-018-34038-x.

(no publicado) DM Jofré, DK Hoffman, AS Cervino, MK Grundy, S Yun, FR Gandhi Amrit, Donna Beer Stolz, E Salvatore, FA Rossi, A Ghazi, MC Cirio, JL Yanowitz, D Hochbaum. "Analysis Of Chd-7 Defective Dauer Nematodes Implicates Collagen Misregulation In Charge Syndrome Features". bioRxiv 2021.03.26.437191; doi: 10.1101/2021.03.26.437191. Actualmente en revisión en la revista *PNAS*.

Agradecimientos

Agradezco a la Universidad de Buenos Aires y a la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales por la educación que me brindó desde la carrera de grado, y durante la formación de posgrado.

Agradezco al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, el cual financió mi trabajo de tesis con la beca interna doctoral.

Gracias Ceci por ser la mejor directora que podría haber tenido. Gracias por tu infinita paciencia al enseñarme, tu entusiasmo contagioso de aprender cosas nuevas (¡las horas que habremos pasado codo a codo bajo lupa!), tu respeto hacia mis ideas y tus críticas, siempre constructivas, que me ayudan a crecer como científica y como persona. ¡Ni una pandemia pudo con nosotras! Con un $n = 1$ me atrevo a afirmar que sos una gran mentora.

A mis compañeres de laboratorio Maru, Vicky, Eve, Marian, Gigi e Iván con los que compartí mesada en distintas instancias del doctorado. Gracias por hacer del trabajo diario un disfrute, de todes aprendí cosas valiosas.

Agradezco al laboratorio de Lance Davidson, sobre todo a Carsten y Jing, porque en el breve tiempo que compartí con ellos me hicieron sentir como en casa. Gracias Lance por tu generosidad y sabiduría.

Gracias a mi familia, por ser mi pilar y apoyo en todo los ámbitos de mi vida. Gracias má por ser mi ejemplo de perseverancia, esfuerzo y dedicación. Gracias pá porque por culpa tuya decidí ser bióloga (a veces te lo echo en cara), gracias contagiarme tu pasión por la fisiología. Gracias a mis *brothers in arms*, Nahus y Na, por

estar siempre a mi lado. Gracias Na, por ser mi hermana, amiga y colega, que no desaprovecha oportunidad de recordarme que *Xenopus* no es un modelo representativo de anfibios.

A mi compañero de ruta, Carlitos, que está apoyándome desde el inicio de mi carrera. Gracias por entender lo importante que es la ciencia en mi vida, por festejar cada logro, por pequeño que sea, y por alentarme en los momentos en los que me desanimó. No sé qué hubiera sido de mi doctorado sin vos, sobre todo durante el confinamiento.

Gracias a les amigues que fui haciendo durante el doctorado, especialmente Aitana, Bruno y Martin, con los que compartí el turbulento camino de ser becaries.

A mis amigues de la vida, gracias por ser mi cable a tierra.

A Dante, a quién tengo siempre presente.

A mi equipo de escritura de tesis, Cersei, Mojo y Jack.

“There is no gene “for” such unambiguous bits of morphology as your left kneecap or your fingernail. [...] Hundreds of genes contribute to the building of most body parts and their action is channeled through a kaleidoscopic series of environmental influences: embryonic and postnatal, internal and external. Parts are not translated genes, and selection doesn’t even work directly on parts”

- Stephen Jay Gould (The Panda's Thumb)

Índice general

Resumen	I
Abstract	III
Publicaciones	V
Agradecimientos	VI
Índice general	IX
Índice de tablas y figuras	XIII
Abreviaturas	XVI
1. Introducción	1
1.a. Establecimiento del plan corporal en vertebrados	1
1.b. La rana <i>Xenopus laevis</i> como organismo modelo en biología del desarrollo	2
1.c. Desarrollo temprano de <i>Xenopus laevis</i>	5
1.d. El organizador dorsal de la gástrula	7
1.e. Gastrulación de <i>Xenopus laevis</i>	9
1.f. Extensión convergente	12
1.g. Cierre del Blastoporo	14
1.h. La proteína de anclaje Furry y las quinasas Ndr	14
1.i. Funciones de los ortólogos de Fry y Ndr en levaduras, moscas y nematodos	18
1.j. Funciones de las proteínas de la familia Fry en vertebrados	21
2. Objetivos e hipótesis	26
2.a. Objetivo general	26
2.b. Hipótesis y objetivos específicos	26

3. Materiales y Métodos	28
3.a. Declaración de ética	28
3.b. Obtención de embriones de <i>Xenopus</i>	28
3.c. Obtención de oocitos de <i>Xenopus</i>	29
3.d. Stock de plásmidos	29
3.e. Síntesis de ARN mensajeros	29
3.f. Protocolo de microinyección	31
3.g. Hibridación <i>in situ</i>	32
3.g.a. Síntesis de sondas para hibridación <i>in situ</i>	32
3.g.b. Procedimiento	33
3.g.c. Soluciones	34
3.h. Inmunohistoquímica	34
3.i. Inmunofluorescencia y cuantificación de fibronectina	35
3.j. Histología	36
3.k. Procesamiento de imágenes y mediciones morfométricas	36
3.l. Videos de gastrulación en vivo	37
3.m. Microscopía de fluorescencia <i>light-sheet</i>	37
3.m.a. Microinyección de los embriones	37
3.m.b. Montaje de los embriones	38
3.m.c. Adquisición y procesamiento de las imágenes	38
3.m.d. Análisis de las imágenes	39
3.n. Explantes de zona marginal dorsal	41
3.n.a. Medición de extensión convergente	41
3.n.b. Explantes para microscopía confocal	41
3.n.c. Explantes de mesodermo precordial presuntivo	42
3.o. Ensayos de separación de tejidos	43
3.p. Análisis estadísticos	43

Resultados

4. Capítulo I «Expresión temprana y pérdida de función de <i>Fry</i> »	45
4.a. Expresión materna de <i>fry</i>	45
4.a.a. Distribución espacial de los transcritos de <i>fry</i> durante el crecimiento de los oocitos	45

4.a.b. Distribución espacial del ARNm de <i>fry</i> en oocitos maduros y embriones en los primeros estadios de desarrollo	47
4.b. Expresión y distribución espacial del ARNm de <i>fry</i> durante la gastrulación	49
4.c. Localización de Fry-GFP en células de la zona marginal dorsal	52
4.d. La depleción de Fry genera defectos en la elongación del eje axial y el desarrollo de la cabeza.	54
4.e. Fry regula el establecimiento del organizador dorsal de la gástrula	57
4.f. La función de Fry no es requerida para la inducción general del mesodermo	58
4.g. Fry regula los movimientos gastrulatorios	59
5. Capítulo II « <i>La función de Fry en la gastrulación</i> »	62
5.a. La función de Fry es necesaria para el cierre normal del blastoporo	62
5.b. La depleción de Fry afecta el movimiento de las células superficiales de la zona marginal que involucrena	65
5.c. La pérdida de función de Fry afecta la morfología de la hendidura de Brachet y su matriz de fibronectina asociada	70
5.d. La pérdida de función de Fry afecta la migración de las células del mesodermo precordial presuntivo	73
5.e. La función de Fry es necesaria para la extensión convergente del cordamesodermo	76
5.f. Fry es requerida para la elongación y orientación medio-lateral de las células del mesodermo dorsal	78
6. Capítulo III « <i>Mecanismos de acción de Fry</i> »	80
6.a. La quinasa Ndr1 en el desarrollo del eje axial	80
6.b. La actividad quinasa de hNDR1 compensa parcialmente la pérdida de función de Fry en el desarrollo del eje axial.	83
6.c. hNDR1-PIF rescata parcialmente el cierre del blastoporo y la extensión convergente en embriones <i>fry</i> -deplecionados	85
6.d. Funciones de Fry independientes de Ndr1: capacidad dorsalizante	87
7. Discusión	91
7.a. Expresión materna de <i>fry</i>	91

7.b. Expresión embrionaria de <i>fry</i>	93
7.c. Los dominios funcionales de Fry y su localización subcelular	94
7.d. La importancia de Fry en los movimientos gastrulatorios de <i>Xenopus</i>	97
7.e. Posibles mecanismos celulares por los que opera Fry durante la gastrulación	99
7.f. Interacción funcional entre Fry y Ndr1	102
7.g. Interacción funcional entre Fry y la vía Wnt/ β -catenina	103
7.h. Conclusiones y perspectivas	104
Referencias bibliográficas	106

Índice de tablas y figuras

Tablas

Tabla 1.1. Ortólogos de Fry y Ndr	17
Tabla 3.1. Plásmidos utilizados para la síntesis de ARNm	30
Tabla 3.2. Plásmidos utilizados en la síntesis de sondas para hibridación <i>in situ</i>	32
Tabla 6.1. Categorización del porcentaje de elongación del eje axial	85

Figuras

1. Introducción

Figura 1.1. Ciclo de vida de <i>Xenopus laevis</i> .	4
Figura 1.2. Modelo de establecimiento del eje dorso-ventral en <i>Xenopus</i> .	7
Figura 1.3. Movimientos gastrulatorios tempranos en <i>Xenopus</i> .	10
Figura 1.4. Formación y cierre del blastoporo en embriones de <i>Xenopus</i> .	11
Figura 1.5. Movimientos de extensión convergente en los tejidos dorsales.	13
Figura 1.6. Las proteínas Furry (Fry).	16
Figura 1.7. Dominios de expresión de fry en embriones de <i>Xenopus</i> .	23
Figura 1.8. Efecto de la pérdida y ganancia de función de Fry en embriones de <i>Xenopus</i> .	24

3. Materiales y Métodos

Figura 3.1. Niveles de expresión relativa de los transcritos de <i>fry</i> y de la proteína Fry durante la oogénesis y el desarrollo de <i>Xenopus</i> .	32
Figura 3.2. Preparación de embriones de <i>Xenopus</i> para microscopia <i>light-sheet</i> .	39
Figura 3.3. Preparación de explantes de zona marginal dorsal (ZMD) y montaje para microscopias confocal.	42

Resultados

4. Capítulo I

Figura 4.1. Presencia y distribución de los transcritos de <i>fry</i> durante el crecimiento de los oocitos de <i>Xenopus</i> .	47
Figura 4.2. Localización de los transcritos de <i>fry</i> en oocitos y en los primeros estadios embrionarios de <i>Xenopus</i> .	49

Figura 4.3. Dominios de expresión de <i>fry</i> durante la gastrulación.	51
Figura 4.4. Localización de la proteína Fry-GFP en células del mesodermo dorsal.	53
Figura 4.5. Ensayos de pérdida de función de Fry y experimentos de rescate.	56
Figura 4.6. La depleción dorsal de Fry reduce el dominio de expresión de genes específicos del organizador de la gástrula pero no altera la inducción general del mesodermo.	57
Figura 4.7. Los embriones deplecionados de Fry poseen estructuras axiales diferenciadas.	59
Figura 4.8. Los embriones deplecionados de Fry presentan defectos de gastrulación.	61
5. Capítulo II	
Figura 5.1. La depleción de Fry genera un retraso en el cierre del blastoporo.	63
Figura 5.2. Dinámica de cierre del blastoporo en embriones deplecionados de Fry	65
Figura 5.3. Proyecciones de intensidad máxima de una serie temporal de células superficiales de la zona marginal que involuciona adquirida por microscopía <i>light-sheet</i> .	67
Figura 5.4. La pérdida de función de Fry afecta al movimiento de las células superficiales de la zona marginal que involuciona.	68
Figura 5.5. La pérdida de función de Fry afecta la configuración espacial de la zona marginal que involuciona.	70
Figura 5.6. La morfología de la hendidura de Brachet se ve alterada en embriones <i>fry</i> -deplecionados.	71
Figura 5.7. La pérdida de función de Fry disminuye la abundancia de las fibrillas de fibronectina en la hendidura de Brachet	72
Figura 5.8. La pérdida de función de Fry no afecta el comportamiento de separación de tejidos en células del mesodermo dorsal.	73
Figura 5.9. La pérdida de función de Fry afecta la migración y convergencia del mesodermo precordial presuntivo.	74
Figura 5.10. La pérdida de función de Fry inhibe el comportamiento migratorio de las células del mesodermo precordial presuntivo	76
Figura 5.11. Fry regula la extensión convergente de los tejidos dorsales en <i>Xenopus</i> .	77
Figura 5.12. La pérdida de función de Fry afecta la polaridad y la orientación de las células mesodérmicas dorsales.	79
6. Capítulo III	
Figura 6.1. Las proteínas NDR1 humana y Stk38 de <i>Xenopus</i> comparten un alto grado de identidad de secuencia aminoacídica.	81
Figura 6.2. La sobreexpresión dorsal de las variantes de hNDR1 afecta el desarrollo del eje axial de <i>Xenopus</i> .	83
Figura 6.3. La variante hNDR1-PIF rescata parcialmente la elongación del eje axial en embriones <i>fry</i> -deplecionados.	84
Figura 6.4. hNDR1-PIF compensa parcialmente los defectos morfogénicos asociados a la pérdida de función de Fry.	86
Figura 6.5. hNDR1-PIF restablece parcialmente la elongación de explantes de zona marginal dorsal ante la pérdida de función de Fry.	87
Figura 6.6. La sobreexpresión de las variantes funcionales de hNDR1 no induce la formación de ejes secundarios ectópicos.	88

Figura 6.7. La sobreexpresión de FD+LZ pero no de hNDR1-PIF restablece el dominio de expresión de <i>chrd</i> en embriones <i>fry</i> -deplecionados.	89
Figura 6.8. La pérdida de función de Fry inhibe la formación del eje secundario ectópico inducido por Wnt8.	90

Videos

Video 5.1. Gastrulación en embriones intactos y <i>fry</i> -deplecionados.	64
Video 5.2. Videos de la zona marginal dorsal de embriones preparados para microscopía de fluorescencia <i>light-sheet</i> .	66

Abreviaturas

*en orden alfabético

ARNm	ARN mensajeros
AS	Dominio de activación de Ndr1
AurKA	<u>A</u> urora <u>A</u> <u>k</u> inase
BMP	<u>B</u> one <u>m</u> orphogenetic protein
Cdk1	<u>C</u> yclin <u>d</u> ependent <u>k</u> inase 1
Chrd	<u>C</u> hord <u>i</u> n
CIM	Comportamiento de intercalación medio-lateral
CPE	Capa profunda del ectodermo
EC	Extensión convergente
FD	Dominio Furry
FN	Fibronectina
FPM	Factor promotor de la maduración
Fry	Furry
Fryl	Furry-like
<i>fry</i> -MO	Morfolino de Furry
Gsc	<u>G</u> oos <u>e</u> coid
hCG	Gonadotropina coriónica humana
HIS	Hibridación <i>in situ</i>
HM	Dominio hidrofóbico de Ndr
hNDR1	NDR1 humana
IHQ	Inmuohistoquímica
LATS1/2	<u>l</u> arge <u>t</u> umor <u>s</u> uppressor kinases 1/2
LDB	labio dorsal del blastoporo
Ldb1	<u>L</u> IM <u>d</u> omain <u>b</u> inding <u>p</u> rotein
LH	Hormona leutinizante

Lhx1	<u>L</u> IM <u>h</u> omeobox 1
LZ	Dominio <i>leucine zipper</i> (motivos <i>leucine zipper</i> y estructura coiled-coil)
MEC	Matriz extracelular
miARNs	micro-ARNs
MO	Morfolino
MOB	<u>m</u> ps <u>o</u> ne <u>b</u> inder
MPP	Mesodermo precordial presuntivo
Msh	<u>M</u> isshapen
MST	Quinasa de la familia <u>m</u> ammalian <u>S</u> te20-like
MT	Microtúbulos
Ndr/Stk38	Quinasa de la familia <u>N</u> uclear <u>D</u> bf2- <u>r</u> elated
Not	<u>N</u> otochord homeobox
NTR	Dominio N-terminal de Ndr1
Otx2	<u>O</u> rthodenticle homeobox 2
PCP	<u>P</u> olaridad <u>c</u> elular <u>p</u> lanar
Plk1	<u>P</u> olo- <u>l</u> ike <u>k</u> inase 1
SIRT2	Deacetilasa de tubulina <u>S</u> irtuin 2
St-MO	Morfolino control (<i>standard</i>)
TAR	Techo del arquenterón
TAZ	<u>T</u> ranscriptional co <u>a</u> ctivator with PD <u>Z</u> -binding motif
TBC	Techo del blastocele
TBM	Transición de blástula media
xBra	Tbtx/ <u>b</u> rachyury
YAP	<u>Y</u> es- <u>a</u> ssoiated <u>p</u> rotein
ZAV	Zona de alineación vegetal
ZMD	Zona marginal dorsal
ZMI	Zona marginal que involuociona

Introducción

1.a. Establecimiento del plan corporal en vertebrados

El plan corporal embrionario se establece muy temprano en el desarrollo y es el resultado de complejos programas genéticos que involucran división celular, determinación de destinos y movimientos celulares, mediante los cuales el embrión adquiere su sofisticada arquitectura (Solnica-Krezel and Sepich, 2012). Uno de los procesos clave de la embriogénesis es la determinación de los tres *ejes embrionarios*, antero-posterior, dorsal-ventral y derecha-izquierda. Esto requiere que las células se polaricen de manera precisa y coordinada mediante la distribución o actividad diferencial de biomoléculas (proteínas y/o ARNs) en dominios subcelulares específicos, estableciéndose así, asimetrías dentro de las células (Butler and Wallingford, 2017; Sindelka et al., 2018). La *polarización celular* determina la orientación de las divisiones, la morfología, el destino celular y los movimientos celulares. También regula la configuración de las uniones celulares y las propiedades mecánicas del tejido (ej. organización de la matriz extracelular (MEC)), determinando la función que los tejidos cumplen dentro del organismo (Kim et al., 2018; Von Dassow and Davidson, 2007).

Otro evento importante en el desarrollo temprano de los animales es la formación de las *capas germinales* que dan origen a los distintos tejidos y órganos. Este proceso de diversificación celular ocurre cuando el embrión está formado por un número relativamente pequeño de células pluripotentes. Los organismos triblásticos como los vertebrados, desarrollan tres capas germinales: el endodermo, el mesodermo y el ectodermo. En vertebrados, el *ectodermo* da lugar al sistema nervioso central, la periférico, las células pigmentarias y los huesos faciales). A partir del *mesodermo* deriva la notocorda, el esqueleto axial, el tejido conectivo, los músculos del tronco, los riñones, las gónadas y el sistema cardiovascular. El epitelio de los tractos gastrointestinal y

respiratorio, y varias glándulas endocrinas se desarrollan a partir del *endodermo* (Barresi and Gilbert, 2019).

Los precursores de las tres capas germinales se segregan durante la *gastrulación*, un conjunto de movimientos morfogenéticos coordinados que posicionan las células mesodérmicas entre las células ectodérmicas externas y las endodérmicas internas (Keller et al., 2003). En desarrollo, el término *morfogénesis* se refiere a la formación de estructuras ordenadas a partir de movimientos celulares coordinados (Von Dassow and Davidson, 2007). En este sentido, la gastrulación es el primer proceso morfogenético a gran escala del desarrollo embrionario y constituye un excelente modelo para estudiar la expresión genética, la regulación de vías de señalización y la mecánica de los tejidos que le dan forma al embrión (Davidson, 2017; Keller et al., 2003; Kim et al., 2018; Rohde and Heisenberg, 2007; Solnica-Krezel, 2005; Von Dassow and Davidson, 2007).

Los movimientos gastrulatorios difieren entre los distintos grupos de animales, incluso entre especies emparentadas. Sin embargo, a lo largo de la evolución han surgido varias estrategias para generar un mismo plan corporal básico (Keller et al., 2003). En este sentido, existe una alta conservación de los genes y las vías de señalización que regulan estos movimientos celulares y el establecimiento de los ejes embrionarios dentro de vertebrados (Leptin, 2005; Solnica-Krezel, 2005). Los estudios de gastrulación también han contribuido a la comprensión de defectos congénitos, como la espina bífida, y los mecanismos moleculares involucrados en patologías como el cáncer en humanos (Solnica-Krezel and Sepich, 2012).

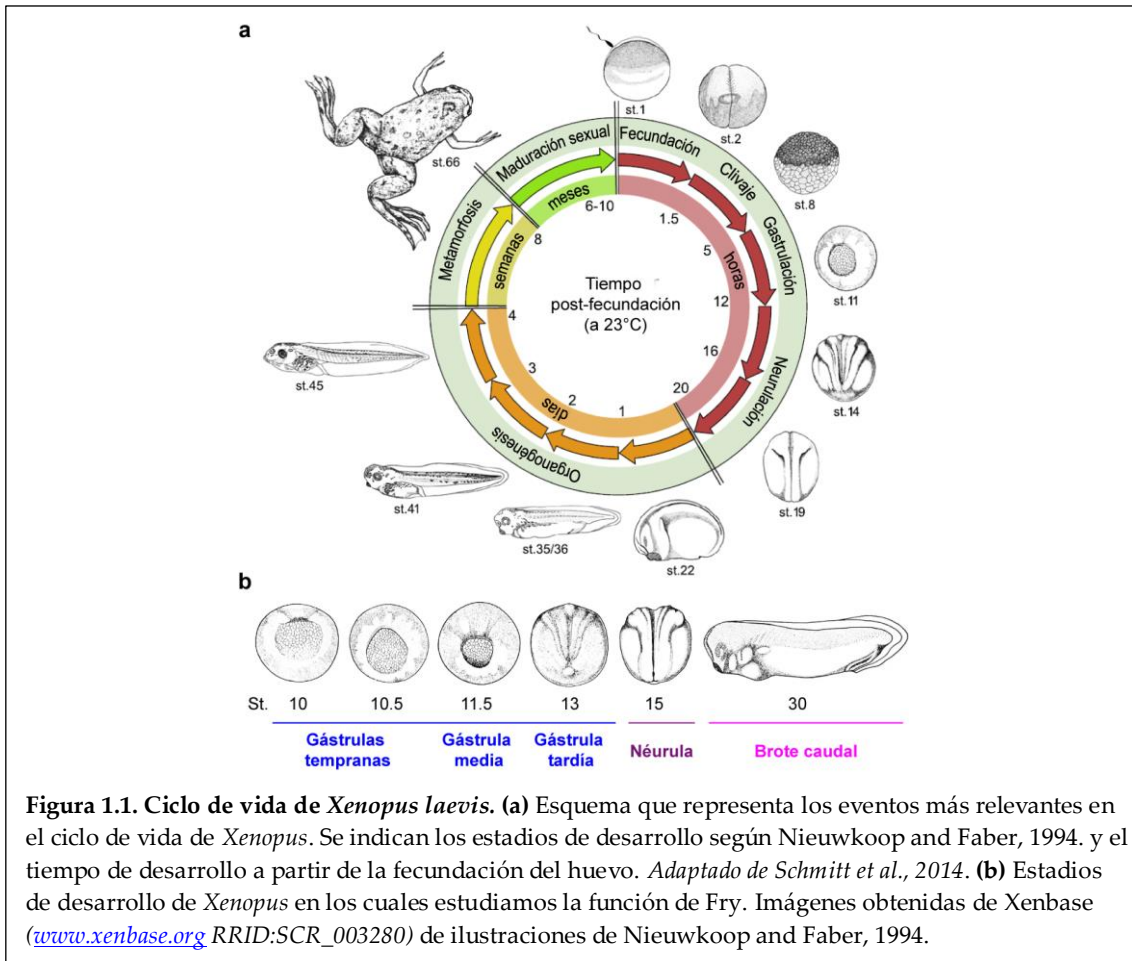
En vertebrados, como resultado de la gastrulación queda establecido el plan corporal embrionario, que consiste en un eje antero-posterior elongado, la región cefálica anterior, el sistema nervioso central de posición dorsal, por encima de la notocorda flanqueada por somitos bilaterales, y el tubo digestivo ventral (Solnica-Krezel, 2005). La notocorda y los somitos son dos tejidos mesodérmicos transitorios, críticos para la elongación y el *patterning* del eje embrionario. La *notocorda* es un cordón que le otorga soporte mecánico al embrión, sirve de molde para la formación de la columna vertebral y juega un papel importante en la inducción de tejidos circundantes. Los *somitos* son estructuras segmentadas que dan origen a las vértebras, la dermis

dorsal y los músculos esqueléticos de la espalda, pared corporal y extremidades (Barresi and Gilbert, 2019).

1.b. La rana *Xenopus laevis* como organismo modelo en biología del desarrollo

Desde finales del siglo XIX los embriólogos experimentales utilizan embriones de anfibios como modelo de desarrollo temprano en vertebrados. A diferencia de la mayoría de los anfibios, la rana africana *Xenopus laevis* es capaz de poner huevos durante todo el año en respuesta a la hormona gonadotrofina coriónica humana (hCG) (Gurdon and Hopwood, 2000). El gran número de embriones por puesta (aproximadamente 1500 por hembra) y el gran tamaño de sus huevos (1 mm de diámetro), hacen de *Xenopus laevis* un excelente modelo para estudios embriológicos y bioquímicos (Blum and Ott, 2019; De Robertis et al., 2000; Harland and Grainger, 2011; Schmitt et al., 2014). *Xenopus laevis* ofrece numerosas ventajas para estudiar aspectos generales del desarrollo embrionario de vertebrados. Al presentar desarrollo externo, los embriones son de fácil acceso, pueden mantenerse en simples soluciones salinas y no poseen tejidos extraembrionarios que interfieran con el estudio del embrión propiamente dicho (Blitz et al., 2006; Harland and Grainger, 2011; Schmitt et al., 2014).

Por otro lado, el gran tamaño de los embriones y su resistencia a la manipulación, los hace ideales para realizar microinyecciones, microcirugías y trasplante de tejidos que no son posibles, o son muy difíciles de llevar a cabo, en embriones de otros vertebrados (Blitz et al., 2006; Blum and Ott, 2019; Harland and Grainger, 2011). Gracias a la predictibilidad de las divisiones celulares y la generación de mapas de destino de todas las blastómeras en los primeros estadios de desarrollo, es posible realizar microinyecciones dirigidas. Esto, sumado al rápido desarrollo de los embriones dentro de un amplio rango de temperatura (14 – 23°C), posibilita la obtención de resultados estadísticamente representativos y de alta reproducibilidad en cortos períodos de tiempo (Blum and Ott, 2019) (*Figura 1.1.a*).



Xenopus constituye un excelente modelo para estudiar la función génica, siendo los oligonucleótidos antisentido morfolino (MO) la estrategia más utilizada para estudiar fenotipos de pérdida de función. Además, la posibilidad de realizar inyecciones dirigidas de MO permite evaluar la pérdida de función de ARN mensajeros (ARNm) maternos y cigóticos de manera tejido-específica (Blum et al., 2015).

El genoma de *Xenopus* posee un grado de sintenia asombrosamente alto con el genoma humano. Cerca del 90% de los genes involucrados en enfermedades humanas tienen homólogos en *Xenopus* con una conservación de secuencia generalmente alta (Blum and Ott, 2019). Gracias a estas y otras numerosas cualidades, *Xenopus laevis* se convirtió en un sistema modelo para el estudio del desarrollo embrionario de vertebrados y más recientemente en una herramienta invaluable para estudiar las bases moleculares de diversas enfermedades genéticas del desarrollo en humanos (Blum and Ott, 2019; Schmitt et al., 2014).

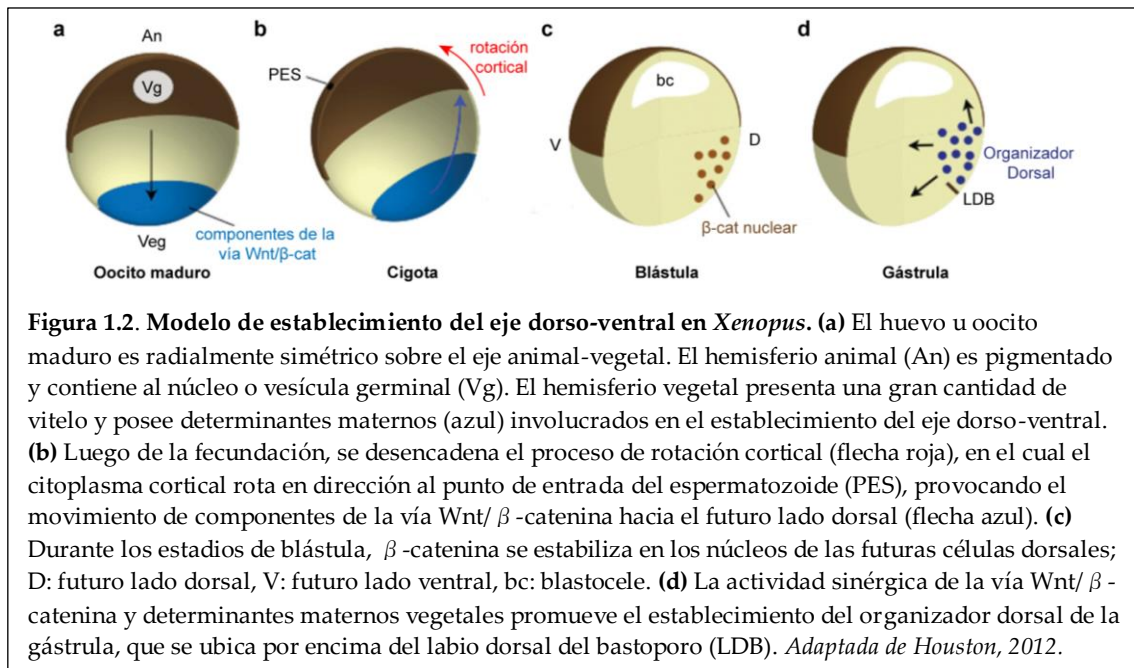
1.c. Desarrollo temprano de *Xenopus laevis*

Al presentar desarrollo externo, el oocito maduro o huevo de *Xenopus* posee gran cantidad de vitelo (material nutricional) concentrado en el *hemisferio vegetal* de color blanco opaco. En el lado opuesto, el *hemisferio animal* contiene la mayoría de las organelas celulares y la vesícula germinal (núcleo del oocito), y se caracteriza por la presencia de pigmentos de melanina en el citoplasma cortical. Durante el apareo o amplexo, el macho de *Xenopus* toma a la hembra por encima de la pelvis y fecunda los huevos a medida que estos son ovipuestos. El espermatozoide puede ingresar al huevo por cualquier sitio del hemisferio animal. Los embriones presentan una *segmentación holoblástica* (completa) de tipo *mesolecítica*, debido a la concentración de vitelo en el hemisferio vegetal que dificulta su clivaje. Por esta razón, la primera división celular comienza en el polo animal y avanza lentamente hacia el hemisferio vegetal. El segundo clivaje comienza en el polo animal en forma perpendicular al primero, y al igual que este es meridional. El tercer clivaje es ecuatorial desplazado hacia el polo animal, debido a la abundancia de vitelo en el hemisferio vegetal. Durante la etapa de clivaje, el volumen del embrión se mantiene constante y las células del hemisferio animal, al dividirse más rápido, se van haciendo progresivamente más pequeñas respecto a las del hemisferio vegetal. Durante este periodo de segmentación, en el hemisferio animal se forma una cavidad llena de fluido llamada *blastocela*. Esta cavidad aísla a las células animales de las señales inductivas emanadas por las células vegetales y es esencial para los movimientos celulares que se producirán durante la gastrulación. Durante gran parte de los estadios de clivaje, el desarrollo embrionario está regulado por la expresión de ARNm de origen materno que se almacenan progresivamente durante la ovogénesis. En *Xenopus*, la activación del genoma embrionario no ocurre hasta la duodécima división celular en la llamada *transición de blástula media* (TBM) (Barresi and Gilbert, 2019).

La simetría radial del huevo de *Xenopus* (animal-vegetal) (*Figura 1.2.a*) se rompe poco después de la fecundación con el establecimiento de la polaridad dorso-ventral, antes de la primera división celular. En la región opuesta al punto de entrada del espermatozoide se desarrollará la futura región dorsal del embrión como consecuencia de la *rotación cortical*. En este proceso mediado por microtúbulos (MT), la corteza y el

citoplasma cortical del huevo sufren una rotación de aproximadamente 30° con respecto al citoplasma vitelino, en dirección animal-vegetal (*Figura 1.2.b*) (Barresi and Gilbert, 2019; De Robertis et al., 2000; Houston, 2012). Este movimiento de rotación cortical da lugar al transporte de *determinantes maternos* desde el polo vegetal hacia el futuro lado dorsal (*Figura 1.2.b*). Estos factores, principalmente componentes citoplasmáticos de la vía Wnt/ β -catenina como Wnt11 y GBP (*GSK3 binding protein*), están ubicados dentro de vesículas membranosas (Barresi and Gilbert, 2019; Carron and Shi, 2016; Houston, 2012). En consecuencia, en el lado dorsal, ocurre la estabilización de β -catenina y la consecuente activación de la vía Wnt canónica en ese lado del embrión a partir del estadio de 16-células (*Figura 1.2.c*) (Carron and Shi, 2016; De Robertis et al., 2000; Houston, 2012).

En embriones de anfibios, las capas germinales presuntivas pueden mapearse a lo largo del eje animal-vegetal del huevo, incluso antes de la fecundación. Las células del ectodermo del embrión derivarán del hemisferio animal, mientras que el hemisferio vegetal dará origen al endodermo. El mesodermo se forma en la zona marginal situada por debajo del blastocelo, a partir de señales inductivas emanadas por las células vegetales subyacentes (Barresi and Gilbert, 2019). La inducción del mesodermo requiere de la actividad de la vía de señalización mediada por proteínas *Nodal*, un subconjunto de proteínas de la superfamilia del factor de crecimiento transformante beta (TGF β). La activación de la vía Nodal implica la fosforilación de su efector transcripcional, *Smad2*. Durante la TBM, la acción sinérgica del determinante materno VegT, de ubicación vegetal, y la activación de la vía Wnt/ β -catenina en el lado dorsal, genera un gradiente asimétrico de *Smad2* fosforilado a lo largo del eje dorso-ventral (Carron and Shi, 2016; De Robertis et al., 2000). Como consecuencia de los altos niveles de actividad de *Nodal* y de la vía Wnt/ β -catenina, se produce la formación del *centro de Nieuwkoop*. Este centro inductivo se ubica en la región dorso-vegetal de la blástula, y las señales emanadas del mismo son requeridas para el establecimiento del *organizador dorsal de la gástrula* (*Figura 1.2.d*). Por otro lado, bajos niveles de actividad de *Nodal* inducen la formación del mesodermo ventral en la región ventro-vegetal (Carron and Shi, 2016; De Robertis et al., 2000).



1.d. El organizador dorsal de la gástrula

Hace casi un siglo atrás, los experimentos de Hans Spemann y Hilde Mangold revolucionaron el campo de la biología del desarrollo. Empleando embriones de tritón europeo *Tritus*, mostraron que al trasplantar el tejido ubicado por encima del labio dorsal del blastoporo (LDB) de una gástrula temprana en la región ventral de otra gástrula huésped, los embriones trasplantados desarrollan un eje secundario completo (cabeza y tronco-cola) (Spemann and Mangold, 2001). A esta zona ubicada por encima del LDB se le asignó el nombre de *organizador de Spemann-Mangold* u *organizador dorsal de la gástrula* (Barresi and Gilbert, 2019; De Robertis et al., 2000). Estructuras funcionalmente similares al organizador de anfibios se han identificado en otros vertebrados, como el *escudo embrionario* en peces y el *Nodo de Hensen* en amniotas (pollo y ratón) (Martinez Arias and Steventon, 2018; Niehrs, 2004).

La formación del organizador dorsal está mediada por la interacción sinérgica de dos vías. Por un lado la vía Wnt/β-catenina, en el lado dorsal del embrión, activa la expresión de los factores de transcripción Siamois y Twin. Por el otro, la actividad de la vía Nodal desde el centro de Nieuwkoop, promueve la fosforilación de Smad2 en las células mesodérmicas subyacentes. La acción conjunta de Smad2 y de Siamois/Twin activa la expresión de genes específicos del organizador (factores de transcripción y

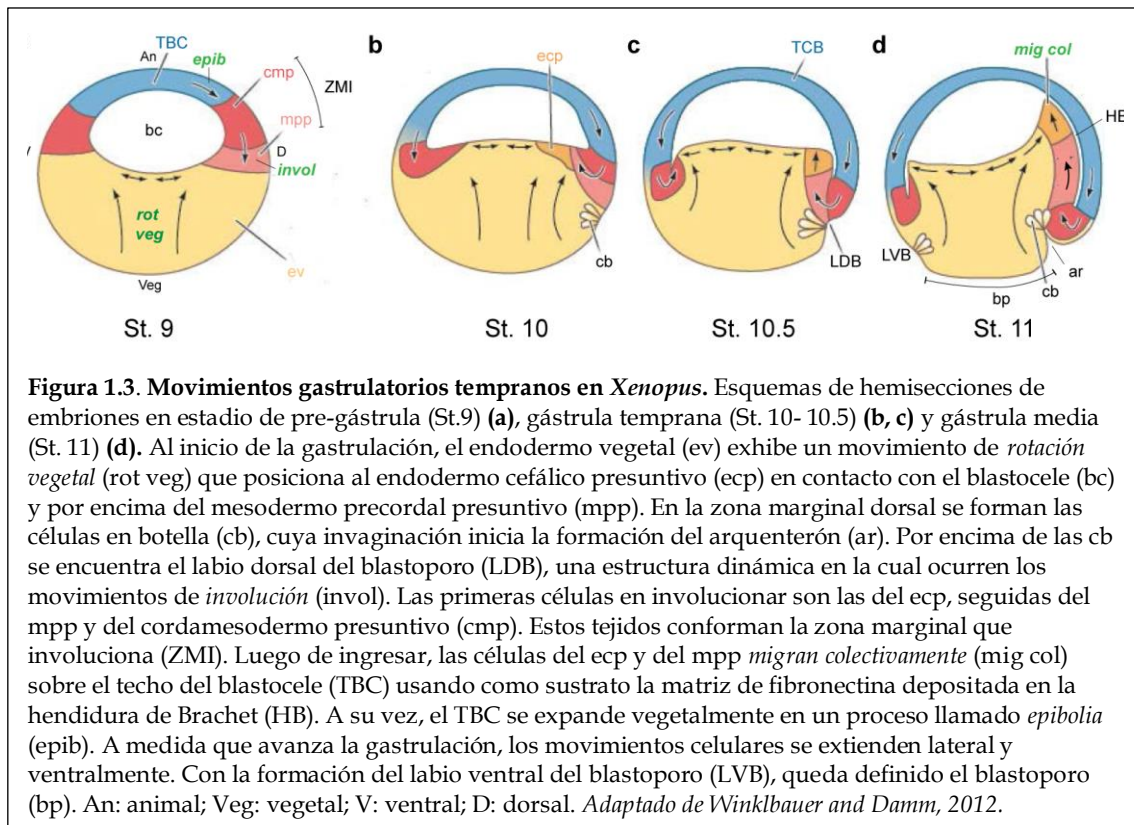
morfógenos) que le otorgan identidad a las distintas subpoblaciones celulares que lo conforman (Carron and Shi, 2016; De Robertis et al., 2000).

El organizador dorsal tiene tres propiedades fundamentales: (i) capacidad de autodiferenciarse en mesodermo axial (mesodermo precordal y cordamesodermo); (ii) capacidad *dorsalizante* sobre el mesodermo y ectodermo circundante (que por defecto desarrollan mesodermo ventral y ectodermo epidérmico, respectivamente); (iii) iniciación de los movimientos gastrulatorios (Barresi and Gilbert, 2019). La irradiación con luz UV de embriones tempranos de *Xenopus* impide el rearrreglo de MT responsable de la rotación cortical y por lo tanto el establecimiento del organizador dorsal. Este tratamiento resulta en “embriones ventralizados” que no poseen estructuras cefálicas, ni elongan su eje axial (De Robertis et al., 2000). Las células del organizador cumplen su función dorsalizante al secretar antagonistas de las vías de señalización BMP (Bone Morphogenetic Proteins), Wnt y Nodal (Carron and Shi, 2016; De Robertis et al., 2000; De Robertis et al., 2001; Zinski et al., 2018). Este antagonismo no es “todo o nada”, sino que establece gradientes de morfógenos que, de manera combinatoria, permiten el correcto modelado o *patterning* de los ejes dorso-ventral y antero-posterior (Bier and De Robertis, 2015).

El organizador dorsal es un tejido heterogéneo y dinámico, cuyas poblaciones celulares se caracterizan por tener distintos perfiles de expresión génica, originar distintos tejidos de la línea media, presentar distintas propiedades inductivas y ejecutar distintos movimientos morfogenéticos (Niehrs, 2004). Según el destino de sus células y la identidad neural que inducen en el ectodermo subyacente, se puede subdividir al organizador en “*organizador de la cabeza*” (mesodermo precordal y endodermo cefálico) y “*organizador del tronco*” (cordamesodermo) (Carron and Shi, 2016; Kiecker and Niehrs, 2001; Niehrs, 2004). Las células del organizador de la cabeza expresan, entre otros, los factores de transcripción Goosecoid (Gsc), Orthodenticle homeobox 2 (Otx2) y LIM homeobox 1 (Lhx1) y secretan antagonistas de las vías BMP, Wnt y Nodal. Por otro lado, las células del organizador del tronco expresan, entre otros, los factores de transcripción Lhx1, Tbx/xbrachyury (xBra) y Notochord homeobox (Not). Esta región del organizador secreta esencialmente antagonistas de BMP (Carron and Shi, 2016; De Robertis et al., 2001; Niehrs, 2004).

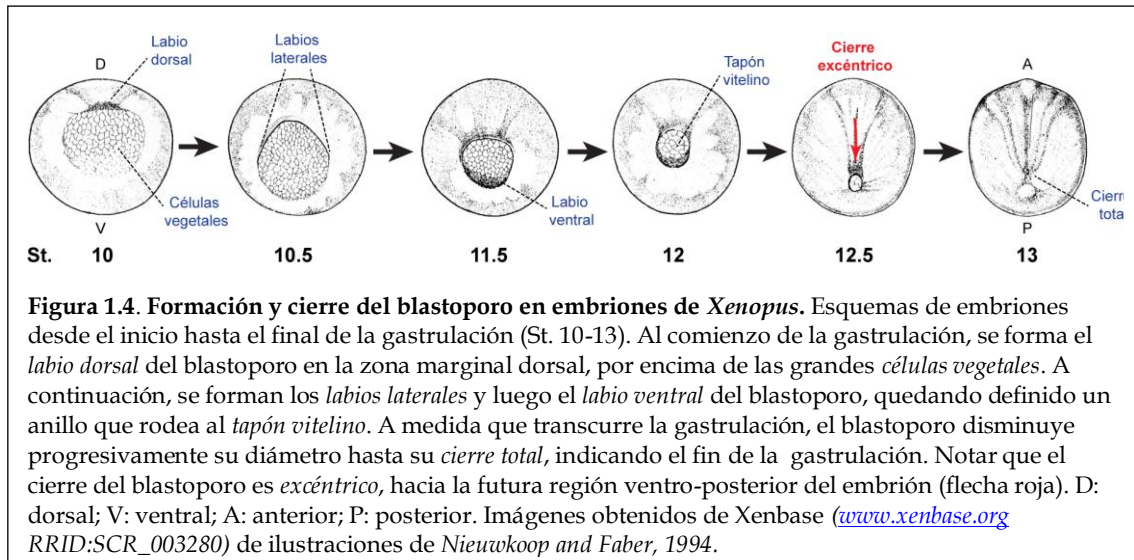
1.e. Gastrulación de *Xenopus laevis*

En el embrión de *Xenopus*, como resultado del establecimiento del organizador dorsal de la gástrula se activan programas morfogénicos que inician los movimientos gastrulatorios. La gastrulación comienza en la *zona marginal dorsal* (ZMD), por debajo del organizador dorsal, donde se forma una depresión local como resultado de la constricción apical de células superficiales que da lugar al *surco del blastoporo*. La invaginación de estas células, denominadas *células en botella* por la morfología que adoptan, inicia la formación del *arquenterón* o intestino primitivo (*Figura 1.3.b*) (Barresi and Gilbert, 2019; Keller et al., 2003; Winklbauer, 2020). Aunque es la primera manifestación externa, la formación del surco del blastoporo no es el primer evento de la gastrulación. Antes de que se formen las células en botella, las células vegetales se mueven en forma de espiral hacia el hemisferio animal (arriba) y hacia el lado dorsal (periferia). Este movimiento denominado *rotación vegetal*, posiciona a las células del endodermo anterior prospectivo en contacto con el blastocele e inmediatamente por encima de las células del mesodermo precordial presuntivo (*Figura 1.3.a,b*). Asimismo, la rotación vegetal pone en contacto a las células del piso del blastocele (endomesodermo) con las del techo del blastocele (TBC, ectodermo) (*Figura 1.3.b,c*) (Barresi and Gilbert, 2019; Huang and Winklbauer, 2018a; Winklbauer, 2020; Winklbauer and Damm, 2012). Las células de estas dos capas germinales exhiben un *comportamiento de separación de tejidos* permaneciendo separadas entre sí, formándose un espacio estrecho llamado *hendidura de Brachet* en el que se ensambla una MEC de fibronectina (FN) fibrilar (Davidson et al., 2004; Wacker et al., 2000; Winklbauer and Damm, 2012). Este conjunto de movimientos vegetales constituyen la primera fase de involución e involucra a las células vegetales, a las células adyacentes a las células en botella (endodermo cefálico presuntivo), y a las células del mesodermo precordial presuntivo (MPP) (*Figura 1.3.b,c*) (Barresi and Gilbert, 2019; Winklbauer, 2020)



Se conoce como *involución* al movimiento de un tejido que gira hacia adentro y se extiende sobre una superficie interna, en este caso el TBC (Barresi and Gilbert, 2019). La región de la gástrula que exhibe este comportamiento se denomina *zona marginal que involuciona* (ZMI) (Figura 1.3.a). Una vez que células de la ZMI ingresan, *migran colectivamente* utilizando como sustrato la matriz de FN depositada en la superficie del TBC, viajando hacia el futuro anterior del embrión (Figura 1.3.c,d) (Huang and Winklbauer, 2018; Rozario et al, 2009; Winklbauer, 2020). A medida que involucionan, las células de la ZMD forman el LDB, una estructura dinámica de células epiteliales superficiales y células mesenquimáticas profundas que son reemplazadas continuamente a medida que migran hacia el interior del embrión. Así, las próximas células en involucionar pertenecen al cordamesodermo prospectivo, flanqueado por las células del mesodermo paraxial prospectivo (Figura 1.3.b,c) (Barresi and Gilbert, 2019). Tanto la formación de células en botella como la rotación vegetal comienzan dorsalmente y se extienden lateral y ventralmente, seguidas de la involución del tejido circundante (Figura 1.3.d) (Keller et al., 2003; Winklbauer, 2020). Con la aparición del labio ventral, el blastoporo forma un anillo alrededor de las enormes células del endodermo vitelino las que constituyen el *tapón vitelino* (Figura 1.4). A medida que

avanza la involución, el blastoporo disminuye progresivamente de diámetro y termina de cerrarse al final de la gastrulación, definiendo la parte posterior del embrión (*Figura 1.4*) (Barresi and Gilbert, 2019; Keller and Shook, 2008; Keller et al., 2003).



Simultáneamente, la región animal del embrión se expande en un proceso llamado *epibolia*, extendiéndose vegetalmente hacia la región desocupada por la ZMI a medida que ésta se internaliza (*Figura 1.3.a-d*). La *epibolia*, ocurre por adelgazamiento y extensión del TBC en todas las direcciones, estableciendo la cubierta epidérmica del embrión. Existen dos mecanismos esenciales que impulsan la *epibolia*: la *división celular polarizada* en el eje horizontal del TBC, y la *intercalación radial* entre las células profundas y las células superficiales del TBC que disminuyen el grosor del tejido de 5-6 capas de células a 2 capas de células (Barresi and Gilbert, 2019; Szabó et al., 2016; Rozario et al, 2009).

A su vez, exclusivamente en el lado dorsal del embrión, las células del mesodermo axial y paraxial, junto con la placa neural subyacente, experimentan *extensión convergente* (EC) que consiste en la convergencia (estrechamiento) en dirección medio-lateral y la extensión (alargamiento) en dirección anteroposterior de los tejidos. Estos movimientos elongan el eje anteroposterior del cuerpo, impulsan la involución y promueven el cierre del blastoporo (*Figura 1.5.b*) (Keller et al., 2003; Shindo, 2018; Shook et al., 2018). El final de la gastrulación está operacionalmente definido por el cierre del blastoporo debajo de las células vegetales, donde el endodermo se conecta

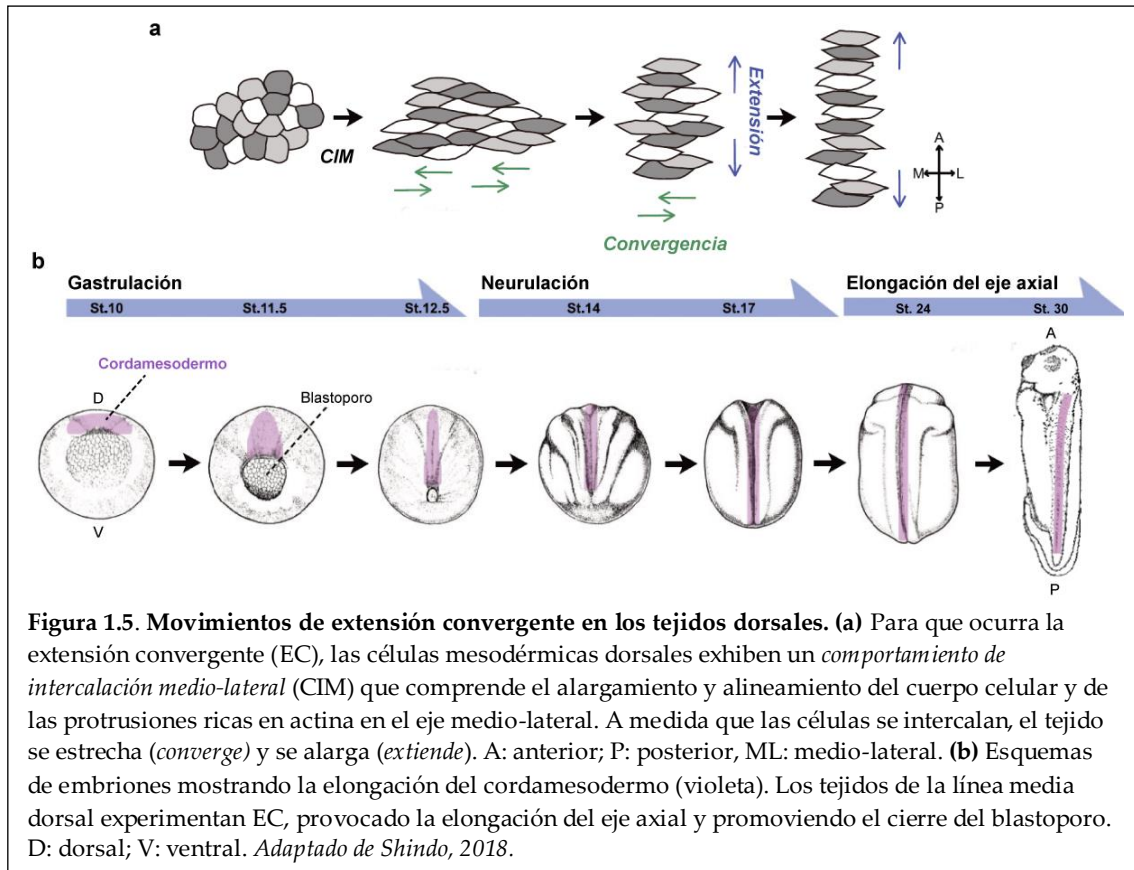
con el ectodermo determinando la futura posición del ano (*Figura 1.4*) (Barresi and Gilbert, 2019; Keller et al., 2003).

1.f. Extensión convergente

Históricamente, la formación de la notocorda de *Xenopus* ha sido el modelo de EC más estudiado. Comenzando en la gástrula media (St. 11.5) y continuando hasta la neurulación, las células del cordamesodermo prospectivo luego de involucionar adquieren una morfología alargada a lo largo del eje medio-lateral y se intercalan entre sí estrechando y elongando el tejido (*Figura 1.5.a*). La principal ventaja que presenta este modelo de EC, es la posibilidad de estudiar este comportamiento celular aislado, mediante la preparación y cultivo de explantes *ex vivo* de la ZMD (*explantes de Keller*) (Keller, 2002; Keller et al., 1985). En cultivo, los explantes de ZMD se elongan como resultado de la EC, poniendo en evidencia la capacidad de las células dorsales de moverse activamente generando fuerzas locales de manera autónoma (Keller et al., 2003; Shindo, 2018; Wilson and Keller, 1991). Para impulsar la EC, las células mesodérmicas de la ZMD exhiben un *comportamiento de intercalación medio-lateral* (CIM), que implica el alargamiento y alineación del cuerpo celular y de protrusiones ricas en actina, con el eje medio-lateral del embrión (*Figura 1.5.a*) (Keller et al., 2003; Pfister et al., 2016; Wallingford et al., 2000; Wallingford et al., 2002).

Dado que la EC requiere de la intercalación de células polarizadas, la disrupción de la morfología polarizada o la estabilidad de las protrusiones resulta en una EC deficiente (Wallingford et al., 2000). Los mecanismos celulares y moleculares que regulan la EC han sido y siguen siendo intensamente investigados. A nivel molecular, la EC depende principalmente de la integridad de las vías no-canónica Wnt/polaridad celular planar (Wnt/PCP), Nodal y la señalización por Ca²⁺ (Heisenberg et al., 2000; Huebner et al., 2021; Kraft et al., 2012; Kühl et al., 2001; Luxardi et al., 2010; Shindo et al., 2019; Tada and Smith, 2000; Ulmer et al., 2017; Wallingford et al., 2000; Wallingford et al., 2001; Williams and Solnica-Krezel, 2020). Si bien la activación de estas vías está regulada de manera diferencial, todas convergen en la modulación de las pequeñas GTPasas RhoA/Rac/Cdc42, que en última instancia remodelan la organización del citoesqueleto de actina y regulan la contractilidad de la miosina (Habas et al., 2001;

Habas et al., 2003; Kim and Davidson, 2011; Köster et al., 2010; Kwan and Kirschner, 2005; Pfister et al., 2016; Shindo et al., 2019; Tahinci and Symes, 2003; Tanegashima et al., 2008; Unterseher et al., 2004).



Originalmente, la EC se caracterizó durante la elongación del eje axial en *Xenopus* (Figura 1.5.b) (Keller et al., 1985) y desde entonces se ha descrito en el mesodermo paraxial y placa neural de anfibios, ratón y pollo, en el mesodermo axial de zebrafish y ascidias, en la hipodermis dorsal y el cordón nervioso ventral de *C. elegans*, en el túbulo renal de embriones de *Xenopus*, en la extensión de la banda germinal de embriones de *Drosophila* y en la cóclea de embriones de ratón (Irvine and Wieschaus, 1994; Lienkamp et al., 2012; Munro and Odell, 2002; Shah et al., 2017; Topczewski et al., 2001; Wallingford et al., 2002; Williams et al., 2014). Asimismo, alteraciones en la EC conducen a defectos congénitos graves como espina bífida, cardiopatías y displasias esqueléticas. Por consiguiente, el estudio de los mecanismos celulares y moleculares que controlan la EC constituye uno de los objetivos clave en el estudio de la embriología animal, en particular en el campo de la morfogénesis (Butler and Wallingford, 2017; Huebner and Wallingford, 2018; Tada and Heisenberg, 2012).

1.g. Cierre del Blastoporo

El principal objetivo de la gastrulación de anfibios es el cierre del blastoporo, que permite la completa internalización del endodermo y el mesodermo dentro del ectodermo (Barresi and Gilbert, 2019; Keller and Shook, 2008). El cierre del blastoporo es un proceso complejo que involucra la interacción mecánica de una gran variedad de movimientos morfogénicos que incluyen la rotación vegetal, la involución, la EC de los tejidos dorsales, el engrosamiento convergente de los tejidos circumblastoporales y la epibolia. Disrupciones de alguno de estos movimientos conllevan a defectos o retrasos en el cierre del blastoporo (Ewald et al., 2004; Goto et al., 2005; Shook et al., 2018; Rozario et al., 2009).

Durante mucho tiempo se consideró a la EC como la principal fuerza convergente impulsora del cierre del blastoporo (*Figura 1.4*). Sin embargo, recientemente se identificó al *engrosamiento convergente* como una fuerza que opera en todos los tejidos circumblastoporales pre-involución, contribuyendo al cierre del blastoporo (Keller and Shook, 2008; Shook et al., 2018). La anisotropía (sesgada dorsalmente) que genera la EC, resulta en el cierre asimétrico del blastoporo en dirección dorsal y de ubicación excéntrica hacia el lado ventro-posterior (*Figura 1.4*). En contraste, en embriones ventralizados que no presentan EC, el cierre del blastoporo es simétrico y de ubicación central, lo que demuestra la naturaleza isotrópica del engrosamiento convergente (Shook et al., 2018).

La complejidad de los movimientos gastrulatorios que ocurren en simultáneo puede dificultar la identificación y comprensión de los eventos moleculares y celulares que tienen lugar en los diferentes tejidos. En este sentido, la preparación de explantes a partir de embriones de *Xenopus* ha permitido estudiar *ex vivo* los procesos morfogénicos autónomos que impulsan la gastrulación (Huang and Winklbauer, 2018a; Keller, 2002; Shindo, 2018; Shook et al., 2018).

1.h. La proteína de anclaje Furry y las quinasas Ndr

El gen *FRY microtubule binding protein (fry)* codifica para una proteína de gran tamaño (~300 kDa) evolutivamente muy conservada llamada Furry (Fry) (Nagai and

Mizuno, 2014). Se identificó originalmente en *Drosophila* (Cong et al., 2001) y desde entonces se han descrito ortólogos en diversas especies eucariotas, incluyendo levaduras, plantas, nematodos y vertebrados. Las proteínas Fry presentan entre 5-6 regiones conservadas (*Figura 1.6.a*) y está involucrada en numerosos procesos celulares como mantenimiento del citoesqueleto, polarización celular, división celular y morfogénesis (Chiba et al., 2009; Cong et al., 2001; Du and Novick, 2002; Emoto et al., 2004; Fang and Adler, 2010; Gallegos and Bargmann, 2004; He et al., 2005; Hirata et al., 2002; Horne-Badovinac et al., 2012; Nagai et al., 2013; Nelson et al., 2003; Norkett et al., 2020). El dominio de mayor conservación, denominado dominio Furry (*FD*), se ubica en la región N-terminal y consiste en repeticiones del tipo HEAT/Armadillo. Estas estructuras superhelicales están presentes en una amplia variedad de proteínas eucariotas y forman una plataforma versátil de interacción con múltiples proteínas (Tewari et al., 2010; Yoshimura and Hirano, 2016). Esta región está seguida por otras 5 regiones conservadas sin dominios funcionales reconocibles que permitan predecir sus funciones (*Figura 1.6.a*) (Gallegos and Bargmann, 2004). Exclusivamente en vertebrados, Fry posee en el extremo C-terminal dos motivos cierre de leucinas (*leucine zipper*) y una estructura *coiled-coil* formando el dominio *LZ* (*Figura 1.6.a*) (Goto et al., 2010). Estos dominios estructurales se caracterizan por formar heterodímeros con estructuras similares y están involucrados en una amplia gama de funciones biológicas, principalmente relacionadas con la expresión génica (Lupas and Gruber, 2005; Szczepaniak et al., 2020).

Organismo	Ortólogos de Fry	Ortólogos de Ndr	Funciones descriptas
Mamíferos	FRY	NDR1/2 (STK38/STK38L)	-Integridad de los husos mitóticos y alineación de los cromosomas (Chiba et al., 2009; Ikeda et al., 2012) * -Acetilación de MT del huso (Nagai et al., 2013) -Retención citoplasmática de YAP/TAZ (Irie et al., 2020) * -Desarrollo de la glándula mamaria durante la preñez (Liu et al., 2019) -Morfología, crecimiento y proliferación de células de cáncer de mama (Liu et al., 2019) -Gen de susceptibilidad al carcinoma mamario (Ren et al., 2013)
<i>X. laevis</i>	Fry	Ndr1/2 (Stk38/Stk38L)	-Formación del eje y la cabeza (Goto et al., 2010) -Regulación indirecta de genes del mesodermo dorsal (Goto et al., 2010) -Desarrollo del pronefros (Espiritu et al., 2018)
<i>D. melanogaster</i>	Fry	Tricornered (Trc)	-Mantenimiento de la integridad de pelos y aristas en células epidérmicas del ala (Cong et al., 2001; He et al., 2005; Fang and Adler, 2002)* -Arborización y <i>tilling</i> dendrítico (Emoto et al., 2004; Han et al., 2012)* -Extensión de neuritas por deslizamiento de MT (Norkett et al., 2020)* -Elongación de la cámara del huevo (Horne-Badovinac et al., 2012)*
<i>C. elegans</i>	Sax-2	Sax-1	-Arborización y <i>tilling</i> dendrítico (Gallegos and Bargmann, 2004)*
<i>S. pombe</i>	Mor2	Orb6	-Mantenimiento del crecimiento polarizado y progresión del ciclo celular (Hirata et al., 2002; Kanai et al., 2005)*
<i>S. cerevisiae</i>	Tao3 (Pag1)	Cbk1	-Control del crecimiento polarizado, tabicamiento y citocinesis (Du and Novick, 2002; Nelson et al., 2003)*

Tabla 1.1. Ortólogos de Fry y Ndr en los organismos indicados. Los * indican las funciones asociadas a Ndr

Las proteínas Ndr (Ndr1 y Ndr2 en vertebrados) pertenecen a la subfamilia de quinasas de serina/treonina AGC y son los homólogos más cercanos de *large tumor suppressor kinases 1/2* (LATS1/2), componentes de la vía Hippo (Hergovich, 2016; Hergovich et al., 2006; Sharif and Hergovich, 2018). La vía de señalización Hippo es una cascada de quinasas altamente conservada que juega un rol fundamental en el control del crecimiento y homeostasis tisular y cuya actividad es esencial para la supresión de tumores (Yu et al., 2015). Sus componentes canónicos son las quinasas MST que fosforilan y activan a LATS1/2, que a su vez fosforilan e inactivan a los cofactores de transcripción *Yes-associated protein* (YAP) y *transcriptional coactivator with*

PDZ-binding motif (TAZ), induciendo su secuestro citoplasmático y degradación proteosómica (Taha et al., 2018; Yu et al., 2015). Recientemente se ha reportado que NDR1/2 es capaz de fosforilar y suprimir la localización nuclear de YAP en el epitelio intestinal de ratón (Zhang et al., 2015), proponiendo a las quinasas NDR como componentes adicionales de la vía Hippo (Hergovich, 2016). En este sentido, un estudio reciente muestra que Fry y NDR están involucradas en el secuestro citoplasmático de YAP y TAZ en cultivos de células HEK293 (Irie et al., 2020).

1.i. Funciones de los ortólogos de Fry y Ndr en levaduras, moscas y nematodos

Los ortólogos de Ndr y Fry son esenciales para la morfogénesis durante la gemación y el crecimiento celular polarizado de la levadura de gemación *S. cerevisiae* y la levadura de fisión *S. pombe*, respectivamente (Du and Novick, 2002; Hirata et al., 2002; Kanai et al., 2005; Weiss et al., 2002). Cepas mutantes para estos genes presentan morfología redondeada debido a la falta de polarización celular (Hirata et al., 2002; Nelson et al., 2003). Durante la gemación de *S. cerevisiae*, Tao3 (Fry), Mob2 y la quinasa Kic1 (MST) actúan cooperativamente en la activación de Cbk1 (NDR) en el denominado sistema RAM, para el correcto crecimiento polarizado, tabicamiento y citocinesis (Du and Novick, 2002; Nelson et al., 2003). Tao3 también especifica la localización nuclear de Cbk1, restringiéndola a las células hijas (Weiss et al., 2002). Allí Cbk1 promueve la activación y acumulación nuclear del factor de transcripción Ace2, controlando la expresión de genes específicos para la degradación del tabique y la separación de la célula madre de la hija (Colman-Lerner et al., 2001; Weiss et al., 2002).

En *S.pombe*, la vía de señalización MOR (contraparte de la vía RAM de *S. cerevisiae*) controla el reordenamiento del citoesqueleto de actina y la progresión del ciclo celular. Orb6 (Ndr) regula la actividad de la pequeña GTPasa Cdc42 en los extremos de las células en crecimiento y en el sitio de tabicamiento (Das et al., 2009; Hirata et al., 2002; Kanai et al., 2005). Mor2 (Fry) actúa como proteína *scaffold* de Orb6 y la quinasa Nak1 (MST), siendo el único ortólogo de Fry reportado en interacción directa con una quinasa de la familia MST (Ray et al., 2010).

Las células epidérmicas de *Drosophila* presentan una única extensión polarizada, siendo un pelo o una cerda sensorial con orientación distal en células del ala, o una arista lateral en las antenas. Estas estructuras son ampliamente utilizadas para el estudio de morfogénesis y establecimiento de polaridad celular planar (Adler and Wallingford, 2017; He and Adler, 2002). En este contexto, *fry* fue identificado originalmente en un *screen* de genes involucrados en morfogénesis de células epidérmicas (Cong et al., 2001). Dado que las mutantes de Fry son letales recesivas, se caracterizó su pérdida de función en moscas mosaico. Células mutantes en el ala de las moscas presentan múltiples pelos agrupados (alrededor de 5), a menudo ramificados, y también cerdas sensoriales ramificadas (Cong et al., 2001). La interacción genética entre Fry y Trc (Ndr) en este fenotipo indica que ambas proteínas regulan la integridad y morfogénesis de las extensiones celulares epidérmicas por medio de una vía de señalización común (Cong et al., 2001; He et al., 2005). Mutaciones en *fry* o *trc* producen un aumento en los niveles de F-actina y DE-cadherina en células del ala, generan desarreglos en los filamentos de actina y disminución en la densidad de MT en las aristas laterales, lo que sugiere que la vía Fry/Trc está involucrada en la regulación del citoesqueleto y la adhesión celular (He and Adler, 2002; Zheng et al., 2010). Asimismo, mutaciones con pérdida de función de pequeñas GTPasas de la familia de Rho intensifican el fenotipo en mutantes para *trc*, sugiriendo que funcionan como vías paralelas para la morfogénesis del pelo (He and Adler, 2002). Mecanísticamente, se ha establecido que Fry es necesaria para el reclutamiento de Trc en los pelos de las alas, donde estarían vinculadas a vesículas de transporte intracelular durante el crecimiento polarizado (Fang and Adler, 2010; He et al., 2005).

En *Drosophila*, Fry también participa en el proceso de elongación de la cámara del huevo (Horne-Badovinac et al., 2012). Mutaciones para *fry*, *trc* y *misshapen* (Msn, quinasa de la familia Ste20-like) resultan en huevos redondos en lugar de alargados. En estos mutantes, la organización de los filamentos de actina en la superficie basal de las células foliculares en dirección perpendicular al eje antero-posterior, se pierde durante las primeras etapas de la oogénesis (Horne-Badovinac et al., 2012).

El *tilling* dendrítico se refiere a la organización espacial que adoptan las dendritas de neuronas sensoriales de un mismo tipo funcional, que permite el establecimiento del campo receptivo completo y no redundante (Jan and Jan, 2003). Ortólogos de Fry y Ndr desempeñan papeles esenciales en la arborización y *tilling* dendrítico de neuronas sensoriales en *Drosophila* y *C. elegans* (Emoto et al., 2004; Gallegos and Bargmann, 2004). Sax-1 (Ndr) y Sax-2 (Fry) son esenciales para establecer el *tilling* dendrítico de neuronas mecanosensoriales en *C. elegans*, regulando la velocidad de crecimiento de ciertas neuritas. El análisis genético en neuronas sensoriales sugiere que mutaciones en *sax-1* o *rhoA* causan defectos morfológicos similares, posiblemente al afectar el mismo proceso celular. Asimismo, los fenotipos mutantes de *sax-2* son más severos que los de *sax-1*, lo que sugiere que Sax-2 podría estar involucrada en otras vías celulares paralelas. Sin embargo, el mecanismo por el cual Sax-1/Sax-2 median el *tilling* dendrítico en *C. elegans* sigue siendo desconocido (Gallegos and Bargmann, 2004). En neuronas sensoriales de clase IV de *Drosophila*, mutaciones en *fry* o *trc* causan la excesiva ramificación y superposición dendrítica indicando que ambas proteínas son necesarias para la correcta extensión, auto-evasión y *tilling* dendrítico (Emoto et al., 2004). Se ha demostrado que la proteína de membrana Flamigo (Fmi), componente de la vía Wnt/PCP, interactúa genéticamente con Fry y Trc evitando la superposición entre dendritas (Matsubara et al., 2011). Los resultados de estos y otros estudios en *Drosophila* sugieren que la vía Fry/Trc suprime la ramificación y superposición dendrítica inhibiendo la actividad de Rac y promoviendo la unión a la MEC vía integrinas (Emoto et al., 2004; Han et al., 2012a). Además, Fry/Trc también regularían el crecimiento de las neuritas por inhibición del deslizamiento de MT (el transporte de MT mediado por MT) (Norkett et al., 2020).

En conjunto, los trabajos realizados en levaduras, nematodos y moscas indican que Fry participa en la regulación de la polaridad, la morfología y la adhesión celular (Cong et al., 2001; Du and Novick, 2002; Emoto et al., 2004; Fang and Adler, 2010; Gallegos and Bargmann, 2004; He et al., 2005; Hirata et al., 2002; Horne-Badovinac et al., 2012; Nelson et al., 2003; Norkett et al., 2020). La mayoría de los fenotipos que presentan los mutantes de Fry están genéticamente relacionados con mutaciones de Ndr, lo que sugiere que en estos organismos, ambas proteínas están implicadas en las

mismas vías celulares (Cong et al., 2001; Du and Novick, 2002; Emoto et al., 2004; Gallegos and Bargmann, 2004; Hirata et al., 2002; Horne-Badovinac et al., 2012). Sin embargo, se conocen muy pocos elementos que regulan a la vía Fry/Ndr y el contexto celular en el cual se activa (Emoto et al., 2004; Hirata et al., 2002; Weiss et al., 2002).

1.j. Funciones de la proteína Fry en vertebrados

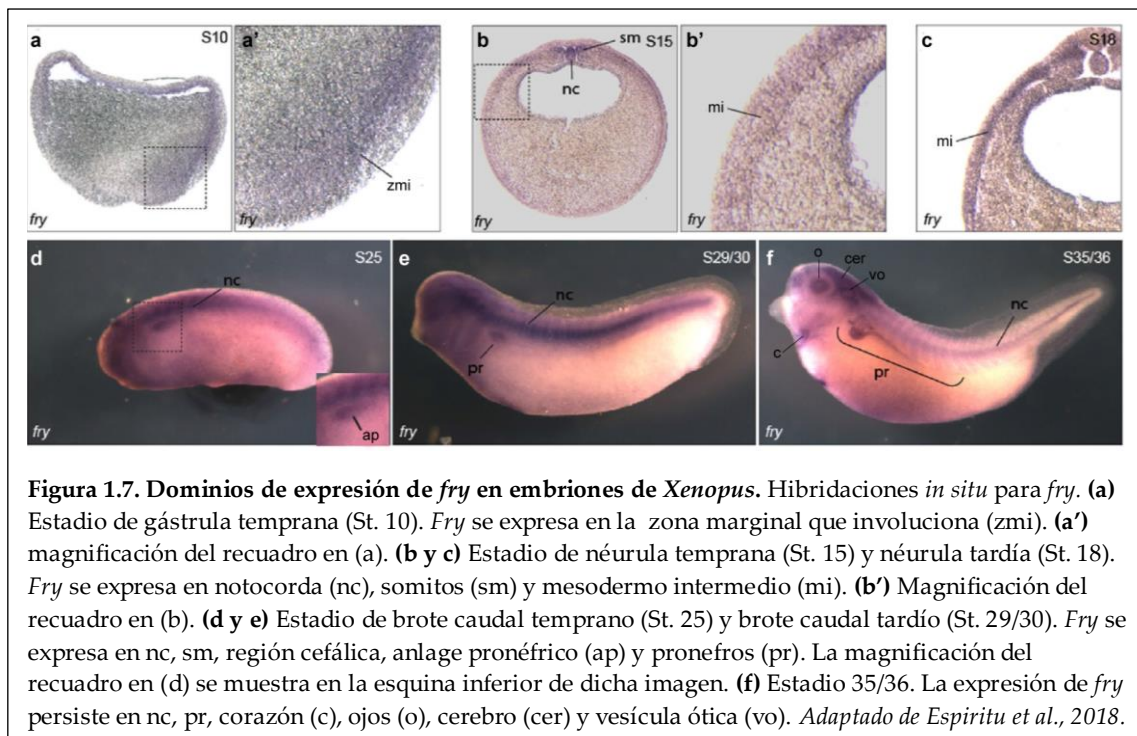
Estudios realizados en células de mamíferos en cultivos muestran que la depleción de FRY, NDR1 o MST1/2 causa desalineación de los cromosomas y formación de husos mitóticos multipolares (Chiba et al., 2009). Las quinasas NDR1 y MST1/2 se encuentran activas durante la mitosis y la activación mitótica de NDR1 requiere de MST2, MOB2 y FRY. Al inicio de la mitosis, FRY se une a los MT del huso actuando como *scaffold* de NDR1 y la proteína activadora MOB2 (Chiba et al., 2009). Durante la división celular, FRY también regula la integridad estructural de los centrosomas y centriolos, promoviendo la activación de la quinasa Polo-like 1 (Plk1) mediada por la quinasa Aurora A (AurKA). En la mitosis temprana, FRY es fosforilada por la quinasa dependiente de ciclina 1 (Cdk1), lo que permite su unión a Plk1. De este modo, Fry actúa como *scaffold* entre Plk1 y AurKA, facilitando la fosforilación de Plk1 por parte de AurKA (Ikeda et al., 2012). Adicionalmente, FRY regula directamente la función, estabilidad y organización de MT durante la mitosis. Se estableció que la región N-terminal de Fry interactúa con MT acetilados del huso y con la deacetilasa de tubulina Sirtuin 2 (SIRT2), preferentemente en células mitóticas, inhibiendo su actividad y modulando así los niveles de acetilación de los MT (Nagai et al., 2013). Estos trabajos realizados en células de mamíferos revelan la importancia de FRY para la alineación de los cromosomas durante la división celular y proponen un mecanismo molecular. A inicios de la mitosis, la región C-terminal de FRY es fosforilada por quinasas mitóticas (Cdk1, Plk1 y AurKA) liberando a Fry de su autoinhibición. La fosforilación de Fry probablemente induce un cambio conformacional, permitiendo su unión a MT, SIRT2 y NDR1 a través de su región N-terminal (dominio FD) (Chiba et al., 2009; Ikeda et al., 2012; Nagai et al., 2013).

Un estudio reciente empleando células humanas reveló que FRY está involucrada en la inactivación de los cofactores transcripcionales YAP y TAZ (Irie et al., 2020). Utilizando cultivos Fry *knock-out*, se demostró que FRY promueve la fosforilación de YAP por parte de NDR1/2. Curiosamente, la depleción conjunta de FRY y NDR1/2 genera un efecto más pronunciado, sugiriendo la existencia de un mecanismo regulatorio adicional. De hecho, Fry no solo participa de la activación de NDR1/2 sino que además, se une directamente a YAP promoviendo su retención citoplasmática (Irie et al., 2020). Dado que la actividad de la vía Hippo es fundamental en tumorigenesis (Taha et al., 2018; Yu et al., 2015), se puede especular que FRY tendría función supresora de tumores. En este sentido, FRY es un gen candidato de susceptibilidad al carcinoma mamario en ratas y presenta bajos niveles de expresión en líneas celulares de cáncer de mama humanas (Ren et al., 2013). En congruencia, el estudio de ratones *Fry-KO* condicionales en glándulas mamarias, revela que FRY es necesaria para el desarrollo mamario durante el periodo de preñez (Liu et al., 2019). Además, la expresión ectópica de FRY afecta la morfología y suprime el crecimiento y proliferación de líneas celulares de cáncer de mama. Análisis de transcriptómica en estas células sugieren que FRY interactúa con quinasas involucradas en distintas vías de señalización, incluyendo la vía Hippo/Yap, y su sobreexpresión resulta en cambios globales de expresión génica (Liu et al., 2019). Estos resultados refuerzan la posibilidad de que FRY actúe como reguladora de múltiples vías y cumpla un papel en el desarrollo y progresión de tumores.

Adicionalmente, FRY se ha identificado como un gene candidato implicado en trastornos cognitivos recesivos en humanos (Najmabadi et al., 2011). Sin embargo, a pesar de que en *Drosophila* y en *C. elegans* Fry regula la ramificación y el *tilling* dendrítico, se desconoce la función de Fry en el desarrollo del sistema nervioso de vertebrados.

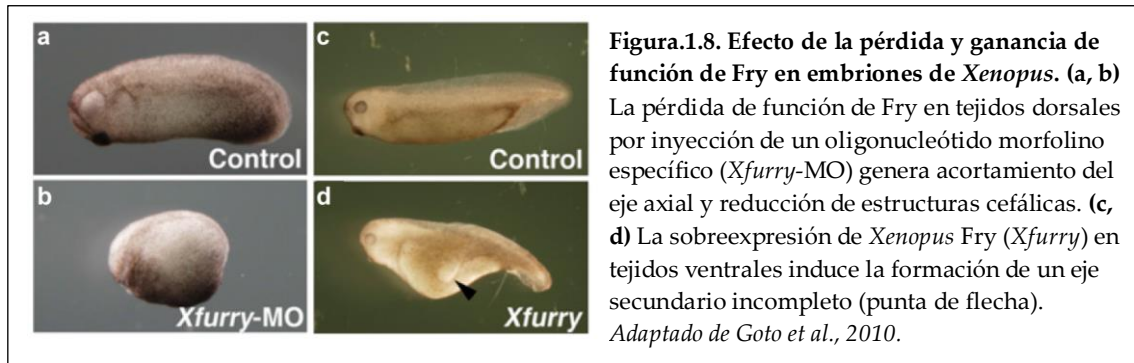
En el desarrollo embrionario de vertebrados, la función de Fry ha sido estudiada únicamente en *Xenopus* y solo en dos trabajos. En ambos se ha asociado a Fry con la regulación de micro-ARNs (miARNs) involucrados en la especificación de dominios mesodérmicos, una función no descrita en otros organismos (Espíritu et al.,

2018; Goto et al., 2010). En *Xenopus*, el gen *fry* es de expresión materna siendo su ARNm detectable por RT-PCR a partir del huevo no fecundado y durante todos los estadios de clivaje (Goto et al., 2010). Por hibridación *in situ* (HIS) se observa la presencia de su ARNm en la ZMD de la gástrula temprana, luego en el cordamesodermo, mesodermo paraxial, mesodermo de las placas laterales y mesodermo intermedio de la gástrula y la neúrla, permaneciendo en somitos, notocorda, corazón, ojos, cerebro y pronefros durante los estadios de brote caudal (Figura 1.7) (Espiritu et al., 2018; Goto et al., 2010).



La depleción de Fry en tejidos dorsales interfiere con el desarrollo de estructuras cefálicas y resulta en embriones con eje axial acortado (Figura 1.8.a,b). Por otro lado, la expresión ectópica de Fry *full-length* en tejidos ventrales induce la formación de un eje secundario incompleto (Figura 1.8.c,d). En este sentido, Fry induce la expresión de genes del mesodermo dorsal como *gsc* y *chordin* (*chrd*) en casquetes animales (TBC) *naïves*, mientras que la depleción de Fry reduce los niveles de expresión de estos genes en gástrulas tempranas (Goto et al., 2010). En conjunto, el trabajo de Goto et al., propone que Fry promueve la expresión de genes del mesodermo dorsal indirectamente, a través de la regulación negativa de miARNs. Sin embargo, no se

presentaron evidencias de que Fry regule directamente la expresión de miARNs o el procesamiento de los mismos.



Nuestro laboratorio comenzó a interesarse por Fry a partir de la búsqueda de proteínas asociadas al complejo transcripcional formado por Lhx1-Ldb1 (LIM domain binding protein) en el desarrollo del riñón. En un ensayo de purificación por afinidad en *tandem* y posterior espectroscopía de masa realizado en una línea celular renal de *Xenopus* adulto, identificamos a Fryl (parálogo de Fry) en interacción con el complejo Lhx1-Ldb1. El genoma de vertebrados posee dos genes parálogos que codifican para las proteínas Fry y Fryl (AF4p12) (Figura 1.6.b). Este último, fue identificado como compañero de fusión del gen *mixed lineage leukemia* (MLL) en células humanas de leucemia linfoblástica aguda (ALL), actuando su extremo C-terminal como activador transcripcional (Hayette et al., 2005). Asimismo, Fryl forma parte del complejo activador de la transcripción de Notch1 en células humanas T-ALL (Yatim et al., 2012). En humanos, estas proteínas presentan un 60% de identidad de secuencia y dominios muy similares (74% de sustituciones sinónimas) (Figura 1.6.b) (Hayette et al., 2005; Nagai and Mizuno, 2014). Sin embargo, a diferencia de *fry*, *fryl* no se expresa en el pronefros de *Xenopus* (Espiritu et al., 2018). A partir de demostrar que: (1) Fryl y los dominios funcionales de Fry interactúan con Lhx1-Ldb1; (2) los transcritos de *fry* están presentes en el primordio renal y luego en el pronefros en dominios que coinciden con los de *lhx1* (Figura 1.7) y (3) que tanto de Lhx1 como de Fry participan en el desarrollo de la cabeza y el eje axial, estudiamos la relación funcional de ambos genes en el desarrollo del pronefros (Espiritu et al., 2018). La pérdida de función de Fry en las blastómeras ventrales, de las cuales derivan tejidos renales, interfiere con la formación del primordio pronefrico de manera similar a la depleción del Lhx1 (Cirio et

al., 2011; Espiritu et al., 2018). Nuestro trabajo demuestra que Lhx1 y Fry interactúan física y funcionalmente en forma sinérgica en el pronefros en desarrollo e identifica grupos de miARNs que regulan el desarrollo renal (Espiritu et al., 2018).

Ambos estudios realizados en *Xenopus* demuestran que Fry juega un papel importante en el establecimiento de destinos celulares mesodérmicos (Espiritu et al., 2018; Goto et al., 2010), sin embargo, el mecanismo celular y molecular por el cual opera en estos tejidos se mantiene elusivo. Mientras que la participación de las quinasas Ndr en el desarrollo del pronefros no ha sido investigada, no está claro si su activación es requerida durante la formación del mesodermo dorsal (Goto et al., 2010). Defectos en el desarrollo del eje axial y en la formación de la cabeza, como los observados en embriones dorsalmente deplecionados de Fry (Goto et al., 2010), son frecuentemente atribuidos a fallas en la especificación de destinos celulares y/o a defectos en los movimientos gastrulatorios (Luxardi et al., 2010; Tada and Smith, 2000; Ulmer et al., 2017; Yokota et al., 2003). Sin embargo, no se ha estudiado hasta el momento un posible rol de esta proteína en los eventos morfogénicos que tienen lugar durante la gastrulación de vertebrados.

Teniendo en cuenta las ventajas y características del sistema modelo *Xenopus* y los antecedentes de Fry en distintos organismos, en el presente trabajo estudiaremos la función de esta proteína en el establecimiento del plan corporal.

Objetivos e hipótesis

2.a. Objetivo general

La gastrulación es un evento clave durante el desarrollo embrionario a partir del cual se elabora el plan corporal de los animales. Durante este proceso se segregan los precursores de las capas germinales y se establecen los ejes embrionarios. El gen *furry microtubule binding protein (fry)* codifica para una proteína evolutivamente muy conservada, cuyos ortólogos han sido asociados a una amplia variedad de funciones celulares que incluyen polarización y división celular, y morfogénesis. Sin embargo, poco se conoce sobre la función de este gen en el desarrollo de vertebrados. En *Xenopus*, *fry* tiene expresión materna y su pérdida de función en el lado dorsal del embrión interfiere con el desarrollo de la cabeza y la elongación del eje axial, un fenotipo frecuentemente atribuido a fallas en la adquisición de destinos celulares y/o a defectos en los movimientos gastrulatorios. Teniendo en cuenta los fenotipos asociados a la pérdida de función de Fry en distintos organismos, el objetivo general de la presente tesis es estudiar el requerimiento de Fry para el establecimiento del plan corporal de vertebrados y la regulación de movimientos morfogenéticos de gastrulación, empleando embriones de *Xenopus laevis* como sistema modelo.

2.b. Hipótesis y objetivos específicos

Hipótesis 1. Fry se distribuye asimétricamente en oocitos y embriones tempranos de *Xenopus*, contribuyendo al establecimiento del plan corporal embrionario.

Objetivo 1.1. Estudiar la distribución espacial del ARNm de *fry* en oocitos y embriones tempranos.

Objetivo 1.2. Analizar la localización subcelular de la proteína Fry en tejidos de la gástrula.

Hipótesis 2. La pérdida de función dorsal de Fry afecta la formación del organizador dorsal de la gástrula y el *patterning* del eje axial.

Objetivo 2.1. Analizar el efecto de la depleción de Fry sobre el dominio de expresión de genes marcadores de distintas poblaciones del organizador dorsal de la gástrula.

Objetivo 2.2. Evaluar el desarrollo y diferenciación de las estructuras de la línea media dorsal en embriones con pérdida de función de Fry.

Hipótesis 3. La función de Fry es necesaria para la correcta ejecución de los movimientos gastrulatorios en *Xenopus*.

Objetivo 3. Investigar el requerimiento funcional de Fry en los movimientos gastrulatorios de involución, extensión convergente y migración colectiva del mesodermo dorsal.

Hipótesis 4. Durante la gastrulación de *Xenopus*, Fry y la quinasa Ndr1/Stk38 interacciona funcionalmente.

Objetivo 4. Evaluar la capacidad de distintas variantes funcionales de NDR1 humana de mitigar los efectos de la depleción de Fry en el desarrollo del eje axial.

Hipótesis 5. Fry modula la actividad de la vía canónica Wnt/ β -catenina durante el desarrollo embrionario temprano de *Xenopus*.

Objetivo 5. Investigar el requerimiento de Fry en la inducción de eje secundario dependiente de la activación ectópica de la vía canónica Wnt/ β -catenina.

Materiales y métodos

3.a. Declaración de ética

Todos los experimentos fueron llevados a cabo en estricta conformidad con la “Guía para el uso y cuidado de animales de laboratorio del NIH” (NIH Publicación N° 86-23, revisado 1996, <http://grants.nih.gov/grants/olaw/olaw.htm>) y la “Guía de experimentación con animales: reporte de experimentos *in vivo*” (ARRIVE guidelines 2.0) (Percie et al., 2020). El protocolo de cuidado animal fue aprobado por la Comisión Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (Protocolo N° 64).

3.b. Obtención de embriones de *Xenopus*

Se obtuvieron embriones de *Xenopus laevis* a partir de amplexo natural de ranas adultas mantenidas en un cuarto con condiciones controladas de temperatura (18 - 21°C) y fotoperíodo constante (ciclo 12:12 horas luz - oscuridad). Para inducir el amplexo, se realizaron inyecciones intracelómicas de la hormona hCG (Pregnyl 500 UI, MSD). Las hembras fueron preinducidas con 50 U.I hCG de 3 a 15 días previos a la inducción para favorecer la maduración oocitaria y se indujo su ovipuesta mediante la inyección de 450 - 800 U.I hCG. El comportamiento reproductivo de los machos se indujo con 100 U.I hCG. Las parejas fueron aisladas en tanques de reproducción durante el amplexo. Aproximadamente 15 horas luego de la inducción, la hembra comienza a poner huevos que son inmediatamente fecundados por el macho (fecundación externa). Se recolectaron los embriones en el agua de puesta cada 1 - 1,5 horas. Con el fin de facilitar la manipulación, microinyección y/o microcirugía, los embriones fueron tratados con una solución de 3% cisteína (pH 8.0) (Sigma) preparada

en 0,1X Marc's Modified Ringer's (MMR) (1 M NaCl, 50 mM HEPES, 20 mM, 20 mM CaCl₂·2H₂O, 20 mM KCl, 1 mM MgSO₄·7H₂O; pH 7,4) para remover las envolturas de gelatina secretadas por el oviducto de las hembras. Los embriones fueron mantenidos en 0.1X MMR en incubadoras a 14 - 20°C hasta el estadio de desarrollo deseado. Se estableció el estadio de los embriones de acuerdo a la Tabla de desarrollo normal de *Xenopus* de Nieuwkoop y Faber (Nieuwkoop and Faber, 1994).

3.c. Obtención de oocitos de *Xenopus*

Se obtuvieron oocitos de *Xenopus* en colaboración con el grupo de investigación del Dr. Daniel Calvo (IFIByNE-UBA-CONICET). El procedimiento quirúrgico y la colagenización de los oocitos fueron llevados a cabo por el Lic. Manuel Lopez siguiendo el protocolo descrito (Beltrán González et al., 2014; Wozniak et al., 2018). Brevemente, las ranas fueron anestesiadas en tricaina metano sulfonato (MS 222) (1,5 mg/mL) durante 30 minutos para la remoción quirúrgica de los ovarios. Los lóbulos de los ovarios fueron incubados en una solución de colagenasa (400 U/mL) durante 4 horas en agitación y los oocitos aislados fueron mantenidos en solución de Barth (88 mM NaCl, 0.33 mM Ca(NO₃)₂, 0.41 mM CaCl₂, 1 mM KCl, 0.82 mM MgSO₄; 2.4 mM NaHCO₃, 10 mM HEPES; pH 7.4) a 18°C hasta ser utilizados. Se estableció el estadio de crecimiento de los oocitos de acuerdo a (Dumont, 1972).

3.d. Stock de plásmidos

Los plásmidos conteniendo el ADNc de interés (*Tablas 3.1 y 3.2*) se amplificaron en bacterias quimio-competentes *E. coli* (cepa DH5α) y se purificaron con *High purity plasmid miniprep kit* (DSBIO). Luego de medir su concentración (NanoDrop, Thermo Scientific), los plásmidos se conservaron a -20°C hasta ser utilizados.

3.e. Síntesis de ARN mensajeros

Los plásmidos utilizados para la síntesis de ARNm *in vitro* se detallan en la *Tabla 3.1* junto con la enzima de restricción con la que fueron linealizados, la ARN

polimerasa con la que fueron sintetizados y su procedencia. Los ADNc de hNDR1-wt, hNDR1-PIF (versión hiperactiva) y hNDR1-kd (quinasa muerta, K118A) (Cook et al., 2014; Vichalkovski et al., 2008) fueron liberados de los plásmidos pcDNA3.HA.hNDR1-wt, pcDNA3.HA.hNDR1-PIF y pcDNA3.HA.hNDR1-kd, respectivamente mediante la digestión con *Bam*HI y *Xho*I, purificados con *Gel Extraction Kit* (DSBIO) y clonados en el plásmido de expresión pCS2+ por ligación con *T4 DNA ligase* (Promega).

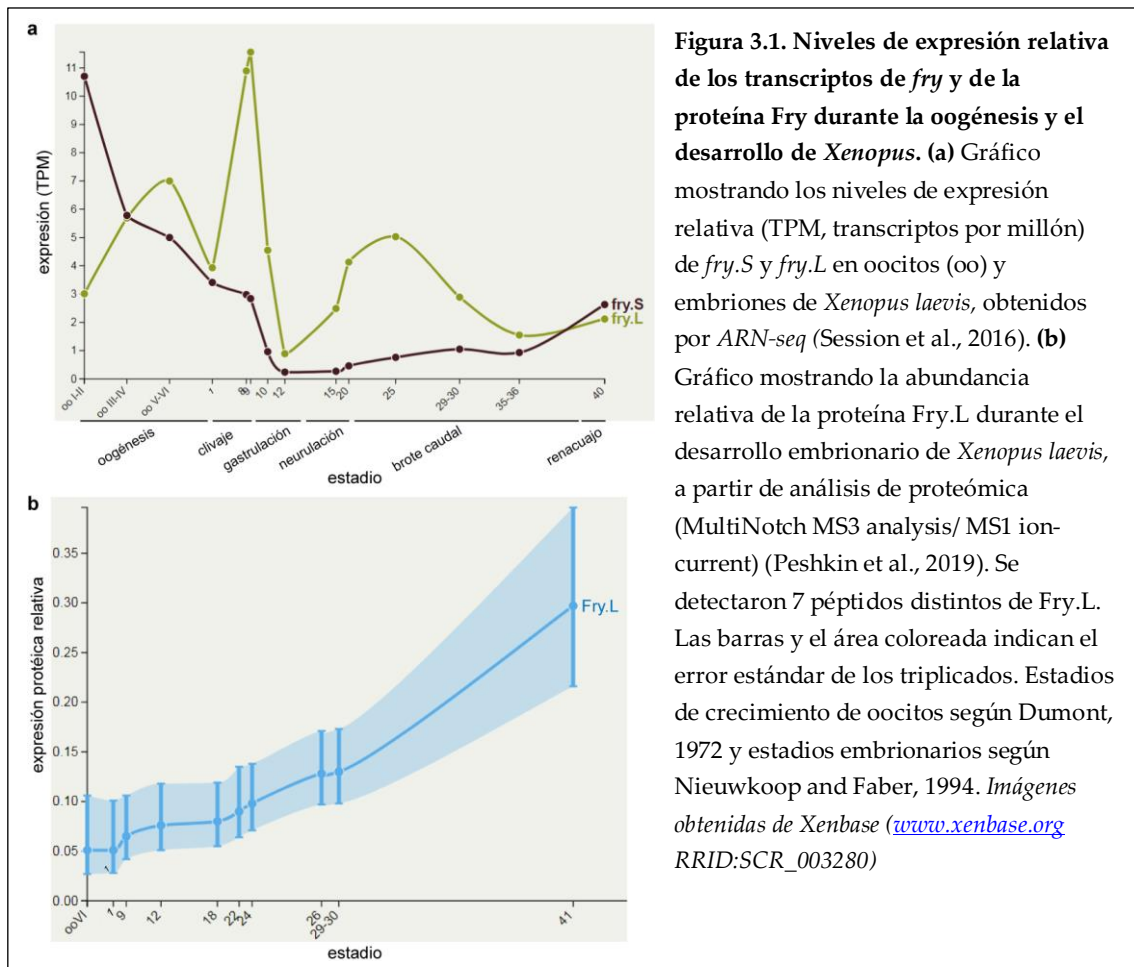
Para la síntesis de ARNm *in vitro*, 2,5 µg de plásmido fueron linealizados con la enzima de restricción correspondiente y el ADN lineal fue purificado con *DNA Clean & Concentrator kit* (Zymo). Se sintetizó el ARNm capeado con la ARN polimerasa correspondiente utilizando *mMessage mMachine kit* (Ambion) y el ARNm resultante se purificó con *DNA Clean & Concentrator kit* (Zymo) eluyendo en 30 µl de agua libre de ARNasa. Luego de medir su concentración (NanoDrop, Thermo Scientific), los ARNm se conservaron en alícuotas de 1 µl a -80°C que fueron descongeladas una única vez inmediatamente antes de la microinyección en embriones.

Plásmido	ADNc	Enzima de restricción	ARN polimerasa	Procedencia
pCS2+	<i>hNDR1-wt</i>	<i>Not</i> I	SP6	Alexander Hergovich
pCS2+	<i>hNDR1-PIF</i>	<i>Not</i> I	SP6	Alexander Hergovich
pCS2+	<i>hNDR1-kd</i>	<i>Not</i> I	SP6	Alexander Hergovich
pCS2+.763	<i>fry-GFP</i>	<i>Not</i> I	T7	Toshiyasu Goto
PCS2+.763	<i>HA-FD+LZ</i>	<i>Not</i> I	T7	M.C. Cirio–N. Hukriede
pCS2+	<i>hsH2B-eGFP</i>	<i>Not</i> I	SP6	Lance Davidson
pCS2+	<i>mem-mScarlet</i>	<i>Not</i> I	SP6	Lance Davidson
pCS2+	<i>wnt8</i>	<i>Not</i> I	SP6	Neil Hukride

Tabla 3.1. Plásmidos utilizados para la síntesis de ARNm

3.f. Protocolo de microinyección

Los embriones fueron mantenidos en 0.1X MMR hasta el estadio de 4-células cuando se los transfirió a una placa de inyección conteniendo una solución de 3% Ficoll (Sigma) preparada en 1X MMR con gentamicina (24 µg/ml). Las microinyecciones de ARNm o MO se realizaron con un microinyector (Pneumatic Picopump PV830, World Precision Instruments) en la región marginal de ambas blastómeras dorsales o ventrales del embrión de 4-células. La especificidad del morfolino de Fry (*fry*-MO) (Genetools, LLC, secuencia: 5'- CGGGCAGGTAAGAGGCTCACACACT -3') ha sido previamente validada (Goto et al., 2010). Este morfolino se une por complementariedad de bases de la región 5' no codificante del ARNm de *fry.L*. Si bien el genoma de *Xenopus* cuenta con dos genes homeólogos de Fry (Fry.S y Fry.L), análisis de *ARN-seq* muestran que Fry.L se expresa en mayor abundancia durante el desarrollo embrionario (Figura 3.1.a) (Session et al., 2016). Análisis de proteómica revelan que la abundancia de Fry.L aumenta progresivamente durante la embriogénesis de *Xenopus* (Figura 3.1.b) (Peshkin et al., 2019). Se utilizó un morfolino standard control (St-MO) (Gene Tools, LLC) como control de toxicidad. Se inyectó *fry*-MO en dosis de 5 - 15 ng por embrión y el St-MO en dosis de 15 ng por embrión. Se inyectaron las siguientes dosis de ARNm por embrión: *fry*-GFP (1,2 ng), *mem-mScarlet* (125 pg), *HA.FD+LZ* (200 - 800 pg), *H2B-eGFP* (500 pg), *hNDR1-wt*, *hNDR1-PIF*, *hNDR1-kd* (150 - 250 pg) y *wnt8* (10 pg). Una vez inyectados, los embriones se mantuvieron en solución de Ficoll por aproximadamente 2 horas para permitir su recuperación. Luego fueron transferidos a una placa con 0.1X MMR con gentamicina (24 µg/ml) hasta alcanzar el estadio deseado. Como control de viabilidad y estadio de desarrollo, por cada placa de embriones inyectados se reservó y mantuvo en las mismas condiciones una placa de embriones no inyectados perteneciente a la misma camada.



3.g. Hibridación *in situ*

3.g.a. Síntesis de sondas para hibridación *in situ*

Los plásmidos utilizados en la síntesis de sondas para HIS se detallan en la *Tabla 3.2* junto con la enzima de restricción con la que fueron linealizados, la ARN polimerasa con la que fueron sintetizados y su procedencia. Para la síntesis de las sondas 2 μ g de plásmido fueron linealizados con la enzima de restricción correspondiente y el ADN lineal fue purificado con *illustra GFX PXR DNA purification kit* (GE Healthcare). Para la síntesis de las sondas de ARN dioxigenina (DIG)-marcadas, se empleó *DIG RNA labeling Mix* (Roche), *RNA polimerase* (Invitrogen) e inhibidor de ARNasa *Riboblock* (Thermo scientific). Se purificó la sonda de ARN resultante por precipitación con cloruro de litio a -20°C *overnight* (ON). Las sondas fueron resuspendidas en 25 μ l de agua ARNasa *free* y 25 μ l de Buffer de Hibridación, y guardadas a -20°C (stock de sonda) hasta su utilización.

Plásmido	ADNc	Enzima de restricción	ARN polimerasa	Procedencia
pCMV.Sport6	<i>fry</i>	<i>SmaI</i>	T7	Dharmacon
pSP73	<i>brachyury</i>	<i>BglIII</i>	T7	Neil Hukriede
pCMV.Sport6	<i>myoD</i>	<i>SalI</i>	T7	Oliver Wessely
pKS+	<i>not</i>	<i>HindIII</i>	T7	David Kimelman
pBS.59	<i>chordin</i>	<i>EcoRI</i>	T7	Edward De Robertis
pSP64T	<i>gsc</i>	<i>EcoRI</i>	SP6	Neil Hukriede
pBS-KS	<i>otx2</i>	<i>EcoRI</i>	T3	Ira Blitz

Tabla 3.2. Plásmidos utilizados en la síntesis de sondas para hibridación *in situ*

3.g.b. Procedimiento

Se realizaron HIS en embriones enteros (*in toto*) siguiendo el protocolo descrito en (Gawantka et al., 1998). Los embriones fueron fijados en MEMFA (1X Sales MEM; 4% Formaldehído) a 4°C ON, deshidratados progresivamente en metanol (MeOH) y mantenidos en MeOH a -20 °C por al menos 2 horas. Luego de una hidratación progresiva en Buffer Fosfato Salino (PBS), los embriones se transfirieron a una solución de PTw (1X PBS, 0,1% Tween 20). Los embriones fueron permeabilizados mediante un tratamiento con Proteinasa K (0,5 ug/ml, Sigma,) y fijados en formaldehído 4%. Luego de prehibridar los embriones en Buffer de Hibridación por al menos 1,5 horas a 65°C, se colocó la Solución de Hibridación (15 µl de stock de sonda en 1,5 ml de Buffer de Hibridación) y se incubó a 65°C en agitación leve ON. Posteriormente se realizaron lavados exhaustivos de la sonda con las soluciones de lavado (*solución 1*: 50% formamida, 2X SSC, 2 x 30 min; *solución 2*: 2X SSC, 2 x 15 min; *solución 3*: 0,2X SSC, 4 x 20 min) a 65°C en agitación leve. Luego de dos incubaciones en solución MAB, se realizó el bloqueo de antígenos inespecíficos en la solución de bloqueo por al menos 1 hora a temperatura ambiente. Los embriones se incubaron en una solución 1:5000 de *anti-DIG alkaline phosphatase Fab fragment antibody* (Roche) preparado en solución de bloqueo a 4°C en agitación ON. Se realizaron lavados en PTw por al menos 3 horas para remover el exceso de anticuerpo. Con el fin de revelar la presencia del anticuerpo

anti-DIG acoplado a fosfatasa alcalina unido a la sonda marcada con DIG, los embriones se incubaron en buffer de tinción con los sustratos *NBT* (Sigma) y *BCIP* (Sigma). En presencia de estos sustratos, la fosfatasa alcalina cataliza una reacción que da lugar a un precipitado de color violeta. La reacción colorimétrica se detuvo al observarse el precipitado violeta, evitando la presencia de *background* inespecífico, mediante lavados con PTw. Los embriones se fijaron en solución Bouin's modificada (4% formaldehído, 5% ácido acético) ON a temperatura ambiente en agitación. Posteriormente, se realizaron varios lavados con 70% EtOH:H₂O para remover la solución de Bouin's. Se procedió a la despigmentación de los embriones utilizando una solución de blanqueo (5% peróxido de oxígeno 100 volúmenes, 5% Formamida, 2,5X SSC) y exposición directa a luz intensa por aproximadamente 1 hora en agitación.

3.g.c. Soluciones

10 X PBS: 1.37 M NaCl, 27 mM KCl, 43 mM Na₂HPO₄, 14 mM KH₂PO₄

Sales MEM 10 X: 0,2 M MOPS (pH 7,4), 4 mM EGTA, 1 mM MgSO

20 X SSC: 3 M NaCl, 300 mM Na₃citrato*2H₂O; pH 7

Buffer de Hibridación: 50% formamida; 5 X SSC, 5 mM EDTA, 0,1% Tween 20, 0,1% CHAPS, 1 mg/ml RNA Tórula (Sigma) preparada en formamida, 50 mg/ml Heparina

Solución de tinción: 100 mM Tris-HCl (pH 9,5), 100 mM NaCl, 50 mM MgCl₂, 0,1% Tween 20 (Sigma), 6,75 µl stock /ml NBT (p-nitroblue tetrazolium chloride) (Sigma) buffer (stock: 50 mg/ml preparado en 70% di-metil-formamida) y 3,5 µl stock /ml BCIP (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate) (Sigma) (stock: 50 mg/ml preparado en H₂O)

MAB: 100 mM ácido maléico, 150 mM NaCl; pH 7,5.

Solución de bloqueo: 2% *Blocking Reagent* (Roche) preparado en MAB, 5% suero de cabra (Merk)

3.h. Inmunohistoquímica

Se realizaron inmuohistoquímicas (IHQ) en embriones enteros (*in toto*) siguiendo el protocolo descrito en (Cirio et al., 2011). Los embriones fueron fijados,

deshidratados e hidratados igual que para HIS (Sección 3.g.b). Se realizó el bloqueo de antígenos inespecíficos con PBT (1% *Blocking reagent* (Roche), 0,1% Triton X-100 preparado en PBS) por al menos 2 horas y la incubación en una solución 1:300 de MZ15 (*keratan sulfate*, DSHB, RRID: AB_760352) o 1:80 de 12/101 (*skeletal muscle marker*, DSHB, RRID: AB_531892) preparados en PBT a 4°C en agitación ON. Posteriormente, se lavaron los anticuerpos primarios con PBT no menos de 4 horas y se incubó con una solución 1:500 de *IgG anti-mouse acoplado a fosfatasa alcalina* (Tecnolab) a 4°C en agitación. El lavado del anticuerpo secundario, la reacción colorimétrica de revelado y la despigmentación de los embriones se realizó de la misma manera que para las HIS (Sección 3.g.b).

3.i. Inmunofluorescencia y cuantificación de fibronectina

La inmunofluorescencia de FN se llevó a cabo según el protocolo descrito en (Davidson et al., 2004). Los embriones fueron fijados en paraformaldehído 4% a 4°C ON y lavados en PBS. Se cortaron hemisecciones de las gástrulas con una hoja de bisturí. Luego de varios lavados en PBT, se realizó el bloqueo inespecífico en la solución de bloqueo (10% suero de cabra, 10% BSA (Sigma) preparado en PBT) durante 1 hora a temperatura ambiente y se incubó en una solución 1:50 de 4H2 (*fibronectin*, DSHB, RRID: AB_2721949) preparado en solución de bloqueo a 4°C en agitación ON. Posteriormente se realizaron lavados del anticuerpo primario en PBT durante 1 hora y se incubó en una solución 1:2000 de *IgG anti-mouse Alexa 488* (Invitrogen, RRID: AB_141607) preparada en solución de bloqueo a temperatura ambiente en agitación durante 3 horas. Luego de varios lavados en PBS, los embriones fueron deshidratados en MeOH e incubados a 4°C ON. El montaje se realizó en cámaras construidas con un anillo de nylon adherido a un cubreobjetos en las cuales se aclararon los embriones en Solución de Murray (50% benzoato de bencilo, 50% alcohol bencílico) con el fin de remover el vitelo opaco que interfiere con la adquisición de imágenes en planos axiales profundos. Una vez transparentadas, las secciones se orientaron bajo lupa y las cámaras fueron selladas con un cubreobjeto y *vacuum grease*. Las imágenes fueron adquiridas con un microscopio confocal *Olympus FV* con un objetivo 20X en 10 planos con 6 µm de distancia axial (profundidad total de 60 µm). La reconstrucción de las imágenes

tridimensionales (máxima intensidad) y las cuantificaciones de FN se realizaron con el software ImageJ (<https://fiji.sc/>).

Con el fin de cuantificar la cantidad de FN presente en la hendidura de Brachet de gástrulas tempranas (St. 10.5), se dibujó un rectángulo de 25 μm de ancho (*eje x*) y 100 μm de alto (*eje y*) sobre las imágenes obtenidas, centrado en la hendidura de Brachet a una distancia de 300 μm del LDB. Se cuantificó la intensidad de fluorescencia en el *eje x* con la función “*Plot profile*”. Esta función promedia los valores (registrados en escala de grises) de los pixeles presentes en el *eje y* para cada punto del *eje x*. Se relativizó a la intensidad *I* de cada punto del *eje x* a la intensidad media *Im*, para hacer posible la comparación entre experimentos independientes. Se graficó la intensidad de fluorescencia relativa *I/Im* en función de la posición (*eje x*) empleando el software *Prism6*, *GraphPad*.

3.j. Histología

Posterior al procesamiento para HIS o IHQ, los embriones se deshidrataron secuencialmente en EtOH (70% EtOH 10 min, 90% EtOH 10 min, 100% EtOH 2 x 10 min) y aclararon en xilol durante 15 min. Luego de un pasaje por xilol-parafina (50:50) y dos pasajes por parafina: histoplast (Biopac) (50:50) de 20 min a 65°C, los embriones se orientaron bajo lupa en tacos de parafina. Se realizaron cortes histológicos de 15 μm de espesor con un micrótopo (Leica) que fueron montados en portaobjetos previamente engelatinados (2% gelatina, Research AG). Por último, los cortes se desparafinaron en xilol y se montaron con medio de montaje anhidro (DPX, Sigma). Se tomaron imágenes de los cortes histológicos con una cámara digital (Infinity 1; Lumera Corporation) acoplada a un microscopio de campo claro (CX31: Olympus,) con un objetivo 10X.

3.k. Procesamiento de imágenes y mediciones morfométricas

Se adquirieron imágenes externas de embriones fijados enteros o hemisecciones con una cámara Leica DFC420 acoplada a una lupa Leica L2 con magnificación 20X

para estadios de blástula a néurula (St. 10 - St. 15) y 16X para estadios de brote caudal (St. 28 - St. 32). Las imágenes fueron editadas con el software *Photoshop CS6*.

Las mediciones de “*cierre de blastoporo*”, “*migración del MPP*”, “*EC del MPP*” y “*elongación del cordamesodermo*” se realizaron en embriones fijados usando el software *ImageJ* (<https://fiji.sc/>). El cierre del blastoporo se calculó como el área del blastoporo sobre el área del hemisferio vegetal del embrión (Ewald, 2004). La migración y la EC del MPP se analizaron como la distancia del dominio de expresión de *gsc* al LDB sobre el diámetro del embrión y el ancho de dicho dominio en hemisecciones de gástrulas tempranas, respectivamente. La elongación del cordamesodermo se evaluó como el largo del dominio de expresión de *not* sobre el diámetro total del embrión (Ewald, 2004).

3.1. Videos de gastrulación en vivo

Para registrar la gastrulación en embriones vivos, se colocaron embriones en estadio de blástula tardía (St. 9) en una cámara con 0,1X MMR que consistía en un soporte acrílico adherido a un cubreobjetos y una red (para inmovilizar los embriones). Se registró la gastrulación por aproximadamente 13 horas (a 18°C). Se adquirieron imágenes cada 3 minutos con una cámara Imaging Source SMK 23G445 acoplada a una lupa Zeiss Axiovert S 100. Los videos resultantes fueron editados con el software *ImageJ* (<https://fiji.sc/>).

3.m. Microscopía de fluorescencia *light-sheet*

La adquisición, procesamiento y análisis de las imágenes obtenidas con microscopía de fluorescencia *light-sheet* se realizaron en colaboración con el grupo de investigación del Dr. Hernán Grecco (IFIBA-UBA-CONICET).

3.m.a. Microinyección de los embriones

Para poder visualizar núcleos celulares y realizar el seguimiento de células individuales, se utilizó la expresión de la histona H2B fusionada a la proteína verde fluorescente (*H2B-eGFP*) en embriones tempranos de *Xenopus*. Embriones de 4-células

fueron inyectados en las dos blastómeras dorsales con 500 pg del ARNm *H2B-eGFP* solo (grupo control) o junto con *fry*-MO, tal como se describe en la *Sección 3.f*. Los embriones fueron mantenidos en oscuridad hasta el momento del montaje.

3.m.b. Montaje de los embriones

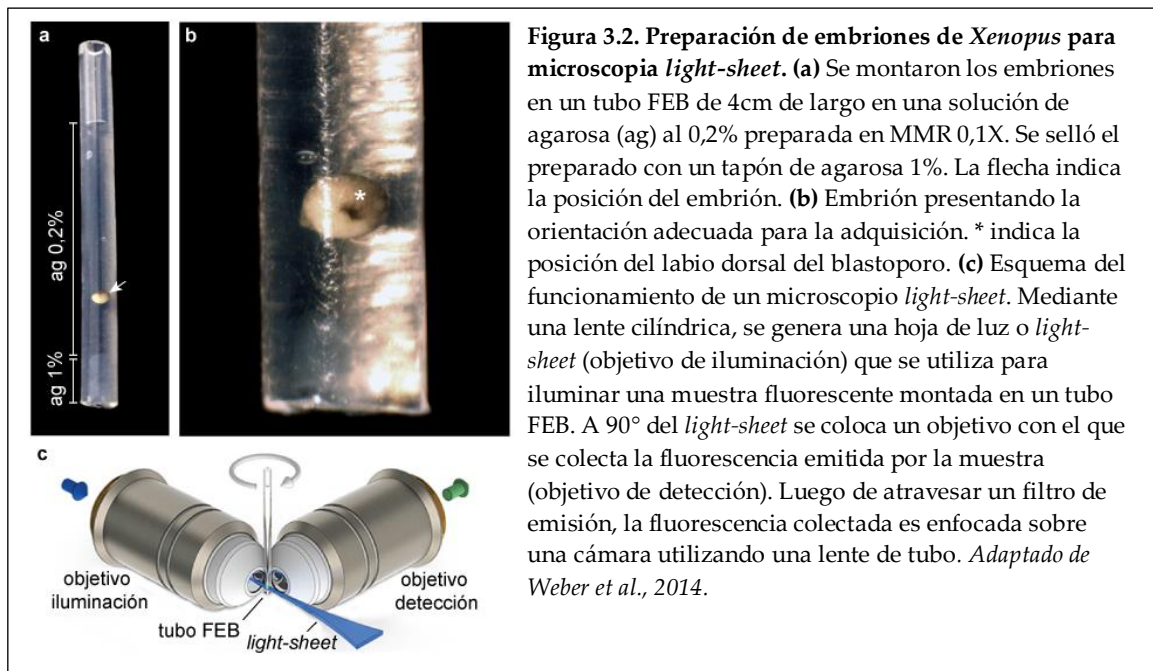
Una vez alcanzado el estadio de blástula tardía (St. 9), los embriones fueron transferidos a una solución de 0.2% agarosa (Biodynamics) preparada en 0.1X MMR precalentada a 22°C (los embriones de *Xenopus* se desarrollan normalmente en este medio). Se montaron los embriones en tubos FEP (fluorinated ethylene-propylene) de 4 cm de largo (Rotilabo, diámetro interno: 1,58 mm, diámetro externo: 3,18 mm) con ayuda de una aguja y jeringa como se describe en (Kaufmann et al., 2012; Weber et al., 2014). Los tubos FEP están compuestos por un polímero con índice de refracción similar al del agua, medio de inmersión en el cual se realizó la adquisición. Los tubos fueron sellados con un “tapón” de 1% agarosa sólida y mantenidos en posición vertical (*Figura 3.2.a*). Se observaron los embriones periódicamente bajo lupa hasta la formación del LDB. Dado que no es posible predecir en qué posición de la zona marginal van a comenzar los movimientos gastrulatorios, de todos los embriones montados muy pocos presentaban la orientación adecuada para realizar las mediciones (*Figura 3.2.b*). Una vez seleccionados, los embriones se ubicaron en el microscopio con el LDB frente al objetivo de detección. El extremo superior del tubo fue encastrado a una pieza soporte que se conecta al motor de pasos del microscopio. Debido a que solo se pudo registrar un embrión por experimento, cada medición corresponde a un experimento independiente.

3.m.c. Adquisición y procesamiento de las imágenes

Las imágenes fueron adquiridas con un microscopio de fluorescencia *light-sheet* construido por el Dr. Bruno Moretti en el laboratorio del Dr. Grecco (*Figura 3.2.c*) (Moretti et al., 2020). En este microscopio, el láser atraviesa una lente cilíndrica para generar un plano de luz estático Gausiano (*light-sheet*), que es enfocado sobre la muestra utilizando un objetivo de iluminación (Olympus UMPLFLN 10XW, 0.3 NA). El *light-sheet* resultante tiene un espesor aproximado de 5 μm sobre un campo visual de alrededor de un 1 mm x 1 mm. La fluorescencia emitida por la muestra fue colectada

utilizando un objetivo de detección (Olympus UMPLFLN 20XW, 0.5 NA) en posición ortogonal al de iluminación. Esta fluorescencia es enfocada en el sensor de una cámara CMOS (Andor Zyla) mediante una lente de tubo. Se escanearon las muestras usando un motor de pasos y todo el microscopio se controló mediante una interfaz gráfica desarrollada en el software *Phyton*.

Se adquirieron *stacks* tridimensionales de los embriones durante tres horas a partir de la formación del LDB, barriendo una profundidad total de 400-600 μm (imágenes con distancia axial de 5 μm) cada tres minutos (aproximadamente 60 *frames*). Se realizaron proyecciones de intensidad máxima de dichos *stacks*, a partir de los cuales se segmentaron los núcleos celulares y se siguieron temporalmente (*tracking*) utilizando el software *ilastik* (Haubold et al., 2016).



3.m.d. Análisis de las imágenes

El resultado del seguimiento o *tracking* de los núcleos celulares fue analizado con algoritmos de *Phyton.3* diseñados por el Dr. Moretti. A partir de estos datos, se calculó la velocidad instantánea y la persistencia de trayectoria de dichas células. Para cada célula i , se definió la velocidad instantánea v_i como $v_i = \Delta r_i / \Delta t$, donde Δr_i es el desplazamiento espacial entre dos puntos temporales consecutivos y Δt es el intervalo de tiempo entre dos *frames* consecutivos (3 minutos). Adicionalmente, se descompuso

la velocidad instantánea en sus componentes paralela y perpendicular al LDB. Para ello, se estimó la posición del LDB de manera semi-manual con un algoritmo que, cada cierta cantidad de tiempo, permite seleccionar manualmente diez puntos a lo largo del LDB sobre la imagen y aproxima la posición del LDB por el conjunto de segmentos que unen a estos puntos. Para obtener una medida de distancia entre una célula i y el LDB en un determinado tiempo t , se calcula cuál de los segmentos que definen al LDB minimiza la distancia a dicha célula. Luego de definir un vector u en la dirección de este segmento, se descompone v_i en sus componentes paralela y perpendicular al LDB. Se calculó la persistencia de trayectoria de las células que se mueven hacia el LDB como el cociente entre la distancia lineal recorrida por una célula y la longitud total de la trayectoria recorrida (Matthews et al., 2008). De esta forma, la persistencia da una idea de la direccionalidad del movimiento: aquellas células que se muevan con una trayectoria mayormente rectilínea presentarán una persistencia más cercana a 1, mientras que células con trayectorias más erráticas tendrán persistencias menores.

Por otro lado, se estudió la distribución espacial de los núcleos de las células superficiales de la ZMI a distintas distancias del LDB. Para ello, se desarrolló un método basado en triangulaciones de Delaunay para estimar la distancia entre una célula y sus primeras vecinas a partir de las posiciones de los núcleos celulares obtenidas en *ilastik*. Este análisis se realizó para las imágenes obtenidas a los 150 minutos desde el inicio de adquisición, que corresponde aproximadamente a un estadio de gástrula media (St. 11.5). Se usaron los núcleos como estimadores de la posición del centro celular. Una triangulación de Delaunay es una red de triángulos tal que la circunferencia circunscrita de cada triángulo de la red no contenga ningún vértice de otro triángulo. Se implementó una versión de este método presente en la librería *SciPy* de *Python*. Por un lado, se calculó la distancia euclidiana r_{ij} entre cada núcleo i y sus primeros vecinos j y luego el promedio r_i para cada célula. Por el otro, se calculó la distancia d_i entre cada núcleo i y el LDB. Una vez obtenidos los valores de r_i y d_i para todas las células segmentadas, se calculó el promedio de la distancia entre vecinos a distancia d del LDB. Para agrupar células según su distancia al LDB, se trazaron ventanas espaciales de 30 μm de ancho en dirección paralela al LDB que se solaparon entre sí por 5 μm . Estos valores fueron elegidos de forma tal que el número

de núcleos en cada ventana sea lo suficientemente grande para que la estadística sea robusta, y el solapamiento lo suficientemente chico para que los cambios en la distribución espacial sean apreciables.

3.n. Explantes de zona marginal dorsal

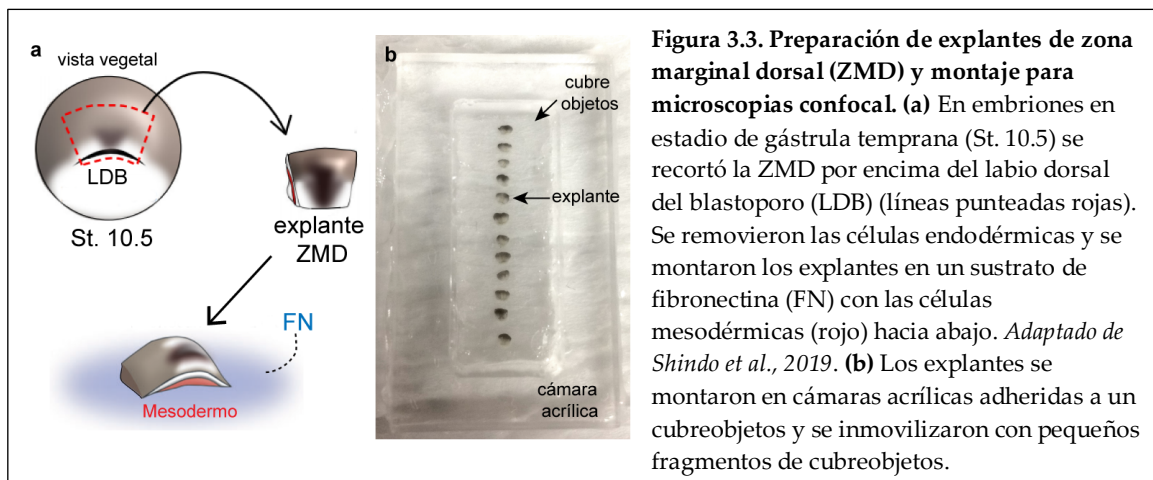
3.n.a. Medición de extensión convergente

Para este análisis, luego de la microinyección, los embriones en estadio de gástrula temprana (St. 10.5) fueron transferidos a una placa con 1X solución Barth modificada (MBS) (88 mM NaCl, 1 mM KCl, 5 mM HEPES, 2,5 mM NaHCO₃, 1 mM MgSO₄·7H₂O, 7 mM CaCl₂·2H₂O; pH 7.8). Se removieron las membranas vitelinas con fórceps y se realizaron explantes de ZMD utilizando “hair loops” y “eyelash knife” como herramientas siguiendo protocolos publicados (Feroze et al., 2015; Shawky et al., 2018). Brevemente, se orientaron los embriones con el polo vegetal hacia arriba y se realizaron dos cortes a los costados del LDB. Se realizó un tercer corte en el casquete animal uniendo los dos primeros y se aisló el explante del resto del embrión cortando por debajo de las células en botella. Se removieron las células vegetales de gran contenido de vitelo y se cortaron los bordes irregulares dando lugar a un explante rectangular. Seguidamente, se inmovilizaron los explantes con un cubreobjetos adherido a la placa con *vacuum grease* y se los cultivó en 1X MBS con gentamicina (24 µg/ml) hasta que embriones intactos co-cultivados alcanzaran el estadio de néurula (St. 19). Se cuantificó el porcentaje de elongación como fue descrito en (Wallingford et al., 2000) como medida de EC. Para ello, se midió el largo inicial y final de los explantes utilizando el software *ImageJ* (<https://fiji.sc/>) y se calculó su elongación como la diferencia entre el largo inicial y el largo final. Las mediciones fueron relativizadas a la elongación de los explantes provenientes de embriones no inyectados (considerada 100% de elongación).

3.n.b. Explantes para microscopía confocal

Los explantes de ZMD fueron preparados de manera similar que en la *Sección 3.n.a* pero se cultivaron en el medio Danilchik's for Amy (DFA) (53 mM NaCl, 5 mM Na₂CO₃, 4,5 mM gluconato de potasio, 32 mM gluconato de sodio, 1mM CaCl₂·2H₂O, 1 mM MgSO₄·7H₂O; pH 8.3) cuya composición iónica es similar a la del blastocele y por

lo tanto preserva mejor la integridad de las células del mesodermo dorsal. Se prepararon cámaras de acrílico adheridas a un cubreobjetos que fueron incubadas previamente con FN (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$, Sigma) a 4°C ON y lavadas en DFA antes del montaje de los explantes (Figura 3.3.a) (Zhou et al., 2010). Los explantes fueron montados en las cámaras llenas con DFA y gentamicina, e inmovilizados con un cubreobjetos (Figura 3.3.b). Se dejaron recuperar por al menos 40 minutos antes de adquirir imágenes en un microscopio confocal Leica Microsystem SP5 con un objetivo 40X. Los explantes utilizados para analizar la morfología celular y el ángulo de polaridad, se cultivaron hasta que embriones intactos co-cultivados alcanzaran el estadio de gástrula tardía (St. 13/14). Los análisis morfométricos se realizaron utilizando el software *ImageJ* (<https://fiji.sc/>) como fue descrito en (Feroze et al., 2015). Para ello, se dibujaron los perímetros de las células del mesodermo dorsal y se ajustaron a una elipsis. Se cuantificó el área celular y se obtuvo el “índice de Polaridad” como el cociente entre el eje mayor y el eje menor de las elipsis. Para obtener el “ángulo de polaridad” se midió el ángulo formado entre el eje mayor de la elipsis respecto al eje mediolateral (considerado 0°). Los resultados fueron volcados en gráficos de rosa polar empleando el software *Phyton.3*.



3.n.c Explantes de mesodermo precordial presuntivo

Posterior a la microinyección, se prepararon explantes de MPP a partir de embriones en estadio de gástrula temprana (St. 10-10.25). Se removió la ZMD de manera similar a lo descrito en la *Sección 3.n.a* y se recortaron pequeños explantes de células del MPP (capa interna de la ZMD por encima del LDB). Los explantes fueron

cultivados en las mismas cámaras y condiciones que se indican en la *Sección 3.n.b*, e incubados durante 1 hora para permitir su cicatrización y adhesión al sustrato de FN. Se adquirieron imágenes con un microscopio Olympus IX-81 (objetivo 20X), acoplado a una cámara CCD (Roper Scientific) luego de 1 hora (condición inicial) y de 6 horas (condición final) de su preparación. Se evaluó el comportamiento migratorio de las células del MPP como la mayor distancia recorrida por una célula del explante utilizado el software (<https://fiji.sc/>) como fue descrito en (Nie and Chang, 2007).

3.o. Ensayos de separación de tejidos

Los ensayos de separación de tejidos fueron llevados a cabo según el protocolo descrito en (Wacker et al., 2000). Posterior a la microinyección, los embriones en estadio de gástrula temprana (St. 10) fueron transferidos a una placa con solución 1X MBS y sus membranas vitelinas removidas con fórceps. Se disecaron pequeños agregados de MPP (capa interna del explante de DMZ) y de la CPE (capa interna del casquete animal). Se obtuvo un solo agregado por embrión. Por otro lado, se realizaron explantes de casquete animal a partir de embriones no inyectados (TBC *naive*) y se colocaron con las células profundas del ectodermo hacia arriba. Se montaron los pequeños agregados sobre el casquete animal (3 agregados de mesodermo y uno de ectodermo por casquete animal) y se inmovilizaron con un cubre objetos y *vacuum grease*. En la *Figura 5.8* de los Resultados se encuentra un esquema mostrando la preparación de los explantes. Con el fin de evaluar el comportamiento de separación de tejidos, se adquirieron imágenes de cada preparado inmediatamente después del montaje ($t = 0$) y luego de 45 minutos. Se cuantificó el porcentaje de agregados que presentaron separación de tejidos como el número de agregados que permanecieron en la superficie del casquete animal a los 45 minutos, sobre el número total de agregados.

3.p. Análisis estadísticos

Con el fin de detectar diferencias significativas en los resultados obtenidos para los distintos grupos experimentales, se utilizaron los siguientes análisis estadísticos: *Test-U de Mann Whitney de los colas* (** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$) (*Figuras 5.2, 5.4.b,f-h, 5.7,*

5.8, 5.9, 5.10, 5.12.e-f), *Test de Kruskal-Wallis* seguido por el contraste post-hoc entre grupos *Test de Dunn* (** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$) (Figuras 5.1, 5.5, 5.11, 6.4, 6.5), *Test de Chi-cuadrado* (** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$) (Figuras 4.5, 4.6, 5.4.c-d, 5.12.c-d, 6.2, 6.3, 6.7, 6.8 y Tabla 6.1).

Los valores fueron expresados como la media \pm el desvío o el error estándar de la muestra. El número de experimentos independientes (N) y el número de embriones (n) se detalla en los epígrafes de las figuras correspondientes. Los cálculos estadísticos y los gráficos de los resultados se realizaron utilizando el software *Prism6*, *GraphPad*.

Capítulo I

Expresión temprana y pérdida de función de Fry

4.a. Expresión materna de *fry*

En *Xenopus laevis*, el ARNm de *fry* fue detectado por RT-PCR y *ARN-seq* en oocitos no fecundados y en embriones en los estadios de clivaje previos a la TBM, demostrando que Fry es un gen de expresión materna (*Figura 3.1.a*) (Goto et al., 2010; Session et al., 2016). Dado que la mayoría de los genes maternos contribuyen a la especificación de las capas germinales y al establecimiento de los ejes embrionarios (Houston, 2012), decidimos estudiar la distribución espacial de los transcritos de *fry* por HIS en la oogénesis y en los primeros estadios del desarrollo embrionario.

4.a.a. Distribución espacial de los transcritos de *fry* durante el crecimiento de los oocitos

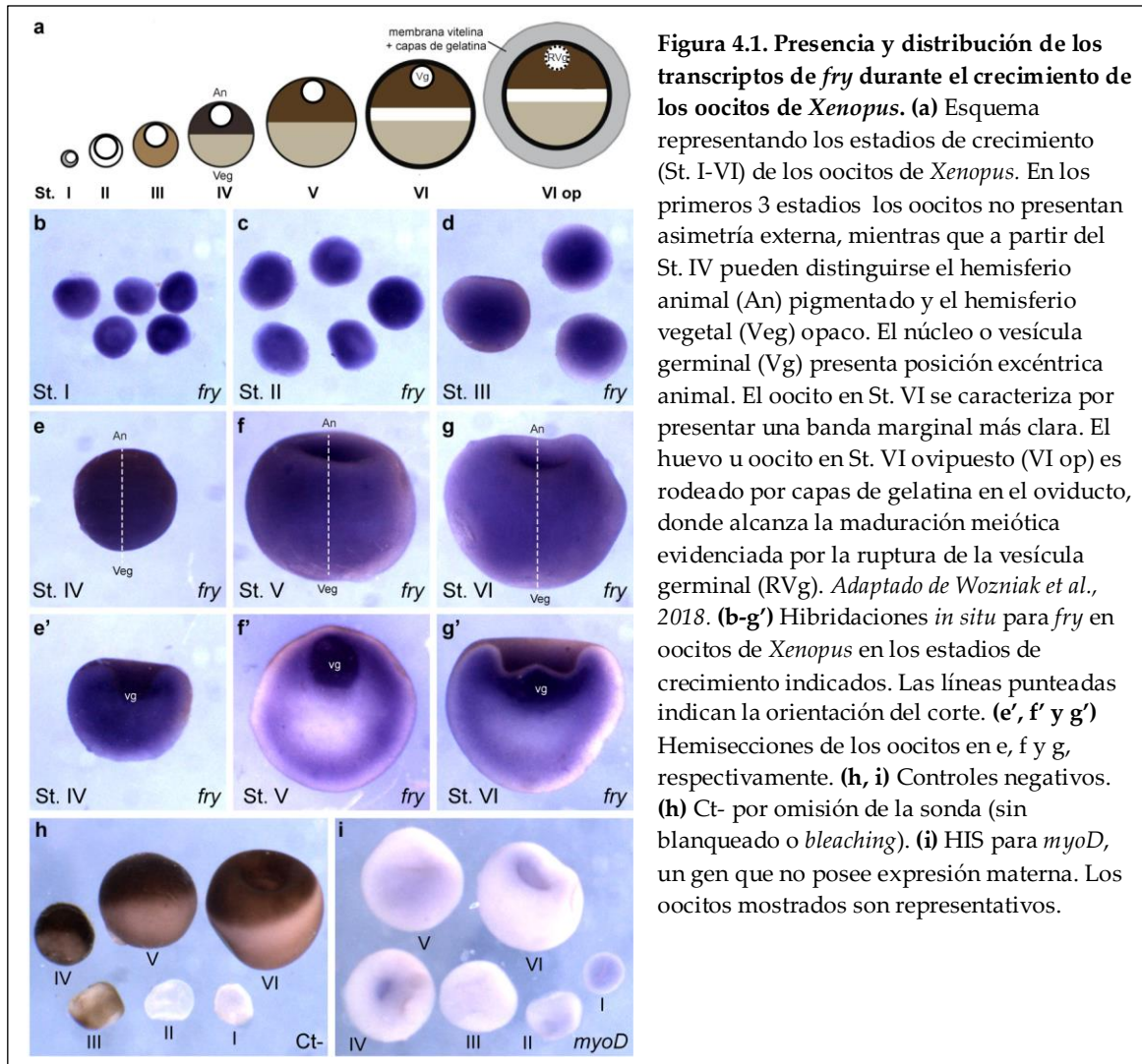
El proceso de crecimiento de los oocitos en *Xenopus* se divide en seis *estadios de crecimiento* consecutivos y distinguibles entre sí por el tamaño y las características morfológicas externas que los mismos adoptan (*Figura 4.1.a*) (Dumont, 1972). En el estadio 1 (St. I) (50–300 μm), el oocito es translúcido y no presenta signos de polaridad externa. A partir del estadio 2 (St. II) (300–450 μm) se inicia el proceso de vitelogénesis y los oocitos se vuelven opacos. El oocito en el estadio 3 (St. III) (450–600 μm) comienza a presentar melanosomas distribuidos homogéneamente. En los últimos estadios (St. IV–VI) (600–1250 μm), los oocitos adquieren su simetría radial final, con polaridad a lo

largo del eje animal-vegetal. El hemisferio animal es marrón oscuro debido a la presencia de gránulos corticales de melanina y contiene al núcleo o vesícula germinal; mientras que el hemisferio vegetal es claro y opaco debido a su composición preponderante de plaquetas vitelinas (*Figura 4.1.a*) (Dumont, 1972).

En la mayoría de los animales, la compartimentalización de ARNm en regiones subcelulares del huevo es fundamental para el establecimiento de las capas germinales y los ejes embrionarios (King et al., 2005). Aunque el oocito de *Xenopus* es radialmente simétrico, contiene distintas poblaciones de ARNs maternos que se localizan en el polo animal y/o vegetal (Kloc et al., 2001). Con el fin de investigar la distribución del ARNm de *fry* en oocitos, realizamos HIS en todos los estadios de crecimiento, detectando la presencia de los transcritos a partir del St. I (*Figura 4.1.b-g'*). Externamente, *fry* parece estar distribuido homogéneamente en los oocitos, tanto en el hemisferio animal como en el hemisferio vegetal. Hemisecciones de oocitos en los St. IV-VI revelaron que los ARNm de *fry* se ubican preferentemente en la periferia celular y alrededor de la vesícula germinal (*Figura 4.1.e',f',g'*). Es probable que esta localización se deba a la exclusión de los transcritos a zonas que contienen una menor cantidad de plaquetas vitelinas.

Para verificar que nuestras observaciones no fueran el resultado de hibridaciones inespecíficas, realizamos dos controles negativos (Ct-): uno omitiendo la incubación con la sonda de *fry*; y el otro empleando una sonda para revelar la presencia del ARNm del gen *myogenic differentiation 1*, *myoD*, que no posee expresión materna (Hopwood et al., 1989). En ninguno de estos controles se observó la presencia de tinción violeta (*Figura 4.1.h,i*).

En conclusión, nuestros resultados indican que los transcritos de *fry* no presentan distribución asimétrica en los oocitos alojados en el ovario. Probablemente, los ARNm de *fry* difundan pasivamente desde la vesícula germinal, de ubicación animal, hacia el hemisferio vegetal, resultando en una distribución homogénea en el oocito en crecimiento (Sidova et al., 2015).



4.a.b. Distribución espacial del ARNm de *fry* en oocitos maduros y embriones en los primeros estadios de desarrollo

Durante el período de crecimiento de los oocitos, la meiosis se detiene en diplotene de la profase I. El arresto meiótico es rescatado por la presencia de hormonas sexuales, a las que solo los oocitos en St. V y VI tienen la capacidad de responder. En anfibios, la hormona luteinizante (LH) promueve la liberación del oocito hacia el celoma, donde es conducido hacia el oviducto (ovulación). La LH actúa sobre las células foliculares que rodean a los oocitos, estimulando la liberación local de progesterona que desencadena la maduración meiótica. De este modo, el oocito en St. VI avanza hasta la metafase II al ser ovipuesto. Como resultado de la maduración meiótica, los oocitos ovipuestos presentan un punto claro en el polo animal que corresponde a la degradación de la vesícula germinal (Figura 4.1.a) (Jesus et al., 2020).

Al analizar la localización de *fry* en oocitos en St. VI ovipuestos (VI op, huevos no fecundados), observamos un enriquecimiento de los transcritos en el hemisferio animal (*Figura 4.2.a,a'*). Esta distribución polarizada se mantiene durante los estadios de segmentación y el estadio de TBM (*Figura 4.2.b-d'*). En cortes histológicos de embriones en estadio de 4 y 8-células, puede apreciarse con más detalle la presencia de *fry* exclusivamente en el hemisferio animal (*Figura 4.2.c'',d''*). En coincidencia con estos resultados, se identificó al ARNm de *fry* como un ARN materno enriquecido en el hemisferio animal mediante la técnica de *TOMO-RNAseq* en huevos no fecundados (Sindelka et al., 2018). Asimismo, detectamos la presencia de transcritos de *fry* en las blastómeras que darán origen tanto a los tejidos dorsales como ventrales del embrión (*Figura 4.2.c*). Identificamos las blastómeras como dorsales o ventrales según su tamaño y pigmentación. Si bien parecería existir un gradiente creciente de abundancia de *fry* hacia el futuro lado dorsal, evaluar una posible distribución asimétrica de *fry* a lo largo del eje dorso-ventral requerirá de análisis adicionales.

En conjunto, estos resultados indican que durante el proceso de maduración meiótica, el ARNm de *fry* se enriquece en el hemisferio animal del oocito y dicha distribución asimétrica se mantiene durante los estadios embrionarios de clivaje y TBM. Comprender la relevancia funcional de esta distribución requerirá de más estudios y podría proporcionar información valiosa sobre la relación entre los mecanismos que regulan la asimetría durante la ovogénesis y el establecimiento de asimetrías en el embrión.

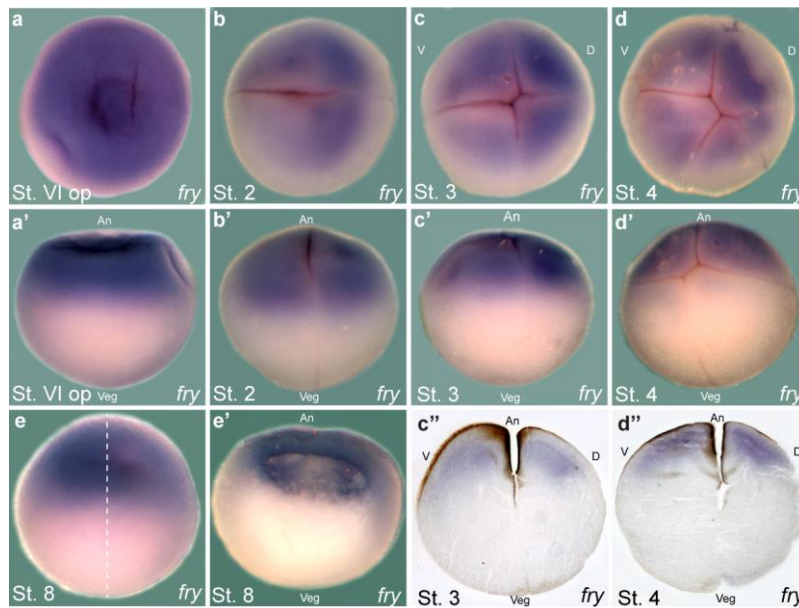


Figura 4.2. Localización de los transcritos de *fry* en oocitos y en los primeros estadios embrionarios de *Xenopus*. Hibridaciones *in situ* para *fry*. (a y a') Oocito en St. VI ovipuestos (St. VI op). (b y b') Embrión en estadio de 2-células (St. 2). (c-c'') Embrión en estadio de 4-células (St. 3). (c'') Corte histológico de un embrión en estadio de 4-células. (d-d'') Embrión en estadio de 8-células (St. 4). (d'') Corte histológico de un embrión en estadio de 8-células. (e) Embrión en estadio de transición de blástula media (TBM) (St. 8). (e') Hemisección de un embrión en estadio de TBM. (a, b, c, d) vistas animales. (a', b', c', d', e) vistas laterales, animal (An) hacia arriba, vegetal (Veg) hacia abajo. D: dorsal; V: ventral. Las líneas punteadas blancas indican la orientación de los cortes. Los embriones mostrados son representativos.

4.b. Expresión y distribución espacial del ARNm de *fry* durante la gastrulación

Durante los primeros estadios del desarrollo y hasta que el embrión alcanza el estadio de blástula tardía, los niveles del ARNm de *fry* detectados por RT-PCR son similares a los del oocito ovipuesto. Posteriormente, el enriquecimiento relativo de los transcritos disminuye durante la gastrulación y aumenta gradualmente en estadios de neurula y brote caudal (Goto et al., 2010). Este perfil de expresión se condice con el obtenido mediante *ARN-seq data* (Figura 3.1.a) (Session et al., 2016). Mediante estudios complementarios de HIS, determinamos que en embriones de *Xenopus*, *fry* se expresa en el mesodermo involutivo de la gástrula temprana. Al comienzo de la neurulación, los transcritos de *fry* están presentes en el mesodermo presomítico, en la notocorda, en una región del mesodermo de la placa lateral y en el mesodermo intermedio. En estadios de brote caudal, *fry* se expresa en somitos, notocorda, corazón, ojo, cerebro y el anlage del riñón (Figura 1.7) (Espiritu et al., 2018).

En este trabajo decidimos investigar en detalle el patrón de expresión de *fry* durante gastrulación de *Xenopus*, ya que en esta etapa del desarrollo embrionario se establece el plan corporal básico y que la pérdida de función de Fry en blastómeras dorsales produce alteraciones en el desarrollo del eje axial y estructuras anteriores (Goto et al., 2010). Observamos que el dominio de expresión de *fry* presente exclusivamente en el hemisferio animal de la blástula, se expande hacia la zona marginal de la gástrula temprana (Figura 4.3.a,a'). Esta región, que dará origen al tejido mesodérmico del embrión, es fundamental para el inicio de los movimientos gastrulatorios. La presencia de *fry* en la ZMD y en la zona marginal ventral es congruente con los resultados de RT-PCR (Goto et al., 2010). Dentro de la ZMD, *fry* está presente en los tejidos que no involucionan y en la zona marginal que involuciona (ZMI), tanto en las células internas (que ya involucionaron) como en las células superficiales (Figura 4.3.a'). Además, en la región animal, *fry* se expresa principalmente en la capa profunda del ectodermo (CPE) que está en contacto con el blastocele (Figura 4.3.a').

En la gástrula tardía, los transcritos de *fry* son detectados en tejidos dorsales (Figura 4.3.b). Cortes histológicos confirman la presencia de *fry* en el mesodermo axial, como así también en los dominios del mesodermo paraxial, lateral y ventral (Figura 4.3.b',b''). Adicionalmente, *fry* se expresa en las células endodérmicas que tapizan el techo del arquenterón (TAR) derivadas de la ZMI superficial (Barresi and Gilbert, 2019), en el endodermo cefálico presuntivo, en el mesodermo precordial presuntivo (MPP) y en el neuroectodermo (Figura 4.3.b',b''). Al final de la gastrulación, *fry* está presente a lo largo del eje axial de la néurula, principalmente en la región dorsal, distinguiéndose su expresión en los pliegues neurales anteriores (Figura 4.3.c,c'). Consistente con lo observado en estadios más tempranos, al inicio de la neurulación, el dominio de expresión de *fry* persiste en la notocorda, en los somitos, en el mesodermo lateral y ventral, como así también en el neuroectodermo, el TAR y la CPE (Figura 4.3.c'').

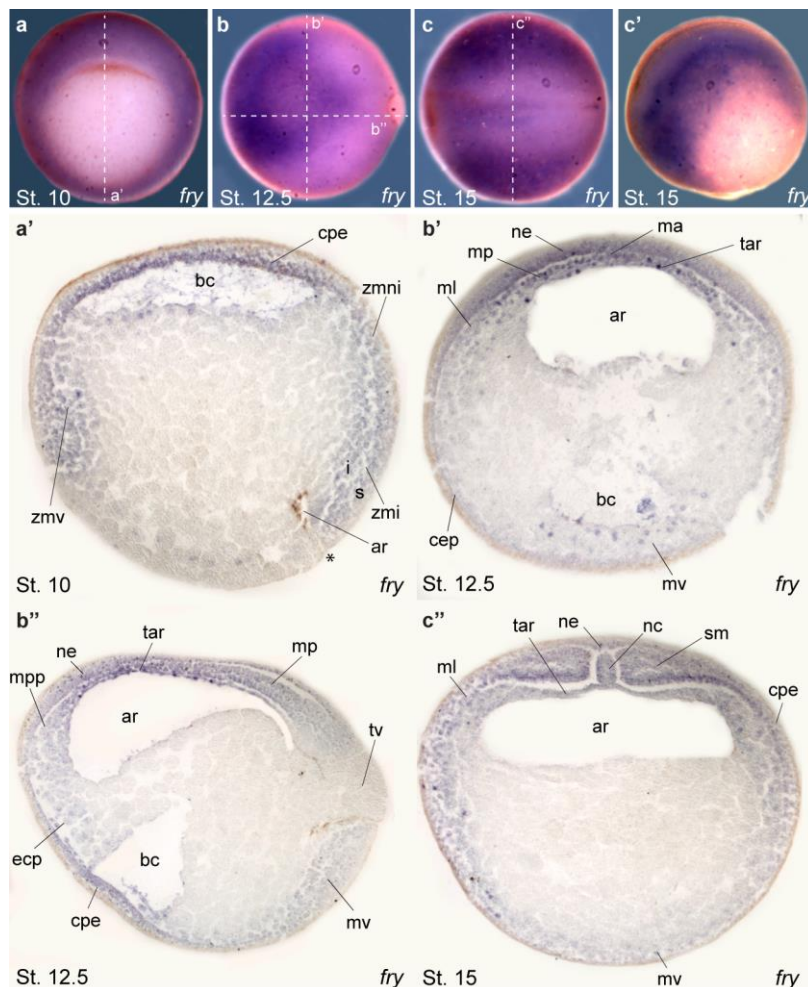


Figura 4.3. Dominios de expresión de *fry* durante la gastrulación. Hibridaciones *in situ* para *fry* en embriones de *Xenopus* en (a,a') estadio de gástrula temprana (St. 10.5); (b-b') estadio de gástrula tardía (St. 12.5); (c-c'') estadio de néurula temprana (St. 15). (a) Vista vegetal, dorsal hacia arriba. (b y c) Vista dorsal, anterior a la izquierda. (c') vista lateral, dorsal hacia arriba, anterior hacia la izquierda. Las líneas punteadas indican el plano de corte de los preparatos histológicos. (a', b', b'', c'') Preparados histológicos. (a') Animal hacia arriba; zmv: zona marginal ventral; bc: blastocele; cpe: capa profunda del ectodermo; zzni: zona marginal que no involucre; zmi: zona marginal que involucra; i: interna; s: superficial; ar: arquenterón. * indica posición del LDB. (b') Corte transversal, dorsal hacia arriba; ml: mesodermo lateral; ma: mesodermo axial; mp: mesodermo paraxial; tar: techo del arquenterón; mv: mesodermo ventral. (b'') Corte parasagital, dorsal hacia arriba, anterior hacia la izquierda; mpp: mesodermo precordial presuntivo; ecp: endodermo cefálico presuntivo; tv: tapón vitelino; ne: neuroectodermo. (c'') Corte transversal, dorsal hacia arriba; nc: notocorda; sm: mesodermo somático. Los embriones y cortes mostrados son representativos.

A partir de este análisis espacial de expresión en embriones, podemos concluir que durante la gastrulación de *Xenopus*, *fry* se expresa principalmente en dominios mesodérmicos que darán origen a los tejidos de la línea media dorsal (notocorda y somitos) y a órganos derivados del mesodermo ventral como el pronefros y el corazón. Este patrón de expresión es consistente con las funciones descritas de Fry en la especificación de tejidos mesodérmicos (Espiritu et al., 2018; Goto et al., 2010). Por otro

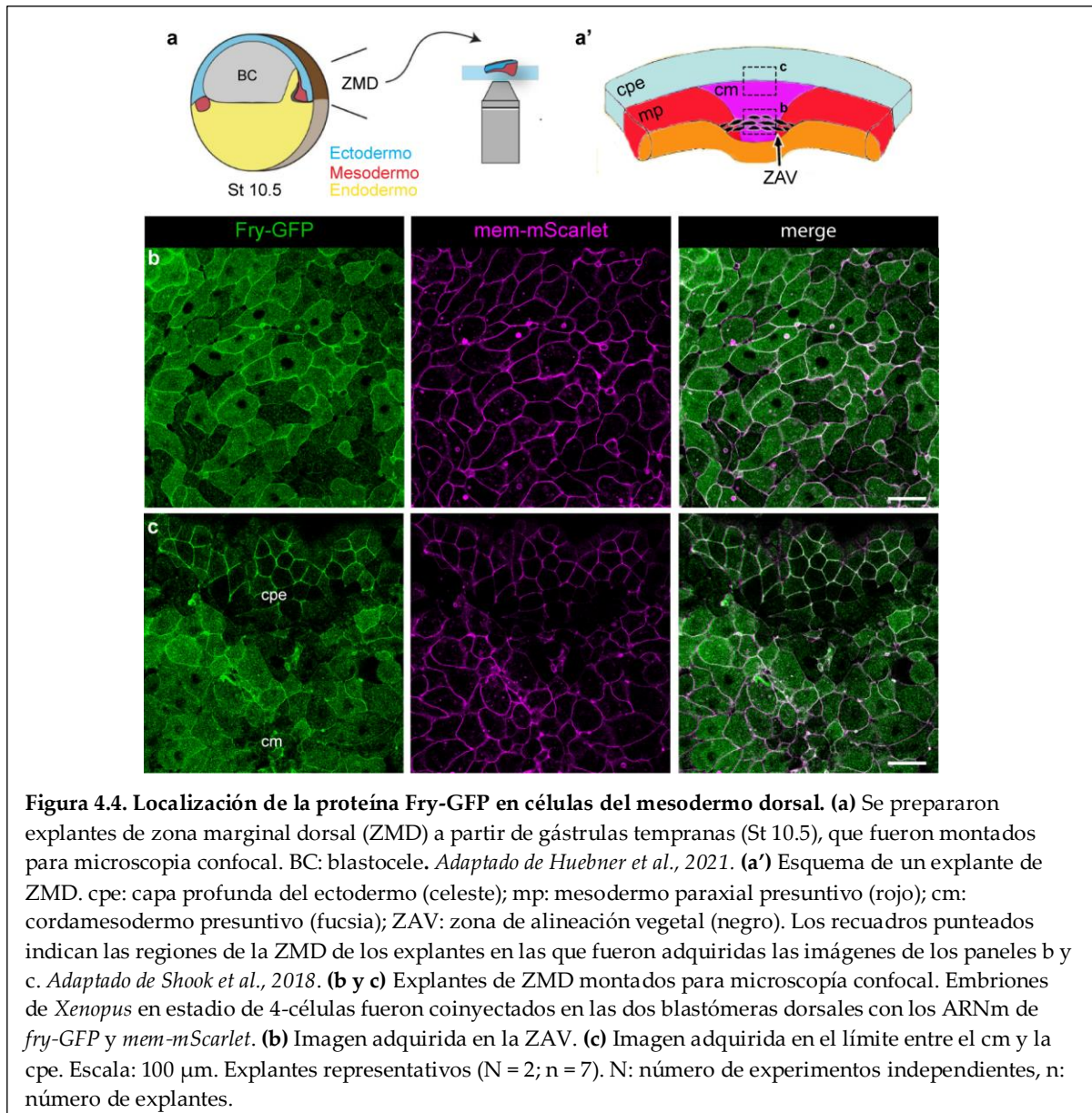
lado, nuestros resultados muestran la presencia de *fry* en tejidos de la gástrula que exhiben una gran variedad de comportamientos celulares morfogenéticos. En este sentido, el análisis del patrón de expresión apoya nuestra hipótesis de que la proteína Fry tiene un rol en morfogénesis durante la gastrulación de *Xenopus*.

4.c. Localización de Fry-GFP en células de la zona marginal dorsal

Nuestros resultados confirman que *fry* es un gen de expresión materna que se acumula en los oocitos desde etapas tempranas de la oogénesis, lo que sugiere una función de Fry en el desarrollo temprano de *Xenopus*. Sin embargo, se desconoce el momento del desarrollo en el cual comienzan a traducirse los transcritos. Análisis de proteómica detectaron la presencia de la proteína Fry.L en oocitos en St. VI ovipuestos y en el desarrollo temprano de *Xenopus*, siendo su abundancia progresivamente creciente a lo largo de la embriogénesis (*Figura 3.1.b*) (Peshkin et al., 2019). No obstante, dado que no hay anticuerpos específicos disponibles contra la proteína Fry de *Xenopus* y pese a nuestros esfuerzos de realizar IHQ e inmunofluorescencia utilizando un anticuerpo generado a partir de un epítipo de la proteína FRY humana, no logramos detectar la proteína Fry endógena para validar estos datos y conocer su distribución espacial.

Conocer en qué tejidos y órganos se expresa una proteína, como así también su localización subcelular, proporciona información sobre su función. Teniendo en cuenta que el ARNm de *fry* está presente en los tejidos dorsales de la gástrula (*Figura 4.3.a'*), decidimos investigar la localización subcelular de la proteína de fusión Fry-GFP en células de la ZMD que involucraron (capa interna) (*Figura 4.4.a*). Para ello, inyectamos el ARNm *fry-GFP* junto al ARNm *mem-scarlet* (para visualizar membranas celulares) en las blastómeras dorsales del embrión de 4-células en dosis que no afectaran el desarrollo embrionario. Al alcanzar el estadio de gástrula temprana, preparamos explantes de ZMD, que fueron montados para microscopía confocal sobre un sustrato de FN (*Sección 3.n.b, Figura 4.4.a*). En la *Figura 4.4.b* se muestra la imagen representativa de un explante en una región cercana al LDB, denominada *zona de alineación vegetal* (ZAV) (*Figura 4.4.a'*) (Shih and Keller, 1992). Puede apreciarse que la proteína Fry-GFP se localiza principalmente en el citoplasma y en la membrana

plasmática de las células mesodérmicas dorsales. Asimismo, Fry-GFP parecería quedar excluida del núcleo celular, aunque para confirmar esto se debería utilizar un trazador fluorescente nuclear. En la *Figura 4.4.c* pueden observarse células de la CPE, próximas a las células del mesodermo dorsal (*Figura 4.4.a'*), en las cuales Fry-GFP también se localiza en el citoplasma y en la membrana plasmática.



En el trabajo de (Goto et al., 2010) reportaron la presencia de la proteína Fry-GFP en el núcleo y citoplasma de células mesodérmicas aisladas de *Xenopus*. Esta aparente discrepancia con nuestros resultados podría estar relacionada con el contexto celular y la identidad de las células estudiadas. Goto et al., analizaron células mesodérmicas

dorsales aisladas de gástrulas tempranas (St. 10) de morfología redondeada, posiblemente correspondientes al MPP. En contraste, nuestras observaciones fueron realizadas en explantes de ZMD en estadio de gástrula media (St. 11-12), en los que las células mesodérmicas preservan su contexto tisular. Por lo tanto, es posible que la localización subcelular de Fry dependa de la identidad y del contexto de los tejidos de la gástrula.

4.d. La depleción de Fry genera defectos en la elongación del eje axial y el desarrollo de la cabeza.

Con el fin de estudiar el requerimiento de Fry en el desarrollo embrionario y en particular en la formación del eje axial, realizamos experimentos de pérdida de función en embriones de *Xenopus* empleando un oligonucleótido antisentido morfolino (MO). El mecanismo de acción de los MO se basa en la estabilidad del dúplex que forma con el ARNm diana, inhibiendo su traducción o *splicing* por impedimento estérico (Blitz et al., 2006; Heasman et al., 2000). El genoma de *Xenopus* cuenta con dos genes homeólogos de Fry (Fry.S y Fry.L), siendo Fry.L el que se expresa en mayor abundancia durante el desarrollo embrionario (*Figura 3.1.a*) (Session et al., 2016). El MO específico contra *fry* (*fry*-MO), previamente diseñado y validado (Goto et al., 2010), se une por complementariedad de bases a la región 5' del ARNm de *fry.L*, bloqueando la traducción del mismo. De acuerdo a la secuencia de Fry.S, *fry*-MO no tendría la capacidad de unirse con el ARNm de este homeólogo. Para realizar ensayos de pérdida de función de Fry dirigidos a las estructuras dorsales del tronco y la cabeza, microinyectamos ambas blastómeras dorsales del embrión de 4-células, y evaluamos el fenotipo en el estadio de brote caudal (*Figura 1.1.b*).

Similar a lo reportado por (Goto et al., 2010), observamos que la depleción dorsal de Fry genera un acortamiento del eje anteroposterior y una reducción del tamaño de las estructuras cefálicas (*Figura 4.5.d,e,h*). Clasificamos los embriones en tres categorías de acuerdo a la severidad del fenotipo: (1) "Normal", sin defectos en el desarrollo; (2) "Eje acortado", acortamiento de la longitud corporal ($\geq 20\%$ respecto de los embriones no inyectados) y reducción de estructuras cefálicas; y (3) "Eje acortado y sin cabeza", eje acortado y ausencia de glándula de cemento, vesículas ópticas y óticas (*Figura 4.5.c,d*).

El efecto de la depleción de Fry manifestó dosis-dependencia, tanto en la proporción de embriones afectados como en la severidad de los fenotipos (*Figura 4.5.h*). Teniendo en cuenta que el ~95% de los embriones inyectados con 15 ng de *fry*-MO presentan defectos en el desarrollo sin afectarse su viabilidad, ésta fue elegida como la dosis de trabajo para los experimentos de pérdida de función. Con el fin de verificar la especificidad del fenotipo de depleción, se utilizó un morfolino estandar control (St-MO) cuya secuencia no es complementaria con ARNm de *Xenopus*. Efectivamente, la inyección de St-MO en la dosis de trabajo no afecta considerablemente el desarrollo de los embriones (~10% de embriones afectados) (*Figura 4.5.c,h*).

Ha sido reportado previamente que la coinyección del ARNm de *fry full-length* (*fry*) junto con *fry*-MO, rescata la formación de la glándula de cemento y parcialmente la elongación del eje axial en el ~60% de los embriones (Goto et al., 2010). Teniendo en cuenta que los dominios FD y LZ de Fry son los únicos dominios funcionales reconocidos en la proteína de vertebrados (*Figura 1.6.a*) (Nagai and Mizuno, 2014) y que juntos son capaces de inducir la formación de un eje secundario de manera similar a *fry* (Goto et al., 2010), decidimos investigar su capacidad para rescatar el fenotipo de depleción. Utilizamos una versión quimérica más corta de Fry llamada FD+LZ, que solo posee la región N-terminal de Fry incluyendo el dominio FD y la región C-terminal incluyendo los motivos de cierre de leucinas y la estructura *coiled-coil* (dominio LZ) (*Figura 4.5.a*). Este ARNm no posee la secuencia de unión de *fry*-MO (Goto et al., 2010). La coinyección del ARNm FD+LZ redujo significativamente y en forma dosis-dependiente la proporción de embriones afectados y la severidad del fenotipo de depleción de Fry (*Figura 4.5.f,h*). Estos resultados demuestran que los dominios FD y LZ pueden compensar parcialmente la pérdida de función de Fry en el desarrollo del eje axial de *Xenopus*. En un trabajo previo de nuestro laboratorio, demostramos que FD+LZ rescata la expresión del marcador del primordio pronéfrico, *pax8*, en embriones con depleción ventral de Fry (Espiritu et al., 2018). Por lo tanto, nuestros resultados apuntan a que los dominios FD y LZ son fundamentales para la función de Fry durante el desarrollo, tanto para el desarrollo del riñón como para la elongación del eje axial y el desarrollo de la cabeza.

Curiosamente, la inyección dorsal del ARNm *FD+LZ* genera defectos en la elongación del eje axial e interfiere con el desarrollo de la cabeza de manera dosis-dependiente (*Figura 4.5.g,h*). En conjunto, estos resultados demuestran la importancia de la función de Fry en el desarrollo de tejidos dorsales de *Xenopus*.

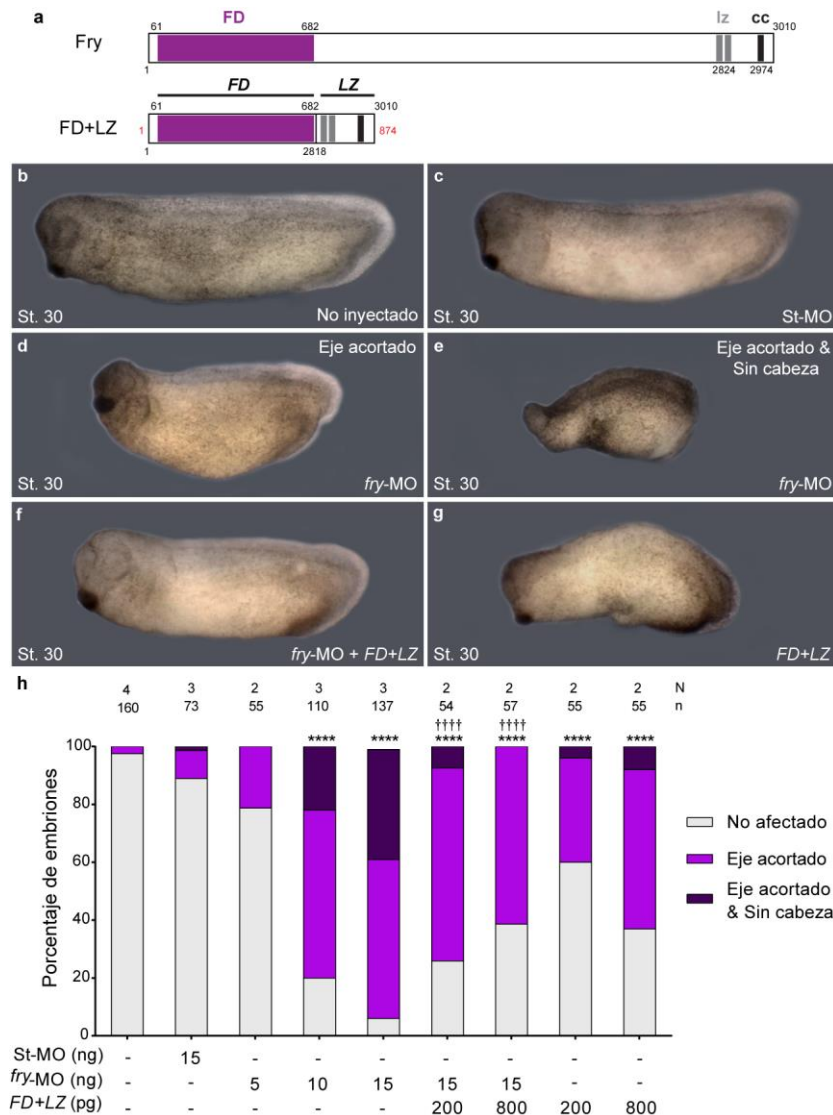


Figura 4.5. Ensayos de pérdida de función de Fry y experimentos de rescate. (a) Esquema representando a la proteína Fry *full-length* (arriba) y a la construcción FD+LZ (abajo). FD: dominio Furry (magenta); lz: dos motivos de cierre de leucinas (*leucine-zipper*, gris); cc: motivo *coiled-coil* (negro). La construcción FD+LZ consiste en la región N-terminal (dominio FD) y la región C-terminal de Fry (motivos lz y cc, dominio LZ). Se indican en negro el número de aminoácidos de la proteína Fry original y en rojo el número de aminoácidos de FD+LZ. (b-g) Embriones de *Xenopus* en estadio de 4-células fueron inyectados en las dos blastómeras dorsales y fijados en estadio de brote caudal (St. 30). (b) Embrión no inyectado. (c) Embrión inyectado con 15 ng de morfolino estándar control (St-MO). (d,e) Embriones inyectados con 15 ng de *fry*-MO con fenotipos “Eje acortado” o “Eje acortado & Sin cabeza”, respectivamente. (f) Experimento de rescate: embrión coinyectado con 15 ng de *fry*-MO + 800 pg del ARNm FD+LZ. (g) Embrión inyectado con 800 pg del ARNm FD+LZ. Se muestran embriones representativos. (h) Cuantificación del porcentaje de embriones que presentan los fenotipos: “No afectado”, “Eje acortado” o “Eje acortado & Sin cabeza”. N: número de experimentos independientes, n: número de embriones. En el gráfico se muestran las medias de cada grupo. Análisis estadístico: Test de *Chi-cuadrado* (****, +++++p < 0.0001). * representa la comparación con el grupo no inyectado y † representa la comparación con el grupo inyectado con *fry*-MO.

4.e. Fry regula el establecimiento del organizador dorsal de la gástrula

El desarrollo del eje anteroposterior es el resultado de la adquisición temprana de destinos celulares y del rearreglo espacial de las células durante la gastrulación. En este sentido, el organizador dorsal de la gástrula está conformado por un grupo heterogéneo de células con propiedades inductivas que dan origen al mesodermo axial y orquestan los movimientos gastrulatorios (De Robertis et al., 2000; Niehrs, 2004). El fenotipo de depleción dorsal de Fry sugiere la existencia de alteraciones en la inducción y/o migración de células que contribuyen a estructuras anteriores y axiales. Estudiamos el efecto de la pérdida de función de Fry sobre el establecimiento del organizador dorsal analizando, mediante HIS, la expresión de genes marcadores de las distintas subpoblaciones celulares en el estadio de gástrula temprana (*Figura 1.1.b*). Seleccionamos *orthodenticle homeobox 2 (otx2)* y *gooseoid (gsc)* como genes marcadores del MPP (Blitz and Cho, 1995; Cho et al., 1991), *chordin (chrd)* como gen marcador del mesodermo axial presuntivo (futuro mesodermo precordial y cordamesodermo) (Sasai et al., 1994), y *notochord homeobox (not)* como gen marcador del cordamesodermo presuntivo (von Dassow et al., 1993).

La depleción dorsal de Fry redujo el dominio de expresión de *otx2*, *gsc* y *chrd* en el 85%, 75% y 97% de los embriones, respectivamente (*Figura 4.6.a-c''*), mientras que no afectó el dominio de expresión de *not* (*Figura 4.6.d-d''*). El porcentaje de embriones afectados fue significativamente mayor en embriones *fry*-deplecionados respecto a los embriones de los grupos control (no inyectado y St-MO). Estos resultados indican que Fry modula la adquisición de destino celular en poblaciones específicas del organizador dorsal, particularmente en células del MPP.

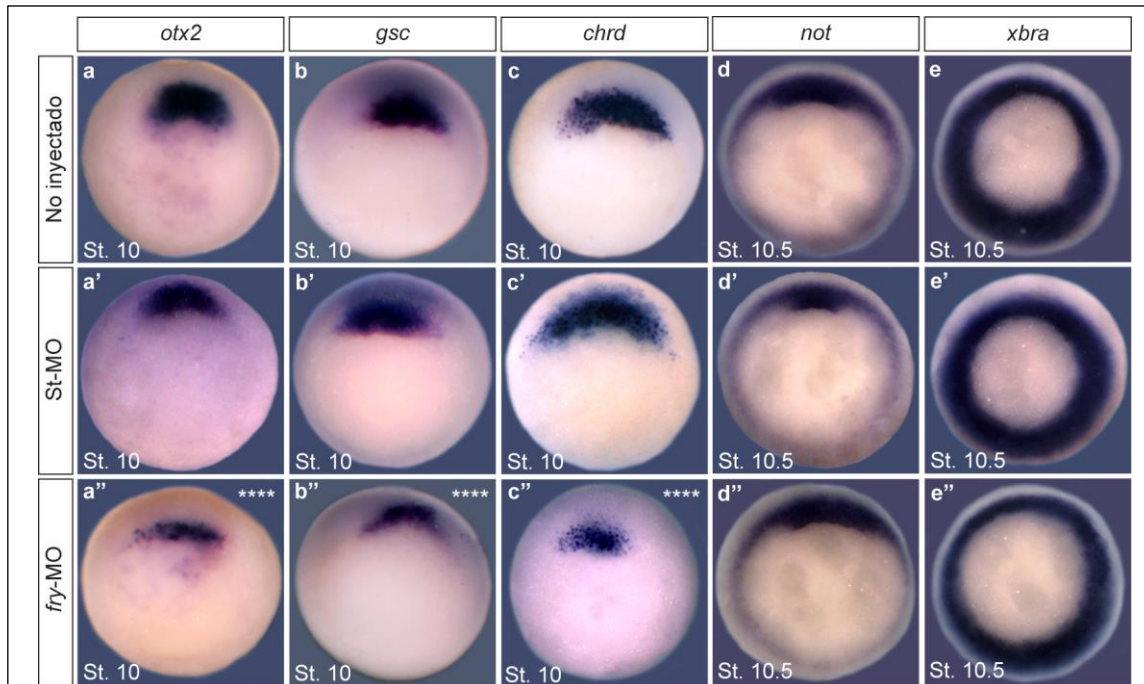
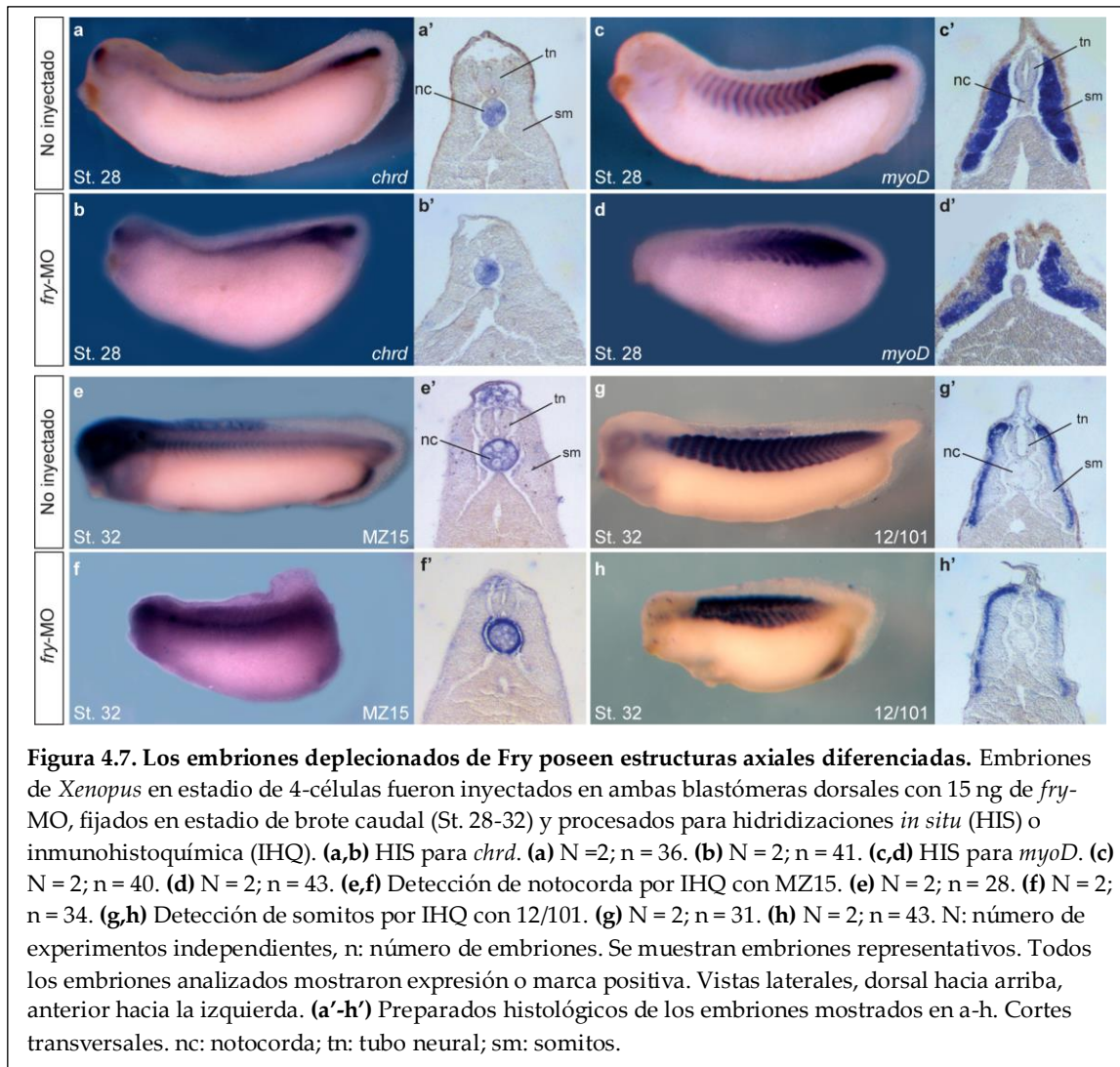


Figura 4.6. La depleción dorsal de Fry reduce el dominio de expresión de genes específicos del organizador de la gástrula pero no altera la inducción general del mesodermo. Embriones de *Xenopus* en estadio de 4-células fueron inyectados en ambas blastómeras dorsales con 15 ng de St-MO o *fry*-MO, fijados en el estadio de gástrula temprana (St. 10- 10.5) y procesados para hibridaciones *in situ*. (a-a'') Expresión del gen *otx2* en el mesodermo precordial presuntivo (mpp). (a) N = 2; n = 33. (a') N = 2; n = 33; 6% dominio reducido. (a'') N = 2; n = 26; 85% dominio reducido. (b-b'') Expresión del gen *gsc* en el mpp. (b) N = 3; n = 98. (b') N = 2; n = 34; 6% con dominio de expresión reducido. (b'') N = 3; n = 74; 78% dominio reducido. (c-c'') Expresión del gen *chrd* en el mesodermo axial presuntivo. (c) N = 5; n = 95. (c') N = 2; n = 34; 6% con dominio de expresión reducido. (c'') N = 5; n = 113; 97% con dominio reducido. (d-d'') Expresión del gen *not* en el cordamesodermo presuntivo. (d) N = 2; n = 52. (d') N = 2; n = 31. (d'') N = 2; n = 47. (e-e'') Expresión del marcador pan-mesodérmico *xbra*. (e) N = 3; n = 47. (e') N = 2; n = 31 (e'') N = 3; n = 53. N: número de experimentos independientes, n: número de embriones. Se muestran embriones representativos. Vistas vegetales, dorsal hacia arriba. Análisis estadístico: Test de *Chi-cuadrado* (***) $p < 0.0001$. * representan las comparaciones con el grupo no inyectado y el grupo inyectado con St-MO.

4.f. La función de Fry no es requerida para la inducción general del mesodermo

Al analizar el dominio de expresión del gen pan-mesodérmico *brachyury* (*xbra*) (Smith et al., 1991) en gástrulas tempranas, no observamos alteraciones en embriones *fry*-deplecionados, sugiriendo que Fry no afecta la especificación general del mesodermo (Figura 4.7.e-e''). En concordancia, embriones inyectados con *fry*-MO expresan el gen específico de diferenciación muscular *myoD* en los somitos (Hopwood et al., 1989) y *chrd* en la notocorda (Figura. 4.7.a- d') en estadio de brote caudal. Además, éstas estructuras axiales resultaron ser inmunoreactivas contra anticuerpos específicos

de diferenciación de notocorda y somitos (MZ15 y 12/101, respectivamente) (Figura 4.7.e-h'). Esto indica, que pese a las anomalías morfológicas observadas, la ausencia de Fry no altera severamente la diferenciación de la notocorda y los somitos. En conjunto, nuestros resultados sugieren que la función de Fry no es esencial para la inducción general del mesodermo o la diferenciación de tejidos axiales mesodérmicos.



4.g. Fry regula los movimientos gastrulatorios

Nuestros resultados indican que la pérdida de función dorsal de Fry afecta la especificación de algunas poblaciones del organizador dorsal de la gástrula (Figura 4.6). A la luz de estos resultados y teniendo en cuenta la importancia del organizador en el inicio y coordinación de los movimientos gastrulatorios, decidimos investigar posibles alteraciones asociadas a defectos migratorios que pudieran contribuir al fenotipo de

depleción de Fry. Como primera aproximación, analizamos el grado de cierre del blastoporo en gástrulas tardías y observamos que la mayoría de los embriones *fry*-deplecionados presentaron el blastoporo abierto (Figura 4.8.a'',b'',c'',e'',f''). Sin embargo, cuando analizamos embriones en estadios de néurula, la mayoría presentaba el blastoporo cerrado (Figura 4.8.d'',g''), sugiriendo que la depleción de Fry genera un retraso en el cierre del blastoporo.

Para estudiar si la pérdida de función de Fry altera la posición y/o el movimiento de los tejidos de la línea media dorsal, analizamos el patrón de expresión de genes marcadores del mesodermo dorsal durante la gastrulación. Consistente con nuestros resultados previos, en el estadio de gástrula tardía los dominios de expresión de *chrd* y *gsc* se observaron reducidos en el 85% y 92% de los embriones deplecionados de Fry, respectivamente. Además, la ausencia de Fry altera la ubicación espacial de dichos dominios en la mayoría de los embriones (Figura 4.8.a-b''). Durante la gastrulación, las células del MPP que expresan *gsc* migran desde el LDB hacia el polo animal, ubicándose en el futuro extremo anterior del embrión (Figura 1.3). Sin embargo, en embriones *fry*-deplecionados observamos que las células del MPP permanecen próximas al LDB, evidenciando defectos migratorios (Figura 4.8.a-a''). Por otro lado, las células del mesodermo axial que expresan *chrd* involucionan progresivamente sobre el LDB para luego converger medio-lateralmente y extenderse sobre el eje axial (Figuras 1.3 y 1.5.b). En contraste, la depleción dorsal de Fry provoca que las células del mesodermo axial no culminen su involución en el estadio de gástrula tardía, y que aquellas que ingresaron no converjan en la línea media. (Figura 4.8.b-b''). En concordancia, las células que expresan *xbra* y *not* también se ubican en forma anormal en gástrulas tardías *fry*-deplecionadas, mostrando dominios de expresión más parecidos a los de estadios más tempranos de la gastrulación (Figura 4.8.c-c'', e-e'').

Defectos en el cierre del blastoporo y alteraciones en los patrones de expresión de genes dorsales como los observados, pueden deberse a movimientos morfogénicos deficientes, o bien a retrasos en el desarrollo embrionario. Exactamente a finales de la gastrulación (St. 13.5), dos dominios neuroectodérmicos anteriores que darán origen a la epífisis, comienzan a expresar *not* (Gont et al., 1993). Al analizar la expresión de *not* en St. 13.5, verificamos la presencia de dichos dominios anteriores en embriones

control y embriones *fry*-deplecionados (Figura 4.8.f-f''). Esta evidencia indica que la pérdida de función de Fry no genera un retraso significativo en el desarrollo embrionario y refuerza nuestra hipótesis de que Fry está involucrada en la regulación de movimientos gastrulatorios. A la luz de estos resultados, decidimos caracterizar los defectos morfogénéticos asociados a la pérdida de la función de Fry.

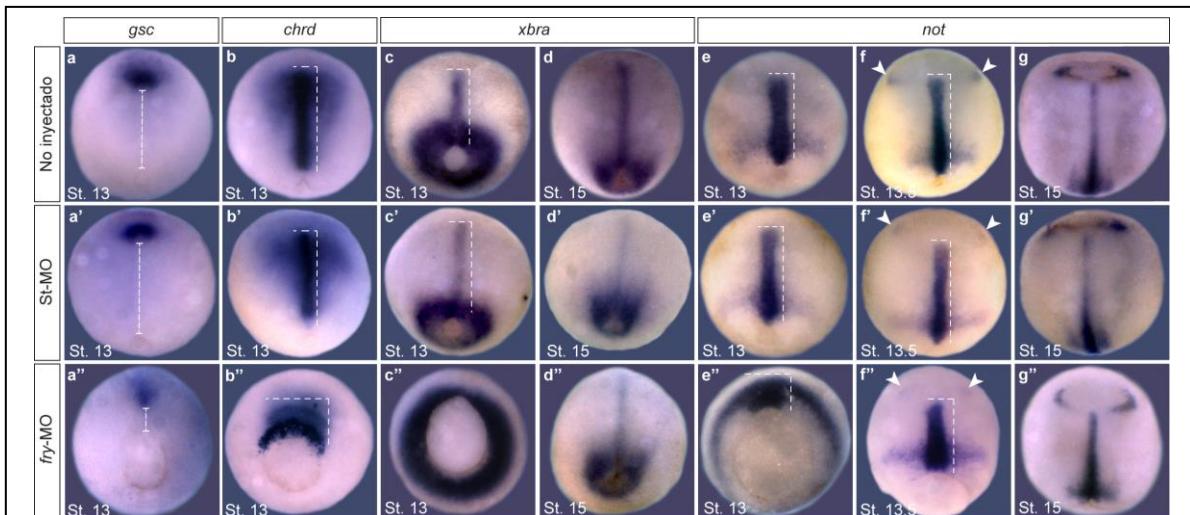


Figura 4.8. Los embriones deplecionados de Fry presentan defectos de gastrulación. Embriones de *Xenopus* en estadio de 4-células fueron inyectados en ambas blastómeras dorsales con 15 ng de St-MO o *fry*-MO, fijados en el estadio de gástrula o neurula (St. 13-15) y procesados para hibridaciones *in situ*. **(a-a'')** Expresión del gen *gsc* en el mesodermo precordial presuntivo (mpp). **(a)** N = 3; n = 60. **(a')** N = 2; n = 30; 10% dominio anormal **(a'')** N = 3; n = 62; 87% y 96% dominio reducido y anormal, respectivamente. La línea punteada indica la distancia entre el blastoporo y el mpp. **(b-b'')** Expresión del gen *chrd* en el mesodermo axial presuntivo. **(b)** N = 4; n = 128. **(b')** N = 2; n = 30, 10% dominio anormal. **(b'')** N = 4; n = 115, 92% y 95% dominio reducido y anormal, respectivamente. **(c-d'')** Expresión del marcador pan-mesodérmico *xbra*. **(c)** N = 2; n = 44. **(c')** N = 2; n = 28; 7% con dominio anormal. **(c'')** N = 2; n = 52; 98% con dominio anormal. **(d)** N = 3; n = 48. **(d')** N = 2; n = 33. **(d'')** N = 3; n = 45. **(e-g'')** Expresión del gen *not* en el cordamesodermo presuntivo y en el neuroectodermo anterior. **(e)** N = 3; n = 39. **(e')** N = 2; n = 27; 4% con dominio anormal. **(e'')** N = 3; n = 43; 100% con dominio anormal. **(f)** N = 2; n = 29. **(f')** N = 2; n = 24. **(f'')** N = 2; n = 32, 63% con dominio anormal. Las puntas de flecha indican la epífisis. **(g)** N = 3; n = 46. **(g')** N = 2; n = 28. **(g'')** N = 3; n = 59. Las líneas punteadas indican la elongación del cordamesodermo N: número de experimentos independientes, n: número de embriones. El estadio de los embriones inyectados se determinó en función a los embriones no inyectados de la misma camada. Se muestran embriones representativos. Vistas dorso-vegetales, anterior hacia arriba.

Capítulo II

La función de Fry en la gastrulación

5.a. La función de Fry es necesaria para el cierre normal del blastoporo

El cierre de blastoporo es un evento clave en la gastrulación de los anfibios y es un proceso complejo que requiere la coordinación de múltiples movimientos morfológicos (Keller et al., 2003). Para evaluar la progresión del cierre de blastoporo desde su formación en la gástrula temprana hasta su cierre al inicio de la neurulación (*Figura 1.4*), medimos el área del blastoporo en embriones fijados en diferentes estadios a lo largo de este proceso (*Figura 5.1.*). En congruencia con nuestras observaciones iniciales, a diferencia de lo que ocurre en embriones no inyectados, el blastoporo de la mayoría de los embriones *fry*-deplecionados permaneció abierto al final de la gastrulación (*Figura 5.1.a-f,i*). Sin embargo, la mayoría de los embriones lograron cerrar su blastoporo en el estadio de néurula, con excepción de un ~25% cuyos tapones vitelinos quedaron extruidos (*Figura 5.1.g-i*). Estos resultados apuntan a que la pérdida de función de Fry genera un retraso en el cierre del blastoporo. De manera similar al rescate fenotípico del eje axial en estadio de brote caudal (*Figura 4.3.f,h*), la coinyección del ARNm *FD+LZ* y *fry-MO* redujo significativamente el efecto de depleción de Fry sobre el cierre del blastoporo (*Figura 5.1.i*). Este rescate demuestra que el retraso en el cierre del blastoporo es causado por la pérdida de función de Fry y que los dominios FD y LZ de la proteína son importantes en este proceso.

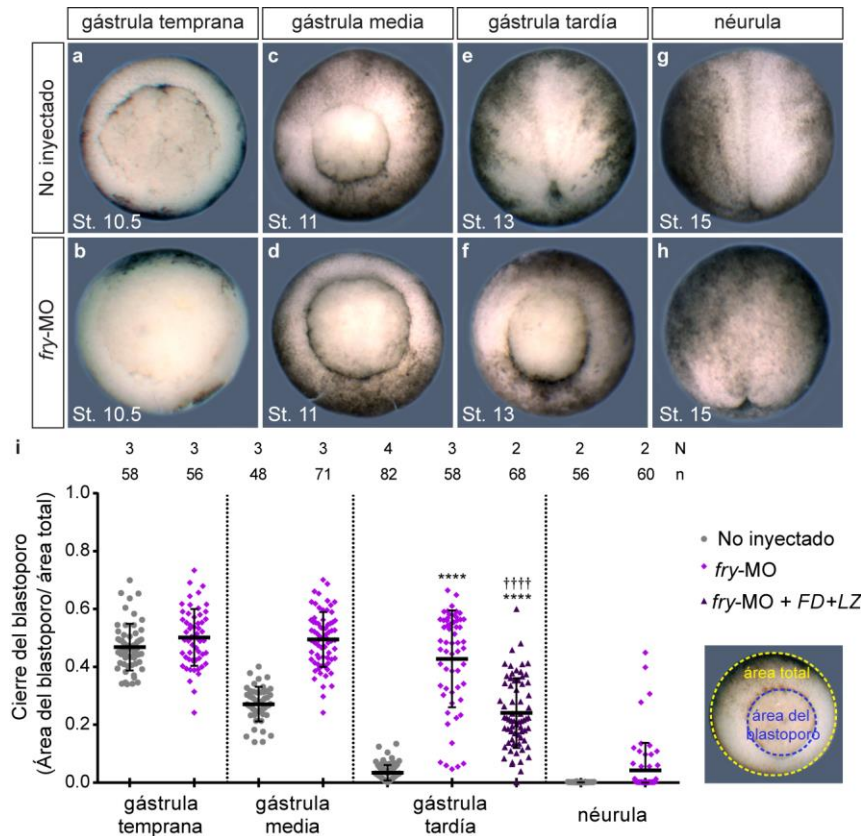
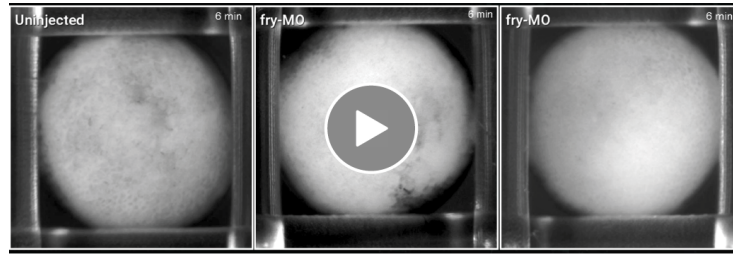


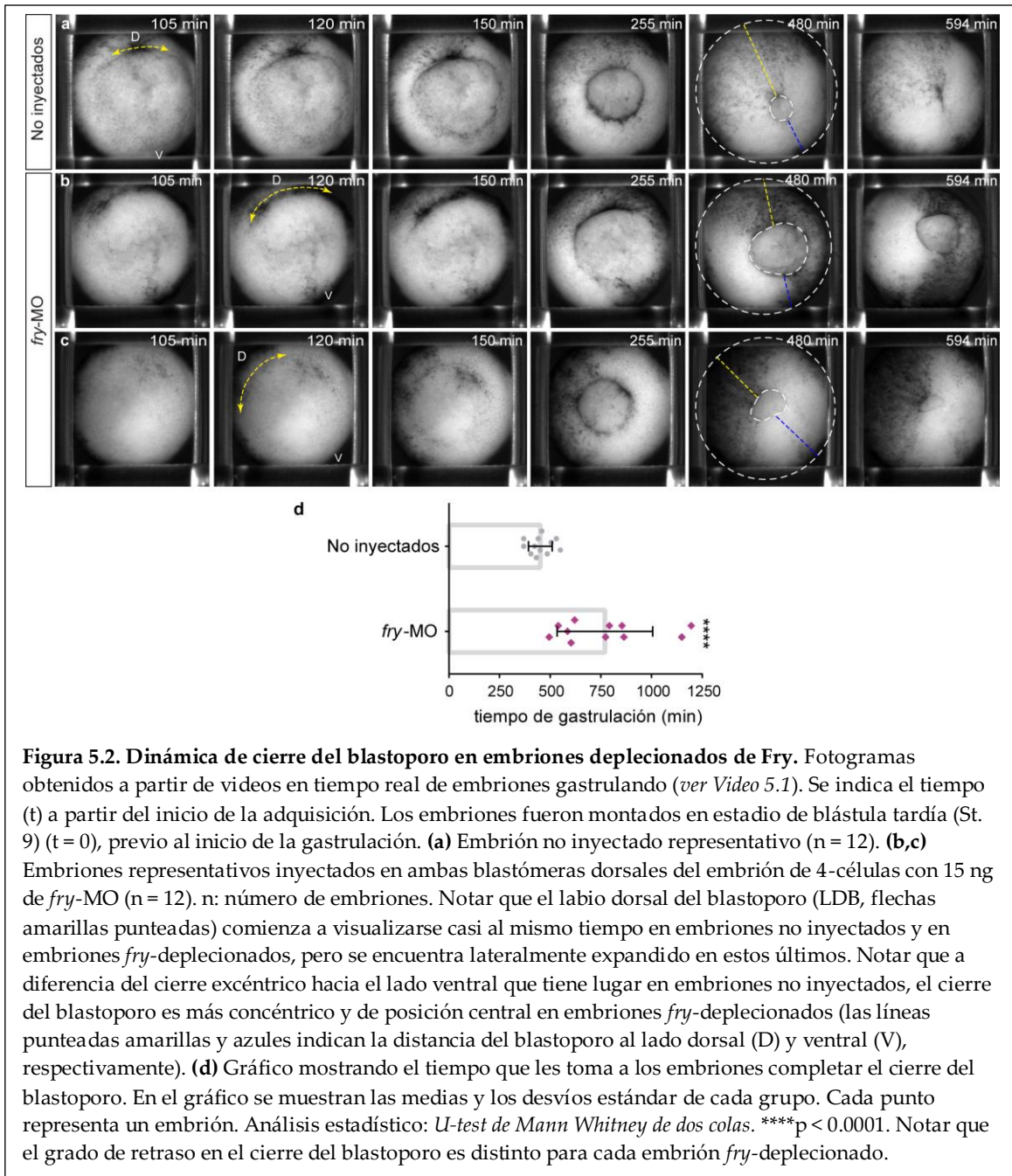
Figura 5.1. La depleción de Fry genera un retraso en el cierre del blastoporo. (a-h) Embriones de *Xenopus* en estadio de 4-células fueron inyectados en ambas blastómeras dorsales con 15 ng de *fry*-MO y fijados en estadios de gástrula o néurula (St. 10.5- 15). El estadio de los embriones inyectados se determinó en función a los embriones no inyectados de la misma camada. Se muestran embriones representativos. Vistas dorso-vegetales, anterior hacia arriba. (i) Izquierda: mediciones de cierre del blastoporo en embriones no inyectados, inyectados con *fry*-MO o coinyectados con 15 ng de *fry*-MO y 800pg del ARNm de *FD+LZ* fijados en el estadio indicado. Derecha: Imagen indicando el área del blastoporo (azul) y el área del hemisferio vegetal (área total, amarillo). El cociente entre ambos se utilizó como medida de cierre del blastoporo, siendo 0 = blastoporo completamente cerrado. N: número de experimentos independientes, n: número de embriones. En el gráfico se muestran las medias y los desvíos estándar de cada grupo. Cada punto representa un embrión. Análisis estadístico: test de *Kruskal-Wallis* y test de *comparaciones múltiples de Dunn* (****, †††† $p < 0.0001$). * representa la comparación con el grupo no inyectado y † representa la comparación con el grupo inyectado con *fry*-MO

Para caracterizar en mayor detalle la progresión de cierre del blastoporo en ausencia de Fry, adquirimos videos de embriones gastrulando en tiempo real (n = 12 para cada grupo) (Sección 3.1). En el Video 5.1 se muestra un embrión no inyectado y dos embriones *fry*-deplecionados representativos. En la Figura 5.2.a-c se muestran fotogramas de dichas filmaciones en momentos claves del proceso gastrulatorio (105 min- 120 min corresponden a la gastrulación temprana, 255 min a la gastrulación media, 480 min a la gastrulación tardía y 594 min al final de la gastrulación e inicio de la neurulación).



Video 5.1. Gastrulación en embriones intactos y *fry*-deplecionados. Videos en tiempo real de embriones gastrulando. (**izquierda**) Embrión no inyectado (uninjected) (n = 12) (fotogramas en *Figura 5.2.a*). (**centro y derecha**) Embriones inyectados con 15 ng de *fry*-MO (fotogramas en *Figura 5.2.b* y *c*, respectivamente). Notar que ambos embriones presentan retraso en el cierre del blastoporo respecto al embrión no inyectado. Se indica el tiempo en minutos a partir del inicio de la adquisición. Se comenzó el registro en el estadio de blástula tardía (St. 9) y se continuó hasta el estadio de néurula (St. 15). 1 frame cada 3 minutos (*Sección 3.1*). Se muestran embriones representativos.

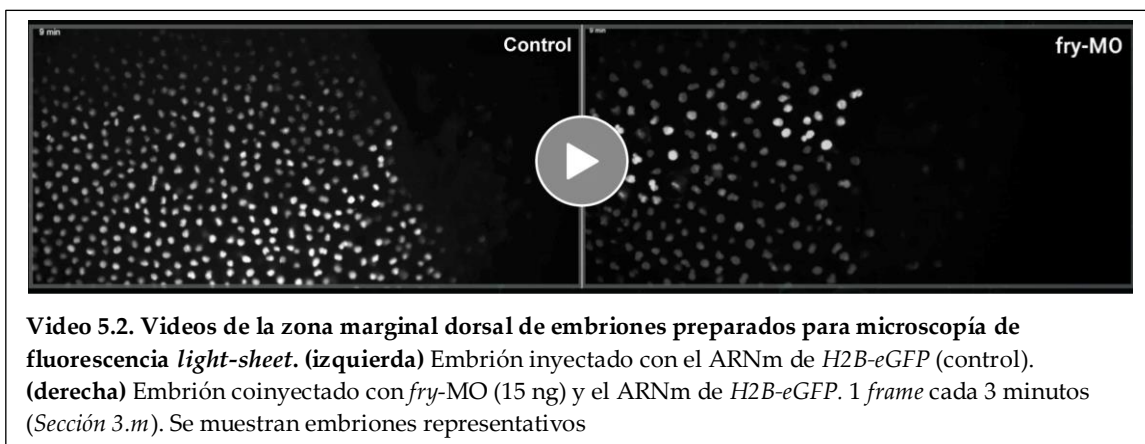
La formación del blastoporo comienza con la aparición del LDB, restringido a una pequeña región en el lado dorsal del embrión (*Figura 1.4*). Observamos que en el ~80% de los embriones *fry*-deplecionados, el LDB estaba lateralmente expandido respecto al de embriones control (flechas punteadas amarillas, *Figura 5.2.a-c*). No obstante, en estos embriones el anillo de células en botella que rodea al tapón vitelino se forma normalmente, sugiriendo que el proceso de constricción apical no está afectado. En concordancia con lo observado en embriones fijados (*Figura 4.8* y *5.1*), el ~90% de los embriones deplecionados de Fry logró cerrar el blastoporo al final de la gastrulación (*Figura 5.2.b,c*). Como puede apreciarse en los videos, los embriones de ambos grupos experimentales comenzaron a gastrular casi al mismo tiempo (el LDB aparece entre los 105-120 min en todos los embriones, *Video 5.1*; *Figura 5.2.a-c*), indicando que los embriones estaban sincronizados al inicio del registro. Sin embargo, a los embriones *fry*-deplecionados les llevó más tiempo cerrar completamente su blastoporo argumentando a favor de que el retraso en el cierre del blastoporo es consecuencia de movimientos morfogénicos deficientes (*Video 5.1*; *Figura 5.2.d*). Asimismo, en contraposición al cierre excéntrico del blastoporo hacia la futura región ventral que tiene lugar en embriones intactos (*Figura 1.4*), en el ~75% de los embriones *fry*-deplecionados el blastoporo cerró concéntricamente y en posición más central, evidenciando alteraciones en las fuerzas que coordinan el cierre del blastoporo y la elongación del eje axial (*Video 5.1*; líneas amarillas y azules, *Figura 5.2.a-c*). En conjunto, estos resultados indican que la pérdida de función de Fry en los tejidos dorsales altera la formación y la dinámica de cierre del blastoporo.



5.b. La depleción de Fry afecta el movimiento de las células superficiales de la zona marginal que involucre

El cierre del blastoporo es impulsado por múltiples procesos morfogénicos que incluyen la epibolia, el engrosamiento convergente, la EC y la involución (Keller and Shook, 2008). Dado que las células superficiales de la ZMI expresan *fry* (Figura 4.3.a'), decidimos investigar el impacto de la depleción sobre el movimiento de estas células previo a la involución. Para esto, inyectamos el ARNm *H2B-eGFP* (histona 2B-

enhanced GFP) en las blastómeras dorsales en presencia o ausencia de *fry*-MO y preparamos los embriones para microscopía de fluorescencia *light-sheet* (Sección 3.m). La expresión de la proteína de fusión H2B-eGFP nos permitió visualizar los núcleos de células individuales y registrar el movimiento de células superficiales de la ZMI dorsal durante 3 horas desde la formación del LDB. En el *Video 5.2* se muestran registros representativos de un embrión control (N = 5) y un embrión *fry*-deplecionado (N = 5). Esta técnica nos permitió visualizar y realizar el seguimiento temporal o *tracking* de núcleos de células dorsales individuales, con niveles insignificantes de *photobleaching* y sin dañar los tejidos embrionarios.



Entre las células “trackeadas”, se analizaron solo aquellas que cumplieran con los siguientes criterios: (i) que fueran seguidas por al menos 45 minutos (15 *frames*), para que la trayectoria evaluada sea representativa, (ii) que migraran una distancia de al menos 20 μm , para descartar cualquier artefacto que sea reconocido por el *software* como un núcleo celular, y (iii) que el último punto temporal en el que fueron trackeadas se encontrara a menos de 80 μm del LDB, con el fin de evaluar sólo aquellas células pertenecientes a la ZMI. El número total de células que cumplieron con estos requisitos fue de $n = 319$ (N = 5) para los embriones control (*H2B-eGFP*), y $n = 332$ (N = 5) para los embriones *fry*-deplecionados (*H2B-eGFP* + *fry*-MO). En la *Figura 5.3* se muestran, a modo de ejemplo, las trayectorias de algunas células trackeadas con este método.

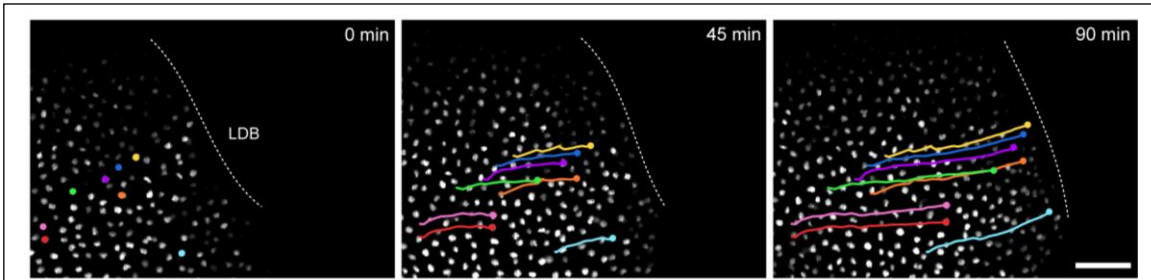


Figura 5.3. Proyecciones de intensidad máxima de una serie temporal de células superficiales de la zona marginal que involucrena adquirida por microscopía *light-sheet*. Embriones de *Xenopus* en estadio de 4-células fueron inyectados en ambas blastómeras dorsales con el ARNm de *H2B-eGFP* en ausencia o presencia de *fry*-MO (15 ng) y montados para microscopía de fluorescencia *light-sheet* al inicio de la gastrulación (St. 10). Se adquirieron videos en tiempo real durante la gastrulación y se siguieron células individuales mientras se movían hacia el labio dorsal del blastoporo (LDB) utilizando el software *ilastik*. Se muestran fotogramas representativos de un embrión control (*H2B-eGFP*) adquiridos a los tiempos indicados en la figura. Se ejemplifica el seguimiento temporal de algunas células individuales (los círculos y las líneas de colores indican la posición de los núcleos y las trayectorias, respectivamente). Las líneas punteadas blancas indican la posición del LDB. Escala: 100 μ m.

Con el fin de analizar la direccionalidad del movimiento de las células superficiales de la ZMI, evaluamos la *persistencia* de sus trayectorias a medida que avanzaban hacia el LDB. Se definió como persistencia al cociente entre la distancia lineal recorrida por una célula y la longitud de su trayectoria total (Sección 3.m.d, Figura 5.4.a). De esta forma, las células que se movieron con una trayectoria mayormente rectilínea presentaron una persistencia cercana a 1, mientras que células con trayectorias más erráticas exhibieron persistencias menores. Observamos que la pérdida de función de Fry redujo significativamente la persistencia media de las células superficiales dorsales ($0,87 \pm 0,15$ *H2B-eGF* vs. $0,79 \pm 0,19$ *H2B-eGFP + fry*-MO) (Figura 5.4.b). Asimismo, una mayor proporción de células control (>50%) tuvieron persistencias entre 1-0,95 y muy pocas presentaron valores por debajo de 0,70, mientras que menos del 20% de las células deplecionadas de Fry cayeron dentro del intervalo 1-0,95 y el 80% restante presentó valores de persistencia menores (Figura. 5.4.c,d). Estos resultados ponen en evidencia que la ausencia de Fry altera la direccionalidad del movimiento de las células superficiales de la ZMI hacia el LDB.

A continuación, definimos la *velocidad instantánea* como el desplazamiento espacial de cada célula entre dos *frames* consecutivos (3 minutos) (Sección 3.m.d, Figura 5.4.e). La pérdida de función de Fry redujo significativamente la velocidad instantánea de las células superficiales de la ZMI que se mueven hacia el LDB ($2,14 \pm 0,62$ μ m/min *H2B-eGF* vs. $1,19 \pm 0,51$ μ m/min *H2B-eGFP + fry*-MO) (Figura 5.4.f). Al descomponer la

velocidad en sus componentes paralela y perpendicular al LDB (Sección 3.m.d), obtuvimos que la depleción de Fry redujo la *velocidad perpendicular* de las células dorsales ($2,11 \pm 0,72 \mu\text{m}/\text{min}$ *H2B-eGF* vs. $1,07 \pm 0,55 \mu\text{m}/\text{min}$ *H2B-eGFP + fry-MO*) (Figura 5.4.g). Por el contrario, la *velocidad paralela* fue mayor en células deplecionadas de Fry respecto a células control ($0,32 \pm 0,25 \mu\text{m}/\text{min}$ *H2B-eGF* vs. $0,48 \pm 0,32 \mu\text{m}/\text{min}$ *H2B-eGFP + fry-MO*) (Figura 5.4.h). Este resultado es congruente con el obtenido para la persistencia, confirmando que en ausencia de Fry las células superficiales de la ZMI se mueven de forma menos direccionada hacia el LDB. En conjunto, estos resultados indican que la pérdida de función de Fry afecta severamente la velocidad y la direccionalidad del movimiento de las células superficiales de la ZMI hacia el LDB.

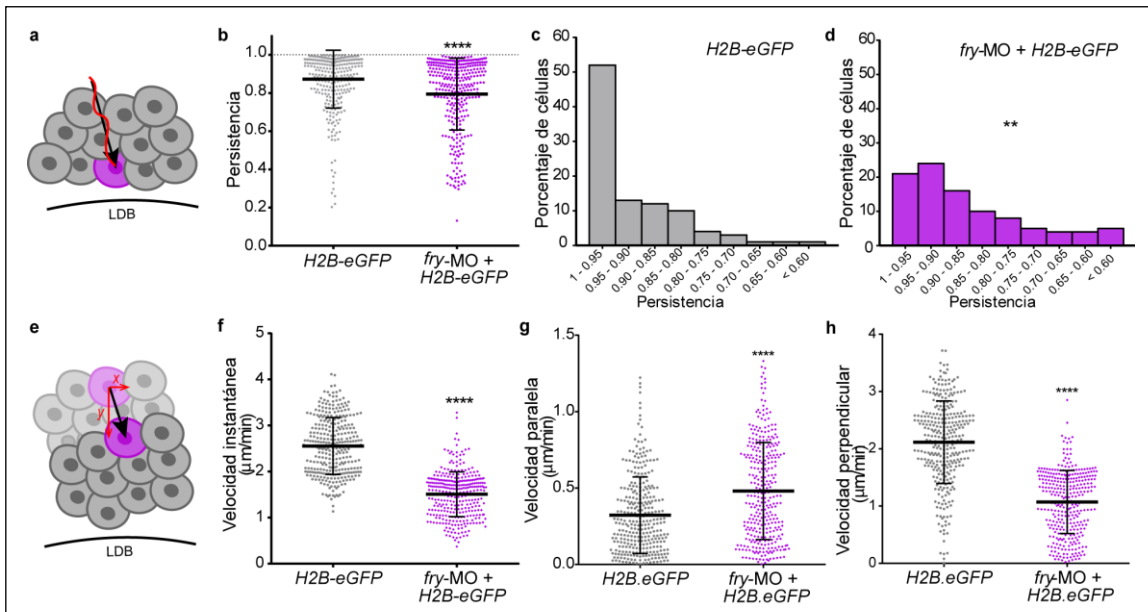
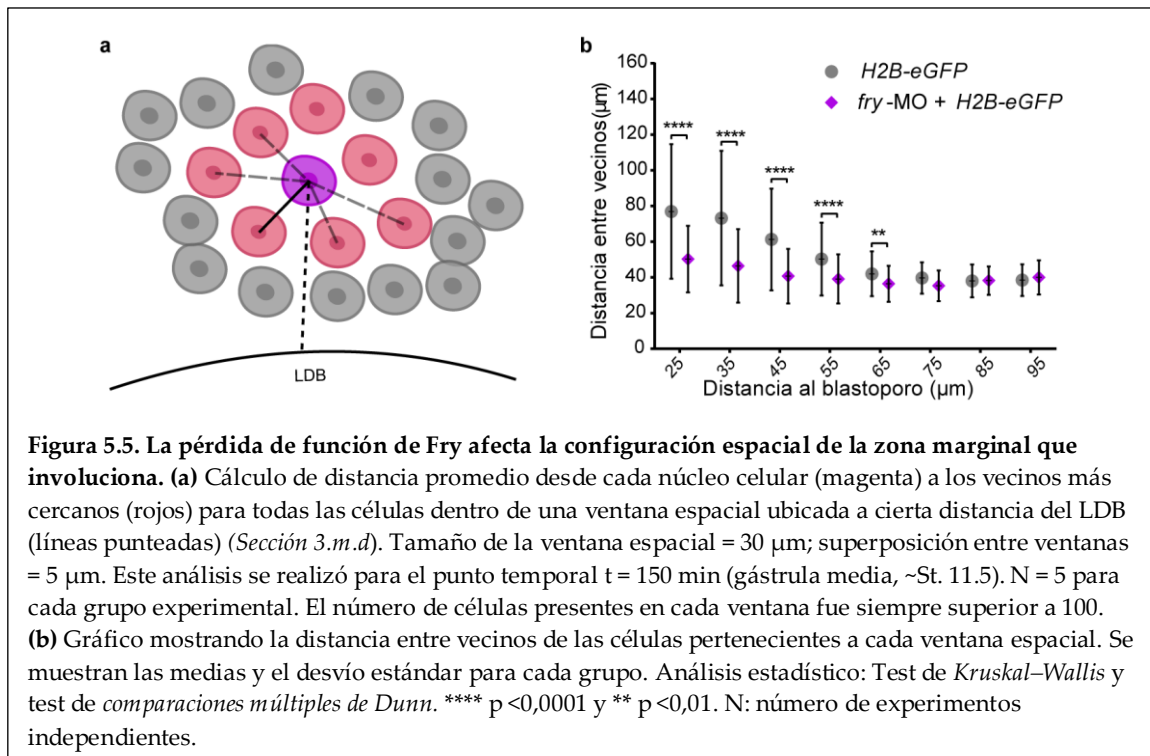


Figura 5.4. La pérdida de función de Fry afecta al movimiento de las células superficiales de la zona marginal que involucre. (a) Se calculó la persistencia de células individuales (magenta) como el cociente entre la distancia lineal recorrida por cada célula (flecha negra) y la longitud total de su trayectoria (línea roja). (b) Gráfico mostrando la persistencia de las células individuales. Se muestran las medias y el desvío estándar para cada grupo. Cada punto representa una célula individual. Análisis estadístico: *U-test de Mann Whitney de dos colas*. **** $p < 0.0001$. (c, d) Histogramas de persistencia de migración de células control (*H2B-eGFP*) y células *fry*-deplecionadas (*fry-MO + H2B-eGFP*), respectivamente. Análisis estadístico: Test de *Chi-cuadrado* (** $p < 0.01$). (e) Se calculó la velocidad instantánea de células individuales (magenta) como la trayectoria de una célula (flecha negra) entre un *frame* (trasparente) y su consecutivo (opaco). Se descompuso la velocidad en sus componentes perpendicular (y) y paralela (x) (flechas rojas) respecto al LDB. (f) Gráfico de velocidad instantánea. (g y h) Gráfico de velocidad perpendicular (h) y paralela (g). Se muestran las medias y el desvío estándar para cada grupo. Cada punto representa una célula individual. Análisis estadístico: *U-test de Mann Whitney de dos colas*. **** $p < 0.0001$. Embriones inyectados con *H2B-eGFP* (N = 5; número total de células seguidas = 319); embriones co-inyectados con *H2B-eGFP + fry-MO* (N = 5; número total de células seguidas = 332). N: número de experimentos independientes.

Estudiar la morfología de las células que rodean al blastoporo da información sobre el contexto mecánico al que está sujeto este tejido (Feroze et al., 2015). De este modo, conocer la configuración espacial de células cercanas al punto de involución nos permite comprender cómo estas células contribuyen o responden pasivamente a las fuerzas responsables del cierre del blastoporo. En este sentido, investigamos la organización espacial de las células superficiales de la ZMI dorsal en ausencia de Fry. Estimamos la distancia entre los núcleos de células cercanas (*distancia entre vecinos*) en función a su distancia al LDB, utilizando un método basado en triangulaciones de Delaunay (Sección 3.m.d, Figura 5.5.a). Mientras que células a 75-95 μm de distancia del LDB mostraron una distancia entre vecinos similar en embriones control y *fry*-deplecionados, las células más cercanas al LDB (hasta 65 μm) presentaron una reducción significativa en la distancia entre vecinos en ausencia de Fry respecto de embriones control (Figura 5.5.b). Este resultado revela que la organización geométrica de la zona de preinvolución de la ZMI dorsal (hasta 30 μm del LDB) se ve afectada por la pérdida de función de Fry. El aumento en la densidad celular, o "amontonamiento", de células próximas al sitio de involución sugiere que estas células están experimentando fuerzas convergentes. Sin embargo, a diferencia de lo que ocurre normalmente, es posible que estas células no estén sujetas a fuerzas internas que impulsen su involución. Estos resultados sugieren que el engrosamiento convergente característico de los tejidos circumblastoporales estaría operando en ausencia de Fry, mientras que fuerzas anisotrópicas generadas por tejidos dorsales que ya involucionaron, estarían probablemente afectadas.

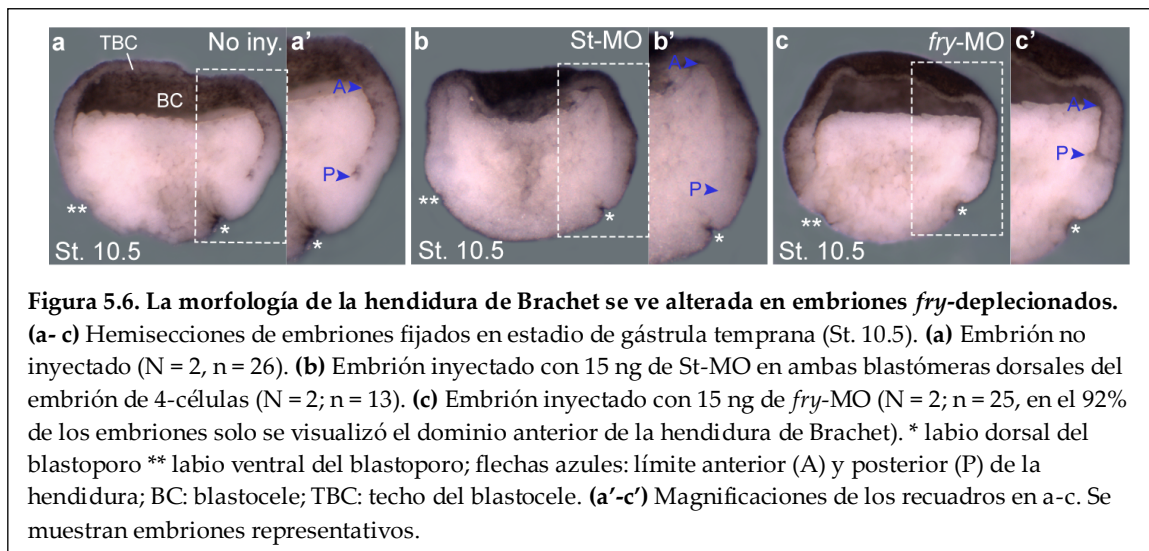


5.c. La pérdida de función de Fry afecta la morfología de la hendidura de Brachet y su matriz de fibronectina asociada

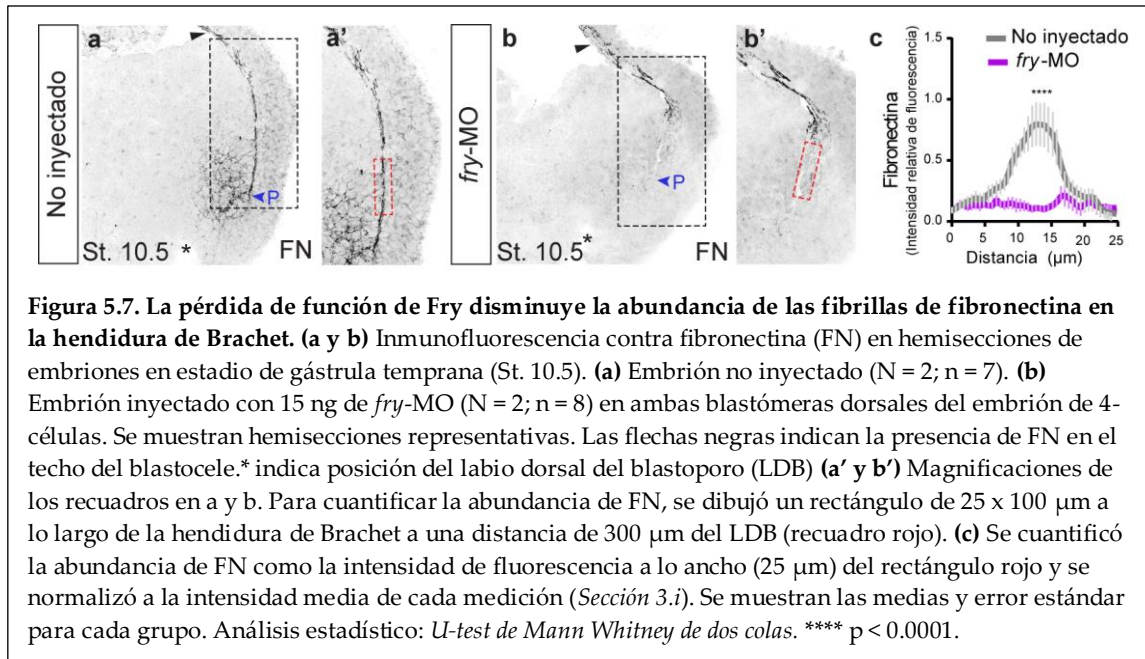
A medida que las células del mesodermo axial prospectivo involucionan, entran en contacto con las células ectodérmicas del TBC (*Figura 1.3*). Estos tejidos no se fusionan sino que permanecen separados por un proceso de *separación de tejidos*, que resulta en la formación de un límite físico denominado hendidura de Brachet. El establecimiento de esta interfase es necesario para el mantenimiento de la identidad de ambos linajes celulares y la correcta ejecución de movimientos gastrulatorios característicos (migración colectiva y EC del mesodermo axial, y epibolia del TBC). La parte anterior de la hendidura de Brachet se forma primero como resultado de la rotación vegetal del endodermo, mientras que el dominio posterior se genera por la involución del mesodermo prospectivo a través del LDB (*Figura 1.3*). Luego de su formación, la hendidura es revestida por una matriz fibrilar de FN que la estabiliza y es indispensable para la migración del mesendodermo post-involutivo (Davidson et al., 2004; Gorny and Steinbeisser, 2012; Winklbauer and Keller, 1996).

Teniendo en cuenta que la función de Fry es necesaria para el correcto movimiento de las células superficiales de la ZMI (*Figura 5.4*), decidimos analizar la

configuración espacial de la región post-involutiva (ZMI interna). Realizamos hemisecciones de gástrulas tempranas para visualizar la hendidura de Brachet en toda su extensión, desde el piso del blastocele (límite anterior) hasta el labio interno del blastoporo (sitio de involución, límite posterior) (Figura 5.6). Verificamos la sincronización de los embriones estudiados por la presencia de un incipiente labio ventral del blastoporo (doble asterisco, Figura 5.6). Al analizar la región dorsal de las hemisecciones, observamos que el dominio posterior de la hendidura de Brachet está menos definido en embriones *fry*-deplecionados respecto a embriones control (Figura 5.6.c,c'). Este resultado indica que la morfología de la hendidura de Brachet en gástrulas tempranas se ve afectada por la pérdida de función de Fry.



Para estudiar en mayor detalle la morfología de la hendidura de Brachet, revelamos la presencia de su MEC asociada. Al comienzo de la gastrulación, la matriz de FN fibrilar que tapiza al TBC se expande hacia la hendidura cuando ésta se forma (Davidson et al., 2004; Winklbaauer and Keller, 1996). En embriones *fry*-deplecionados, las fibrillas de FN normalmente abundantes a lo largo de toda la hendidura, se observaron considerablemente reducidas en el dominio posterior (Figura 5.7.a', b'). La cuantificación de la abundancia de FN fibrilar en esta región (recuadro rojo, Figura 5.7.a',b', Sección 3.i), verificó una reducción significativa en embriones deplecionados de Fry (Figura 5.7.c). Sin embargo, las fibrillas de FN presentes en el TBC no parecen estar afectadas en estos embriones (puntas de flecha negra, Figura 5.4.a, b).



La formación de la hendidura de Brachet requiere que el mesodermo post-involutivo exprese el comportamiento de separación de tejidos, previniendo que las células mesodérmicas internalizadas invadan el tejido del TBC. Para evaluar la capacidad de células mesodérmicas deplecionadas de Fry de mantenerse separadas del ectodermo subyacente (TBC), realizamos *ensayos de separación de tejidos ex-vivo* (Luu et al., 2015; Wacker et al., 2000). Estos ensayos consisten en utilizar explantes de la capa interna del TBC como sustrato, sobre los cuales se cultivan en contacto agregados de células mesodérmicas (Sección 3.0, Figura 5.8.a). A modo de control, colocamos agregados de células ectodérmicas de la capa interna del TBC (flechas celestes, Figura 5.8.b-c') sobre la superficie de TBC preparados a partir de embriones no inyectados (TBC *naïves*). Observamos que estos agregados se fusionan al sustrato debido a la ausencia de comportamiento de separación de tejido entre células ectodérmicas. Por otro lado, tanto los agregados mesodérmicos provenientes de embriones *fry*-deplecionados como de embriones control permanecieron en la superficie del explante de TBC *naïve* (flechas rojas, Figura 5.8.b-d). Este resultado demuestra que la pérdida de función de Fry no afecta la capacidad del mesodermo post-involutivo de mantenerse separado del tejido ectodérmico subyacente.

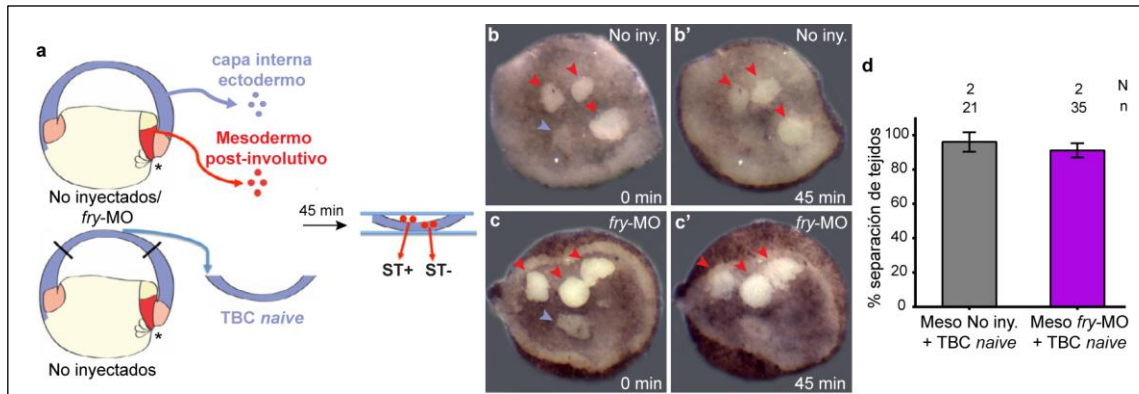


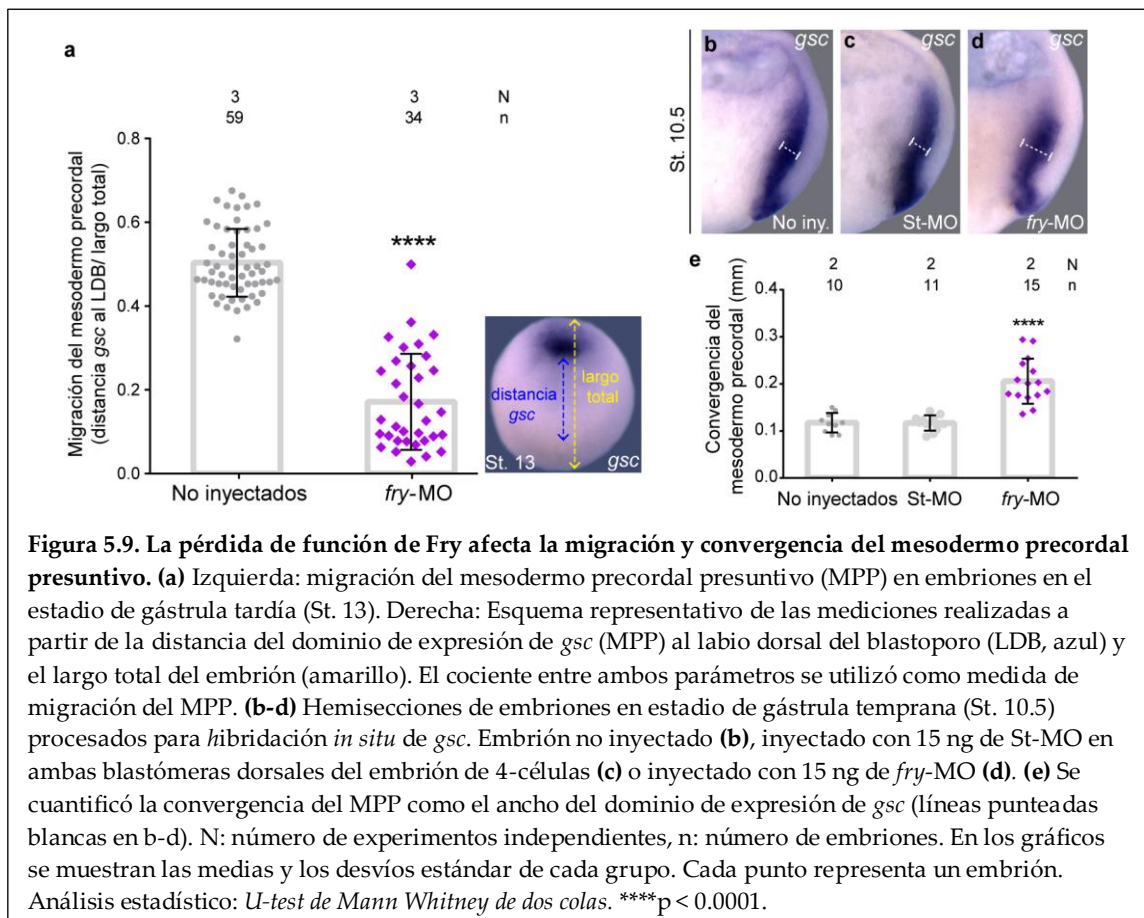
Figura 5.8. La pérdida de función de Fry no afecta el comportamiento de separación de tejidos en células del mesodermo dorsal. (a) Se prepararon agregados de mesodermo post-involutivo (rojo) o de la capa interna del ectodermo (celeste) a partir de gástrulas tempranas (St. 10.5), que fueron colocados sobre un explante de TBC *naive*. Se evaluó el comportamiento de separación de tejidos (ST) luego de 45 min, como la capacidad de los agregados de permanecer en la superficie del TBC. * indica la posición del labio dorsal del blastoporo. *Adaptado de Luu et al., 2015.* (b-b', c-c') Agregados de embriones no inyectados e inyectados con 15ng de *fry*-MO en ambas blastómeras dorsales del embrión de 4-células, respectivamente. Se muestran preparados representativos. (d) Gráfico mostrando el porcentaje de agregados mesodérmicos que exhibieron comportamiento de separación de tejidos. N: número de experimentos independientes, n: número de embriones. Se muestran las medias y el desvío estándar para cada grupo. Análisis estadístico: *U-test de Mann Whitney de dos colas*. No se encontraron diferencias significativas entre ambos grupos ($p = 0.4258$).

En conjunto, nuestros resultados indican que la pérdida de función de Fry no altera el comportamiento de separación de tejidos que expresan las células mesodérmicas post-involutivas, pero sí afecta la morfología de la hendidura de Brachet y la formación de la MEC asociada a su dominio posterior. Probablemente, fallas en el ensamblado de la matriz de FN vaya en detrimento de la estabilidad de la hendidura de Brachet en embriones *fry*-deplecionados. Asimismo, teniendo en cuenta la importancia de la matriz de FN fibrilar en la migración colectiva de las células mesodérmicas (Huang and Winklbauer, 2018b; Winklbauer and Keller, 1996), es posible especular que las alteraciones observadas ocasionen defectos en los movimientos morfogenéticos de los tejidos post-involutivos y contribuyan al fenotipo de depleción de Fry.

5.d. La pérdida de función de Fry afecta la migración de las células del mesodermo precordial presuntivo

Las primeras células mesodérmicas en involucionar pertenecen al MPP, y se caracterizan por expresar el factor de transcripción *gsc*. Luego de ingresar, el MPP migra colectivamente hacia la futura región anterior del embrión empleando como

sustrato la matriz de FN fibrilar presente en la hendidura de Brachet (Figura 1.3). Al llegar a su destino, estas células dan origen al parénquima cefálico e inducen la especificación del neuroectodermo anterior (Barresi and Gilbert, 2019). La reducción o ausencia de estructuras anteriores en embriones *fry*-deplecionados (Figura 4.5) (Goto et al., 2010), las alteraciones en los dominios de expresión de genes específicos del MPP (Figuras 4.6.b-b'' y 4.8.a-a'') y en la matriz de FN sobre la cual estas células migran (Figura 5.7), nos motivó a estudiar el comportamiento de este tejido durante la gastrulación. En primera instancia, analizamos la distancia entre el LDB y el dominio de expresión de *gsc* en el estadio de gástrula tardía (células *gsc*-positivas). En congruencia con nuestras observaciones iniciales (Figura 4.8.a-a''), la distancia recorrida por el MPP se redujo considerablemente en embriones *fry*-deplecionados respecto a embriones control (Figura 5.9.a). Debido a que la pérdida de función de Fry reduce el dominio de expresión de *gsc* (Figura 4.8.a-a''), solo pudimos realizar cuantificaciones en aquellos embriones con dominio de expresión detectable.



Durante el proceso de involución, las células del MPP que ingresan primero migran más rápido que las posteriores. Este gradiente de velocidades migratorias genera que las células anteriores, más rápidas, se separen de las posteriores, más lentas, y que por ende, el tejido se extienda y se estreche (Evren et al., 2014). A diferencia de la intercalación medio-lateral que exhiben las células del cordamesodermo, la EC del MPP es consecuencia de la intercalación paralela de sus células (Winklbauer, 2020). Como puede apreciarse en hemisecciones de gástrulas tempranas, el dominio de expresión de *gsc* no solo se extiende menos sino que se encuentra más ensanchado en embriones *fry*-deplecionados respecto a embriones control (Figura 5.9.d-e). Esto sugiere que la dinámica migratoria de las células del MPP se ve comprometida por la pérdida de función de Fry.

La interacción de las células del MPP con la matriz de FN promueve la formación de protrusiones ricas en actina necesarias para su migración activa (Evren et al., 2014; Nie and Chang, 2007). Como indican nuestros resultados, la pérdida de función de Fry disminuye la abundancia de FN fibrilar en la hendidura de Brachet (Figura 5.7). Por lo tanto, es posible que el efecto negativo de Fry sobre la formación de esta MEC contribuya a los defectos migratorios del MPP. Con el fin de evaluar el requerimiento de Fry para el comportamiento migratorio del MPP independientemente del contexto tisular, realizamos ensayos de migración en explantes *ex-vivo*. Para ello, preparamos explantes de la ZMD anterior a partir de gástrulas tempranas (St. 10-10.25) no inyectadas o inyectadas con *fry*-MO, que fueron cultivados sobre un sustrato de FN exógena (Sección 3.n.c) (Nie and Chang, 2007). En estas condiciones, las células del MPP se mueven hacia afuera del explante por migración activa. Luego de 6 horas en cultivo, alrededor del 80% de los explantes control presentaron células migratorias, mientras que en aquellos deplecionados de Fry el porcentaje se redujo a 60%. Como medida de migración, cuantificamos la distancia recorrida por la célula más lejana respecto al explante original (Nie and Chang, 2007). Efectivamente, las células provenientes de embriones *fry*-deplecionados migraron distancias menores en comparación con las células control (Figura 5.10). Por lo tanto, estos resultados indican que la pérdida de función de Fry afecta directamente el comportamiento migratorio de las células del MPP.

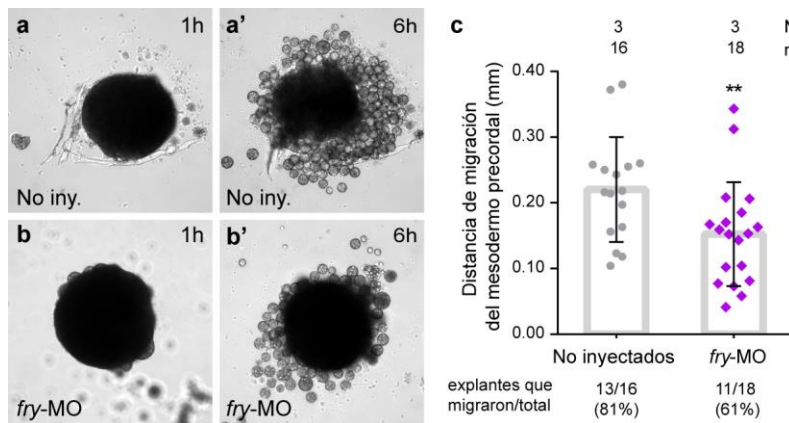
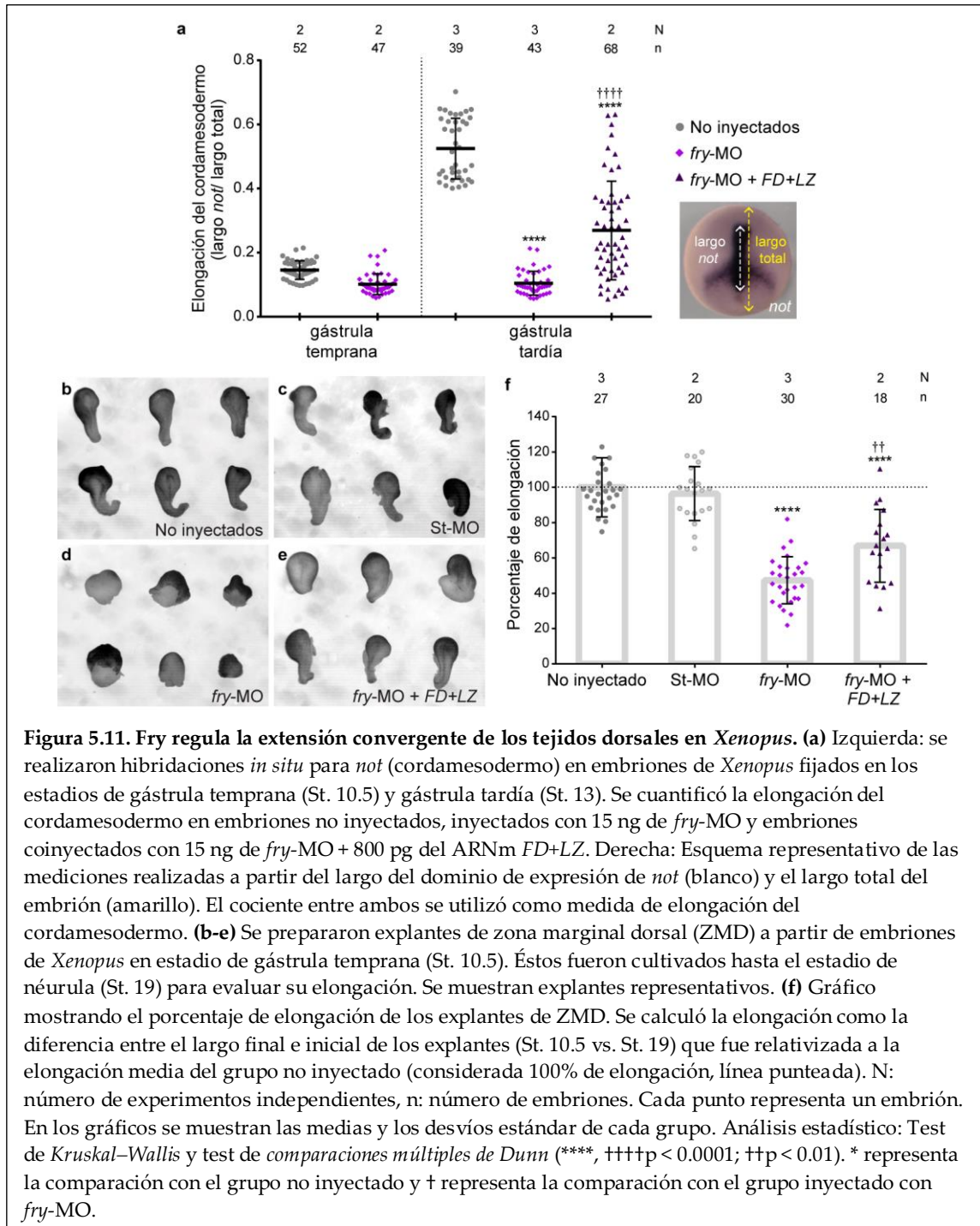


Figura 5.10. La pérdida de función de Fry inhibe el comportamiento migratorio de las células del mesodermo precordial presuntivo (a, b) Se prepararon explantes de zona marginal dorsal (ZMD) anterior a partir de embriones de *Xenopus* en estadio de gástrula temprana (St. 10) no inyectados o inyectados con 15 ng de *fry*-MO en ambas blastómeras dorsales del embrión de 4-células. Los explantes fueron cultivados durante 6 horas (a' y b') sobre un sustrato de fibronectina para evaluar el comportamiento migratorio de las células del mesodermo precordial presuntivo (mpp). Se muestran explantes representativos. (c) Gráfico mostrando la distancia recorrida por la célula más lejana de cada explante. N: número de experimentos independientes, n: número de embriones. Cada punto representa un embrión. Se muestran las medias y los desvíos estándar de cada grupo. Análisis estadístico: *U-test de Mann Whitney de dos colas*. ** $p < 0.01$.

5.e. La función de Fry es necesaria para la extensión convergente del cordamesodermo

La EC de los tejidos dorsales es el principal proceso morfogénico que contribuye a la elongación de la línea media dorsal (Figura 1.5.b) (Shih and Keller, 1992). Teniendo en cuenta el fenotipo de depleción de Fry en el estadio de brote caudal (Figura 4.5.d,e) y las alteraciones en el cierre del blastoporo (Figura 5.2), decidimos estudiar el rol de esta proteína en la EC del cordamesodermo. Como primer abordaje, analizamos los cambios en la longitud del dominio de expresión del gen marcador de cordamesodermo *not* durante la gastrulación (Ewald, 2004). Luego de su involución, el cordamesodermo presuntivo se elonga a lo largo de la línea media dorsal como resultado de la EC. En consecuencia, el dominio de expresión de *not*, que se encuentra inicialmente cerca del LDB (gástrula temprana), aumenta en longitud a medida que transcurre la gastrulación (gástrula tardía) (Figura 1.5.b) (von Dassow et al., 1993). En coincidencia con nuestras observaciones iniciales (Figura 4.8.e-e''), en ausencia de Fry la elongación del cordamesodermo se inhibe significativamente respecto de embriones

control. Asimismo, la coinyección de *FD+LZ* y *fry*-MO rescata parcialmente la elongación de la línea media dorsal (Figura 5.11.a).



Para verificar el requerimiento de Fry en la EC del mesodermo dorsal, realizamos explantes de ZMD de gástrulas tempranas (Sección 3.n.a) (Keller et al., 1985). Estos explantes se elongan mimificando el comportamiento morfogénico en embriones intactos, permitiendo la evaluación de la EC independientemente de los otros

movimientos morfogénicos que ocurren simultáneamente durante la gastrulación. Los resultados muestran que, en contraste con la pronunciada extensión de los explantes control, la pérdida de función de Fry redujo significativamente la elongación de los explantes (*Figura 5.11.b-d,f*). Consistentemente con el recate fenotípico en el estadio de brote caudal y la elongación de la línea media en gástrulas tardías, la expresión de *FD+LZ* compensó parcialmente el efecto de la depleción de Fry sobre la elongación de los explantes (*Figura 5.11.e,f*). Estos resultados confirman que la función de Fry es necesaria para que ocurra la EC en los tejidos dorsales de embriones de *Xenopus*.

5.f. Fry es requerida para la elongación y orientación mediolateral de las células del mesodermo dorsal

Para que ocurra la intercalación celular responsable de la EC, las células mesodérmicas deben elongarse y alinearse en sentido mediolateral. A este conjunto de comportamientos celulares coordinados se los denomina comportamiento de intercalación mediolateral (CIM) (*Figura 1.5.a*) (Shih and Keller, 1992). A la luz de los resultados anteriores, evaluamos si Fry juega un papel en la regulación del CIM. Para ello, inyectamos embriones en las blastómeras dorsales con el ARNm *mem-Scarlet* en ausencia o en presencia de *fry*-MO. La proteína fluorescente *mem-Scarlet* se ancla a la membrana celular permitiendo su visualización. Luego de ser aislados, los explantes de la ZMD fueron montados para microscopía confocal en un sustrato de FN (*Sección 3.n.b*) (Zhou et al., 2010). Los explantes fueron cultivados hasta que los embriones control (intactos) alcanzaron el estadio de gástrula tardía, momento en que las células de la ZAV (*Figura 4.4.a'*) (Shih and Keller, 1992) del explante fueron fotografiadas bajo un microscopio confocal (*Figura 5.12.a,b*). Cuantificamos la *orientación* de las células del cordamesodermo trazando el ángulo que forma el eje mayor de la célula con respecto al eje mediolateral y presentamos los resultados en un diagrama de rosas. En las mismas condiciones de cultivo, las células mesodérmicas de los explantes control (*mem-mScarlet*) se orientaron preferentemente a lo largo del eje mediolateral, mientras que las células de los explantes deplecionados de Fry (*fry*-MO + *mem-mScarlet*) no presentaron esta característica orientación mediolateral (*Figura. 5.12.c,d*).

Por otro lado, la adquisición de una morfología bipolar de las células del cordamesodermo o "índice de polaridad" se calculó como el cociente entre el eje mayor y el eje menor de cada célula (Feroze et al., 2015). En ausencia de Fry, las células exhiben un índice de polaridad menor respecto a las células control ($1,64 \pm 0,02$ fry-MO + mem-mScarlet vs. $1,92 \pm 0,03$ mem-mScarlet) (Figura. 5.12.e). Asimismo, en ausencia de Fry, las células del cordamesodermo presentaron un área celular menor en comparación a las células del grupo de control, lo que evidencia cambios adicionales en la forma celular (Figura. 5.12.f). En conjunto, estos experimentos muestran una pérdida de la morfología polarizada y orientación de las células del cordamesodermo como resultado de la depleción de Fry, evidenciando el requerimiento funcional de esta proteína en el CIM.

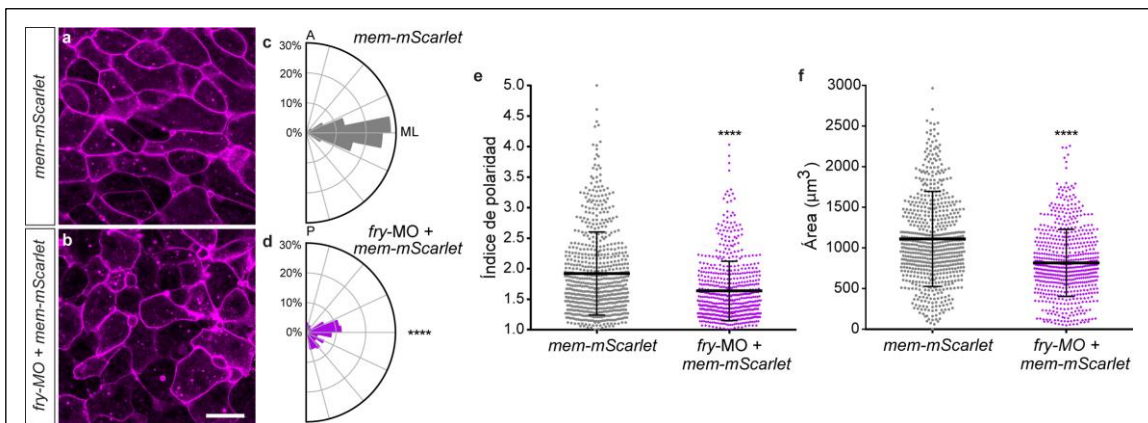


Figura 5.12. La pérdida de función de Fry afecta la polaridad y la orientación de las células mesodérmicas dorsales. (a y b) Se prepararon explantes de la zona marginal dorsal (ZMD) a partir de embriones de *Xenopus* en estadio de gástrula temprana (St. 10.5). Los explantes fueron montados para microscopía confocal. Se adquirieron imágenes de la zona de alineación vegetal (Fig. 4.4.a') en el estadio de gástrula tardía (St. 13). (a) Embrión inyectado con el ARNm de *mem-mScarlet* (control) (N = 2, n = 7). (b) Embrión coinyectado con 15 ng de *fry*-MO y el ARNm *mem-mScarlet* (N = 2, n = 7). N: número de experimentos independientes, n: número de embriones. Escala: 100 µm. Se muestran explantes representativos. (c,d) Se cuantificó la orientación celular como el ángulo del eje mayor de la célula respecto al eje mediolateral (ML). Los gráficos de rosa muestran el porcentaje de embriones que presentan cierto ángulo de polaridad. A: anterior, P: posterior. (c) Embrión inyectado con el ARNm de *mem-mScarlet* (células analizadas = 147). (d) Embrión coinyectado con 15 ng de *fry*-MO y el ARNm *mem-mScarlet* (células analizadas = 151). Análisis estadístico: Test de *Chi-cuadrado* ****p < 0.0001. (e) Gráfico mostrando la cuantificación del índice de polaridad de las células dorsales calculado como el cociente entre el eje mayor y el eje menor de las células. (f) Gráfico mostrando la cuantificación del área de células del mesodermo dorsal. (e,f) Embriones inyectados con el ARNm *mem-mScarlet* (células analizadas = 660); Embriones coinyectados con 15 ng de *fry*-MO + el ARNm *mem-mScarlet* (células analizadas = 632). Cada punto representa una célula. En los gráficos se muestran las medias y los desvíos estándar de cada grupo. Análisis estadístico: *U-test de Mann Whitney de dos colas*. ****p < 0.0001.

Capítulo III

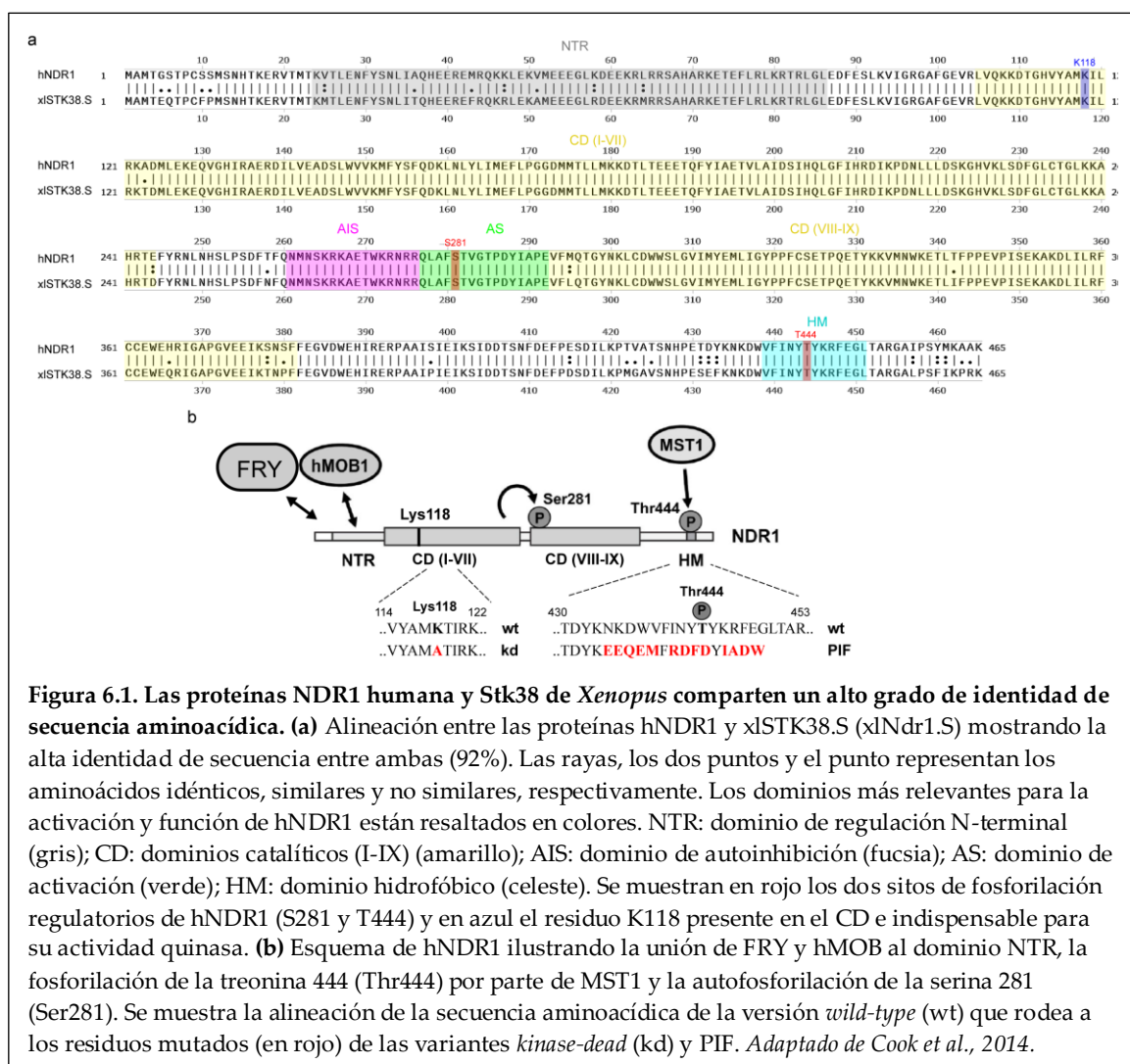
Mecanismos de acción de Fry

6.a. La quinasa Ndr1 en el desarrollo del eje axial

En células de mamíferos, invertebrados y levaduras, los ortólogos de Fry interactúan genética y físicamente con quinasas Ndr actuando como activadores y andamiaje de complejos multiprotéicos (Chiba et al., 2009; Gallegos and Bargmann, 2004; He et al., 2004; He et al., 2005; Irie et al., 2020; Xiong et al., 2018). Sin embargo, hasta el momento no hay evidencia de la existencia de una interacción funcional entre ambas proteínas en el desarrollo embrionario de vertebrados. El genoma de vertebrados presenta dos genes parálogos que codifican para las quinasas Ndr1 y Ndr2 (Stk38 y Srk38L, respectivamente), siendo Ndr1 el ortólogo de *sax-1* (*C. elegans*) y *trc* (*Drosophila*) (Tabla 1.1). En humanos, NDR1 y NDR2 comparten un 87% de identidad de secuencia aminoacídica (Devroe et al., 2004). Ratones *knock-out* para NDR1 o NDR2 se desarrollan normalmente, mientras que los dobles *knock-out* NDR1/NDR2 son letales embrionarios, sugiriendo la existencia de funciones compensatorias (Schmitz-Rohmer et al., 2015). Si bien se ha reportado que en cultivo de células humanas Fry regula la activación tanto de NDR1 como de NDR2 (Irie et al., 2020), sólo se ha demostrado la interacción física y funcional entre Fry y NDR1 (Chiba et al., 2009).

La actividad de la quinasa NDR1 humana (hNDR1) está regulada por fosforilación del residuo Thr444 por quinasas de la familia MST en su dominio de

activación (AS) y por auto-fosforilación del residuo Ser281 en su motivo hidrofóbico (HM), para lo que requiere de la interacción con las proteínas MOB y FRY a través del dominio de regulación N-terminal (NTR) (Figura 6.1.b) (Chiba et al., 2009; Devroe et al., 2004). Es tal el grado de conservación funcional entre quinasas Ndr, que hNDR1 rescata el fenotipo de pérdida de función de Trc en células epidérmicas del ala de la mosca (He et al., 2005). Asimismo, existe un 92% de identidad de secuencia entre la proteína hNDR1 y la proteína Stk38.S (Stk38 homeólogo S) de *Xenopus*, estando conservados los sitios regulatorios más relevantes para su activación y función quinasas (Figura 6.1.a).



Teniendo en consideración la alta homología de secuencia entre hNDR1 y Stk38.S, y que se desconoce la función de esta quinasas en *Xenopus*, decidimos investigar la participación de Ndr1 en el desarrollo del eje embrionario anteroposterior. Para ello,

realizamos experimentos con variantes de hNDR1 que mimifican una ganancia o pérdida de función (*Figura 6.1.b*). Las variantes funcionales utilizadas fueron: (i) hNDR1 *wild-type* (**hNDR1-wt**); (ii) una variante hiperactiva llamada **hNDR1-PIF**, que posee el dominio hidrofóbico de la proteína PRK2 (PKC related protein 2) en su extremo C-terminal, que se auto-fosforila en el residuo Ser281 sin requerir la presencia de MOB y Fry (Cook et al., 2014); (iii) una versión “quinasa-muerta” (*kinase-dead*) llamada **hNDR1-kd**, que por una sustitución Lys-Ala en el residuo K118A no presenta actividad enzimática (Hergovich et al., 2005). La inyección dorsal de todas estas variantes de hNDR1 generan una reducción de estructuras cefálicas y defectos en la elongación del eje anteroposterior en el ~ 50% de los embriones (*Figura 6.2*). Esto sugiere que Ndr1 participa en el desarrollo del eje axial de *Xenopus*. Si bien el fenotipo de estos embriones es similar al de depleción de Fry (*Figura 4.5*), las alteraciones axiales causadas por las variantes de hNDR1 son menos severas y presentan menor incidencia.

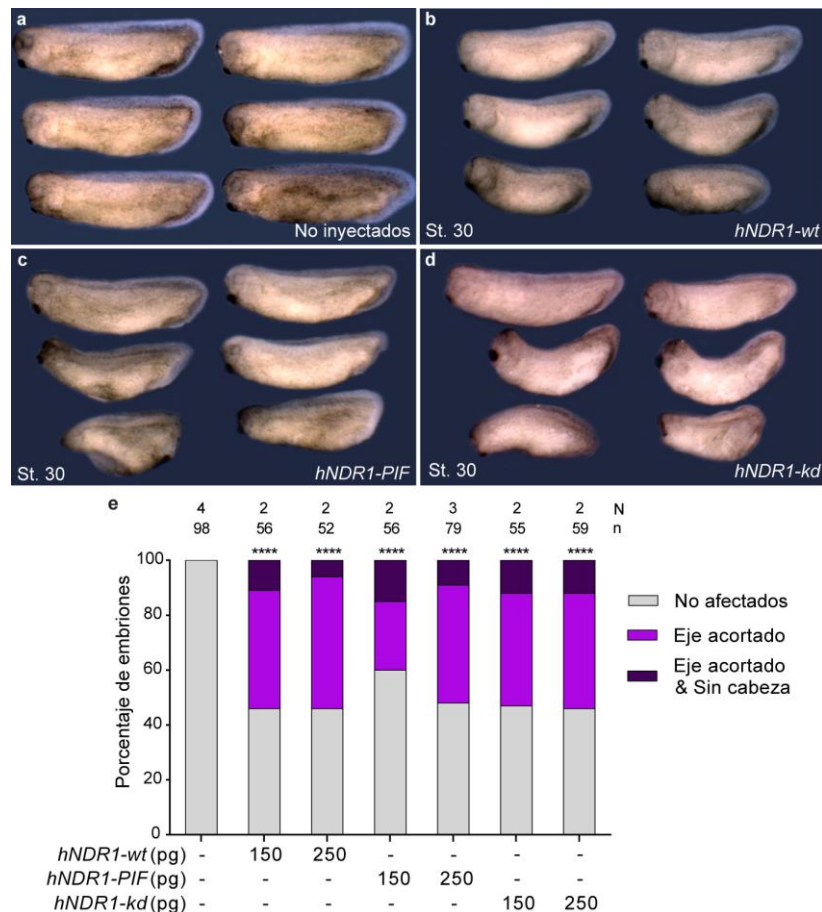
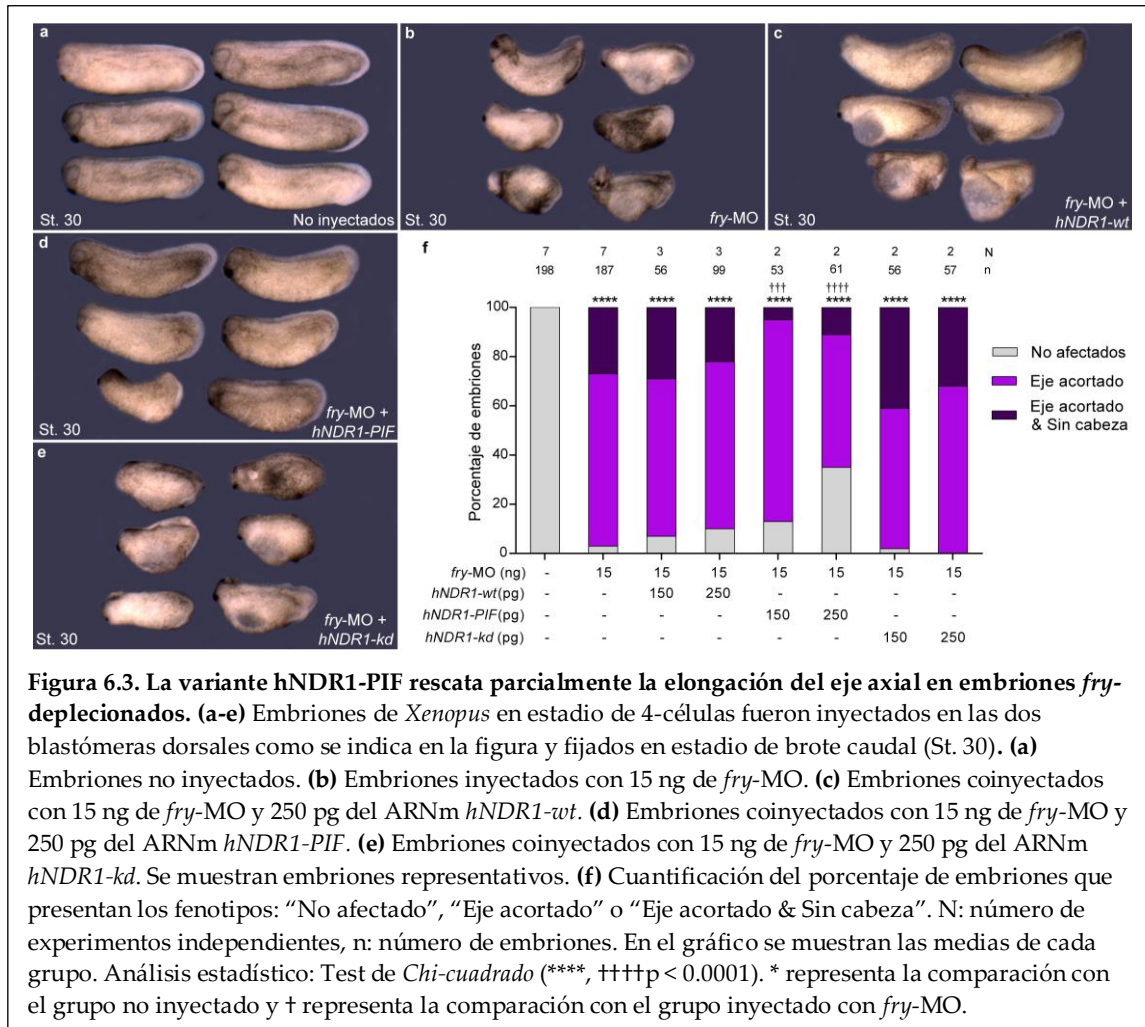


Figura 6.2. La sobreexpresión dorsal de las variantes de hNDR1 afecta el desarrollo del eje axial de *Xenopus*. (a-c) Embriones de *Xenopus* en estadio de 4-células fueron inyectados en las dos blastómeras dorsales con 150 pg o 250 pg de ARNm de las variantes de hNDR1. Se muestran embriones representativos fijados en el estadio de brote caudal (St. 30). (d) Cuantificación del porcentaje de embriones que presentan los fenotipos: “No afectado”, “Eje acortado” o “Eje acortado & Sin cabeza”. N: número de experimentos independientes, n: número de embriones. En el gráfico se muestran las medias de cada grupo. Análisis estadístico: *Test de Chi-cuadrado* (**** $p < 0.0001$). Se indican diferencias con el grupo no inyectado.

6.b. La actividad quinasa de hNDR1 compensa parcialmente la pérdida de función de Fry en el desarrollo del eje axial.

A continuación, evaluamos la interacción funcional entre Fry y hNDR1 en la elongación del eje axial y el desarrollo de estructuras anteriores. Para ello, pusimos a prueba la capacidad de las diferentes variantes de hNDR1 de compensar el fenotipo de depleción de Fry en el estadio de brote caudal. Analizamos los embriones según las categorías de alteraciones axiales (Figura 4.5) y observamos que la coinyección dorsal de los ARNm *hNDR1-wt* o *hNDR1-kd* no rescata el efecto de la depleción de Fry (Figura 6.3.b,c,e,f). En cambio, la coinyección del ARNm *hNDR1-PIF* suprimió parcial pero

significativamente las alteraciones axiales en embriones *fry*-deplecionados (Figura 6.3.d,f).



Aunque la mayoría de los embriones coinyectados con el ARNm *hNDR1-PIF* y *fry*-MO presentaron defectos de elongación del eje y por ende fueron incluidos en la categoría "Eje acortado", la severidad del fenotipo de dichos embriones fue claramente menor respecto a los embriones inyectados únicamente con *fry*-MO (Figura 6.3.b,d). Para evidenciar estas observaciones, categorizamos a los embriones según el porcentaje de elongación de su eje axial respecto a la longitud media de los embriones no inyectados. Como puede apreciarse en la Tabla 6.1, la expresión de *hNDR1-PIF* redujo drásticamente los efectos de la depleción de Fry sobre la elongación del eje axial. Este análisis también evidencia que la sobreexpresión de *hNDR1-wt* compensa significativamente la falta de elongación del eje axial causada por la depleción de Fry (Tabla.6.1).

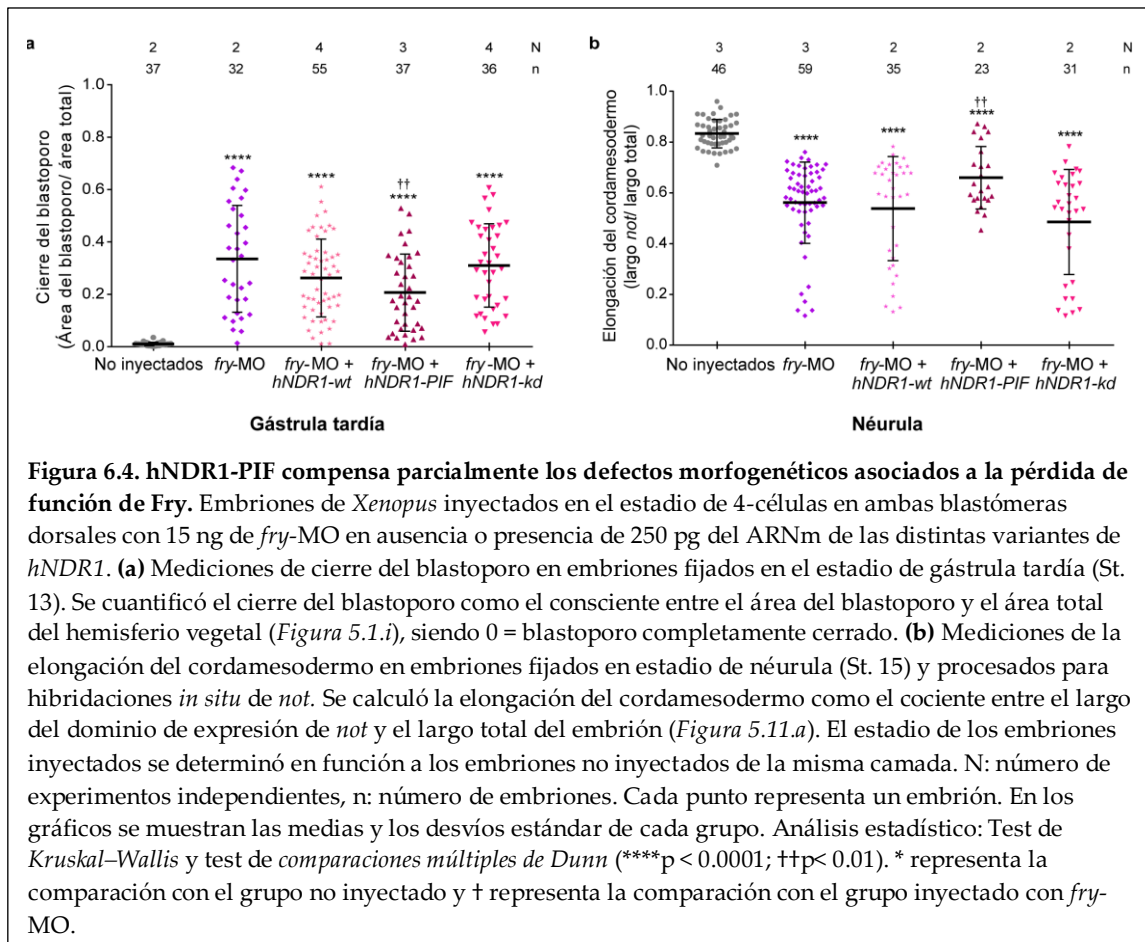
	Porcentaje de elongación de eje			n	N	
	>80%	80-50%	<50%			
No inyectados	100.0	0.0	0.0	51	2	
<i>fry</i> -MO	0.0	51.7	48.3	60	2	****
<i>fry</i> -MO + <i>hNDR1-wt</i>	15.4	48.3	36.3	91	3	****/ ††††
<i>fry</i> -MO + <i>hNDR1-PIF</i>	34.0	60.3	5.7	53	2	****/ ††††
<i>fry</i> -MO + <i>hNDR1-kd</i>	1.9	51.9	46.2	52	2	****

Tabla 6.1. Categorización del porcentaje de elongación del eje axial. Embriones de *Xenopus* en estadio de 4-células fueron inyectados en las dos blastómeras dorsales como se indica en la tabla y fijados en estadio de brote caudal (St. 30). Las dosis inyectadas de *fry*-MO y los ARNm de las variantes de *hNDR1* fueron 15 ng y 250 pg, respectivamente. Los embriones fueron categorizados según el porcentaje de elongación de su eje relativo a la media del grupo no inyectado (considerado 100% de elongación de eje). N: número de experimentos independientes, n: número de embriones. Análisis estadístico: Test de *Chi-cuadrado* (****, ††††p < 0.0001). * representa la comparación con el grupo no inyectado y † representa la comparación con el grupo inyectado con *fry*-MO.

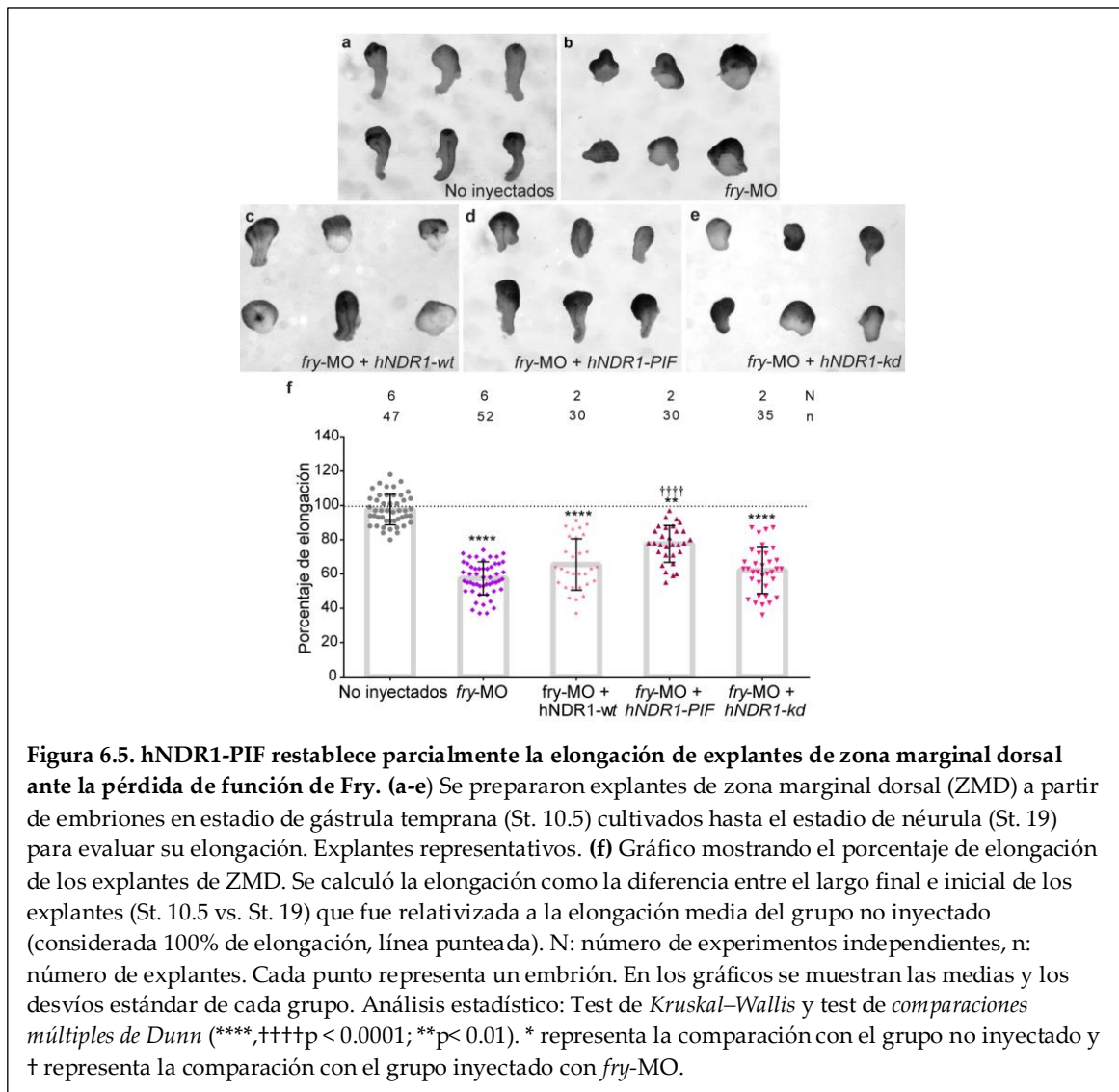
En conjunto, nuestros resultados argumentan a favor de una interacción funcional entre *Ndr1* y *Fry* en el desarrollo del eje axial. Mientras que *hNDR1-PIF* alivia tanto la severidad de las alteraciones axiales como la elongación del eje en embriones *fry*-deplecionados, la compensación que genera la sobreexpresión de *hNDR1-wt* es mucho más moderada (*Figura 6.3.f, Tabla 6.1*). Estos resultados, sumados a la falta de rescate fenotípico por parte de *hNDR1-kd* (*Figura 6.3.f, Tabla 6.1*), indican que la actividad quinasa de *NDR1* es importante para el desarrollo axial y sugieren que durante la embriogénesis de *Xenopus* *Fry* ejerce su función, al menos en parte, mediante la activación de *NDR1*.

6.c. *hNDR1-PIF* rescata parcialmente el cierre del blastoporo y la extensión convergente en embriones *fry*-deplecionados

A la luz de una función conjunta de *Fry* y *Ndr1* en el desarrollo del eje axial, decidimos evaluar la capacidad de las variantes funcionales de *hNDR1* de compensar los defectos morfogénicos asociados a la ausencia de *Fry* durante la gastrulación. Al cuantificar el cierre del blastoporo en embriones fijados en estadio de gástrula tardía, observamos que *hNDR1-PIF* es la única variante que atenúa parcialmente el efecto negativo de la pérdida de función de *Fry* sobre este proceso (*Figura 6.4.a*).



A continuación, estudiamos la participación de Ndr1 en los movimientos de EC del cordamesodermo. En primera instancia, cuantificamos la elongación de la línea media dorsal en el estadio de néurula, medida a partir de la longitud del dominio de expresión de *not* (Figura 5.11.a) (Ewald, 2004). En concordancia con nuestros resultados anteriores, la coinyección de *hNDR1*-PIF y *fry*-MO rescató modesta pero significativamente la elongación del mesodermo dorsal, mientras que esto no se evidencia con las otras dos variantes de *hNDR1* (Figura 6.4.b). Por otro lado, analizamos la elongación de explantes de ZMD y observamos que la expresión de *hNDR1*-PIF compensó parcialmente la pérdida de función de Fry (Figura 6.5.d,f). Si bien los explantes provenientes de embriones coinyectados con *hNDR1*-wt o *hNDR1*-kd y *fry*-MO elongaron sutilmente, las diferencias no fueron significativas respecto a los explantes *fry*-deplecionados (Figura 6.5.c,e,f).

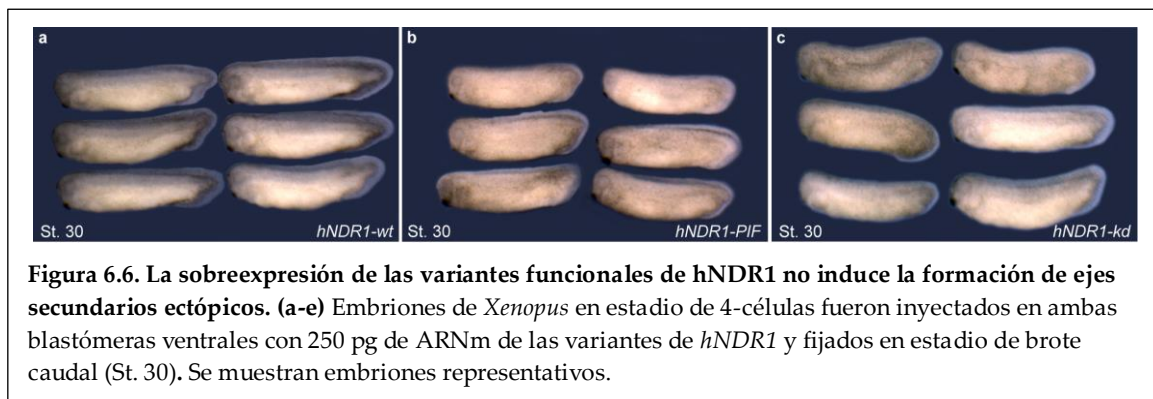


En conjunto, nuestros resultados demuestran una interacción funcional entre Fry y Ndr1 durante la gastrulación de *Xenopus*, especialmente la EC de los tejidos dorsales. El hecho de que solo la variante hiperactiva de hNDR1 compense la ausencia de Fry en estos procesos morfogénicos evidencia un rol de Fry como activador de la actividad quinasa de Ndr1. Por lo tanto, estos resultados confirman nuestra hipótesis de una función evolutivamente conservada de Fry/Ndr1 en morfogénesis de vertebrados.

6.d. Funciones de Fry independientes de Ndr1: capacidad dorsalizante

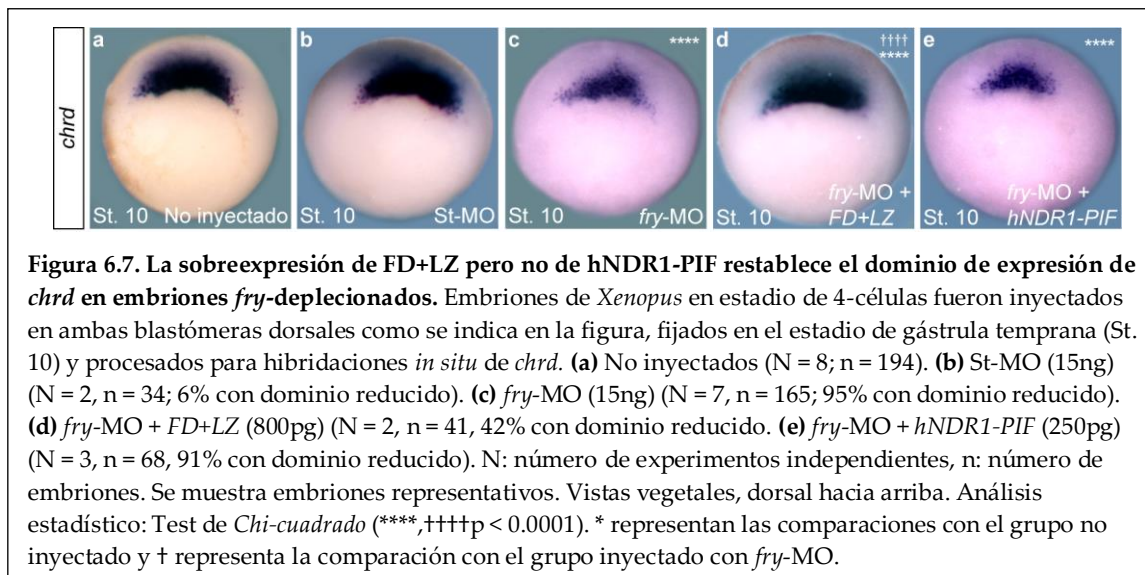
Nuestros resultados y trabajos previos indican que Fry juega un papel importante en el establecimiento de destinos celulares (*Figura 4.6*) (Espíritu et al., 2018; Goto et al., 2010). Esta evidencia sumada al enriquecimiento asimétrico de los transcritos de *fry*

durante los estadios de clivaje (*Figura 4.2*), apuntan a una función temprana de Fry en el desarrollo de *Xenopus*. En este sentido, la sobreexpresión de Fry en blastómeras ventrales induce la formación de un eje secundario incompleto, lo que sugiere que Fry posee propiedades dorsalizantes (*Figura 1.8*) (Goto et al., 2010). Sin embargo, la participación de Ndr en estos procesos inductivos no ha sido explorada en profundidad. En el trabajo de (Goto et al., 2010) reportaron que la sobreexpresión ventral de NDR1 y NDR2 no afecta el desarrollo del eje axial de los embriones. En este contexto, decidimos evaluar la capacidad de las variantes funcionales de hNDR1 de inducir un eje secundario en los tejidos ventrales. En concordancia con el trabajo de (Goto et al., 2010), no observamos formación de ejes ectópicos o anomalías de eje al inyectar el ARNm de *hNDR1-wt*. Tampoco observamos alteraciones al inyectar las otras variantes de *hNDR1* (*Figura 6.6*). Estos resultados indican que a diferencia de Fry, la sobreexpresión ventral de hNDR1 no es suficiente para modificar el destino celular de los tejidos ventrales y por lo tanto no posee capacidad dorsalizante.



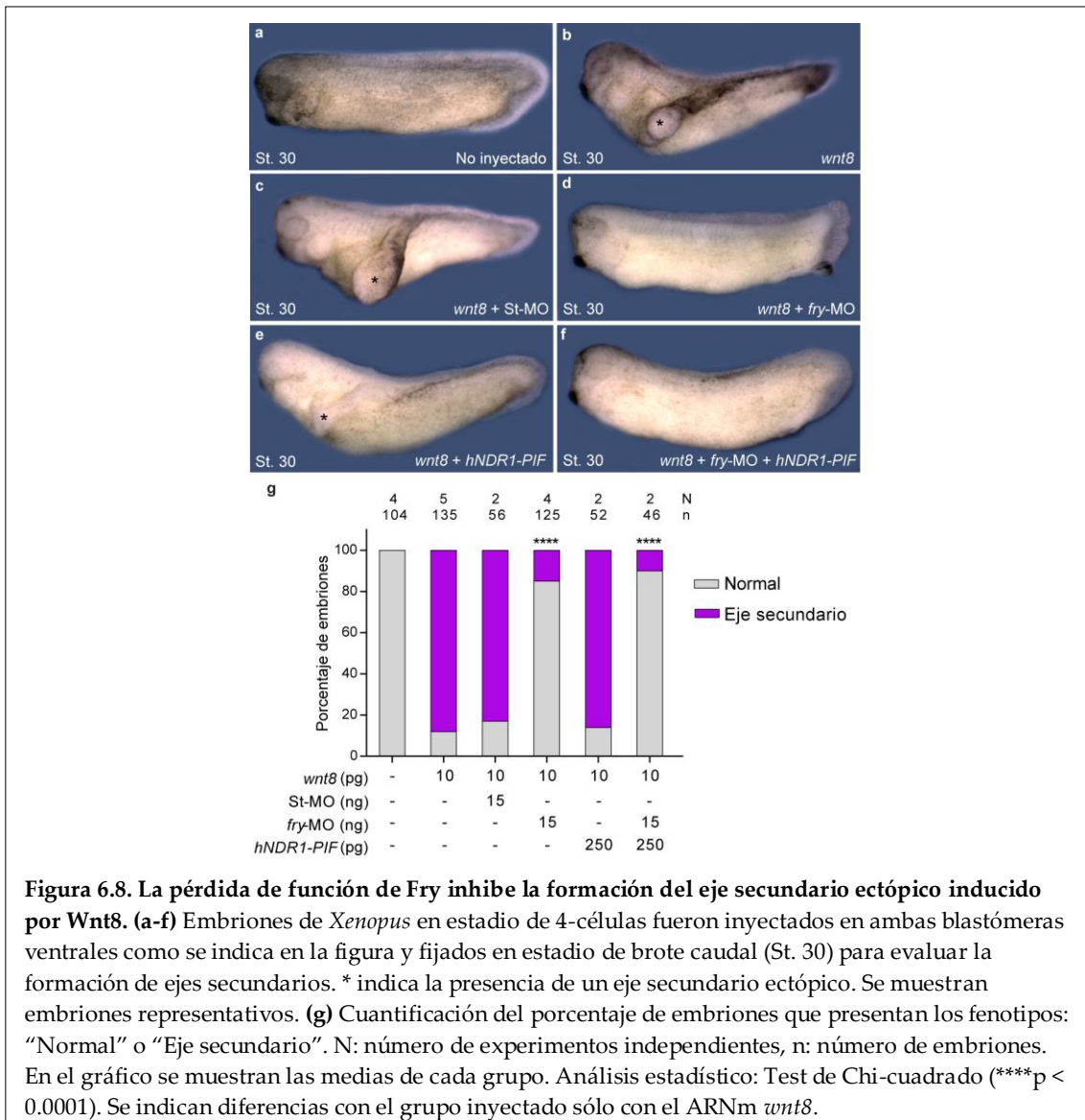
En el estadio de blástula, la actividad conjunta de la vía Wnt/ β -catenina y la vía Nodal activa la expresión de genes específicos del organizador dorsal de la gástrula (De Robertis et al., 2001; Ding et al., 2017; Niehrs, 2004). Entre dichos genes se encuentra *chrd*, un antagonista de la vía BMP que impide la ventralización de los futuros tejidos dorsales limitando la expansión del organizador ventral (De Robertis et al., 2000). Las evidencias indican que Fry regula directa o indirectamente los niveles de expresión de *chrd* en embriones de *Xenopus* (*Figura 4.6.c-c''*) (Goto et al., 2010). En este contexto, evaluamos si la construcción FD+LZ es capaz de restablecer la expresión de *chrd* en embriones *fry*-deplecionados. Efectivamente, la coinyección del ARNm FD+LZ junto con *fry*-MO rescató significativamente el tamaño del dominio de expresión de

chrd (Figura 6.7.c,d). Este resultado indica que los dominios funcionales FD y LZ de Fry compensan, al menos parcialmente, la pérdida de función de Fry en el establecimiento de destinos dorsales. A la luz de estos resultados y considerando la interacción funcional entre Fry y Ndr1 durante la gastrulación (Figuras 6.4 y 6.5), decidimos evaluar el efecto de la expresión de hNDR1-PIF sobre el dominio de expresión de *chrd* en embriones *fry*-deplecionados. Al coinyectar el ARNm *hNDR1-PIF* junto con *fry*-MO, no obtuvimos diferencias en la proporción de embriones con dominio de expresión reducido (Figura 6.7.c,e). Esto sugiere que Ndr1 no participa en la regulación que ejerce Fry sobre la expresión de *chrd* a inicios de la gastrulación y constituye una evidencia de que la función dorsalizante de Fry es independiente de Ndr1.



A continuación, teniendo en cuenta la importancia de la vía Wnt/ β -catenina en la inducción de destinos dorsales y en el establecimiento de los ejes embrionarios (Figura 1.1) (Harland and Gerhart, 1997), decidimos investigar si Fry es capaz de modular la actividad de esta vía de señalización. Para ello, utilizamos como estrategia experimental la formación de un eje secundario completo por expresión ectópica de Wnt8 (ligando de la vía Wnt) en blastómeras ventrales (Maia et al., 2017; Smith and Harland, 1991). La inyección ventral del ARNm *wnt8* solo o junto con St-MO indujo la formación de un eje secundario en más del 80% de los embriones (Figura 6.8.b,c,g). Notablemente, la coinyección de *fry*-MO junto con *wnt8* redujo significativamente la incidencia de ejes secundarios ectópicos (Figura 6.8.d,g). Este resultado indica que Fry es necesario para el efecto dorsalizante de Wnt8.

Por otro lado, decidimos poner a prueba la capacidad de Ndr1 de modular la actividad de la vía Wnt canónica. La coinyección del ARNm *hNDR1-PIF* junto al de *wnt8* no modificó la proporción de embriones que presentaron eje secundario (Figura 6.8.e,g). En congruencia con los resultados anteriores (Figura 6.7.e), la expresión de *hNDR1-PIF* tampoco compensó el efecto inhibitorio de la pérdida de función de Fry sobre la actividad dorsalizante de Wnt8 (Figura 6.8.f,g). En suma, estos resultados apuntan a un rol de Fry en la modulación de la vía canónica Wnt/ β -catenina y sugieren que esta función sería independiente de la quinasa Ndr1.



7.a. Expresión materna de *fry*

En la mayoría de los invertebrados y vertebrados, el desarrollo adecuado del embrión depende de la distribución asimétrica de ARNs maternos en el citoplasma del huevo. En *Xenopus*, este proceso ocurre durante el largo período de diferenciación y crecimiento de los oocitos en el ovario (Kloc et al., 2001). Este mecanismo postranscripcional restringe la síntesis de proteínas temporal y espacialmente, jugando un papel fundamental en el establecimiento de polaridad y adquisición de destino celular (King et al., 2005). *Fry* ha sido descrito como un gen de expresión materna en *Xenopus*, dado que sus transcritos son detectados en el huevo (Goto et al., 2010; Session et al., 2016). Sin embargo, su distribución espacial durante la oogénesis no había sido explorada. Considerando la importancia de la compartimentalización de ARNs maternos durante el desarrollo temprano, analizamos el patrón de expresión de *fry* durante el crecimiento y maduración de los oocitos por HIS. Establecimos que el ARNm de *fry* está presente en oocitos a partir del primer estadio de crecimiento (Figura 4.1). Hemisecciones de oocitos inmaduros revelaron un enriquecimiento de los transcritos cerca de la vesícula germinal (Figura 4.1), probablemente resultado de la difusión pasiva de los transcritos desde el hemisferio animal hacia el resto del oocito (Sidova et al., 2015) y no a un mecanismo activo que los confine a dominios citoplasmáticos específicos.

En el huevo u oocito maduro en St. VI, el ARNm de *fry* se acumula en el hemisferio animal (Figura 4.2). En presencia de hormonas sexuales, los oocitos de mayor tamaño (St. V y VI) se liberan del arresto meiótico, mientras que los oocitos más pequeños (St I-IV) no son competentes a esta inducción (Jesus et al., 2020; Meneau et al., 2020). Este proceso de maduración evita la generación de huevos haploides de

tamaño insuficiente y está regulado por una compleja cascada de señalización. El paso limitante que desencadena el desarresto meiótico es la activación del *factor de promoción de la maduración* (FPM), en la cual está involucrada la Plk1 (Karaiskou et al., 2004; Meneau et al., 2020). En células de mamíferos, Fry promueve la activación de la Plk1 durante la división celular, siendo esencial para la localización de esta quinasa en los centriolos (Ikeda et al., 2012). Al igual que *fry*, los transcritos de *plk1* son detectados en oocitos de *Xenopus* en estadios de crecimiento y se ven enriquecidos en el hemisferio animal del huevo (Karaiskou et al., 2004; Sindelka et al., 2018). A pesar de la presencia de su ARNm en estadios más tempranos, la proteína Plk1 comienza a acumularse en el St V, momento en cual se activa el FPM y el oocito se vuelve competente para reanudar la meiosis (Karaiskou et al., 2004). Lamentablemente se desconoce la dinámica de traducción de Fry durante la ovogénesis y el desarrollo temprano de *Xenopus*. Elucidar el rol de esta proteína en el proceso de maduración meiótica y en la regulación de la actividad de Plk1 en oocitos, requerirá de futuros esfuerzos.

El enriquecimiento animal de *fry* en el huevo se mantiene durante los estadios de clivaje y TBM (Figura 4.2). Esta distribución asimétrica podría ser el resultado de un mecanismo de transporte o retención activo de los transcritos hacia o en el hemisferio animal, o bien a su degradación específica en el dominio vegetal. En *Xenopus*, las tres capas germinales se especifican a lo largo del eje animal-vegetal del huevo por actividad asimétrica de determinantes maternos (Barresi and Gilbert, 2019; Kloc et al., 2001). Por lo tanto, la polarización de los transcritos de *fry* apunta a una función temprana de esta proteína en el establecimiento de destinos celulares. Si bien no conocemos la distribución espacial de la proteína Fry endógena, lo más probable es que su localización se vea restringida al hemisferio animal durante los estadios de blástula. Esta región constituye el TBC, el denominado “casquete animal”, compuesto por células pluripotentes que se diferencian en tejido ectodérmico durante la gastrulación (Barresi and Gilbert, 2019). En este sentido, es posible que Fry esté involucrada en el mantenimiento del estado pluripotente de las células animales durante los estadios de clivaje y/o en la posterior adquisición de destino celular de los tejidos ectodérmicos. En consistencia, si bien la expresión de *fry* se expande hacia la zona marginal de la gástrula, su expresión persiste en derivados ectodérmicos durante todo el desarrollo

embrionario de *Xenopus* (Figuras 1.6 y 4.3) (Espiritu et al., 2018). Por lo expuesto, estudiar los mecanismos que generan la distribución asimétrica de los transcritos de *fry* y su relevancia funcional durante los primeros estadios de desarrollo de *Xenopus*, podría contribuir a la comprensión de los procesos que establecen las asimetrías tempranas del embrión.

7.b. Expresión embrionaria de *fry*

Los dramáticos movimientos celulares que tienen lugar durante la gastrulación segregan las capas germinales presuntivas y ponen en contacto tejidos previamente distantes. La regulación de la expresión génica en esta etapa es fundamental para que las distintas poblaciones celulares mantengan su competencia, sean capaces de percibir y emanar señales inductivas, adquieran un destino celular y ejecuten movimientos morfogénicos específicos (Barresi and Gilbert, 2019). En este contexto, al comienzo de la gastrulación los transcritos de *fry* están presentes en el hemisferio animal y en la zona marginal, región que corresponde al mesodermo prospectivo y en la cual se inician los movimientos gastrulatorios (Figura 4.3). Consistentemente, la pérdida de función de Fry en blastómeras ventrales afecta el desarrollo del riñón, derivado del mesodermo ventral, mientras que la pérdida de función en blastómeras dorsales afecta la formación del organizador dorsal de la gástrula y el desarrollo de tejidos mesodérmicos dorsales (Figuras 4.6-4.8). En este sentido, la pérdida de función de Fry en el lado dorsal altera el movimiento de las células superficiales de la ZMD durante la involución (Figura 5.4). A medida que avanza la gastrulación, *fry* se enriquece en tejidos de la línea media dorsal que experimentan EC (Figura 4.3) y su función es necesaria para que ocurra este proceso morfogénico (Figura 4.8 y 5.10). Asimismo, Fry se expresa en el MPP y su pérdida de función reduce el dominio de expresión de genes específicos y afecta el comportamiento migratorio de sus células (Figura 4.3, 4.6 y 5.10). En suma, nuestros resultados indican que el patrón de expresión temprano de *fry* es consistente con su función en especificación de destino celular y morfogénesis.

Durante el desarrollo de zebrafish, los transcritos de *fryb* (ortólogo de *fry*) son detectados en la capa envolvente del blastodermo durante la gastrulación y con posterioridad en la notocorda, los somitos y regiones del cerebro (Thisse et al., 2001).

Por otro lado, en embriones E14.5 de ratón, *fry* se expresa en regiones del cerebro, la médula espinal, los ganglios del sistema nervioso periférico, el esqueleto axial (huesos craneales, vértebras y costillas) y huesos de las extremidades (Diez-Roux et al., 2011). El patrón de expresión de Fry en estos dos organismos concuerda con el observado en *Xenopus* (Espiritu et al., 2018). Si bien estas evidencias sugieren funciones conservadas de Fry en la gastrulación y el desarrollo del eje axial, la función de esta proteína en el desarrollo de otros vertebrados no ha sido estudiada.

Fry se expresa también en la zona marginal ventral de la gástrula de *Xenopus* y luego en el mesodermo ventral (*Figura 4.3*), permaneciendo en el riñón y el corazón en estadios posteriores (*Figura 1.6*) (Espiritu et al., 2018). En modelos murinos, el ARNm de *fry* fue detectado en tejido cardíaco y renal (Byun et al., 2018; Ren et al., 2013). Mientras nuestro laboratorio ha aportado evidencias de la importancia de Fry en el establecimiento del primordio pronéfrico en *Xenopus* (Espiritu et al., 2018), el rol de esta proteína en el desarrollo cardíaco no ha sido explorado. Elucidar la función de Fry en los tejidos ventrales, requerirá de futuros esfuerzos.

7.c. Los dominios funcionales de la proteína Fry y su localización subcelular

La distribución subcelular de las proteínas está estrechamente relacionada con su función celular, resultando particularmente relevante su estudio en proteínas como Fry, cuyos dominios funcionales no han sido caracterizados. Fry presenta entre 5 y 7 regiones de variable conservación evolutiva. En general, estas regiones no presentan dominios funcionales reconocibles que permitan predecir sus funciones, a excepción del dominio N-terminal Furry (FD) y el dominio C-terminal LZ, exclusivo de vertebrados (*Figura 1.5.a*) (Gallegos and Bargmann, 2004; Goto et al., 2010; Nagai and Mizuno, 2014). El FD es el dominio más conservado y consiste en repeticiones HEAT/Armadillo (Gallegos and Bargmann, 2004). En eucariotas, existe una gran cantidad de proteínas con dominios HEAT/Armadillo que cumplen diversas e importantes funciones celulares, incluyendo el transporte nuclear, la condensación cromosómica, la adhesión celular y la expresión génica (Tewari et al., 2010). Estas estructuras tridimensionales funcionan como andamiajes de grandes complejos proteicos y experimentan cambios conformacionales altamente flexibles cuando

interactúan con otras proteínas o frente a cambios del contexto mecánico (Yoshimura and Hirano, 2016). Un buen representante de este tipo de proteínas es el efector de la vía Wnt canónica, β -catenina, que juega un papel importante en adhesión celular y expresión génica, actuando como nexo de muchas redes de señalización celular (Tewari et al., 2010). Estas funciones de β -catenina están mediadas por la unión mutuamente excluyente de cadherinas y componentes de la vía Wnt a las repeticiones HEAT/Armadillo (Xu and Kimelman, 2007), que además tienen la capacidad de interactuar con MT regulando su crecimiento y organización en la mitosis (Huang et al., 2007). Es posible especular entonces, que las repeticiones HEAT/Armadillo presentes en el dominio FD le confieran a Fry la capacidad de interactuar con diversas proteínas en un contexto celular dado, actuando como un “anfitrión” para la formación de complejos multiproteicos. Por otro lado, el dominio LZ posee un motivo *leucine-zipper* y dos motivos *coiled-coil* (Goto et al., 2010; Nagai and Mizuno, 2014). Si bien estos motivos suelen estar implicados en la formación de heterodímeros con proteínas que presentan estructuras helicoidales similares (Lupas and Gruber, 2005; Szczepaniak et al., 2020), se desconocen proteínas que interactúen con LZ. Cabe mencionar también, que en células de mamíferos se ha reportado la interacción de Fry con proteínas por fuera de los dominios FD y LZ (Ikeda et al., 2012; Irie et al., 2020). Asimismo, se ha propuesto la presencia de dominios auto-inhibitorios que modulan la función de Fry, impidiendo su interacción con otras proteínas. Es posible que existan señales río arriba de Fry, como por ejemplo su fosforilación, que induzcan cambios conformacionales que la liberen de la auto-inhibición (Chiba et al., 2009; Ikeda et al., 2012; Nagai and Mizuno, 2014). En este sentido, la fosforilación de la treonina 2516 de FRY por parte de Cdk1 al inicio de la mitosis, permite su interacción con Plk1 (Ikeda et al., 2012). Sin embargo, se conoce muy poco sobre estos mecanismos regulatorios.

Nuestros resultados muestran que una versión quimérica de Fry que contiene solo los dominios FD y LZ rescata parcialmente los efectos de la pérdida de función de esta proteína durante el desarrollo del eje axial (*Figura 4.5*). En congruencia, la expresión de *FD+LZ* compensa parcialmente disrupciones morfogénicas en embriones *fry*-deplecionados (*Figuras 5.1 y 5.11*), y reestablece el dominio de expresión de *chrd* en el organizador dorsal de la gástrula (*Figura 6.7*) y de *pax8* en el anlage

pronéfrico (Espiritu et al., 2018). Ha sido reportado que la expresión de FD+LZ en tejidos dorsales induce la formación de un eje secundario, mientras que cada dominio aislado no tienen esta capacidad (Goto et al., 2010). Estas evidencias apuntan a que FD y LZ son esenciales para la función de Fry en el desarrollo temprano, pero sugieren el requerimiento de otras regiones adicionales. Por lo tanto, la identificación de proteínas que interaccionan con Fry, los dominios que intervienen y el contexto celular en el que lo hacen, será de gran importancia para elucidar los eventos celulares regulados por esta proteína.

Respecto a la distribución subcelular, la proteína Fry endógena ha sido detectada en el citoplasma y en la membrana plasmática de células humanas HeLa, y de células epidérmicas del ala pupal y células foliculares de la cámara del huevo de *Drosophila* (Chiba et al., 2009; He et al., 2005; Horne-Badovinac et al., 2012; Irie et al., 2020). Además, se ha reportado la localización nuclear de Fry en glándulas salivales y cuerpos grasos de *Drosophila* (He et al., 2005). Un estudio en *Drosophila* empleando un transgén Fry-GFP, reveló que dicha proteína de fusión está enriquecida en el extremo de cerdas en crecimiento y en dendritas de neuronas sensoriales, y presenta movimientos rápidos y bidireccionales por estas estructuras (Fang et al., 2010). En células de mamíferos, Fry presenta ubicación citoplasmática difusa durante la interfase, mientras que durante la división celular se localiza en los husos mitóticos uniéndose directamente a MT (Chiba et al., 2009; Nagai et al., 2013). Pese a que durante el desarrollo de *Xenopus* se desconoce la ubicación espacio-temporal de la proteína Fry endógena, ha sido reportado que la proteína de fusión Fry-GFP se localiza en el núcleo y el citoplasma celular en células mesodérmicas aisladas de gástrulas tempranas (Goto et al., 2010). De igual modo, la versión quimérica de fusión FD+LZ-GFP se localiza en ambos compartimentos celulares. En contraste, LZ-GFP se ubica mayoritariamente en el núcleo, mientras que FD-GFP se acumula en el citoplasma (Goto et al., 2010). En este trabajo, analizamos la localización de Fry-GFP en explantes de ZMD a fin de preservar el contexto celular y tisular. Observamos que en células del cordamesodermo y de la CPE, Fry-GFP se localiza mayoritariamente en el citoplasma y la membrana celular, quedando excluida del núcleo (Figura 4.4). En conjunto, la evidencia previa y nuestros resultados sugieren que la localización subcelular de Fry es un proceso altamente

regulado, posiblemente mediado por interacción de diferentes proteínas a sus distintos dominios funcionales, que depende del tipo celular y del contexto temporal y espacial. Futuros esfuerzos en el laboratorio serán dirigidos a investigar los mecanismos que regulan la localización subcelular de la proteína Fry en el desarrollo temprano de *Xenopus*.

7.d. La importancia de Fry en los movimientos gastrulatorios de *Xenopus*

La gastrulación es el proceso morfogénético más relevante de la embriogénesis animal, durante el cual se establece el plan corporal básico del embrión (Leptin, 2005; Solnica-Krezel and Sepich, 2012). Si bien Fry cumple funciones asociadas a morfogénesis en levaduras e invertebrados (Cong et al., 2001; Du and Novick, 2002; Emoto et al., 2004; Fang and Adler, 2010; Gallegos and Bargmann, 2004; He et al., 2005; Hirata et al., 2002; Horne-Badovinac et al., 2012; Nelson et al., 2003; Norkett et al., 2020), su rol durante la gastrulación de vertebrados no había sido explorado. En este trabajo, establecimos que la pérdida de función de Fry altera la ejecución de varios movimientos morfogénéticos durante la gastrulación de *Xenopus*, incluidos la involución de la ZMI, la migración colectiva del MPP y la EC del cordamesodermo. En conjunto, nuestros resultados muestran por primera vez un papel de Fry como regulador de morfogénesis en vertebrados.

En anfibios, la especificación del eje dorso-ventral está estrechamente vinculada, y en última instancia, determina los procesos que establecen el eje axial (Carron and Shi, 2016). Esto se debe a que la actividad del organizador dorsal de la gástrula inicia los movimientos gastrulatorios en la ZMD (De Robertis et al., 2000; Niehrs, 2004). Teniendo en cuenta que Fry regula la expresión de genes específicos del organizador (Figura 4.6), es posible que los defectos morfogénéticos en embriones *fry*-deplecionados sean causados primariamente por fallas en la adquisición de destino celular. Sin embargo, la pérdida de función de Fry impacta moderadamente sobre el *patterning* de los tejidos axiales, dado que los embriones desarrollan notocorda, somitos y tubo neural (Figura 4.7). Como ha sido demostrado en embriones expuestos a radiación UV leve, los procesos morfogénéticos de la línea media dorsal tienen lugar normalmente

aún en ausencia de notocorda (Malacinski and Youn, 1981). Por consiguiente, el efecto negativo de la depleción de Fry sobre el establecimiento del organizador dorsal no explica los defectos morfogénicos severos que presentan los tejidos dorsales. Por otro lado, las anomalías en el desarrollo cefálico en embriones *fry*-deplecionados podrían ser atribuidas a la expresión disminuida de genes específicos del MPP. No obstante, interrupciones de la vía Wnt/PCP, que no afectan el establecimiento de destinos celulares, generan defectos en el desarrollo de estructuras anteriores debido a alteraciones morfogénicas (Heisenberg et al., 2000). Por consiguiente, es difícil discriminar si el efecto de la pérdida de función de Fry sobre el *patterning* de estructuras anteriores es el resultado de alteraciones en la adquisición de destinos celulares, deficiencias morfogénicas, o ambas.

Entre los múltiples movimientos celulares involucrados en el cierre del blastoporo, existen dos tipos de movimientos convergentes intrínsecos de la ZMI: la EC que ocurre exclusivamente en los tejidos dorsales a partir de estadio de gástrula media, y el engrosamiento convergente que opera en todos los tejidos circumblastoporales preinvolutivos (Keller et al., 1985; Shook et al., 2018). La pérdida de función de Fry en los tejidos dorsales genera un retraso temporal en el cierre del blastoporo y el cierre ocurre de manera más concéntrica y en posición más central respecto a embriones no inyectados (*Figuras 5.1 y 5.2*). Como fue demostrado en embriones ventralizados, el engrosamiento convergente es capaz de impulsar el cierre del blastoporo por sí solo en ausencia de EC, aunque de forma menos eficiente (Shook et al., 2018). Las similitudes que presenta el cierre del blastoporo en embriones *fry*-deplecionados y embriones ventralizados (*Figura 5,2 y Video 5.1*), sugiere que el engrosamiento convergente opera incluso en ausencia de Fry. Consistentemente, en la región pre-involutiva se observa un amontonamiento de células cerca del LDB en embriones *fry*-deplecionados (*Figura 5.5*). Este hecho no solo refuerza la idea de que los tejidos circumblastoporales experimentan engrosamiento convergente, sino que también revela una falta de coordinación entre las fuerzas que operan en el sistema. En este sentido, la pérdida de función de Fry en los tejidos dorsales inhibe la EC del cordamesodermo y la migración activa del MPP (*Figuras 5.10 y 5.11*). Podemos concluir entonces, que las alteraciones de cierre del blastoporo que presentan estos embriones son consecuencia de deficiencias

en los movimientos celulares de la zona pre-involutiva y los movimientos post-involutivos de los tejidos dorsales. No obstante, no se puede descartar la contribución de otros procesos morfogénéticos como por ejemplo la epibolia del TBC, que no fue explorada en este trabajo.

Llamativamente, la pérdida de función de Fry reduce la abundancia de FN fibrilar en la hendidura de Brachet (*Figura 5.8*). Esta MEC juega un papel esencial durante la gastrulación, proveyendo soporte mecánico sobre el cuál las células migran, siendo fuente de señalización vía integrinas o actuando como superficie de acumulación estratégica de morfógenos (Davidson et al., 2004; Davidson et al., 2006; Rozario et al., 2009). La ausencia de FN genera un retraso en el cierre del blastoporo similar al observado por depleción de Fry (Davidson et al., 2006), por lo que se puede inferir que la alteración de esta MEC contribuye a los defectos morfogénéticos causados por la pérdida de función de Fry. Sin embargo, en ausencia de Fry, las células del mesodermo axial presentan comportamientos morfogénéticos alterados aun cuando son provistas de un sustrato de FN exógeno (*Figuras 5.9 y 5.11*), sugiriendo la existencia de alteraciones celulares adicionales. En este sentido, durante la autoevolución y *tilling* dendrítico de neuronas en *Drosophila*, mutaciones de *fry* y *trc* generan el desprendimiento de las dendritas de su MEC, lo que es rescatado por la sobreexpresión de integrinas (Han et al., 2012). Es posible especular entonces, que la función de Fry sería requerida para la correcta organización de la MEC y la adhesión de las células mesodérmicas post-involutivas a su matriz de FN asociada.

7.e. Posibles mecanismos celulares por los que opera Fry durante la gastrulación

Si bien nuestro trabajo muestra por primera vez la importancia de la proteína Fry como reguladora de los movimientos morfogénéticos durante la gastrulación, aún quedan muchas preguntas por responder en relación a los mecanismos celulares y moleculares por los cuales opera. No obstante, basándonos en nuestros resultados y en publicaciones previas, podemos formular varias hipótesis no excluyentes al respecto.

Nuestros resultados muestran que la pérdida de función de Fry inhibe el CIM en células del cordamesodermo y en consecuencia, la EC de los tejidos axiales (*Figuras 5.11 y 5.12*). Este movimiento morfogenético involucra una regulación fina del citoesqueleto de actina y contracciones de actomiosina, para lo cual es requerida la activación coordinada y precisa de las pequeñas GTPasas RhoA/Rac (Kim and Davidson, 2011; Koster et al., 2010; Pfister et al., 2016; Shindo et al., 2019; Tahinci and Symes, 2003). Teniendo en cuenta los defectos morfogenéticos y de polaridad celular que observamos en células del mesodermo dorsal en ausencia de Fry, es posible relacionar la función de Fry con la regulación de la estructura y dinámica del citoesqueleto. En este sentido, Fry y Trc regulan la organización de actina durante el alargamiento de la cámara del huevo y la morfogénesis de la epidermis del ala de *Drosophila*. Además, la función de Mor2 (Fry) es requerida para la localización de F-actina en el sitio de tabicamiento de la levadura *S. pombe* (Fang and Adler, 2010; Hirata et al., 2002; Horne-Badovinac et al., 2012). Asimismo, varios trabajos, en *C. elegans* y *Drosophila*, vinculan a la vía Fry/Ndr con la regulación de pequeñas GTPasas de la familia Rho (Gallegos and Bargmann, 2004; He et al., 2005). Por otra parte, en *Drosophila*, Fry/Trc regulan la densidad de MT en aristas laterales e inhiben el crecimiento de neuritas mediante un mecanismo que involucra el deslizamiento de MT (He et al., 2005; Norkett et al., 2020). Fry también promueve la acetilación de los MT del huso durante la división celular en cultivos de células HeLa (Nagai et al., 2013). Futuros esfuerzos en nuestro laboratorio estarán destinados a estudiar la función de Fry sobre la regulación de la estructura, dinámica y polarización de MT y del citoesqueleto de actomiosina, como así también sobre la modulación de pequeñas GTPasas de la familia Rho.

Existen también evidencias que sugieren que la función de Fry está vinculada a la adhesión de las células mesodérmicas a su MEC asociada, afectando en consecuencia su comportamiento morfogenético. En *Xenopus*, la interacción FN-integrinas promueve el establecimiento y el mantenimiento de protrusiones polarizadas que impulsan la migración activa del MPP y el CIM del cordamesodermo (Davidson et al., 2006; Huang and Winklbauer, 2018b). Asimismo, la unión de los dímeros solubles de FN a integrinas, gatilla la formación de fibrillas de FN modificando la organización tridimensional y las propiedades mecánicas de la MEC (Rozario and DeSimone, 2010;

Rozario et al., 2009). En este sentido, nuestro trabajo muestra que en ausencia de Fry se pierde tanto la configuración espacial de la MEC, como el comportamiento morfogénico de los tejidos mesodérmicos (*Figuras 5.7, 5.10 y 5.12*). Dado que en neuronas de *Drosophila*, Fry promueve la unión de las dendritas a la MEC mediante un mecanismo celular no identificado pero que involucra a integrinas (Han et al., 2012), es posible que la proteína Fry de *Xenopus* regule la capacidad de las células post-involutivas de interactuar con la matriz de FN. El requerimiento funcional de Fry sobre la vía de adhesión celular de integrinas será analizado en futuros estudios.

Es posible también que Fry regule la orientación de las divisiones celulares durante la gastrulación. Este proceso es esencial para el establecimiento de la polaridad celular, el movimiento celular polarizado y la morfogénesis de los tejidos en desarrollo (Concha and Adams, 1998; Gong et al., 2004; Kieserman and Wallingford, 2009). En células de mamíferos en cultivo, Fry cumple una función importante en la división celular, regulando la alineación de los cromosomas y la orientación de los husos mitóticos (Chiba et al., 2009; Ikeda et al., 2012; Nagai et al., 2013). En particular, la división celular polarizada es de suma importancia durante la epibolia del hemisferio animal (Barresi and Gilbert, 2019; Szabó et al., 2016; Rozario et al., 2009), no así en las células del mesodermo dorsal que no se dividen durante la gastrulación (Murakami et al., 2004; Saka and Smith, 2001). Teniendo en cuenta que en la gástrula de *Xenopus* Fry se expresa en la CPE del TBC (*Figura 4.3*), sería interesante estudiar el efecto de su depleción sobre la orientación de los husos mitóticos en estas células durante la epibolia.

Durante la elongación del eje axial, una de las principales vías de señalización involucrada en la regulación del comportamiento polarizado de las células dorsales, es la vía no-canónica Wnt/PCP. Perturbaciones en esta vía, ya sea por atenuación o exacerbación de su actividad, afectan la EC y el cierre de blastoporo (Butler and Wallingford, 2017; Darken et al., 2002; Goto and Keller, 2002; Goto et al., 2005; Gray et al., 2011; Keller, 2002; Medina et al., 2004; Sokol, 1996; Takeuchi et al., 2003; Wallingford et al., 2000). La desregulación de la vía Wnt/PCP inhibe el CIM en células del cordamesodermo y altera la organización polarizada de la matriz fibrilar de FN

asociada (Goto et al., 2005; Gray et al., 2011; Wallingford et al., 2000). Teniendo en cuenta que los fenotipos de pérdida de función de Fry se asemejan a disrupciones de la vía Wnt/PCP, es posible que en células del mesodermo dorsal, la función celular de Fry involucre efectores comunes con esta vía (Goto and Keller, 2002; Goto et al., 2005; Keller, 2002; Wallingford et al., 2000). Asimismo, el hecho de que la sobreexpresión dorsal de la proteína quimérica FD+LZ resulta en embriones con fenotipos similares al fenotipo de pérdida de función de Fry (*Figura 4.5*), sugiere la participación de Fry en una vía de polaridad celular. En este contexto, durante el *tilling* dendrítico de neuronas sensoriales de *Drosophila*, Fry/Trc interactúan genéticamente con componentes de la vía Wnt/PCP y con pequeñas GTPasas de la familia Rho (Emoto et al., 2004; Matsubara et al., 2011). Futuros esfuerzos de nuestro laboratorio serán puestos en determinar el nivel de interacción física y funcional entre los componentes de la vía Wnt/PCP y Fry durante la gastrulación de *Xenopus*.

7.f. Interacción funcional entre Fry y Ndr1

Los trabajos en levaduras, invertebrados y el nuestro en *Xenopus*, demuestran un rol de Fry vinculado a la activación de las quinasas Ndr en morfogénesis (*Figuras 6.4 y 6.5*) (Cong et al., 2001; Du and Novick, 2002; Emoto et al., 2004; Gallegos and Bargmann, 2004; Hirata et al., 2002; Horne-Badovinac et al., 2012; Nelson et al., 2003; Norkett et al., 2020; Wang and Fang, 2010). Mediante experimentos de rescate utilizando tres variantes de NDR1 humana, establecimos que la variante hiperactiva hNDR1-PIF, es la única capaz de revertir consistentemente los defectos morfogénicos causados por la depleción de Fry (*Figuras 6.3- 6.5*). El hecho de que rescate del fenotipo de embriones *fry*-deplecionados por parte de hNDR1-PIF sea parcial, puede deberse a que Fry posea funciones independientes de esta quinasa en el desarrollo de *Xenopus*. Si bien esto ha sido mostrado en el *tilling* dendrítico en *C. elegans* (Gallegos and Bargmann, 2004) y en células en cultivo HEK293A (Irie et al., 2020), experimentos adicionales serán necesarios en nuestro modelo. Por su parte, la coinyección de *hNDR1-wt* también produce un efecto compensatorio en ausencia de Fry, aunque mucho más moderado (*Figuras 6.3- 6.5, Tabla 6.1*). En contraste, la expresión de *hNDR1-kd* no rescata los fenotipos generados por depleción Fry y de hecho produce fenotipos

más severos (*Figura 6.3, Tabla 6.1*), argumentando a favor que la actividad quinasa de Ndr1 está río abajo de Fry. Estos resultados demuestran la existencia de una interacción funcional entre Fry y Ndr1, en particular, en el proceso de elongación de los tejidos de la línea media dorsal (*Figuras 6.3- 6.5*). Además, revelan que el alto grado de identidad aminoacídica entre hNDR1 y xlStk38 (xlNdr1) (*Figura 6.1.a*) correlaciona con una conservación funcional entre ambas proteínas. En conclusión, nuestros resultados muestran por primera vez una función evolutivamente conservada de Fry/Ndr1 en morfogénesis de vertebrados y apuntan a un rol de Fry como activador de la quinasa de Ndr1 durante la gastrulación de *Xenopus*. Si bien nuestras evidencias sugieren que Ndr1/Stk38 participaría en el desarrollo del eje axial (*Figura 6.2*), en la actualidad estamos investigando el patrón de expresión de Stk38 y su función en la morfogénesis del eje axial y estructuras anteriores de *Xenopus*.

Recientemente se ha demostrado una función de FRY y NDR1/2 en la retención citoplasmática de YAP, efector de la vía Hippo, en células humanas HEK293A. FRY actuaría uniéndose directamente a YAP y promoviendo además su fosforilación por NDR1/2, inhibiendo la traslocación del co-factor de transcripción al núcleo (Irie et al., 2020). Es interesante que en *Xenopus* y zebrafish, la pérdida y ganancia de función de YAP producen alteraciones en los movimientos gastrulatorios, afectan la elongación del eje axial y la expresión de genes tempranos del mesodermo (Gee et al., 2011). Considerado las similitudes de los fenotipos de pérdida de función de Fry con los de alteraciones en la abundancia de la proteína YAP, es posible especular un mecanismo de acción de Fry vinculado a la vía de señalización Hippo durante la morfogénesis de la línea media dorsal de *Xenopus*. Sería interesante evaluar si Fry es capaz de modular la actividad transcripcional de YAP y/o su función como proteína de andamiaje.

7.g. Interacción funcional entre Fry y la vía Wnt/ β -catenina

El patrón de expresión de *fry* en oocitos y embriones de *Xenopus* (*Figuras 4.1 y 4.2*), sumado a que la ausencia dorsal de Fry reduce el dominio de expresión de algunos genes del organizador dorsal de la gástrula (*Figura 4.6*), sugirieren un requerimiento temprano de esta proteína en el establecimiento de destinos celulares. De hecho, la expresión ectópica de Fry *full-length* en blastómeras ventrales induce la formación de un

eje secundario incompleto, indicando que Fry tiene la capacidad de inducir la diferenciación de tejidos dorsales (Goto et al., 2010). Teniendo en cuenta la importancia de la vía Wnt/ β -catenina en el desarrollo de la línea media dorsal (De Robertis et al., 2000; Harland and Gerhart, 1997), investigamos si Fry interviene en la señalización de esta vía. Empleando como estrategia la inducción de un eje secundario por expresión ectópica de Wnt8 en tejidos ventrales (Maia et al., 2017), establecimos que Fry tiene la capacidad de modular la actividad dorsalizante de la vía Wnt/ β catenina en *Xenopus* (Figura 6.8).

A diferencia de las vías no-canónicas de Wnt (Wnt/PCP y Ca^{2+}) que regulan polaridad celular y morfogénesis, la función de la vía canónica Wnt/ β -catenina está asociada principalmente a procesos de diferenciación celular (Heisenberg et al., 2000; Wallingford and Habas, 2005; Wallingford et al., 2000). Por lo discutido anteriormente, nuestros resultados y evidencias previas sugieren que Fry podría relacionarse con la rama no-canónica Wnt/PCP y con la rama canónica Wnt/ β -catenina. Avances en la identificación de las funciones de los dominios de Fry y las proteínas con las que interacciona, permitirán establecer a qué nivel y de qué manera Fry participa en estas complejas e importantísimas vías de señalización, aportando información valiosa sobre mecanismos celulares implicados en el desarrollo embrionario y la homeostasis tisular.

7.h. Perspectivas a futuro

En conjunto, los resultados de este trabajo apuntan a que Fry está involucrada en diversos e importantes eventos del desarrollo embrionario de *Xenopus*. Por un lado, demostramos que Fry regula la adquisición de destino celular en el organizador dorsal de la gástrula, y por el otro, pusimos en evidencia la importancia de esta proteína para la morfogénesis de tejidos de la gástrula. Dado que la identidad de las células determina su comportamiento morfogenético y viceversa, es posible que Fry regule vías de señalización que participen integralmente en ambos procesos, o bien, varias vías celulares independientes involucradas en uno u otro proceso. En este sentido, proponemos que durante el desarrollo embrionario Fry interactúa funcionalmente con elementos de las vías Wnt e Hippo/YAP, implicadas en cambios globales de expresión génica, reorganización del citoesqueleto y homeostasis tisular.

Asimismo, mientras nuestros resultados demuestran una interacción funcional entre Fry y Ndr1 en morfogénesis (*Figuras 6.3- 6.5*), apuntan a que la capacidad dorsalizante de Fry no requiere de esta quinasa (*Figuras 6.6- 6.8*) argumentando a favor de la existencia de mecanismos celulares independientes regulados por Fry. En este trabajo pusimos en evidencia la versatilidad y la importancia de la proteína Fry en el desarrollo embrionario, y abrimos las puertas a nuevas investigaciones que pondrán énfasis en caracterizar los mecanismos celulares y moleculares en los que interviene.

Referencias bibliográficas

- Adler, P. N. and Wallingford, J. B.** (2017). From Planar Cell Polarity to Ciliogenesis and Back: The Curious Tale of the PPE and CPLANE proteins. *Trends Cell Biol* **27**, 379–390.
- Barresi and Gilbert** (2019). *Developmental Biology*. 12th edition. New York, United States of America: Oxford University Press.
- Beltrán González, A. N., Gasulla, J. and Calvo, D. J.** (2014). An intracellular redox sensor for reactive oxygen species at the M3-M4 linker of GABAA α 1 receptors. *Br. J. Pharmacol.* **171**, 2291–2299.
- Bier, E. and De Robertis, E. M.** (2015). BMP gradients: A paradigm for morphogen-mediated developmental patterning. *Science (80-.)*. **348**,.
- Blitz, I. L. and Cho, K. W.** (1995). Anterior neurectoderm is progressively induced during gastrulation: the role of the *Xenopus* homeobox gene orthodenticle. *Development* **121**, 993–1004.
- Blitz, I. L., Andelfinger, G. and Horb, M. E.** (2006). Germ layers to organs: Using *Xenopus* to study “later” development. *Semin. Cell Dev. Biol.* **17**, 133–145.
- Blum, M. and Ott, T.** (2019). *Xenopus*: An undervalued model organism to study and model human genetic disease. *Cells Tissues Organs* **205**, 303–312.
- Blum, M., De Robertis, E. M., Wallingford, J. B. and Niehrs, C.** (2015). Morpholinos: Antisense and Sensibility. *Dev. Cell* **35**, 145–149.
- Butler, M. T. and Wallingford, J. B.** (2017). Planar cell polarity in development and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* **18**, 375–388.
- Byun, Y. S., Kim, E. K., Araki, K., Yamamura, K. I., Lee, K., Yoon, W. K., Won, Y. S., Kim, H. C., Choi, K. C. and Nam, K. H.** (2018). Fryl deficiency is associated with defective kidney development and function in mice. *Exp. Biol. Med.* **243**, 408–417.
- Carron, C. and Shi, D. L.** (2016). Specification of anteroposterior axis by combinatorial signaling during *Xenopus* development. *Wiley Interdiscip. Rev. Dev. Biol.* **5**, 150–168.
- Chiba, S., Ikeda, M., Katsunuma, K., Ohashi, K. and Mizuno, K.** (2009). MST2- and Furry-mediated activation of NDR1 kinase is critical for precise alignment of mitotic chromosomes. *Curr Biol* **19**, 675–681.
- Cho, K. W., Blumberg, B., Steinbeisser, H. and De Robertis, E. M.** (1991). Molecular nature of Spemann’s organizer: the role of the *Xenopus* homeobox gene goosecoid. *Cell* **67**, 1111–1120.
- Cirio, M. C., Hui, Z., Haldin, C. E., Cosentino, C. C., Stuckenholz, C., Chen, X., Hong, S. K., Dawid, I. B. and Hukriede, N. A.** (2011). Lhx1 is required for specification of the renal progenitor cell field. *PLoS One* **6**, e18858.
- Colman-Lerner, A., Chin, T. E. and Brent, R.** (2001). Yeast Cbk1 and Mob2 activate daughter-specific genetic programs to induce asymmetric cell fates. *Cell* **107**, 739–750.
- Concha, M. L. and Adams, R. J.** (1998). Oriented cell divisions and cellular morphogenesis in the zebrafish gastrula and neurula: A time-lapse analysis. *Development*.
- Cong, J., Geng, W., He, B., Liu, J., Charlton, J. and Adler, P. N.** (2001). The furry gene of *Drosophila* is important for maintaining the integrity of cellular extensions during morphogenesis. *Development* **128**, 2793–2802.
- Cook, D., Hoa, L. Y., Gomez, V., Gomez, M. and Hergovich, A.** (2014). Constitutively active NDR1-PIF kinase functions independent of MST1 and hMOB1 signalling. *Cell Signal* **26**, 1657–1667.
- Darken, R. S., Scola, A. M., Rakeman, A. S., Das, G., Mlodzik, M. and Wilson, P. A.** (2002). The planar polarity gene strabismus regulates convergent extension movements in *Xenopus*. *EMBO J* **21**, 976–985.

- Das, M., Wiley, D. J., Chen, X., Shah, K. and Verde, F.** (2009). The conserved NDR kinase Orb6 controls polarized cell growth by spatial regulation of the small GTPase Cdc42. *Curr Biol* **19**, 1314–1319.
- Davidson, L. A.** (2017). Mechanical design in embryos: Mechanical signalling, robustness and developmental defects. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* **372**,.
- Davidson, L. A., Keller, R. and DeSimone, D. W.** (2004). Assembly and remodeling of the fibrillar fibronectin extracellular matrix during gastrulation and neurulation in *Xenopus laevis*. *Dev Dyn* **231**, 888–895.
- Davidson, L. A., Marsden, M., Keller, R. and Desimone, D. W.** (2006). Integrin alpha5beta1 and fibronectin regulate polarized cell protrusions required for *Xenopus* convergence and extension. *Curr Biol* **16**, 833–844.
- De Robertis, E. M., Larrain, J., Oelgeschläger, M. and Wessely, O.** (2000). The establishment of Spemann's organizer and patterning of the vertebrate embryo. *Nat. Rev. Genet.* **1**, 171–181.
- De Robertis, E. M., Wessely, O., Oelgeschläger, M., Brizuela, B., Pera, E., Larrain, J., Abreu, J. and Bachiller, D.** (2001). Molecular mechanisms of cell-cell signaling by the Spemann-Mangold organizer. *Int. J. Dev. Biol.* **45**, 189–197.
- Devroe, E., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P. and Silver, P. A.** (2004). Human Mob proteins regulate the NDR1 and NDR2 serine-threonine kinases. *J. Biol. Chem.*
- Diez-Roux, G., Banfi, S., Sultan, M., Geffers, L., Anand, S., Rozado, D., Magen, A., Canidio, E., Pagani, M., Peluso, I., et al.** (2011). A high-resolution anatomical atlas of the transcriptome in the mouse embryo. *PLoS Biol.* **9**,.
- Ding, Y., Ploper, D., Sosa, E. A., Colozza, G., Moriyama, Y., Benitez, M. D. J., Zhang, K., Merkurjev, D. and De Robertis, E. M.** (2017). Spemann organizer transcriptome induction by early beta-catenin, Wnt, Nodal, and Siamois signals in *Xenopus laevis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **114**, E3081–E3090.
- Du, L. L. and Novick, P.** (2002). Pag1p, a novel protein associated with protein kinase Cbk1p, is required for cell morphogenesis and proliferation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* **13**, 503–514.
- Dumont, J. N. . 105136020.** (1972). Oogenesis in *Xenopus laevis* (Daudin). I. Stages of oocyte development in laboratory maintained animals. *J. Morphol.* **136**, 153–179.
- Emoto, K., He, Y., Ye, B., Grueber, W. B., Adler, P. N., Jan, L. Y. and Jan, Y. N.** (2004). Control of dendritic branching and tiling by the Tricornered-kinase/Furry signaling pathway in *Drosophila* sensory neurons. *Cell* **119**, 245–256.
- Espiritu, E. B., Crunk, A. E., Bais, A., Hochbaum, D., Cervino, A. S., Phua, Y. L., Butterworth, M. B., Goto, T., Ho, J., Hukriede, N. A., et al.** (2018). The Lhx1-Ldb1 complex interacts with Furry to regulate microRNA expression during pronephric kidney development. *Sci Rep* **8**, 16029.
- Evren, S., Wen, J. W. H., Luu, O., Damm, E. W., Nagel, M. and Winklbauer, R.** (2014). EphA4-dependent Brachyury expression is required for dorsal mesoderm involution in the *Xenopus* gastrula. *Dev.* **141**, 3649–3661.
- Ewald, A. J.** (2004). Regional requirements for Dishevelled signaling during *Xenopus* gastrulation: separable effects on blastopore closure, mesendoderm internalization and archenteron formation. *Development* **131**, 6195–6209.
- Ewald, A. J., Peyrot, S. M., Tyszka, J. M., Fraser, S. E. and Wallingford, J. B.** (2004). Regional requirements for Dishevelled signaling during *Xenopus* gastrulation: separable effects on blastopore closure, mesendoderm internalization and archenteron formation. *Development* **131**, 6195–6209.
- Fang, X. and Adler, P. N.** (2010). Regulation of cell shape, wing hair initiation and the actin cytoskeleton by Trc/Fry and Wts/Mats complexes. *Dev Biol* **341**, 360–374.
- Fang, X., Lu, Q., Emoto, K. and Adler, P. N.** (2010). The *drosophila* fry protein interacts with Trc and is highly mobile in vivo. *BMC Dev. Biol.* **10**,.
- Feroze, R., Shawky, J. H., von Dassow, M. and Davidson, L. A.** (2015). Mechanics of blastopore closure during amphibian gastrulation. *Dev Biol* **398**, 57–67.
- Gallegos, M. E. and Bargmann, C. I.** (2004). Mechanosensory neurite termination and tiling depend on SAX-2 and the SAX-1 kinase. *Neuron* **44**, 239–249.
- Gawantka, V., Pollet, N., Delius, H., Vingron, M., Pfister, R., Nitsch, R., Blumenstock, C. and Niehrs, C.** (1998). Gene expression screening in *Xenopus* identifies molecular pathways, predicts gene function

- and provides a global view of embryonic patterning. *Mech. Dev.*
- Gee, S. T., Milgram, S. L., Kramer, K. L., Conlon, F. L. and Moody, S. A.** (2011). Yes-associated protein 65 (YAP) expands neural progenitors and regulates pax3 expression in the neural plate border zone. *PLoS One* **6**.
- Gong, Y., Mo, C. and Fraser, S. E.** (2004). Planar cell polarity signalling controls cell division orientation during zebrafish gastrulation. *Nature*.
- Gont, L. K., Steinbeisser, H., Blumberg, B. and De Robertis, E. M.** (1993). Tail formation as a continuation of gastrulation: The multiple cell populations of the *Xenopus* tailbud derive from the late blastopore lip. *Development* **119**, 991–1004.
- Gorny, A. K. and Steinbeisser, H.** (2012). Brachet's cleft: A model for the analysis of tissue separation in *Xenopus*. *Wiley Interdiscip. Rev. Dev. Biol.* **1**, 294–300.
- Goto, T. and Keller, R.** (2002). The planar cell polarity gene *Strabismus* regulates convergence and extension and neural fold closure in *Xenopus*. *Dev. Biol.*
- Goto, T., Davidson, L., Asashima, M. and Keller, R.** (2005). Planar cell polarity genes regulate polarized extracellular matrix deposition during frog gastrulation. *Curr Biol* **15**, 787–793.
- Goto, T., Fukui, A., Shibuya, H., Keller, R. and Asashima, M.** (2010). *Xenopus* furry contributes to release of microRNA gene silencing. *Proc. Natl. Acad. Sci.*
- Gray, R. S., Roszko, I. and Solnica-Krezel, L.** (2011). Planar Cell Polarity: Coordinating Morphogenetic Cell Behaviors with Embryonic Polarity. *Dev. Cell* **21**, 120–133.
- Gurdon, J. B. and Hopwood, N.** (2000). The introduction of *Xenopus laevis* into developmental biology: Of empire, pregnancy testing and ribosomal genes. *Int. J. Dev. Biol.* **44**, 43–50.
- Habas, R., Kato, Y. and He, X.** (2001). Wnt/Frizzled activation of Rho regulates vertebrate gastrulation and requires a novel Formin homology protein Daam1. *Cell* **107**, 843–854.
- Habas, R., Dawid, I. B. and He, X.** (2003). Coactivation of Rac and Rho by Wnt/Frizzled signaling is required for vertebrate gastrulation. *Genes Dev* **17**, 295–309.
- Han, C., Wang, D., Soba, P., Zhu, S., Lin, X., Jan, L. Y. and Jan, N.** (2012a). dimensional Space. **73**, 64–78.
- Han, C., Wang, D., Soba, P., Zhu, S., Lin, X., Jan, L. Y. and Jan, Y. N.** (2012b). Integrins Regulate Repulsion-Mediated Dendritic Patterning of *Drosophila* Sensory Neurons by Restricting Dendrites in a 2D Space. *Neuron* **73**, 64–78.
- Harland, R. and Gerhart, J.** (1997). Formation and function of Spemann's organizer. *Annu Rev Cell Dev Biol* **13**, 611–667.
- Harland, R. M. and Grainger, R. M.** (2011). *Xenopus* research: Metamorphosed by genetics and genomics. *Trends Genet.* **27**, 507–515.
- Haubold, C., Schiegg, M., Kreshuk, A., Berg, S., Koethe, U. and Hamprecht, F. A.** (2016). Segmenting and tracking multiple dividing targets using ilastik. *Adv. Anat. Embryol. Cell Biol.*
- Hayette, S., Cornillet-Lefebvre, P., Tigaud, I., Struski, S., Forissier, S., Berchet, A., Doll, D., Gillot, L., Brahim, W., Delabesse, E., et al.** (2005). AF4p12, a human homologue to the furry gene of *Drosophila*, as a novel MLL fusion partner. *Cancer Res.* **65**, 6521–6525.
- He, B. and Adler, P. N.** (2002). The genetic control of arista lateral morphogenesis in *Drosophila*. *Dev Genes Evol* **212**, 218–229.
- He, Y., Fang, X., Emoto, K., Jan, Y. N., Adler, P. N., Cong, J., Geng, W., He, B., Liu, J., Charlton, J., et al.** (2004). Mechanosensory neurite termination and tiling depend on SAX-2 and the SAX-1 kinase. *Mol Biol Cell* **44**, 239–249.
- He, Y., Fang, X., Emoto, K., Jan, Y. N. and Adler, P. N.** (2005). The tricornered Ser/Thr protein kinase is regulated by phosphorylation and interacts with furry during *Drosophila* wing hair development. *Mol Biol Cell* **16**, 689–700.
- Heasman, J., Kofron, M. and Wylie, C.** (2000). β -catenin signaling activity dissected in the early *Xenopus* embryo: A novel antisense approach. *Dev. Biol.* **222**, 124–134.
- Heisenberg, C. P., Tada, M., Rauch, G. J., Saude, L., Concha, M. L., Geisler, R., Stemple, D. L., Smith, J. C. and Wilson, S. W.** (2000). Silberblick/Wnt11 mediates convergent extension movements during zebrafish gastrulation. *Nature* **405**, 76–81.

- Hergovich, A.** (2016). The roles of NDR protein kinases in hippo signalling. *Genes (Basel)* **7**, 1–16.
- Hergovich, A., Bichsel, S. J. and Hemmings, B. A.** (2005). Human NDR Kinases Are Rapidly Activated by MOB Proteins through Recruitment to the Plasma Membrane and Phosphorylation. *Mol. Cell. Biol.*
- Hergovich, A., Stegert, M. R., Schmitz, D. and Hemmings, B. A.** (2006). NDR kinases regulate essential cell processes from yeast to humans. *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**, 253–264.
- Hirata, D., Kishimoto, N., Suda, M., Sogabe, Y., Nakagawa, S., Yoshida, Y., Sakai, K., Mizunuma, M., Miyakawa, T., Ishiguro, J., et al.** (2002). Fission yeast Mor2/Cps12, a protein similar to *Drosophila* furry, is essential for cell morphogenesis and its mutation induces Wee1-dependent G2 delay. *EMBO J.* **21**, 4863–4874.
- Hopwood, N. D., Pluck, A. and Gurdon, J. B.** (1989). MyoD expression in the forming somites is an early response to mesoderm induction in *Xenopus* embryos. *EMBO J* **8**, 3409–3417.
- Horne-Badovinac, S., Hill, J., Gerlach 2nd, G., Menegas, W. and Bilder, D.** (2012). A screen for round egg mutants in *Drosophila* identifies tricornered, furry, and misshapen as regulators of egg chamber elongation. *G3* **2**, 371–378.
- Houston, D. W.** (2012). Cortical rotation and messenger RNA localization in *Xenopus* axis formation. *Wiley Interdiscip. Rev. Dev. Biol.* **1**, 371–388.
- Huang, Y. and Winklbauer, R.** (2018a). Cell migration in the *Xenopus* gastrula. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol* **7**, e325.
- Huang, Y. and Winklbauer, R.** (2018b). Cell migration in the *Xenopus* gastrula. *Wiley Interdiscip. Rev. Dev. Biol.* **7**, 1–21.
- Huang, P., Senga, T. and Hamaguchi, M.** (2007). A novel role of phospho- β -catenin in microtubule regrowth at centrosome. *Oncogene* **26**, 4357–4371.
- Huebner, R. J. and Wallingford, J. B.** (2018). Coming to Consensus: A Unifying Model Emerges for Convergent Extension. *Dev. Cell* **46**, 389–396.
- Huebner, R. J., Malmi-Kakkada, A. N., Sarikaya, S., Weng, S., Thirumalai, D. and Wallingford, J. B.** (2021). Mechanical heterogeneity along single cell-cell junctions is driven by lateral clustering of cadherins during vertebrate axis elongation. *Elife* **10**,
- Ikeda, M., Chiba, S., Ohashi, K. and Mizuno, K.** (2012). Furry protein promotes aurora A-mediated Polo-like kinase 1 activation. *J Biol Chem* **287**, 27670–27681.
- Irie, K., Nagai, T. and Mizuno, K.** (2020). Furry protein suppresses nuclear localization of yes-associated protein (YAP) by activating NDR kinase and binding to YAP. *J. Biol. Chem.* **295**, 3017–3028.
- Irvine, K. D. and Wieschaus, E.** (1994). Cell intercalation during *Drosophila* germband extension and its regulation by pair-rule segmentation genes. *Development* **120**, 827–841.
- Jan, Y. N. and Jan, L. Y.** (2003). The Control of Dendrite Development. *Neuron* **40**, 229–242.
- Jessus, C., Munro, C. and Houlston, E.** (2020). *Frogs and Jellyfish*.
- Kanai, M., Kume, K., Miyahara, K., Sakai, K., Nakamura, K., Leonhard, K., Wiley, D. J., Verde, F., Toda, T. and Hirata, D.** (2005). Fission yeast MO25 protein is localized at SPB and septum and is essential for cell morphogenesis. *EMBO J.*
- Karaiskou, A., Leprêtre, A. C., Pahlavan, G., Du Pasquier, D., Ozon, R. and Jessus, C.** (2004). Polo-like kinase confers MPF autoamplification competence to growing *Xenopus* oocytes. *Development* **131**, 1543–1552.
- Kaufmann, A., Mickoleit, M., Weber, M. and Huiskens, J.** (2012). Multilayer mounting enables long-term imaging of zebrafish development in a light sheet microscope. *Development* **139**, 3242–3247.
- Keller, R.** (2002). Shaping the vertebrate body plan by polarized embryonic cell movements. *Science (80-.)*. **298**, 1950–1954.
- Keller, R. and Shook, D.** (2008). Dynamic determinations: patterning the cell behaviours that close the amphibian blastopore. *Philos Trans R Soc L. B Biol Sci* **363**, 1317–1332.
- Keller, R. E., Danilchik, M., Gimlich, R. and Shih, J.** (1985). The function and mechanism of convergent extension during gastrulation of *Xenopus laevis*. *J Embryol Exp Morphol* **89 Suppl**, 185–209.
- Keller, R., Davidson, L. A. and Shook, D. R.** (2003). How we are shaped: the biomechanics of gastrulation. *Differentiation* **71**, 171–205.

- Kiecker, C. and Niehrs, C.** (2001). The role of prechordal mesendoderm in neural patterning. *Curr Opin Neurobiol* **11**, 27–33.
- Kieserman, E. K. and Wallingford, J. B.** (2009). In vivo imaging reveals a role for Cdc42 in spindle positioning and planar orientation of cell divisions during vertebrate neural tube closure. *J. Cell Sci*
- Kim, H. Y. and Davidson, L. A.** (2011). Punctuated actin contractions during convergent extension and their permissive regulation by the non-canonical Wnt-signaling pathway. *J Cell Sci* **124**, 635–646.
- Kim, E. J. Y., Korotkevich, E. and Hiiragi, T.** (2018). Coordination of Cell Polarity, Mechanics and Fate in Tissue Self-organization. *Trends Cell Biol.* **28**, 541–550.
- King, M. Lou, Messitt, T. J. and Mowry, K. L.** (2005). Putting RNAs in the right place at the right time: RNA localization in the frog oocyte. *Biol. Cell* **97**, 19–33.
- Kloc, M., Bilinski, S., Chan, A. P., Allen, L. H., Zearfoss, N. R. and Etkin, L. D.** (2001). RNA localization and germ cell determination in xenopus. *Int. Rev. Cytol.* **203**, 63–91.
- Koster, I., Jungwirth, M. S. and Steinbeisser, H.** (2010). xGit2 and xRhoGAP 11A regulate convergent extension and tissue separation in Xenopus gastrulation. *Dev Biol* **344**, 26–35.
- Köster, I., Jungwirth, M. S. and Steinbeisser, H.** (2010). XGit2 and xRhoGAP 11A regulate convergent extension and tissue separation in Xenopus gastrulation. *Dev. Biol.* **344**, 26–35.
- Kraft, B., Berger, C. D., Wallkamm, V., Steinbeisser, H. and Wedlich, D.** (2012). Wnt-11 and Fz7 reduce cell adhesion in convergent extension by sequestration of PAPC and C-cadherin. *J Cell Biol* **198**, 695–709.
- Kühl, M., Geis, K., Sheldahl, L. C., Pukrop, T., Moon, R. T. and Wedlich, D.** (2001). Antagonistic regulation of convergent extension movements in Xenopus by Wnt/ β -catenin and Wnt/Ca²⁺ signaling. *Mech. Dev.* **106**, 61–76.
- Kwan, K. M. and Kirschner, M. W.** (2005). A microtubule-binding Rho-GEF controls cell morphology during convergent extension of Xenopus laevis. *Development* **132**, 4599–4610.
- Leptin, M.** (2005). Gastrulation movements: the logic and the nuts and bolts. *Dev Cell* **8**, 305–320.
- Lienkamp, S. S., Liu, K., Karner, C. M., Carroll, T. J., Ronneberger, O., Wallingford, J. B. and Walz, G.** (2012). Vertebrate kidney tubules elongate using a planar cell polarity-dependent, rosette-based mechanism of convergent extension. *Nat. Genet.* **44**, 1382–1387.
- Liu, Y., Chen, X., Gong, Z., Zhang, H., Fei, F., Tang, X., Wang, J., Xu, P., Zarbl, H. and Ren, X.** (2019). Fry Is Required for Mammary Gland Development During Pregnant Periods and Affects the Morphology and Growth of Breast Cancer Cells. *Front. Oncol.* **9**, 1–12.
- Lupas, A. N. and Gruber, M.** (2005). The structure of α -helical coiled coils. *Adv. Protein Chem.* **70**, 37–38.
- Luu, O., Damm, E. W., Parent, S. E., Barua, D., Smith, T. H., Wen, J. W., Lepage, S. E., Nagel, M., Ibrahim-Gawel, H., Huang, Y., et al.** (2015). PAPC mediates self/non-self-distinction during Snail1-dependent tissue separation. *J Cell Biol* **208**, 839–856.
- Luxardi, G., Marchal, L., Thome, V. and Kodjabachian, L.** (2010). Distinct Xenopus Nodal ligands sequentially induce mesendoderm and control gastrulation movements in parallel to the Wnt/PCP pathway. *Development* **137**, 417–426.
- Maia, L. A., Velloso, I. and Abreu, J. G.** (2017). Advances in the use of Xenopus for successful drug screening. *Expert Opin. Drug Discov.* **12**, 1153–1159.
- Malacinski, G. M. and Youn, B. W.** (1981). Neural plate morphogenesis and axial stretching in “notochord-defective” Xenopus laevis embryos. *Dev. Biol.* **88**, 352–357.
- Martinez Arias, A. and Steventon, B.** (2018). On the nature and function of organizers. *Dev.* **145**,
- Matsubara, D., Horiuchi, S., Shimono, K., Usui, T. and Uemura, T.** (2011). The seven-pass transmembrane cadherin Flamingo controls dendritic self-avoidance via its binding to a LIM domain protein, Espinas, in Drosophila sensory neurons. 1982–1996.
- Matthews, H. K., Marchant, L., Carmona-Fontaine, C., Kuriyama, S., Larraín, J., Holt, M. R., Parsons, M. and Mayor, R.** (2008). Directional migration of neural crest cells in vivo is regulated by Syndecan-4/Rac1 and non-canonical Wnt signaling/RhoA. *Development* **135**, 1771–1780.
- Medina, A., Swain, R. K., Kuerner, K. M. and Steinbeisser, H.** (2004). Xenopus paraxial protocadherin has signaling functions and is involved in tissue separation. *EMBO J* **23**, 3249–3258.

- Meneau, F., Dupré, A., Jesus, C. and Daldello, E. M. (2020). Translational Control of *Xenopus* Oocyte Meiosis: Toward the Genomic Era. *Cells* **9**, 1–24.
- Moretti, B., Müller, N. P., Wappner, M. and Grecco, H. E. (2020). Compact and reflective light-sheet microscopy for long-term imaging of living embryos. *Appl. Opt.* **59**, D89–D94.
- Munro, E. M. and Odell, G. M. (2002). Polarized basolateral cell motility underlies invagination and convergent extension of the ascidian notochord. *Development* **129**, 13–24.
- Murakami, M. S., Moody, S. A., Daar, I. O. and Morrison, D. K. (2004). Morphogenesis during *Xenopus* gastrulation requires Wee1-mediated inhibition of cell proliferation. *Development* **131**, 571–580.
- Nagai, T. and Mizuno, K. (2014). Multifaceted roles of Furry proteins in invertebrates and vertebrates. *J Biochem* **155**, 137–146.
- Nagai, T., Ikeda, M., Chiba, S., Kanno, S. and Mizuno, K. (2013). Furry promotes acetylation of microtubules in the mitotic spindle by inhibition of SIRT2 tubulin deacetylase. *J Cell Sci* **126**, 4369–4380.
- Najmabadi, H., Hu, H., Garshasbi, M., Zemojtel, T., Abedini, S. S., Chen, W., Hosseini, M., Behjati, F., Haas, S., Jamali, P., et al. (2011). Deep sequencing reveals 50 novel genes for recessive cognitive disorders. *Nature* **478**, 57–63.
- Nelson, B., Kurischko, C., Horecka, J., Mody, M., Nair, P., Pratt, L., Zougman, A., McBroom, L. D. B., Hughes, T. R., Boone, C., et al. (2003). RAM: A conserved signaling network that regulates Ace2p transcriptional activity and polarized morphogenesis. *Mol. Biol. Cell.*
- Nie, S. and Chang, C. (2007). Regulation of *Xenopus* gastrulation by ErbB signaling. *Dev. Biol.* **303**, 93–107.
- Niehhs, C. (2004). Regionally specific induction by the Spemann-Mangold organizer. *Nat Rev Genet* **5**, 425–434.
- Nieuwkoop, P. D. and Faber, J. (1994). *Normal table of Xenopus Laevis*. New York: Garland Publishing.
- Norkett, R., Del Castillo, U., Lu, W. and Gelfand, V. I. (2020). Ser/Thr kinase Trc controls neurite outgrowth in *Drosophila* by modulating microtubule-microtubule sliding. *Elife* **9**.
- Percie, N., Id, A. A., Id, S. A., Id, M. T. A., Baker, M., Id, W. J. B., Id, A. C., Id, I. C. C., Id, U. D., Emerson, M., et al. (2020). PLOS BIOLOGY Reporting animal research : Explanation and elaboration for the ARRIVE guidelines 2 . 0.
- Peshkin, L., Lukyanov, A., Kalocsay, M., Gage, R. M., Wang, D. Z., Pells, T. J., Karimi, K., Vize, P. D., Wühr, M. and Kirschner, M. W. (2019). The protein repertoire in early vertebrate embryogenesis. *bioRxiv*.
- Pfister, K., Shook, D. R., Chang, C., Keller, R. and Skoglund, P. (2016). Molecular model for force production and transmission during vertebrate gastrulation. *Dev.* **143**, 715–727.
- Ray, S., Kume, K., Gupta, S., Ge, W., Balasubramanian, M., Hirata, D. and McCollum, D. (2010). The mitosis-to-interphase transition is coordinated by cross talk between the SIN and MOR pathways in *Schizosaccharomyces pombe*. *J. Cell Biol.* **190**, 793–805.
- Ren, X., Graham, J. C., Jing, L., Mikheev, A. M., Gao, Y., Lew, J. P., Xie, H., Kim, A. S., Shang, X., Friedman, C., et al. (2013). Mapping of Mcs30, a new mammary carcinoma susceptibility quantitative trait locus (QTL30) on rat chromosome 12: identification of fry as a candidate Mcs gene. *PLoS One* **8**.
- Rohde, L. A. and Heisenberg, C. P. (2007). Zebrafish Gastrulation: Cell Movements, Signals, and Mechanisms. *Int. Rev. Cytol.* **261**, 159–192.
- Rozario, T., Dzamba, B., Weber, G.F., Davidson, L.A., and DeSimone, D. W. (2009). The Physical State of Fibronectin Matrix Differentially Regulates Morphogenetic Movements In Vivo. *Dev. Biol.* **327**, 386–398.
- Rozario, T. and DeSimone, D. W. (2010). The extracellular matrix in development and morphogenesis: A dynamic view. *Dev. Biol.* **341**, 126–140.
- Saka, Y. and Smith, J. C. (2001). Spatial and temporal patterns of cell division during early *Xenopus* embryogenesis. *Dev. Biol.* **229**, 307–318.
- Sasai, Y., Lu, B., Steinbeisser, H., Geissert, D., Gont, L. K. and De Robertis, E. M. (1994). *Xenopus* chordin: a novel dorsaling factor activated by organizer-specific homeobox genes. *Cell* **79**, 779–790.
- Schmitt, S. M., Gull, M. and Brändli, A. W. (2014). Engineering *Xenopus* embryos for phenotypic drug

- discovery screening. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **69–70**, 225–246.
- Schmitz-Rohmer, D., Probst, S., Yang, Z. Z., Laurent, F., Stadler, M. B., Zuniga, A., Zeller, R., Hynx, D., Hemmings, B. A. and Hergovich, A.** (2015). NDR kinases are essential for somitogenesis and cardiac looping during mouse embryonic development. *PLoS One*.
- Session, A. M., Uno, Y., Kwon, T., Chapman, J. A., Toyoda, A., Takahashi, S., Fukui, A., Hikosaka, A., Suzuki, A., Kondo, M., et al.** (2016). Genome evolution in the allotetraploid frog *Xenopus laevis*. *Nature* **538**, 336–343.
- Shah, P. K., Tanner, M. R., Kovacevic, I., Rankin, A., Marshall, T. E., Noblett, N., Tran, N. N., Roenspies, T., Hung, J., Chen, Z., et al.** (2017). PCP and SAX-3/Robo Pathways Cooperate to Regulate Convergent Extension-Based Nerve Cord Assembly in *C. elegans*. *Dev. Cell* **41**, 195-203.e3.
- Sharif, A. A. D. and Hergovich, A.** (2018). Seminars in Cancer Biology The NDR / LATS protein kinases in immunology and cancer biology. *Semin. Cancer Biol.* **48**, 104–114.
- Shawky, J. H., Balakrishnan, U. L., Stuckenholz, C. and Davidson, L. A.** (2018). Multiscale analysis of architecture, cell size and the cell cortex reveals cortical f-actin density and composition are major contributors to mechanical properties during convergent extension. *Dev.* **145**.
- Shih, J. and Keller, R.** (1992). Cell motility driving mediolateral intercalation in explants of *Xenopus laevis*. *Development* **116**, 901–914.
- Shindo, A.** (2018). Models of convergent extension during morphogenesis. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol* **7**.
- Shindo, A., Inoue, Y., Kinoshita, M. and Wallingford, J. B.** (2019). PCP-dependent transcellular regulation of actomyosin oscillation facilitates convergent extension of vertebrate tissue. *Dev Biol* **446**, 159–167.
- Shook, D. R., Kasproicz, E. M., Davidson, L. A. and Keller, R.** (2018). Large, long range tensile forces drive convergence during *Xenopus* blastopore closure and body axis elongation. *Elife* **7**.
- Sidova, M., Sindelka, R., Castoldi, M., Benes, V. and Kubista, M.** (2015). Intracellular microRNA profiles form in the *Xenopus laevis* oocyte that may contribute to asymmetric cell division. *Sci. Rep.* **5**, 1–9.
- Sindelka, R., Abaffy, P., Qu, Y., Tomankova, S., Sidova, M., Naraine, R., Kolar, M., Peuchen, E., Sun, L., Dovichi, N., et al.** (2018). Asymmetric distribution of biomolecules of maternal origin in the *Xenopus laevis* egg and their impact on the developmental plan. *Sci. Rep.* **8**, 1–16.
- Smith, W. C. and Harland, R. M.** (1991). Injected Xwnt-8 RNA acts early in *Xenopus* embryos to promote formation of a vegetal dorsalizing center. *Cell* **67**, 753–765.
- Smith, J. C., Price, B. M. J., Green, J. B. A., Weigel, D. and Herrmann, B. G.** (1991). Expression of a *xenopus* homolog of Brachyury (T) is an immediate-early response to mesoderm induction. *Cell* **67**, 79–87.
- Sokol, S. Y.** (1996). Analysis of Dishevelled signalling pathways during *Xenopus* development. *Curr Biol* **6**, 1456–1467.
- Solnica-Krezel, L.** (2005). Conserved patterns of cell movements during vertebrate gastrulation. *Curr Biol* **15**, R213-28.
- Solnica-Krezel, L. and Sepich, D. S.** (2012). Gastrulation: Making and shaping germ layers. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **28**, 687–717.
- Spemann, H. and Mangold, H.** (2001). Induction of embryonic primordia by implantation of organizers from a different species. 1923. *Int J Dev Biol* **45**, 13–38.
- Szabó, A., Cobo, I., Omara, S., McLachlan, S., Keller, R. and Mayor, R.** (2016). The Molecular Basis of Radial Intercalation during Tissue Spreading in Early Development. *Dev. Cell* **37**, 213–225.
- Szczepaniak, K., Bukala, A., Da Silva Neto, A. M., Ludwiczak, J. and Dunin-Horkawicz, S.** (2020). A library of coiled-coil domains: From regular bundles to peculiar twists. *Bioinformatics* **36**, 5368–5376.
- Tada, M. and Heisenberg, C. P.** (2012). Convergent extension: Using collective cell migration and cell intercalation to shape embryos. *Dev.* **139**, 3897–3904.
- Tada, M. and Smith, J. C.** (2000). Xwnt11 is a target of *Xenopus* Brachyury: regulation of gastrulation movements via Dishevelled, but not through the canonical Wnt pathway. *Development* **127**, 2227–2238.
- Taha, Z., Janse van Rensburg, H. J. and Yang, X.** (2018). The hippo pathway: Immunity and cancer. *Cancers (Basel)*. **10**, 1–20.

- Tahinci, E. and Symes, K.** (2003). Distinct functions of Rho and Rac are required for convergent extension during *Xenopus* gastrulation. *Dev Biol* **259**, 318–335.
- Takeuchi, M., Nakabayashi, J., Sakaguchi, T., Yamamoto, T. S., Takahashi, H., Takeda, H. and Ueno, N.** (2003). The prickle-related gene in vertebrates is essential for gastrulation cell movements. *Curr Biol* **13**, 674–679.
- Tanegashima, K., Zhao, H. and Dawid, I. B.** (2008). WGEF activates Rho in the Wnt-PCP pathway and controls convergent extension in *Xenopus* gastrulation. *EMBO J.* **27**, 606–617.
- Tewari, R., Bailes, E., Bunting, K. A. and Coates, J. C.** (2010). Armadillo-repeat protein functions: Questions for little creatures. *Trends Cell Biol.* **20**, 470–481.
- Thisse, B., Pflumio, S., Fürthauer, M., Loppin, B., Heyer, V., Degrave, A., Woehl, R., Lux, A., Steffan, T., Charbonnier, X.Q. and Thisse, C.** (2001). Expression of the zebrafish genome during embryogenesis. *ZFIN Direct Data Submiss.*
- Topczewski, J., Sepich, D. S., Myers, D. C., Walker, C., Amores, A., Lele, Z., Hammerschmidt, M., Postlethwait, J. and Solnica-Krezel, L.** (2001). The Zebrafish Glypican Knypek Controls Cell Polarity during Gastrulation Movements of Convergent Extension. *Dev. Cell* **1**, 251–264.
- Ulmer, B., Tingler, M., Kurz, S., Maerker, M., Andre, P., Monch, D., Campione, M., Deissler, K., Lewandoski, M., Thumberger, T., et al.** (2017). A novel role of the organizer gene Goosecoid as an inhibitor of Wnt/PCP-mediated convergent extension in *Xenopus* and mouse. *Sci Rep* **7**, 43010.
- Unterseher, F., Hefele, J. A., Giehl, K., De Robertis, E. M., Wedlich, D. and Schambony, A.** (2004). Paraxial protocadherin coordinates cell polarity during convergent extension via Rho A and JNK. *EMBO J* **23**, 3259–3269.
- Vichalkovski, A., Gresko, E., Cornils, H., Hergovich, A., Schmitz, D. and Hemmings, B. A.** (2008). Report NDR Kinase Is Activated by RASSF1A / MST1 in Response to Fas Receptor Stimulation and Promotes Apoptosis. *Curr. Biol.* **18**, 1889–1895.
- von Dassow, G., Schmidt, J. E. and Kimelman, D.** (1993). Induction of the *Xenopus* organizer: expression and regulation of *Xnot*, a novel FGF and activin-regulated homeo box gene. *Genes Dev* **7**, 355–366.
- Von Dassow, M. and Davidson, L. A.** (2007). Variation and robustness of the mechanics of gastrulation: The role of tissue mechanical properties during morphogenesis. *Birth Defects Res. Part C - Embryo Today Rev.* **81**, 253–269.
- Wacker, S., Grimm, K., Joos, T. and Winklbauer, R.** (2000). Development and control of tissue separation at gastrulation in *Xenopus*. *Dev Biol* **224**, 428–439.
- Wallingford, J. B. and Habas, R.** (2005). The developmental biology of Dishevelled: An enigmatic protein governing cell fate and cell polarity. *Development* **132**, 4421–4436.
- Wallingford, J. B., Rowning, B. A., Vogeli, K. M., Rothbacher, U., Fraser, S. E. and Harland, R. M.** (2000). Dishevelled controls cell polarity during *Xenopus* gastrulation. *Nature* **405**, 81–85.
- Wallingford, J. B., Vogeli, K. M. and Harland, R. M.** (2001). Regulation of convergent extension in *Xenopus* by Wnt5a and Frizzled-8 is independent of the canonical Wnt pathway. *Int J Dev Biol* **45**, 225–227.
- Wallingford, J. B., Fraser, S. E. and Harland, R. M.** (2002). Convergent extension: the molecular control of polarized cell movement during embryonic development. *Dev Cell* **2**, 695–706.
- Wang, F. and Fang, X. L.** (2010). [Discussion on the important role of Chuaixue in acupuncture manipulation]. *Zhongguo Zhen Jiu* **30**, 393–394.
- Weber, M., Mickoleit, M. and Huisken, J.** (2014). Multilayer mounting for long-term light sheet microscopy of zebrafish. *J. Vis. Exp.* 1–8.
- Weiss, E. L., Kurischko, C., Zhang, C., Shokat, K., Drubin, D. G. and Luca, F. C.** (2002). The *Saccharomyces cerevisiae* Mob2p-Cbk1p kinase complex promotes polarized growth and acts with the mitotic exit network to facilitate daughter cell-specific localization of Ace2p transcription factor. *J. Cell Biol.* **158**, 885–900.
- Williams, M. L. K. and Solnica-Krezel, L.** (2020). Nodal and planar cell polarity signaling cooperate to regulate zebrafish convergence & extension gastrulation movements. *Elife* **9**, 1–25.
- Williams, M., Yen, W., Lu, X. and Sutherland, A.** (2014). Distinct apical and basolateral mechanisms drive planar cell polarity-dependent convergent extension of the mouse neural plate. *Dev. Cell* **29**, 34–46.

- Wilson, P. and Keller, R.** (1991). Cell rearrangement during gastrulation of *Xenopus*: Direct observation of cultured explants. *Development* **112**, 289–300.
- Winklbauer, R.** (2020). *Mesoderm and endoderm internalization in the Xenopus gastrula*. 1st ed. Elsevier Inc.
- Winklbauer, R. and Damm, E. W.** (2012). Internalizing the vegetal cell mass before and during amphibian gastrulation: Vegetal rotation and related movements. *Wiley Interdiscip. Rev. Dev. Biol.* **1**, 301–306.
- Winklbauer, R. and Keller, R. E.** (1996). Fibronectin, mesoderm migration, and gastrulation in *Xenopus*. *Dev Biol* **177**, 413–426.
- Wozniak, K. L., Phelps, W. A., Tembo, M., Lee, M. T. and Carlson, A. E.** (2018). The TMEM16A channel mediates the fast polyspermy block in *Xenopus laevis*. *J. Gen. Physiol.* **150**, 1249–1260.
- Xiong, S., Lorenzen, K., Couzens, A. L., Guettler, S., Gingras, A., Sicheri, F., Xiong, S., Lorenzen, K., Couzens, A. L., Templeton, C. M., et al.** (2018). Structural Basis for Auto-Inhibition of the NDR1 Kinase Domain by an Atypically Long Activation Article Structural Basis for Auto-Inhibition of the NDR1 Kinase Domain by an Atypically Long Activation Segment. 1101–1115.
- Xu, W. and Kimelman, D.** (2007). Mechanistic insights from structural studies of β -catenin and its binding partners. *J. Cell Sci.* **120**, 3337–3344.
- Yatim, A., Benne, C., Sobhian, B., Laurent-Chabalier, S., Deas, O., Judde, J. G., Lelievre, J. D., Levy, Y. and Benkirane, M.** (2012). NOTCH1 Nuclear Interactome Reveals Key Regulators of Its Transcriptional Activity and Oncogenic Function. *Mol. Cell* **48**, 445–458.
- Yokota, C., Kofron, M., Zuck, M., Houston, D. W., Isaacs, H., Asashima, M., Wylie, C. C. and Heasman, J.** (2003). A novel role for a nodal-related protein; *Xnr3* regulates convergent extension movements via the FGF receptor. *Development* **130**, 2199–2212.
- Yoshimura, S. H. and Hirano, T.** (2016). HEAT repeats - versatile arrays of amphiphilic helices working in crowded environments? *J. Cell Sci.* **129**, 3963–3970.
- Yu, F. X., Zhao, B. and Guan, K. L.** (2015). Hippo Pathway in Organ Size Control, Tissue Homeostasis, and Cancer. *Cell* **163**, 811–828.
- Zhang, L., Tang, F., Terracciano, L., Hynx, D., Kohler, R., Bichet, S., Hess, D., Cron, P., Hemmings, B. A., Hergovich, A., et al.** (2015). NDR functions as a physiological YAP1 kinase in the intestinal epithelium. *Curr. Biol.* **25**, 296–305.
- Zheng, J., Wu, B. H., Jiang, Z. Y., Kuang, Q., Fang, X. L., Xie, Z. X., Huang, R. B. and Zheng, L. S.** (2010). General and facile syntheses of metal silicate porous hollow nanostructures. *Chem Asian J* **5**, 1439–1444.
- Zhou, J., Kim, H. Y., Wang, J. H. and Davidson, L. A.** (2010). Macroscopic stiffening of embryonic tissues via microtubules, RhoGEF and the assembly of contractile bundles of actomyosin. *Development* **137**, 2785–2794.
- Zinski, J., Tاجر, B. and Mullins, M. C.** (2018). TGF- β family signaling in early vertebrate development. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **10**, 1–76.