ESCUELA DE DOCTORADO
INTERNACIONAL DE LA USC

Álvaro Jesús
Arana Díaz

Tesis doctoral

Generación de un modelo de pez cebra (D. rerio) del Síndrome de CHARGE: Base genética y molecular.

Lugo, 2023

Programa de doctorado en Medicina Molecular

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

TESIS DE DOCTORADO

GENERACIÓN DE UN MODELO DE PEZ CEBRA (*D. rerio*) DEL SÍNDROME DE CHARGE: BASE GENÉTICA Y MOLECULAR

Álvaro Jesús Arana Díaz

ESCUELA DE DOCTORADO INTERNACIONAL DE LA UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

PROGRAMA DE DOCTORADO EN MEDICINA MOLECULAR

SANTIAGO DE COMPOSTELA / LUGO

2023

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

Álvaro Jesús Arana Díaz

DECLARACIÓN DEL AUTOR/A DE LA TESIS

D./Dña. **ALVARO JESUS ARANA DÍAZ**

Título da tese: **Generación de un modelo de pez cebra (D. rerio) del Síndrome de CHARGE: Base genética y molecular**

Presento mi tesis, siguiendo el procedimiento adecuado al Reglamento y declaro que:

1) La tesis abarca los resultados de la elaboración de mi trabajo.
2) De ser el caso, en la tesis se hace referencia a las colaboraciones que tuvo este trabajo.
3) Confirmo que la tesis no incurre en ningún tipo de plagio de otros autores ni de trabajos
presentados por mí para la obtención de otros títulos.
4) La tesis es la versión definitiva presentada para su defensa y coincide la versión impresa con la presentada en formato electrónico.
5) Las figuras presentadas en esta tesis son originales y de elaboración propia.

Y me comprometo a presentar el Compromiso Documental de Supervisión en el caso que el original no esté depositado en la Escuela.

En **Lugo, 24 de mayo de 2022.**

Firma electrónica

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

AUTORIZACIÓN DO DIRECTOR/TITOR DA TESE

D./Dna. **Laura Elena Sánchez Piñón**

En condición de: **Titor/a e director/a**

Título da tese: Generación de un modelo de pez cebra (D. rerio) del Síndrome de CHARGE: Base genética y molecular

INFORMA:

Que a presente tese, correspóndese co traballo realizado por D/Dna Álvaro Jesús Arana Díaz, baixo a miña dirección/titorización, e autorizo a súa presentación, considerando que reúne os requisitos esixidos no Regulamento de Estudos de Doutoramento da USC, e que como director/titor desta non incorre nas causas de abstención establecidas na Lei 40/2015.

En **Lugo**, **28 de Decembro de 2022**

Sinatura electrónica

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

AUTORIZACIÓN DO DIRECTOR/TITOR DA TESE

D./Dna. **Manuel Collado Rodríguez**

En condición de: **Director/a**

Título da tese: Generación de un modelo de pez cebra (D. rerio) del Síndrome de CHARGE: Base genética y molecular

INFORMA:

Que a presente tese, correspóndese co traballo realizado por D/Dna Álvaro Jesús Arana Díaz, baixo a miña dirección/titorización, e autorizo a súa presentación, considerando que reúne os requisitos esixidos no Regulamento de Estudos de Doutoramento da USC, e que como director/titor desta non incorre nas causas de abstención establecidas na Lei 40/2015.

En **Lugo**, **28 de Decembro de 2022**

Sinatura electrónica

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

DECLARACIÓN DE CONFLICTOS DE INTERÉS

Yo, Álvaro Jesús Arana Díaz, con DNI 54150145-A, declaro que la presente tesis doctoral no presenta conflicto de interés alguno.

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

EXPERIMENTACIÓN ANIMAL

Yo, Alvaro Jesús Arana Díaz, con DNI 54150145-BA declaro que esta tesis fue realizada al amparo del proyecto de investigación denominado `El pez cebra y su aplicación en biomedicina, acuicultura y medio ambiente´ (Exp. 01/20/LU-003), aprobado por el Comité de Ética de Experimentación Animal (CEEA) de la Universidad de Santiago de Compostela (MR110250) (Anexo II), de acuerdo con la normativa actual de bienestar animal y conforme a los protocolos estándar (Real Decreto 53/2013, Directiva 2010-63-UE). Los procedimientos se llevaron a cabo en el animalario del Departamento de Zoología, Genética y Antropología Física, en la Facultad de Veterinaria, Lugo (AE-LU-003), con código REGA de autorización ES270280346401. Todos los procedimientos fueron realizados por Alvaro Jesús Arana Díaz, capacitada para las funciones A, B y C de experimentación animal con peces, anfibios y roedores (Anexo III).

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

FINANCIACIÓN

El trabajo de la presente tesis se desarrolló con la ayuda para la consolidación y estructuración de grupos de investigación de la Consellería de Educación. Alvaro Jesús Arana Díaz fue financiado por las Ayudas de Apoyo a la Etapa Predoctoral de la Xunta de Galicia (ED481A-2018/095).

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

A todos los que de alguna forma habéis pasado por mi vida, gracias.

En esta vida estoy aprendiendo a querer y estoy aprendido a dejar. Aun no se cuál de las dos duele más, pero daría mi vida por seguir en la tuya.

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

ÍNDICE

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

ÍNDICE

ABREVIATURAS 37

RESUMO 47

RESUMEN 51

INTRODUCCIÓN 55

1. EL SÍNDROME DE CHARGE 55

1.1. DESCRIPCIÓN DEL SÍNDROME 57

1.2. DIAGNÓSTICO DEL SÍNDROME DE CHARGE 58

1.3. LAS MUTACIONES EN EL GEN CHD7 CAUSAN EL SÍNDROME DE CHARGE 58

1.3.1. El Gen CHD7 y la Proteína CHD7 60

1.3.2. Expresión de CHD7 en Humanos 61

1.3.3. Consecuencias de la Mutación de CHD7 en Humanos 61

2. LA SENESCENCIA 63

2.1. LA SENESCENCIA CELULAR 63

2.1.1. La Senescencia Embrionaria 64

2.2. LA SENESCENCIA EMBRIONARIA EN EL SÍNDROME DE CHARGE 65

2.3. LA SENESCENCIA EMBRIONARIA EN PEZ CEBRA Y KILLIFISH. 67

2.3.1. Marcadores de Senescencia Embrionaria en pez Cebra 67

2.3.2. Marcadores de Senescencia Embrionaria en Killifish 68

3. ORGANISMOS MODELO 69

3.1. EL PEZ CEBRA (DANIO RERIO) 69

3.1.1. El Pez Cebra Como Modelo de Enfermedades Genéticas 70

3.1.2. El Pez Cebra Como Modelo del Síndrome de CHARGE 71

3.1.3. Expresión de Chd7 en Pez Cebra 71

3.1.4. Papel de Chd7 en el Desarrollo del Pez Cebra 71

3.1.5. Relación de Chd7 y Sox9 en el Desarrollo del Pez Cebra 72

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

3.2. Killifish (Nothobranchius furzeri) 73

3.2.1. El Killifish Como Modelo de Envejecimiento 73

3.2.2. El Killifish Como Modelo del Síndrome de CHARGE 75

3.2.3. Expresión de Chd7 en el Killifish 75

4. TÉCNICAS PARA EL ESTUDIO DE ENFERMEDADES GENÉTICAS HUMANAS 76

4.1. Genética Directa 76

4.1.1 ENU 76

4.2. Genética Reversa 77

4.2.1 Knockdown y Morfolinos 78

4.2.2. El Origen del Sistema CRISPR/Cas9 80

4.2.2.1. Sistemas CRISPR/Cas9 in vivo 82

4.2.2.2. Sistemas CRISPR/Cas9 in vitro 84

5. DISCREPANCIA FENOTÍPICA Y CONTROVERSIAS ENTRE TÉCNICAS 87

5.1. Compensación genética 88

5.1.1. Compensación Genética Mediada por NMD y las PTCs 88

5.1.2. La Compensación Genética, una Cuestión Temporal 89

5.2. Contribución Materna 90

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS 97

MATERIALES Y MÉTODOS 103

1. GENERACIÓN DE LA LÍNEA MUTANTE CHD7-CRISPR DE PEZ CEBRA 103

1.1. Selección y Análisis de la Secuencia Diana del Gen chd7 103

1.2. Inyección de los sgRNA y Cas-9 103

1.3. Detección de Mutantes por Clonación en Bacterias del Gen chd7 103

2. LÍNEAS, CRÍA Y MANTENIMIENTO DE PEZ CEBRA Y KILLIFISH 104

2.1. Líneas de Pez Cebra y Killifish 104

2.2. Cría y Mantenimiento de las Líneas de Pez Cebra y Killifish 104

2.2.1 Cría y Mantenimiento de las Líneas de Pez Cebra 105

2.2.1.1. Cruces, procedimiento experimental y almacenamiento de las muestras 105

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

2.2.2. Cría y Mantenimiento de las Líneas de Killifish 106

2.2.2.1. Cruces, procedimiento experimental y almacenamiento de las muestras 106

3. ANÁLISIS GENOTÍPICO DE EMBRIONES Y ADULTOS 107

3.1. Extracción del DNA 107

3.2. PCR del Gen chd7 107

3.3. Comprobación de la Amplificación por Electroforesis en Gel de Agarosa 107

3.4. Análisis del Tamaño de los Fragmentos Amplificados 107

3.4.1. Electroforesis Capilar en Secuenciador ABI 3730 108

3.4.2. Detección de Heterodúplex por Electroforesis en Gel de Acrilamida 108

3.4.3. Detección de Heterodúplex en Homocigotos Problema 109

3.5. Secuenciación Sanger 109

3.5.1. Clonación Bacteriana 109

3.5.1.1 Reacción de ligación 110

3.5.1.2. Transformación bacteriana 110

3.5.1.3. PCR de colonias y electroforesis en gel de agarosa 110

3.5.2. Secuenciación 111

3.5.2.1. Purificación de los productos de PCR 111

3.5.2.2 Reacción de secuenciación 111

3.5.2.3. Purificación de la reacción de secuenciación 111

3.5.2.4. Secuenciación 111

4. KNOCKDOWN DEL GEN CHD7 MEDIANTE MICROINYECCIÓN DE MORFOLINOS 111

4.1. Preparación del Stock de Morfolino 112

5. CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE EMBRIONES Y ADULTOS 112

5.1. Selección y Análisis de Caracteres Morfológicos 112

5.2. Control de Calidad y Análisis de Datos 113

5.3. Tinción Azul Alcián 113

5.4. Tinción Rojo Alizarina 113

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

6. ANÁLISIS HISTOLÓGICO DE LA SENESCENCIA 113

6.1. Tinción SA-b-Gal 114

6.2. Fijación, Inclusión en Parafina 114

6.3. Cortes Histológicos y Contratinción 114

6.4. Fotografía y Análisis de Senescencia 114

7. DETERMINACIÓN DE LA EXPRESIÓN RELATIVA DEL MRNA 114

7.2. Selección de los Genes Marcadores de Senescencia y chd7. 115

7.3. Extracción de RNA 116

7.4. Amplificación de RNA en Tiempo Real, o RT-rtPCR: 116

7.4.1. RT 116

7.4.2. rtPCR 117

7.4.3. Cuantificación Relativa 117

8.1. Síntesis y Purificación de la Ribosonda Antisentido de RNA 117

8.2. Transcripción in vitro y Purificación de la Ribosonda antisentido 117

8.3. Reacción de HIS 118

9. ANÁLISIS DE MOVILIDAD DE LA LÍNEA CRISPR PARA CHD7 118

10. REVISIÓN Y ANÁLISIS COMPARATIVO DE DIFERENTES TÉCNICAS DE ANÁLISIS FUNCIONAL Y MODIFICACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA. 119

11. ANÁLISIS ESTADÍSTICO 119

RESULTADOS 123

1. COMPARACIÓN ENTRE DIFERENTES TÉCNICAS PARA EL ESTUDIO DE ENFERMEDADES GENÉTICAS HUMANAS EN PEZ CEBRA 123

1.1. Análisis comparativo de las técnicas de modificación genética 123

1.2. La baja correlación fenotípica se debe a la ausencia de fenotipo en los mutantes. 124

1.3. El uso de los guidelines con morfolinos no aumenta la recapitulación fenotípica. 125

1.4. La falta de recapitulación fenotípica es una pérdida de homogeneidad fenotípica de los mutantes con el morfante para un mismo gen. 125

2. OPTIMIZACIÓN DEL PROTOCOLO DE CRISPR 127

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

2.1. Identificación de los mutantes homocigotos 129

3. GENERACIÓN, VALIDACIÓN Y ESTABLECIMIENTO DE LA LÍNEA MUTANTE KNOCKOUT ESTABLE CHD7-CRISPR 130

3.1. Establecimiento del Mutante CRISPR para chd7 130

3.2. Caracterización fenotípica chd7-CRISPR 133

3.2.1. El Outcross de los Mutantes Heterocigotos Chd7-CRISPR Reproduce Parcialmente el Fenotipo Morfante 133

3.2.2. Los Mutantes Heterocigotos Chd7-CRISPR Descendientes de un Outcross Presentan un Fenotipo Distintivo 134

3.2.3. El Incross de los Mutantes Heterocigotos Chd7-CRISPR Agrava el Fenotipo 135

3.2.4. Los Embriones Chd7-CRISPR Incross Presentan una Pérdida Total de la Homocigosidad Entre las 120 Hpf y 144 Hpf 135

3.2.5. Los Embriones Chd7-CRISPR Presentan Defectos del Desarrollo Temprano. 136

3.2.6. Los Defectos del Desarrollo de los Embriones Chd7-CRISPR Incross Se Mantienen, Se Recuperan o Se Agravan a las 48 Hpf. 137

3.2.7. Los Embriones Chd7-CRISPR Incross Sufren una Alteración Materno-Cigótica o una Compensación Cigótica 138

3.3. El efecto materno-cigótico de chd7 provoca malformaciones ópticas y óticas. 141

3.3.1. Los Embriones Chd7-CRISPR Outcross Rescatan el Fenotipo a Través de la Activación Cigótica del Programa de Senescencia Embrionaria 142

3.3.2. En los Embriones Chd7-CRISPR Ocurren Efectos Materno-Cigóticos Tardíos Independientemente del Genotipo. 145

3.3.3. La Carga Materna de Chd7-CRISPR Influye en la Variabilidad Fenotípica146

3.4. Los Embriones chd7-CRISPR Descendientes de un Incross Presentan Varias Anomalías Cartilaginosas 148

3.4.1 los Embriones Chd7-CRISPR Descendientes de un Incross Presentan Asociación Fenotípica en los Defectos Cartilaginosos 149

3.5. Los Embriones chd7-CRISPR Descendientes de un Incross Presentan Defectos en la Migración Celular Debidos a la Contribución Materna. 151

3.6. Los embriones chd7-CRISPR descendientes de un incross presentan alteraciones en los patrones de expresión génica 153

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

3.6.1. Los Embriones Chd7-CRISPR Descendientes de un Incross Presentan un Fenotipo en la Expresión de Genes Relacionado con la Gravedad Fenotípica 154

3.6.2. La Deficiencia en Chd7 Produce Alteraciones en la Expresión de Sox9B 154

3.7. Los adultos heterocigotos de chd7-CRISPR presentan un fenotipo distintivo 156

3.8. Los mutantes chd7-CRISPR presentan alteraciones en los patrones de comportamiento 158

4. RELACIÓN ENTRE LA EXPRESIÓN DE CHD7 Y LA SENESCENCIA EMBRIONARIA 163

4.1. La deficiencia en chd7 produce un retraso temporal en el programa de senescencia embrionaria en pez cebra 163

4.1.1. La Deficiencia en Chd7 Produce Alteraciones Locales en la Senescencia del pez Cebra Mutante Chd7-CRISPR 164

4.1.2. Los Tejidos en los que Se Produce Actividad SA-B-Gal Son los Mismos Tejidos que Están Afectados en el Síndrome de CHARGE 166

4.2. La deficiencia del gen chd7 produce alteraciones en la senescencia embrionaria del pez cebra mutante chd7-CRISPR. 167

4.2.1. La Activación del Programa de Senescencia Embrionaria Está Marcado por un Momento en Desarrollo Embrionario 171

4.2.2. Las Alteraciones en la Senescencia Embrionaria Producen Malformaciones en las Estructuras que la Presentan. 173

5. KILLIFISH 177

DISCUSIÓN 183

1. ANÁLISIS COMPARATIVO DE LAS DIFERENTES APROXIMACIONES PARA EL ESTUDIO DE LA FUNCIÓN GÉNICA. 183

1.1. Los genes son más o menos susceptibles a la pérdida de homogeneidad fenotípica 183

1.2. Los morfolinos son responsables del descenso en la homogeneidad fenotípica. 184

1.2.1 el Uso Indiscriminado y sin Controles de los Morfolinos, Altera los Resultados de la Homogeneidad Fenotípica. 185

1.2.2. El Uso de los Controles Disminuye el Número de Falsos Positivos en los Morfantes y Aumenta la Homogeneidad Fenotípica. 185

1.3. Las técnicas de edición genética producen mutaciones distintas que implican resultados distintos en la homogeneidad fenotípica. 186

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

1.3.1. El Tipo de Mutación Influye Negativa y Positivamente en la Recapitulación de Fenotipos de pez Cebra. 186

1.4. La pérdida de la homogeneidad fenotípica es una cuestión genética. 187

1.4.1. Modelo de Genes Susceptibles y Genes Inmunes a la Recapitulación Fenotípica 188

1.4.2. Las Discrepancias Fenotípicas Entre Técnicas Están Causadas por la Contribución Materna. 189

1.4.3. Las Discrepancias Fenotípicas Entre Técnicas Están Causadas por la Activación de la GCR. 189

1.4.4 los Genes Susceptibles e Inmunes a la Recapitulación Fenotípica: un Caso Real 190

1.5. Inmunes y susceptibles. Los genes de Schrödinger. 191

1.5.1 CHD7, ¿Un Gen De Schrödinger? 192

1.6. Todas las técnicas de knockdown y knockout son correctas y válidas para el estudio de la función génica 192

1.6.1. Modelo de Genes Susceptibles e Inmunes Ampliado 193

1.7. Recapitulación fenotípica 195

1.8. El gen chd7 es inmune a la recapitulación fenotípica 196

1.9. El sistema "autoinmune" genético del pez cebra. 197

1.9.1. La GCR Podría Explicar Muchos de los Mecanismos de Reparación y Duplicación Genética Celulares. 198

1.10. Variabilidad fenotípica de chd7 explicada a través de las PTCs 199

2. EL FENOTIPO CHARGE DE LOS MUTANTES CHD7-CRISPR 201

2.1 El Fenotipo CHARGE en Humanos 201

2.2. Establecimiento del Fenotipo CHARGE en Pez Cebra 202

2.2.1. El Cruzamiento Incross de Mutantes Heterocigotos Chd7-CRISPR Muestra un Fenotipo en la Expresión de Genes, Independiente del Genotipo 202

2.2.2. Los Mutantes Chd7-CRISPR Presentan Alteraciones del Comportamiento Relacionadas con un Programa de Senescencia Embrionaria Mal Establecido 203

3. LA CONTRIBUCIÓN MATERNA DE CHD7 205

3.1. La Contribución Materna de chd7 Activa el Programa de Senescencia Embrionaria 205

UdC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

3.1.1. El Gen Chd7 Bloquea las Rutas de Activación de la Senescencia Celular en las Células Programados Para Activar la Senescencia Embrionaria 206

3.1.3. Muchos de los Defectos del Desarrollo de los Peces Cebra Chd7-CRISPR Se Deben a las Alteraciones del Programa de Senescencia Embrionaria 207

3.2. El Efecto Materno del Gen chd7 208

3.2.1. Los Mutantes Chd7-CRISPR Muestran una Amplia Variabilidad Fenotípica Independientemente del Genotipo 209

3.2.2. La Variante Mutante Chd7-CRISPR de Pez Cebra Es Heredable en Heterocigosis Gracias a la Contribución Materna 209

3.2.3. Los Efectos del Gen Chd7 Son Dependientes de la Dosis 210

3.3. Teoría de la Contribución Materna Gradual 212

3.4. No Es Solo Cuestión Materna: la Función Materno-Cigótica de chd7 214

3.4.1. Los Embriones Chd7-CRISPR Muestran o Rescatan un Fenotipo Tardíamente Independientemente del Genotipo 214

3.4.2. El Gen Chd7 Tiene una Función Materno-Cigótica 215

3.4.3. Muchos de los Defectos del Desarrollo No Se Pueden Relacionar con Defectos en el Programa de Senescencia Embrionario Observable 215

3.4.4. El Gen Chd7 Podría Jugar un Papel en la Proliferación Celular Antes o Durante el Programa de Senescencia Embrionaria 216

3.4.6. El Gen Chd7 Materno Cofactor del Programa de Senescencia Embrionaria. 218

3.5. La variante gen chd7 es susceptible a GCR 219

3.5.1. La Línea de pez Cebra Mutante Chd7-CRISPR Produce una Variante de la Proteína Disfuncional 219

3.5.2 la Variante de la Proteína Chd7-CRISPR Produce un PTC Susceptible a Activar la GCR 220

3.5.2.1. El gen chd8 podría compensar la deficiencia cigótica de chd7 a pesar de la no activación de la GCR 220

3.5.2.2. La presencia de PTCs no prueban la GCR para chd7 221

3.5.2.3. La presencia de PTCs prueban el efecto materno de chd7 222

3.5.3. Los Cruzamientos Outcross Nos Pueden Ayudar a Crear una Teoría de la Contribución Materno-Cigótica Gradual 222

3.5.3.1. Los retrasos en el desarrollo observados en mutantes chd7-CRISPR, pueden deberse a activaciones de la GCR en la ZGA 223

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

4. CHD7 EL "INTERRUPTOR" DE LA SENESCENCIA 225

4.1 El Pez Cebra Mutante chd7-CRISPR Es un Modelo Válido para el Estudio Funcional de la Senescencia Embrionaria durante el Síndrome de CHARGE 225

4.1.1. La Deficiencia en Chd7 Produce Retrasos en la Activación del Programa de Senescencia Embrionaria. 226

4.1.2. La Mutación Chd7-CRISPR Inhibe la Proliferación Celular en los Tejidos Senescentes. 227

4.1.3. La Mutación Chd7-CRISPR 227

4.1.5. La Expresión de Chd7 Se Correlaciona Espacial y Temporalmente con la Presencia de Actividad SA-B-Gal Embrionaria Observada en Diferentes Tejidos en Embriones WT y Mutantes Chd7-CRISPR. 228

5. MATAR AL MENSAJERO 229

5.1. Chd7 y chd7 se Contradicen 229

5.2. "Snorlax" sube y baja el interruptor a través de p53. 230

5.2.1. La Expresión del Gen Chd7 Convierte a las Células en Células Sensibles a la Senescencia. 231

5.2.2. Los Mutantes Chd7-CRISPR Activan los Programas de Senescencia Celular Durante la Senescencia Embrionaria 231

5.2.3. La Deficiencia del Gen Chd7 Confiere Inmunidad Apoptótica, Pero su Ausencia Produce la Muerte. 232

5.2.4. El Gen Chd7 Inhibidor/Activador de P53. 233

5.2.4.1. La deficiencia en chd7 activa la expresión de p53 233

5.2.4.2. La deficiencia en chd7-CRISPR inhibe la apoptosis y la proliferación celular y activa la senescencia embrionaria. 234

5.3. La activación del programa de senescencia embrionaria pone fin a la senescencia celular. 234

6. LA PROTEÍNA CHD7, EL "DESTORNILLADOR" DE LA SENESCENCIA EMBRIONARIA 236

6.1. "Desatornillando" la Senescencia Embrionaria 236

6.1.1. La Deficiencia en la Dosis Materna de Chd7 Retrasa la Aparición de la Senescencia Embrionaria 237

6.1.2. La Deficiencia en Chd7 Activa la Apoptosis 237

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

6.2. La Proteína CHD7 Inhibidora/Activadora de la Senescencia Embrionaria 238

6.2.1 la Proteína Chd7 Coactiva la Senescencia 238

6.2.2. La Proteína Chd7 Tiene una Función Tejido-Específica 239

6.2.3 el Gen Chd7 Se Expresa en las Células Embrionarias Para Activar e Inhibir el Proceso de Senescencia Embrionaria 240

6.2.4. La Proteína Chd7 No Activa el Programa El de Senescencia Embrionaria 241

6.2.5. La Proteína Chd7 Tiene una Función Indirectamente Proporcional a la Dosis de Chd7 en la Activación de la Senescencia Embrionaria. 241

6.3. La proteína Chd7 inhibe las rutas de p53 y activa así la senescencia 242

6.3.1. La Proteína Chd7 Funciona Como un Interruptor Genético de la Senescencia 243

6.3.2. Las Funciones Cigóticas de Chd7 243

6.4. La Pérdida del Efecto Materno-Cigótico de chd7 Juega un Papel Clave en el Desarrollo de la Enfermedad. 244

6.5. El Gen chd7 Implicado en la Senescencia en la Regeneración de Tejidos. 245

6.5.1. La Deficiencia en Chd7 Produce Alteraciones en la Regeneración Tisular. 246

6.5.2. La Proteína Chd7-CRISPR No Permite la Regeneración Tisular. 246

7. EL GEN CHD7 EN LA IMPRONTA DE LOS VERTEBRADOS 248

7.1. El síndrome de CHARGE es una enfermedad epigenética compleja 249

7.1.1. El Gen CHD7 Es un Factor Epigenético. 249

7.1.2. El Síndrome de CHARGE Es una Enfermedad Epigenética. 250

7.1.3. El Síndrome de CHARGE una Enfermedad Susceptible y CHD7 un Gen Inmune. 252

7.2. El efecto de la contribución materna de CHD7 en el síndrome de CHARGE 253

7.2.1. Los Efectos del síndrome CHARGE Se Deben a la Desregulación del Efecto Materno-Cigótico de CHD7 y la Activación de la Senescencia a Través de la Impronta. 254

7.3. CHD7-CHD8 hermanos siameses 255

7.3.1 la Deficiencia en CHD7 Produce Retrasos en el Encendido y Apagado del Programa de Senescencia 256

USC UNIVERSIDADE DE COMPOSTELA

7.3.2. La Deficiencia en CHD7 Produce Alteraciones en la Expresión de SOX9 Asociadas a Malformaciones del Fenotipo CHARGE en la Etapa Materno-Cigótica y Cigótica del Desarrollo. 257

7.3.3. El Tipo de Mutación También Afecta al Síndrome de CHARGE 258

7.3.4. La Redundancia Genética y Funcional Afectan al Síndrome de CHARGE 259

7.3.5. La Homología Podría Afectar al Síndrome de CHARGE. 263

8. SENESCENCIA CELULAR VS. SNORLAX 265

8.1. CHD7 EL REPETIDOR DE SEÑALES 265

8.2. EL AGOTAMIENTO DEL PRODUCTO MATERNO Y CIGÓTICO 266

8.2.1. El Agotamiento del Producto Materno y Cigótico 267

8.2.2. Los Inhibidores del Ciclo Celular P15 P21 Contribuyen a Estabilizar la Entrada del Programa de Senescencia Embrionaria en los Tejidos. 268

8.3. EL COMPONENTE MATERNO AJUSTA LOS NIVELES DE CHD7 ANTES DE LA TRANSICIÓN CIGÓTICA 269

8.4. LA CRESTA NEURAL TIENE ALGO QUE DECIR 272

8.4.1. CHD7 el Reprogramador de la Cresta Neural. 273

8.4.2. Los Efectos Materno-Cigóticos de CHD7 en el Neuroepitelio 274

8.5. LAS VARIANTES GENÉTICAS DE CHD7 EN EL SÍNDROME DE CHARGE 279

8.5.1. La Patología Fenotípica del Síndrome de CHARGE Podría Estar Relacionada con el Aumento de PTCs en las Gónadas, No en los Gametos. 280

8.6. LA CONTRIBUCIÓN MATERNA AFECTA A LA GCR 280

8.6.1. La Contribución Materna Es Gradualmente Positiva y Negativa 281

8.6.2. El Tipo de Mutación en la Respuesta al síndrome de CHARGE. 283

8.6.3 la Inmunidad Está en la Necesidad. 284

8.7. VARIABILIDAD FENOTÍPICA EN GENES MATERNO-CIGÓTICOS EXPLICADA POR LA PRESENCIA DE PTCS 284

8.7.1. Los PTCs Afectan a Línea Germinal Pero No a la Somática 285

8.7.2. La Posición del PTC Podría Influir en la Actividad de la GCR 286

9. EL PROGRAMA DE SENESCENCIA EMBRIONARÍA EN PEZ CEBRA A TRAVÉS DE CHD7 288

9.1. CONTRIBUCIÓN EPIGENÉTICA 290

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

9.2. La descompensación materno-cigótica altera los programas del desarrollo 291

9.3. CHD7 es imprescindible para llevar a cabo todos los programas de migración, proliferación, diferenciación, apoptosis y senescencia necesarios para el correcto desarrollo embrionario 293

9.4. Las Implicaciones de la Senescencia Embrionaria en el Síndrome de CHARGE 294

9.4.1. Los Efectos Materno-Cigóticos de Chd7 en la Senescencia Embrionaria 295

9.5. La Impronta causa de la Expresividad y Penetrancia del Síndrome de CHARGE 297

9.5.1. La Pérdida de la Proteostasis Aumenta la Penetrancia y Expresividad 298

10. LA SENESCENCIA Y LA DIAPAUSA 299

10.1. La diapausa en el killifish podría ser un estado de senescencia embrionaria prolongado y reversible. 300

FIGURAS SUPLEMENTARIAS 305

CONCLUSIONS 313

CONCLUSIONES 319

2.1.1. La Presencia de Defectos Fenotípicos en los Embriones WT De Igual Gravedad que los Observados en los Mutantes Homocigotos y Morfantes Para Chd7 Revela la Importancia de la Carga Materna Gradual Positiva y Negativa. 320

2.1.2. La Ausencia de Fenotipo en Mutantes Heterocigotos e Incluso Algunos Homocigotos, Desvela la Importancia de la Carga Materna Negativa y Positiva También en Humanos al Recapitular el Aumento en la Variabilidad de la Expresividad y la Penetrancia Incompleta Para CHD7 Observada Estos Últimos Años. 320

BIBLIOGRAGÍA 327

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

ABREVIATURAS

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

ABREVIATURAS

%: por ciento
°C: Grados Centígrados
µg: microgramos
µl: microlitros
µm: micrometros
µS: microsiemens
6-FAM: 6-Carboxifluoresceína
BSA: *Bovine serum albumin*
Cas: *CRISPR-associated genes*
cDNA: DNA complementario
CHARGE: *Coloboma, Heart malformations, Atresia of the choanae, Retardation of growth and development, Genital hypoplasia, Ear abnormalities or deafness*
***CHD7*:** *Chromodomain Helicase DNA-binding protein 7*
CRISPR: *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*
crRNA: CRISPR-RNA
CUT: Cortada Un Trocito
DSBs: corte de doble cadena, del inglés *Double Strand Breaks*
DNA: ácido desoxiribonucleico
dNTPs: desoxirribonucleótidos trifosfato
dpf: días posfecundación
ENU: N-ethyl-N-nitrosourea
EtOH: etanol
F0: generación fundadora 0
F1: primera generación filial
F2: segunda generación filial
F3: tercera generación filial
g: gramos
GCR: *Gentetic Compensation Response*
GFP: *Green Fluorescent Protein*
HH5: *The Holstein Friesian Lethal Haplotype 5*
H_2O_2: peróxido de hidrógeno
HCL: cloruro de hidrógeno
HIS: hibridación *in situ*
hpf: horas posfecundación
***indels*:** inserciones y delaciones
iRNA: RNA interferentes
KOH: hidróxido de potasio
LoF: *Loss of Function*

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

M: molar
MBT: *midblastula transition*
MO: morfolino
mol: moles
MP: *Maternal Product*
MUT: mutante
MZT: transición materno-cigótica, del inglés *maternal-zygotic transiton*
NHEJ: *Non-Homologous End Joining*
NMD: *Nonsenese Mediated Decay*
nm: nanometros
nmol: nanomol
nl: nanolitro
NOCUT: No Cortada Un Trocito
ON: *overnight*
p15: proteína p15
p19: RNA silencing suppressor p19
p21: *Cyclin-dependent kinase inhibitor 1*
p53: proteína tumoral p53
p27: *Cyclin-dependent kinase inhibitor 1B*
PAM: *Protospacer Adjacent Motif*
***PAX2*:** *Paired box protein 2*
pb: pares de bases
PBT: PBS + Triton
PFA: Paraformaldehido
***pdgfrb*:** *Platelet Derived Growth Factor Receptor beta*
RNA: ácido ribonucleico
PTC: *Premature Termination Codon*
rpm: revoluciones por minuto
RT: transcripción reversa, del inglés *reverse transcription*
rRNA: RNA ribosómico
SA-β-Gal: actividad β-Galactosidasa asociada a senescencia
SAP: del inglés *Shrimp Alkaline Phosphatase*
SASP: *Senescence-Associated Secretory Phenotype*
SNPs: *Single Nucletide Position*
***SEMA3A*: s**emaforina 3A
***SOX2*:** SRY-*box transcription factor* 2
***SOX9*:** SRY-*box transcription factor* 9 (s*ox9a* y s*ox9b* en pez cebra)
***SOX10*:** SRY-box transcription factor 10
TALEN: *Tal-Effector Nucleases*
***TCOF1*:** Treacle Ribosome Biogenesis Factor 1
tracrRNA: *Trans-activating crRNA*
u.a.: unidades *actinteg*
V: voltios

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

VACTERL: *Vertebral defects, Anal atresia, Cardiac defects, Tracheoesophageal fistula, Renal anomalies, and Limb abnormalities*
WES: *Whole Exome Secuencing*
WT: *wild type*
ZFN: *Zinc Fingers Nuclease*
ZGA: *Zygotic Genome Activation*
ZMP: *Zebrafish Mutation Project*
ZP: *Zygotic Product*

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

SUMMARY

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

SUMMARY

CHARGE syndrome is a genetic disease due to the haploinsufficiency of the CHD7 gene, which produces a set of physical and behavioral malformations during embryonic development. Embryonic senescence is a controlled cell cycle arrest process that occurs in some tissues during embryonic development. This cellular program is controlled by the cell cycle inhibitors *cdkn1a* (p21) and *cdkn2a/b* (p15), which are overexpressed by *chd7* deficiencies during zebrafish embryonic development.

The overlap between the tissues affected in CHARGE syndrome and the tissues programmed for embryonic senescence, in addition to the control of *chd7* on the expression of its inhibitors, suggests that these deficiencies produce alterations of the embryonic senescence program in these tissues due to the mismatch of the maternal-zygotic burden of the *chd7* gene leading to the developmental malformations and behavioral deficits seen in patients with CHARGE syndrome.

By generating a *chd7* CRISPR/Cas9 mutant line and recognizing the maternal and zygotic functions of the gene in the establishment and programming of embryonic senescence, we demonstrate that the maternal contribution of the *chd7* gene in zebrafish is essential for the activation and development of the embryonic senescence program.

Deficiencies in this maternal contribution, added to haploinsufficiency of the *chd7* gene, lead to alterations in the maternal-zygotic function of the gene and mismatches in *p53* expression in the embryo during the maternal, maternal-zygotic, and zygotic phases of embryonic development. Also, they produce alterations in the expression of *cdkn2a/b* and *cdkn1a* in senescent cells and the expression of *sox9b* in tissue-specific cells during the maternal-zygotic and zygotic phases.

On the other hand, CHARGE syndrome disease must be re-evaluated, since the zygotic function of the *CHD7* gene, through the establishment of embryonic senescence in the tissues, contributes to the rescue of the individual and the correct development of the organism, thus haploinsufficiency or a deficiency in the *CHD7* gene would not be enough to explain the disease. Deficiencies of the *CHD7* gene are due to a negative maternal contribution or a mismatch of the maternal-zygotic contribution in the activation and programming of embryonic senescence.

The origin of this negative maternal contribution could be related to the results obtained in zebrafish and a hidden mechanism for genetic "immunity" for maternal-zygotic genes. These genes present more severe phenotypes in the presence of PTCs in the mRNA sequences. Most mutations in patients with CHARGE syndrome are likely to produce these PTCs, so it is suggested that the increased expression of these genes in the parental gonads, and genetic compensation through GCR would be contributing negatively and are the origin of the high phenotypic variability and more severe disease phenotypes of CHARGE syndrome.

In addition, for the first time, evidence is provided that the regulation of diapause processes in killifish could be related to these moments of embryonic senescence and surely regulated by chd7, so the killifish model could be a valid model for the study of embryonic senescence and CHARGE syndrome.

USC UNIVERSIDADE

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

RESUMO

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

RESUMO

A síndrome de CHARGE é unha enfermidade xenética que é debida á haploinsuficiencia do xene *CHD7*, que produce un conxunto de malformacións físicas e de comportamento durante o desenvolvemento embrionario. A senescencia embrionaria é un proceso de detención programado do ciclo celular, que se produce nalgúns tecidos durante o desenvolvemento embrionario. Este programa celular está controlado polos inhibidores do ciclo celular *cdkn1a* (p21) e *cdkn2a/b* (p15), que se sobreexpresan polas deficiencias de *chd7* durante o desenvolvemento embrionario do peixe cebra.

A superposición entre os tecidos afectados na síndrome de CHARGE e os tecidos programados para a senescencia embrionaria, ademais do control de *chd7* sobre a expresión dos seus inhibidores, suxire que estas deficiencias producen alteracións do programa de senescencia embrionaria nestes tecidos debido á falta de coincidencia de a carga materno-cigótica do xene *chd7* que conduce ás malformacións durante o desenvolvimiento e deficiencias do comportamento observadas en pacientes coa síndrome de CHARGE.

Mediante a xeraciónd unha liña mutante CRISPR/Cas9 para *chd7*, e o recoñecemento das suas funcións maternas e cigóticas e no establecemento e programación da senescencia embrionaria, demostramos que a contribución materna do xene *chd7* no peixe cebra é esencial para a activación e desenvolvemento do xene. programa de senescencia embrionaria. As deficiencias desta contribución materna, sumadas á haploinsuficiencia do xene *chd7*, provocan alteracións na función materno-cigótica do xene e desaxustes na expresión de *p53* no embrión durante as fases materna, materno-cigótica e cigótica do desenvolvemento embrionario, e alteracións na expresión de *cdkn2a/b* e *cdkn1a* en células senescentes e *sox9b* en células específicas de tecido durante as fases materno-cigótica e cigótica.

Por outra banda, a enfermidade da síndrome de CHARGE debe ser reavaliada, xa que a función cigótica do xene *chd7*, mediante o establecemento da senescencia embrionaria nos tecidos, contribúe ao rescate do individuo e ao correcto desenvolvemento do organismo, polo que unha haplosuficiencia ou unha deficiencia no xene *CHD7* non sería suficiente para explicar a enfermidade. As deficiencias do xene *CHD7* poderían deberse a unha contribución materna negativa ou a un desajuste da carga materno-cigótica na activación e programación da senescencia embrionaria.

A orixe desta carga materna negativa podería estar relacionada cos resultados obtidos no peixe cebra e cun mecanismo oculto de "inmunidade" xenética para os xenes materno-cigóticos. Estes xenes presentan fenotipos máis graves en presenza de PTC nas secuencias de ARNm. A maioría das mutacións en pacientes con síndrome de CHARGE é probable que produzan estes PTC, polo que se suxire que o aumento da expresión destes xenes nas gónadas parentais e a compensación xenética a través do GCR estarían contribuíndo negativamente e son a orixe da alta variabilidade fenotípica e máis. fenotipos de enfermidade grave da síndrome de CHARGE.

Además, se aportan evidencias de que la regulación en los procesos de diapausa en el *killifish*, podrían estar relacionados con estos momentos de senescencia embrionaria y seguramente regulados por *chd7*, por lo que el modelo de *killifish* podría ser un modelo válido para el estudio de la senescencia embrionaria y el síndrome de CHARGE.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

RESUMEN

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

RESUMEN

El síndrome de CHARGE es una enfermedad genética debida a la haploinsuficiencia del gen *CHD7*, y que produce un conjunto de malformaciones físicas y del comportamiento durante el desarrollo embrionario. La senescencia embrionaria es un proceso de arresto del ciclo celular controlado, que ocurre en algunos tejidos durante el desarrollo embrionario. Este programa celular está controlado por los inhibidores del ciclo celular *cdkn2a/b* (p15) y *cdkn1a* (p21), que se ven sobreexpresados ante las deficiencias en *chd7* durante el desarrollo embrionario de pez cebra.

El solapamiento entre los tejidos afectados en el síndrome de CHARGE y los tejidos programados para la senescencia embrionaria, además del control de *chd7* sobre la expresión de sus inhibidores, nos hace suponer que estas deficiencias producen alteraciones del programa de senescencia embrionaria en esos tejidos debido al desajuste de la carga materno-cigótica del gen *chd7* que conducen a las malformaciones del desarrollo y deficiencias comportamentales observadas en los pacientes con síndrome de CHARGE.

Mediante la generación de una línea mutante CRISPR/Cas9 para *chd7* y el reconocimiento de las funciones maternas y cigóticas del gen en el establecimiento y programación de la senescencia embrionaria, demostramos que la contribución materna del gen *chd7* en pez cebra es imprescindible para la activación y desarrollo del programa de senescencia embrionaria. Las deficiencias en esta contribución materna, sumadas a la haploinsuficiencia del gen *chd7*, produce alteraciones en la función materno-cigótica del gen y los desajustes en la expresión *p53* en el embrión durante las fases, materno-cigóticas del desarrollo embrionario, y las alteraciones en la expresión de *cdkn2a/b* y *cdkn1a* en las células senescentes y *sox9b* en células específicas de tejido en las fases materno-cigótica y cigótica.

Por otro lado, la enfermedad del síndrome de CHARGE debe ser revaluada, ya que la función cigótica del gen *chd7*, a través del establecimiento de la senescencia embrionaria en los tejidos, contribuye al rescate del individuo y al desarrollo correcto del organismo, por lo que una haploinsuficiencia o una deficiencia en el gen *CHD7*, no es lo que explica la enfermedad. Las deficiencias del gen *CHD7* podrían deberse a una contribución materna negativa o un desajuste de la carga materno-cigótica en la activación y programación de la senescencia embrionaria.

El origen de esta carga materna negativa podría tener relación con los resultados obtenidos en peces cebra y un mecanismo oculto para la "inmunidad" genética para los genes materno-cigóticos. Estos genes presentan fenotipos más graves ante la presencia de PTCs en las secuencias del mRNA. La mayoría de las mutaciones en pacientes con síndrome de CHARGE son susceptibles de producir estos PTCs, por lo que proponemos que el aumento de la expresión de estos genes en las gónadas parentales, y la compensación genética a través de la GCR estarían contribuyendo negativamente y son el origen de la alta variabilidad fenotípica y de los fenotipos más graves de la enfermedad del síndrome de CHARGE.

Además, se aportan evidencias de que la regulación en los procesos de diapausa en el *killifish*, podrían estar relacionados con estos momentos de senescencia embrionaria y seguramente regulados por *chd7*, por lo que el modelo de *killifish* podría ser un modelo válido para el estudio de la senescencia embrionaria y el síndrome de CHARGE.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

INTRODUCCIÓN

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

INTRODUCCIÓN

1. EL SÍNDROME DE CHARGE

El síndrome de **CHARGE** (MIM# 214800) es una enfermedad rara (Jongmans *et al.*, 2006; Lalani *et al.*, 2006), que causa un patrón de anomalías congénitas, provocado en la gran mayoría de los casos por la **haploinsuficiencia** del gen *CHD7*. En otras palabras, se trata de un síndrome genético que se correlaciona con un conjunto de características físicas y del comportamiento, producidas durante el desarrollo embrionario, debidas a mutaciones heterocigotas, en su mayoría originadas ***de novo,*** en el gen *CHD7.* Estas mutaciones producen variantes patogénicas de la proteína CHD7 que no cumplen su función (**LoF**; del inglés ***Loss of Function***). La prevalencia del síndrome de CHARGE es de 1:10.000-1:15.000 nacimientos. El nombre se debe al acrónimo CHARGE por la alta asociación en la combinación de características patogénicas como: coloboma, defectos cardíacos, **atresia** de las coanas, retraso del desarrollo y el crecimiento, anomalías genitales y del oído (en inglés, ***C****oloboma,* ***H****eart malformations,* ***A****tresia of the choanae,* ***R****etardation of growth and development,* ***G****enital hypoplasia,* ***E****ar abnormalities or deafness*) (Pagon *et al.,* 1981). Tanto estos como otros graves defectos del desarrollo que pueden presentarse, complican mucho la vida de los afectados, pudiendo incluso pasarse muchos meses hospitalizados y someterse a muchas cirugías y otros tratamientos. Los problemas de deglución y respiratorios dificultan la vida incluso cuando llegan a casa (Abadie, 1999; White *et al.*, 2005; Dobbelsteyn *et al.*, 2008). La mayoría tiene pérdida auditiva, problemas de visión o ceguera y problemas de equilibrio que retrasan su desarrollo y comunicación (Thelin y Fussner, 2005).

Al igual que ocurre con otros síndromes genéticos, existe una alta heterogeneidad fenotípica y genética dentro del síndrome de CHARGE (Legendre *et al*., 2017). No todos los pacientes con mutaciones en *CHD7* o síndrome de CHARGE diagnosticado cumplen con todos los criterios diagnósticos para el síndrome. Algunos de los pacientes solo tienen una o algunas de las característica fenotípicas asociadas al síndrome (Lalani *et al.*, 2006; Delahaye *et al*., 2007, Jongmans *et al*., 2009, Bergman *et al*., 2011, Hale *et al*., 2016; Bergman *et* al., 2012), y a otros no se les ha encontrado una variante patogénica identificable o deleción en el gen *CHD7* (Zentner *et al.*, 2010; van Ravenswaaij-Arts *et al.*, 2017). El mismo fenotipo asociado al síndrome de CHARGE también puede estar causado por mutaciones en el gen de la semaforina-3E (*SEMA3E*) en el cromosoma 7q21 (Martin *et al.*, 2001; Lalani *et al.*, 2004). Otras enfermedades clínicas pueden reproducir el fenotipo del síndrome de CHARGE, como el síndrome de Kabuki, el síndrome de deleción 22q11.2 y otros síndromes cromosómicos más raros (Sullivan, 2008; Schulz *et al.*, 2014; Patel *et al.*, 2015). El síndrome de Kallmann igual que el síndrome de Treacher Collins, provocados por mutaciones en los genes ***HH5*** y ***TCOF1*** respectivamente**,** son trastornos asociados a anomalías menos graves pero con una alta superposición fenotípica con el síndrome de CHARGE (Ogata *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2008; Jongmans *et al.*, 2009; Janssen *et al.*, 2012; Dixon *et al.*, 2007). No obstante, el síndrome de

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO

CHARGE se considera único en su combinación de estas características con defectos característicos del oído interno y externo y colobomas ópticos (Zentner *et al.*, 2010).

En el caso de que los *array* de **SNPs** (variante de un nucleótido, del inglés *Single Nucletide Polymorphism*) de alta resolución y la secuenciación del exoma completo no proporcionen indicios de estos síndromes superpuestos, entonces los patrones de metilación únicos podrían indicar si el gen *CHD7* está involucrado o no en la enfermedad. Un ejemplo son las **variantes patogénicas** que interrumpen las regiones intragénicas **promotoras** o **reguladoras** de la expresión de *CHD7* y que también pueden conducir a la deficiencia y podrían presentarse con firmas de metilación similares (Bouazoune y Kingston, 2012; van Ravenswaaij-Arts *et al.*, 2017; Aref-Eshghi *et al.*, 2018). En un estudio de Butcher *et al.* en 2017, observaron que existía un patrón distintivo de metilación del **DNA** presente en 19 individuos con el síndrome de CHARGE y una variante patogénica *CHD7*, y que esta **firma epigenética** difería entre los individuos con síndrome de CHARGE y los controles, y entre las variantes ***nonsense*** de *CHD7* probablemente patogénicas y probablemente benignas (Butcher *et al.*, 2017). La información obtenida por los resultados de este estudio de metilación puede resultar útil para distinguir entre individuos con un diagnóstico clínico de síndrome CHARGE en quienes la pérdida de función de CHD7 no es evidente por deleción o variantes patogénicas en el gen y tampoco se encuentran mutaciones en otros genes. Las variantes *missense* por otro lado, suelen asociarse con un fenotipo más leve (Bergman *et al*., 2012).

Aunque las anomalías se produzcan durante el desarrollo embrionario y la mayor parte de casos sean mutaciones *de novo*, la investigación básica sobre la función de CHD7 ha contribuido mucho en la comprensión de este síndrome fenotípicamente complejo y muy variable, y la capacidad de confirmar molecularmente el diagnóstico ha permitido una descripción más precisa del espectro fenotípico completo (Bergman *et al.*, 2011; Zentner, *et al.*, 2010). Se ha mejorado el asesoramiento genético sobre el riesgo de recurrencia al demostrarse que no todos los individuos son esporádicos (Jongmans *et al.*, 2008; Pauli *et al*.,2009; Legendre *et al*., 2017). Con la introducción de técnicas rápidas y rentables de detección de variantes en todo el genoma, se están identificando más individuos con una presentación atípica del síndrome, cambiando gradualmente la descripción del fenotipo y el genotipo (Lalani *et al.*, 2006; Delahaye *et al*., 2007, Jongmans *et al*., 2009, Bergman *et al*., 2011, Hale *et al*., 2016; Bergman *et* al., 2012).

1.1. Descripción del Síndrome

En 1961, Angelman describió cuatro niños durante un período de 10 años con un diagnóstico primario de coloboma y otras anomalías asociadas (Angelman, 1961). En 1979, B. Hall y el grupo de HM. Hittner *et al.* publicaron dos trabajos independientes, aunque de forma simultánea, en los que describían una nueva enfermedad en la que los pacientes presentaban múltiples anomalías congénitas en una amplia variedad de tejidos. Hall (1979), realizó un estudio con 17 pacientes con atresia coanal, en el que se percató de la fuerte asociación que presentaban con un patrón de anomalías: orejas pequeñas y deformes, retraso mental y del crecimiento posnatal, defectos cardíacos, colobomas oculares, sordera e hipogonadismo en varones. Hittner *et al.* (1979) publicaron un estudio con 9 niños y un adulto con microftalmia colobomatosa en el que describían sin saberlo el mismo síndrome. Sus pacientes, presentaban anomalías en el oído externo con una pérdida auditiva asociada, cardiopatías, retraso mental y algunos

USC SANTIAGO DE COMPOSTELA

también parálisis facial y descoordinación o parálisis faríngea (Hall, 1979; Hittner *et al.,* 1979), lo cual condujo al nombre temprano de síndrome de Hall-Hittner.

Dos años más tarde, Pagon *et al.* hicieron un nuevo estudio con 21 pacientes y acuñaron el acrónimo de CHARGE, con el objetivo de resaltar que esta asociación de anomalías congénitas ocurre con más frecuencia de lo que se esperaría por azar, y que se debe a un solo defecto subyacente o a una mera asociación causada por alguna anomalía en algún momento durante la embriogénesis (Pagon *et al.*, 1981). Actualmente ha aumentado mucho la lista de los defectos del desarrollo observados (**Tabla 1**). Aunque muchas de estas características aparecen con frecuencia en otros síndromes, la combinación de estas con colobomas o problemas en el oído interno y externo es único del síndrome de CHARGE.

Tabla 1. Las alteraciones de CHARGE ocurren en regiones que expresan Chd7 y expresan senescencia embrionaria

Fenotipo CHARGE	Órgano Afectado	Expresión de *CHD7*	Senescencia
Coloboma	Ojo	Copa óptica (h, m), ojo inespecífico (zf)	Copa óptica (ck), lente (ck, zf),
Heart malformations (malformaciones cadíacas): defectos septales, ramificación anormal...	Corazón	No en el corazón, sí en los arcos faríngeos.	No en el corazón, sí en los arcos faríngeos.
Atresia coanal	Faringe	Arcos faríngeos (h, m, zf)	Arcos faríngeos (m, ck)
Retraso en el crecimiento e hipoplasia de varias estructuras cerebrales, retraso mental...	Sistema nervioso, pituitaria	Tubo neural (h, r, zf), *midbrain* (zf), *forebrain* (zf), bulbo olfatorio	Tubo neural (m, ck, zf), *hindbrain* (m, xn), *midbrain* (ck, xn)
Genital alterations (Alteraciones Genitales)	Sistema urogenital	Metanefros (m),tubo renal (m),gónadas (m)	Pronefros (ax, xn, zf), metanefros (m, h, q, ck), ducto de Wolffian (m)*
Ear defects (defecto auditivos):displasia del canal semicircular, respuestas afectadas auditivas y vestibulares)	Oído externo y medio	Arcos faríngeos (h, m, zf)	Arcos faríngeos (m, ck)
	Oído interno	Vesícula otica (h, m, ck), canales semcirculares (m), cresta (m), mácula (h,, m), cóclea.	Vesícula ótica (m, ck), ducto endolinfático** (h, m, ck), canales semicirculares (m, ck), cresta (ck), papila basilar (ck)***
Anosmia	Epitelio olfatorio	Epitelio olfatorio (h, m)	Placoda olfatoria (c, ax)
Labio/paladar hendido	Región oral	Arcos faríngeos (h, m)	Arcos faríngeos (m, ck), glándula de cemento (xn)****
Polidactilia, "palo de hockey" dedos en forma de J	Extremidades	Yemas mesenquimales de las extremidades (h)	tejido interdigital (m, ck)

Abrev: ax: ajolote; ck: pollo; h: humano; m: ratón; xn: *Xenopus*; zf: pez cebra
* Los ratones mutantes *Chd7* y *p21* muestran malformaciones vaginales
** Los ratones mutantes *Chd7* y *p21* muestran defectos endolinfáticos
*** Nuestros resultados inéditos
*** La inhibición local de la senescencia altera la cavidad oral de *Xenopus*

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

La esperanza de vida de los pacientes con síndrome CHARGE varía ampliamente, con individuos que viven desde 5 días (Issekutz *et al.*, 2005) hasta al menos 46 años (Jongmans *et al.*, 2006). El análisis actuarial de supervivencia en niños con CHARGE mostró una tasa de supervivencia del 70% a los 5 años de edad, con la mayor tasa de mortalidad en el primer año de vida. La tasa de mortalidad es más alta en los lactantes con una combinación de atresia coanal y defectos cardíacos o fístula traqueoesofágica (Blake *et al*., 1998; Zentner *et al*., 2010). Las dificultades frecuentes para alimentarse y tragar, así como el reflujo gastroesofágico, también contribuyen a la mortalidad infantil de CHARGE y también pueden contribuir a la mortalidad general en todos los pacientes de CHARGE (Blake *et al.*, 1998). La disminución de la esperanza de vida probablemente se relacione con una combinación de defectos cardíacos, infecciones, aspiración o asfixia, problemas respiratorios que incluyen apnea obstructiva y central, y convulsiones. A pesar de estas complicaciones, la esperanza de vida de muchas personas puede ser normal. Muchos adultos con características fenotípicas compatibles con el síndrome CHARGE viven de forma independiente, incluso algunos poseen títulos universitarios. Sin embargo, el nivel de independencia comprende un amplio espectro que depende para cada individuo de la combinación de características fenotípicas, el programa educativo diseñado para abordar necesidades específicas y los recursos disponibles (Blake *et al*., 2005, Hartshorne *et al*., 2016).

1.2. Diagnóstico del síndrome de CHARGE

Para realizar el diagnóstico clínico y fenotípico del síndrome de CHARGE se identifican en los pacientes algunos de los criterios mayores y menores descritos por Blake *et al.* (1998), modificados por Verloes (2005) y resumidos en la Tabla 2. En 1998 Blake *et al.* indicaron la importante disfunción de los nervios craneales como uno de los cuatro criterios principales para un diagnóstico clínico del síndrome (Blake *et al.*, 1998). Verloes puso en relieve la presencia de coloboma ocular, atresia o estenosis coanal e hipoplasia de los canales semicirculares como criterios principales y revisó los criterios diagnósticos para incluir los casos típicos y atípicos (Verloes, 2005). Pero los 3 indicadores de diagnóstico claves siguen siendo: la presencia de coloboma ocular o microftalmía, atresia o estenosis coanal, y las anomalías características del oído interno y externo del fenotipo CHARGE. Tras el diagnóstico fenotípico se debe realizar un diagnóstico genético en el que se buscan mutaciones del gen *CHD7* como confirmación del síndrome (Zentner *et al*., 2010; Bergman et al., 2011). La coocurrencia entre un diagnóstico clínico positivo y la presencia de mutaciones en el gen *CHD7* siguiendo los criterios fenotípicos descritos previamente aumenta aproximadamente al 90%, lo que hace destacar la alta especificidad y sensibilidad de estas observaciones (Basson *et al*., 2015).

1.3. Las mutaciones en el Gen *CHD7* causan el síndrome de CHARGE

Vissers *et al.* en 2004 descubrieron que el gen *CHD7* estaba implicado en el síndrome de CHARGE, al descubrir en varios pacientes diferentes mutaciones en este gen (Vissers *et al.*, 2004). El síndrome de CHARGE puede definirse como un síndrome autosómico dominante, que está causado en más de 2 de cada 3 casos por la haploinsuficiencia debida a mutaciones en el gen *CHD7* (Sanlaville *et al.*, 2007; Zentner *et al.*, 2010). En una revisión de 379 casos publicados de pacientes diagnosticados clínicamente con el síndrome CHARGE, se descubrió que el 67% de los casos se debían a mutaciones en heterocigosis en el gen *CHD7* (Zentner *et*

USC UNIVERSIDADE DE COMPOSTELA

al., 2010). Este porcentaje puede aumentar entre el 90-95% si los pacientes cumplen con un diagnóstico completo y firme, bajo los criterios diagnósticos de Blake *et al.* y Verloes tal y como describieron Jongmans *et al.* y confirmado por Bergman *et al.* (Blake *et al.,* 1998; Verloes, 2005; Jongmans *et al.,* 2006; Bergman *et al.,* 2011; Basson *et al*., 2015). Además, los patrones de expresión de *CHD7* en fetos humanos, se correlacionan espacialmente y en cantidad de expresión con los diferentes tejidos en los que se observan anomalías del desarrollo en el síndrome de CHARGE (Tabla 1) (Sanlaville *et al.*, 2006). Antes del descubrimiento del gen, Pagon *et al.* (1981) ya predijeron que debían de haber al menos dos formas de herencia genética independientes, pero tal vez indistinguibles:

Tabla 2. Criterios diagnósticos del síndrome de CHARGE

Criterios según Blake (1998)	Criterios según Verloes (2005)
Definido - Presencia de 4 caracteres mayores o 3 mayores y 3 menores	**Típico -** Presencia de 3 caracteres mayores o 2 mayores y 2 menores
	Parcial - Presencia de 2 caracteres mayores y 1 menor
Probable/posible CHARGE - Presencia de 1 o 2 caracteres mayores y varios menores	**Atípico -** Presencia de 2 caracteres mayores pero no menores, o 1 mayor y 2 menores
Criterios Mayores	**Criterios Mayores**
Coloboma (iris, retina, coroide, disco óptico, microftalmía)	Coloboma (iris o coroide, con o sin microftalmía)
Atresia coanal/estenosis	Atresia de coanal/estenosis
Anomalías del oído interno (hipoplasia coclear en hueso temporal y/o canales semicirculares ausentes o hipoplásicos)	Hipoplasia/aplasia de los canales semicirculares
Anomalías del oido externo (lóbulos ausentes o hipoplásicos, asimetría, disminución de los pliegues cartilaginosos y concha triangular)	
Disfunción de algún nervio craneal: **I** - anosmia, **VII** - parálisis facial, **VIII** - sordera neurosensorial y problemas vestibulares, **IX** y/o **X** - problemas de deglución (Especialmente NC **VII** y **VIII**)	
Criterios Menores	**Criterios Menores**
Hipoplasia genital	Disfunción rombencefálica (anomalías del tronco cerebral, parálisis de los NC VII to XII, y sordera)
Retraso en el desarrollo: retraso motor, hipotonía, retraso mental	Disfunción hipotálamo-hipófisiaria
Malformación cardiovasculares	Malformación de los órganos del mediastino (corazón, esófago)
Deficiencias del crecimiento	Malformación de la oído interno/externo
Hendidura orofacial	Retraso mental
Fístula traqueo-esofágica	
Rasgos faciales distintivos: frente ancha, inclinada, orejas lateralmente protuberantes, boca pequeña y puente nasal alto	

NC: Nervios Craneales

a). **Herencia autosómica dominante:** sugerido a partir de una familia en la que parecen estar afectadas una madre y su hija.

b). **Herencia autosómica recesiva:** sugerido en otra familia de dos hermanos afectados con padres sanos.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Esta observación, aunque imprecisa, puede ser correcta, ya que ahora se sabe que las mutaciones en *CHD7,* en heterocigosis, son la causa del síndrome de CHARGE, y que el homocigoto mutante para *CHD7* es letal. La forma de herencia ocurre de una manera autosómica dominante, sin antecedentes familiares, siendo aproximadamente el 97 % mutaciones *de novo* (Sanlaville y Verloes, 2007) en su mayoría de origen paterno y sin encontrar ninguna relación con respecto a la edad paterna (Pauli *et al.*, 2012). Como las mutaciones en homocigosis en el gen *CHD7* son letales durante el desarrollo embrionario, no se ha identificado ningún caso de herencia autosómica recesiva (Hurd *et al.*, 2007).

Las mutaciones provocan la haploinsuficiencia del gen debido a alteraciones en la proteína y su función, que a su vez, son la causa de la patogenia de la enfermedad (Bosman *et al.*, 2005; Lalani *et al.*, 2006; Jongmans *et al.*, 2006; Hurd *et al.*, 2007; Jongmans *et al.*, 2008). En la actualidad, se ha informado ya de más de 500 mutaciones diferentes que son variantes patogénicas en humanos registradas en la *CHD7* Database (Janssen *et al.*, 2012; https://www.chd7.org/). Dichas variantes se han encontrado a lo largo de toda la secuencia, a excepción de uno de los 38 exones y en alguna secuencia intrónica, afectando a todos los dominios conocidos de la proteína. No obstante, debido al gran tamaño de la proteína CHD7, el análisis funcional de esta estuvo enormemente obstaculizado. En 2012, Bouazoune y Kingston, comprobaron los efectos de las mutaciones en *CHD7* en ensayos bioquímicos y comprobaron que estas provocan una alteración en la función de remodelación ATP dependiente de los nucleosomas, a lo largo del DNA, disminuyendo la accesibilidad de la cromatina para las enzimas de restricción (Bouazoune y Kingston, 2012).

1.3.1. El Gen *CHD7* y la Proteína CHD7

El gen de *CHD7* (OMIM# 608892), en humanos está situado en el cromosoma *8q12*, y codifica una proteína miembro de la familia de las proteínas helicasas con cromodominio de unión a DNA (CHD, del inglés *Chromodomain Helicase DNA binding protein*), una de las cuatro familias principales de proteínas remodeladoras de la cromatina ATP dependientes (Martens y Winston, 2003; Conaway y Conaway, 2009), conservada evolutivamente en eucariotas desde su único miembro, *CHD1*, en *Saccharomyces cerevisiae*, hasta las nueve que se encuentran en vertebrados. El gen *CHD7* tiene ortólogos en varios organismos modelo, incluyendo ratón, pez cebra y *Drosophila* (Bosman *et al.*, 2005; Srinivasan *et al*., 2008; Bajpai *et al.,* 2010).

La proteína CHD7 presenta 2 cromodominios N-terminales repetidos en tándem, responsables de la unión a histonas metiladas, y el dominio central ATPasa/helicasa tipo SNF2, con actividad de remodelación de la cromatina, característica de la familia CHD (Delmans *et al*.,1993; Brehm *et al.*, 2004). La presencia de los dominios relacionados con la cromatina, así como cinco señales de localización nuclear consenso, llevaron a suponer que CHD7 se trataba de una proteína nuclear, algo que más tarde fue confirmado experimentalmente (Schnetz *et al.*, 2009). Esta proteína tiene efectos epigenéticos gracias a su actividad como regulador transcripcional (Kouzarides, 2007; Rodríguez-Paredes *et al.*, 2009; Schnetz *et al.*, 2009), actuando como efector en la modificación de histonas, y está íntimamente relacionada con las regiones metiladas de la H3K4 (lisina 4 de la histona 3), características de regiones con transcripción activa (Schnetz *et al.*, 2009). La función de CHD7 es unirse a los elementos potenciadores distales y enlazar la cromatina con los sitios de inicio de la transcripción para promover o inhibir la transcripción y facilitar la elongación del **RNA** (Heintzman *et al.*, 2007).

USC UNIVERSIDADE DE COMPOSTELA

1.3.2. Expresión de *CHD7* en Humanos

La expresión de *CHD7* es ubicua y alta en el desarrollo temprano en tejidos fetales humanos durante los primeros 22 días (Sanlaville *et al.*, 2006). A medida que avanza el desarrollo comienza a restringirse la expresión y a localizarse en diversos tejidos que se sabe que están afectados en pacientes con el síndrome de CHARGE, como el oído, el ojo y el sistema olfativo. El neuroepitelio indiferenciado y el mesénquima, que da origen a la cresta neural, son los tejidos en los que se encuentra mayor expresión. Llegando al final del primer trimestre, *CHD7* comienza a expresarse en los ganglios de la raíz dorsal, en los nervios craneales y ganglios auditivos, en la pituitaria, los tejidos nasales y en la retina neural. Los patrones de expresión de *CHD7* son variables a lo largo del desarrollo, lo que sugiere que la expresión de *CHD7* durante el desarrollo no solo es específica de tejidos, sino que también está regulada temporalmente (Sanlaville *et al.*, 2006).

1.3.3. Consecuencias de la Mutación de *CHD7* en Humanos

Desde el descubrimiento de *CHD7* como causa de la enfermedad, se han realizado extensos análisis genotipo-fenotipo de grandes cohortes de individuos, para discernir la contribución de *CHD7* en las diversas características (Jongmans *et al.*, 2006; Lalani *et al.*, 2006; Wincent *et al.*, 2008). Los resultados de estos estudios sugieren que los individuos con síndrome de CHARGE atípico y los de CHARGE típico, según los criterios diagnósticos ampliados por Verloes (2005), presentan distintos tipos de mutación. En este sentido, no todas las mutaciones en *CHD7* causan síndrome de CHARGE, pero cuando la mutación es patogénica, los pacientes generalmente presentan penetrancia completa, aunque su manifestación en los distintos tejidos, es altamente variable (Bergman *et al.*, 2011).

Esto concuerda con las observaciones hechas en gemelos monozigóticos con rasgos discordantes y con la identificación de mutaciones idénticas en pacientes con síndrome de Kallmann como con síndrome de CHARGE (Johnson *et al.*, 2006; Ogata *et al.*, 2006). La condición más frecuente es la displasia o aplasia de los canales semicirculares, que se produce en el 94-98 % de los individuos afectados, independientemente del tipo de mutación, por tanto, se considera casi determinante del síndrome de CHARGE. El coloboma ocular presenta también una alta penetrancia en CHARGE, ocurriendo en un 75-81 % de los pacientes con mutaciones en *CHD7*. Las anomalías cardíacas, disfunción del nervio craneal, atresia coanal y hendiduras son menos comunes, y varían entre el 30-75 % (Bergman *et al.*, 2011; Zentner *et al.*, 2010).

La dificultad en el diagnóstico clínico del síndrome CHARGE radica sobre todo en diferenciarlo de otras enfermedades que comparten muchas de sus características fenotípicas, como el síndrome de deleción 22q, el síndrome de Kabuki, el síndrome velocardiofacial, el síndrome del ojo de gato, la embriopatía por ácido retinoico, la asociación VACTERL y las anomalías de *PAX2* (Lalani *et al.*, 2006). No obstante, además del diagnóstico fenotípico, como hemos explicado, debe realizarse siempre un diagnóstico diferencial del gen *CHD7*. No obstante, en ocasiones los pacientes diagnosticados con otro síndrome como el síndrome de Kallman o hipogonadismo hipogonadotrópico aislado presentan mutaciones en *CHD7* (Kim, 2015; Wen *et al.*, 2018; Gonçalves *et al.*, 2019). Esta alta variabilidad fenotípica de las mutaciones en *CHD7* sugiere que la penetrancia de *CHD7* en el síndrome de CHARGE es incompleta, además de demostrar una alta variabilidad en la expresividad. Actualmente,

USC UNIVERSIDADE DE COMPOSTELA

existen documentadas personas afectadas con mutación en *CHD7* y familiares con la misma mutación, pero no afectados o con fenotipos leves (Delahaye *et al*., 2007; Jongmans *et al*., 2008; Hughes *et al*., 2014; Hale *et al*., 2015; Wen *et al.*, 2018), lo que hace disminuir todavía más la penetrancia y aumentar la variabilidad en la expresividad de *CHD7*.

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

2. LA SENESCENCIA

La senescencia es un proceso celular que produce la inhibición de la proliferación de células dañadas muy importante en cáncer y envejecimiento. Se puede definir como un arresto estable del ciclo celular que puede estar provocado como respuesta a múltiples tipos de daños celulares como: la señalización oncogénica intensa, el daño en el DNA y la pérdida de los telómeros (Campisi y d'Adda di Fagagna, 2007; Collado *et al.*, 2007).

Las células senescentes se encuentran asociadas a situaciones patológicas, sobre todo tumores y tejidos envejecidos y es otra respuesta al daño celular junto con la apoptosis, con la que comparte muchas características y mediadores comunes (Bromleigh y Freedman, 2000; Campisi y d'Adda di Fagagna, 2007; Collado y Serrano, 2010; Moskalev *et al.*, 2014; Wanner *et al.* 2021). Sin embargo, ambos procesos celulares ocurren también durante el desarrollo embrionario como parte de su propio programa celular bien definido y activado en respuesta a señales del desarrollo (Kourtis y Tavernarakis, 2007; Conradt, 2009; Fuchs y Steller, 2011).

2.1. La senescencia celular

Las células senescentes poseen ciertas características morfológicas y moleculares que las definen y las hacen distinguibles. Morfológicamente, estas células son grandes y planas, y poseen una elevada actividad beta-galactosidasa lisosomal (Lee *et al.*, 2006) que se conoce como actividad β-Galactosidasa asociada a senescencia (**SA-β-Gal**), y es la manera más efectiva de comprobar senescencia tanto en tejidos como en cultivos celulares (Dimri *et al.*, 1995; Collado y Serrano, 2006). Se evalúa realizando una tinción β-Galactosidasa, con nombre homónimo (tinción SA-β-Gal), que utiliza el X-gal, un análogo de la galactosa, como sustrato cromogénico, y que ensayada a un pH subóptimo, da como resultado un color azulado específicamente en las células senescentes.

Las células senescentes también presentan una expresión aumentada de proteínas reguladoras características. Entre ellas encontramos distintos miembros de rutas supresoras de tumores, como p16INK4a (*CDKN2A*), p21 (*CDKN2B*), p53 y p19 que funcionan como inhibidores de la proliferación (Rhinn *et al.*, 2019). La participación de estas vías supresoras de tumores sugiere un importante papel de la senescencia cómo un potente mecanismo de supresión tumoral *in vivo* (Lowe *et al.*, 2004; Chen *et al.*, 2005; Majumder *et al.*, 2008; Nardella *et al.*, 2008; Young *et al*., 2008; Xu *et al*., 2008; Collado y Serrano, 2010; Braumüller *et al*., 2013).

Otra característica de las células senescentes es la secreción al medio de una serie de factores de crecimiento, citocinas y proteínas de remodelación de la matriz extracelular. Este fenómeno se conoce como fenotipo secretor asociado a senescencia (**SASP**, del inglés *Senescence-Associated Secretory Phenotype*) y permite la comunicación de estas células no proliferativas con su entorno (Acosta *et al.*, 2008; Kuilman *et al*., 2008; 2010; Coppé *et al.*, 2010). La secreción de estos factores podría estar reforzando y propagando la senescencia de forma autocrina y paracrina, manteniendo el estado estacionario o reclutando células inmunes para eliminar las células senescentes (Kuilman y Peeper, 2009; Acosta *et al.*, 2013). También se ha demostrado que las células senescentes son resistentes a los estímulos apoptóticos (Mooi y Peeper, 2006).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Aunque son procesos celulares distintos, la senescencia celular en muchos aspectos puede equipararse con la apoptosis celular. Ambos comparten estímulos que los activan, como el daño al DNA o el estrés oncogénico, e intermediarios comunes como p53. (Campisi y d'Adda di Fagagna, 2007; Collado *et al.*, 2010). Además, estos dos programas celulares han demostrado desempeñar un importante papel tanto en procesos patológicos como en la reparación y renovación de tejidos (Demaria *et al.*, 2014; Yun *et al.*, 2015; Yun, 2018; Da Silva-Álvarez *et al.*, 2020a). La apoptosis también juega un papel crucial durante el desarrollo embrionario, formando parte de un programa bien definido que se activa en respuesta a distintas señales del desarrollo (Conradt *et al.*, 2009; Kourtis y Tavernarakis, 2007). Este papel crucial de la apoptosis, condujo a la hipótesis de si la senescencia podría también ejercer una función durante la embriogénesis.

2.1.1. La Senescencia Embrionaria

En 2013, los grupos de Muñoz-Espín *et al.,* y Storer *et al.,* identificaron la existencia de senescencia celular durante el desarrollo embrionario y predijeron que su presencia servía para refinar la morfogénesis embrionaria. Tanto en embriones de pollo, ratón y humanos, se encontraron evidencias claras de la presencia de células senescentes no proliferativas y con actividad positiva SA-β-Gal en diferentes estructuras como el mesonefros, el saco endolinfático del oído interno, la cresta apical ectodérmica de las extremidades en desarrollo y durante el cierre del tubo neural entre otras. Además, estas células presentaban elevados niveles de expresión de *p21* (*CDKN2B*), uno de los reguladores del ciclo celular activado durante la senescencia. También se observó en estas mismas estructuras la liberación de un conjunto de proteínas pertenecientes al SASP (Muñoz-Espín *et al.*, 2013; Storer *et al.*, 2013).

Estas 3 características, tinción de SA-β-Gal, expresión de *p21* y liberación de SASP son comunes a los otros mecanismos de senescencia descritos: reparación tisular y supresión tumoral (Fig. 1; Collado y Serrano, 2010; Cevenini *et al*., 2013; Muñoz-Espín *et al* 2013; Storer *et al*., 2013; Campisi, 2013). Sin embargo, otras características no son compartidas por todos los tipos de senescencia celular. Los tejidos senescentes embrionarios no expresan p16INK4a, pero si expresan p15, otro inhibidor del ciclo celular que se ha visto también en unas pocas células senescentes no embrionarias (Storer *et al.*, 2013). Además, no ha sido observada evidencia de respuesta al daño del DNA o la activación de la expresión de *p53*.

Mientras la senescencia en tejidos no embrionarios depende principalmente de p53 y p16INK4a (*CDKN2A*), en el caso de los tejidos embrionarios es dependiente de p21. En el embrión, la expresión de p21 es inducida por las vías de señalización TGFβ/SMAD y PI3K/FOXO, a diferencia de la senescencia no embrionaria, que se produce en respuesta a la expresión de *p53* o al daño al DNA (Muñoz-Espín *et al.*, 2013). Los ratones *p21* nulos presentan un menor número de células positivas para SA-β-Gal en comparación con los controles, y ciertas anormalidades del desarrollo. Sin embargo, la mayoría de estos defectos desaparecen al nacer (Muñoz-Espín *et al.*, 2013). Hay dos razones que podrían explicar el fenotipo de estos ratones y mantener la importancia potencial del programa de senescencia. La primera es que la supresión de p21 puede no ser suficiente para anular la senescencia o que solo retrase su inducción. La segunda, es que los embriones son notablemente plásticos, pudiendo compensar la pérdida de p21 mediante la participación de programas alternativos de remodelación tisular, como la apoptosis, compensando así la falta de senescencia.

USC UNIVERSIDADE DE COMPOSTELA

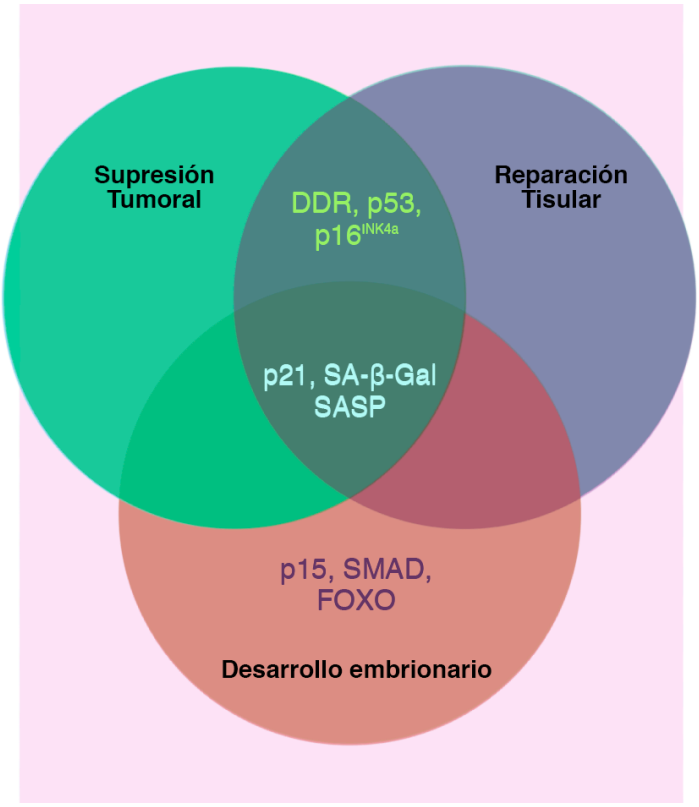


Figura 1. Módulos de Senescencia. La senescencia celular está implicada en la supresión tumoral, la reparación tisular y en la embriogénesis. Las células senescentes expresan la proteína p21, proteínas asociadas al fenotipo secretor asociado a la senescencia (SASP) y exhiben actividad SA-β-Gal. Durante la supresión tumoral y la reparación tisular, la senescencia depende principalmente de la actividad de las proteínas p53 y p16INK4a, a menudo inducidas como parte de la respuesta al daño en el DNA (DDR). La senescencia durante la embriogénesis depende de p21, que es activado por los factores de transcripción FOXO y SMAD, y las células senescentes del embrión también expresan p15. [Modificado de Campisi *et al.*, 2013]

Al igual que la apoptosis, ambos procesos se desencadena en respuesta a diferentes estímulos que en condiciones fisiológicas da como resultado la eliminación de las células dañadas. Sin embargo, la senescencia promueve la reparación y regeneración de tejidos a través del SASP. Por lo tanto, es una respuesta de homeostasis tisular que protege al organismo de diversos daños. No obstante, la senescencia también está en la base de muchas patologías (He y Sharpless, 2017) y la alteración de este programa durante el desarrollo embrionario, podría suponer un problema para el organismo.

2.2. La senescencia embrionaria en el síndrome de CHARGE

Existen muchas pruebas que relacionan el gen *CHD7* con la senescencia celular durante el desarrollo embrionario. Los defectos y anomalías que ocurren durante el desarrollo embrionario y que dan lugar a los criterios mayores y menores (Verloes, 2005) en los pacientes con síndrome de CHARGE, tienen lugar en algunas áreas y tejidos donde se ha descrito senescencia embrionaria (Tabla 1). Los organismos mutantes para el gen homólogo de *CHD7,* recapitulan la mayoría de las anomalías encontradas en los pacientes con CHARGE, lo que también coincide con la mayoría de las estructuras senescentes descritas (Tabla 1) o en estudio (resultados de esta tesis y otros no publicados).

USC DE COMPOSTELA

En otros casos como el corazón, los defectos descritos se explican por un efecto no autónomo de *CHD7* en los arcos faríngeos que da como resultado una mala señalización por parte de células defectuosas de la cresta neural (Corsten-Janssen y Scambler, 2017). Curiosamente, también se ha descrito senescencia embrionaria en los arcos faríngeos (Storer, 2013; Rhinn *et al.,* 2019; Da Silva-Álvarez *et al.*, 2019), pero no se ha encontrado en los tejidos cardíacos en desarrollo.

Los defectos observados en los pacientes con síndrome de CHARGE se corresponden con lo que se esperaría si se alterara la eliminación celular, una de las funciones identificadas para la senescencia del desarrollo (Muñoz-Espín *et al.*, 2013), como la presencia de **placas de fusión de células** en los canales semicirculares, atresia coanal, coloboma o las alteraciones cardíacas. Incluso los defectos de CHARGE menos frecuentes como la polidactilia (Lalani *et al.*, 1993; Kim y Layman, 2011) pueden estar relacionados con defectos en este aclareamiento de las células del desarrollo, lo que concuerda con la expresión de *CHD7* en el brote de la extremidad mesenquimal (Tabla. 1) (Sanlaville *et al.*, 2006), que instruye la senescencia de la cresta apical ectodérmica necesaria para el correcto desarrollo de las extremidades (Storer *et al.*, 2013; Lorda-Diez *et al.*, 2015).

En embriones de pez cebra morfantes para *chd7*, además de presentar defectos multiorgánicos análogos a los afectados en seres humanos con síndrome de *CHARGE* (Tabla 1), se observó un aumento en la expresión de varios inhibidores del ciclo celular, entre los que se incluyen *p15*, *p21* y *p27*, lo que se relaciona con una reducción de la proliferación celular (Balow *et al.*, 2013). La coinyección con **morfolinos** (**MO**) de la histona demetilasa con dominio de jumonji *fbxl10/kdm2bb* (*F-box and leucine-rich repeat protein 10*), un represor de la transcripción del **RNA ribosómico** (**rRNA**) al contrario que *CHD7* (Zentner, *et al.*, 2010; Balow *et al.*, 2013), devuelve la capacidad de proliferación celular y conduce a un rescate completo del fenotipo provocado por el ***knockdown*** de *chd7*.

De acuerdo con la noción de que CHD7 es un regulador transcripcional de los genes de la senescencia, los tejidos fetales de CHARGE muestran un aumento en la expresión de *p53*, un conocido inductor de la senescencia y la apoptosis durante el desarrollo, el cáncer y el envejecimiento (Van Nostrand *et al.*, 2014). Un modelo de ratón que muestra p53 hiperactivado presenta defectos embrionarios característicos del síndrome CHARGE. Además, los embriones nulos de *Chd7* se rescatan parcialmente en un fondo mutante p53 heterocigoto. El mecanismo detrás de estos hallazgos es la inhibición transcripcional de CHD7 a *p53* al unirse a su región promotora (Van Nostrand *et al.*, 2014). Los ratones mutantes *CHD7* muestran defectos genitales, similares a los debidos a la alteración de la senescencia de los embriones nulos para *p21* (Muñoz-Espín *et al.*, 2013; Bosman *et al.*, 2005).

Además de toda esta asociación fenotípica con los inhibidores del ciclo celular e inductores de la senescencia, la asociación entre *CHD7* y senescencia también tiene una base molecular clara. Recientemente, se ha descrito que existe una marca epigenética en la cromatina de las células preparadas para su eliminación durante el desarrollo (Sánchez-Fernández *et al.*, 2020). Los remodeladores de la cromatina como CHD7 se consideran en la actualidad candidatos a desarrollar un papel en la determinación de los programas de eliminación celular. También se ha observado que CHD7 resulta ser coactivador esencial para la inducción de la senescencia a través de *p16INK4A* en células senescentes (Su *et al.*, 2018).

USC UNIVERSIDADE DE COMPOSTELA

2.3. La senescencia embrionaria en pez cebra y *killifish*.

Los primeros estudios en 2006 realizados en embriones de codorniz (Nacher *et al.*, 2006), llevaron al descubrimiento años más tarde de que la senescencia en vertebrados es un mecanismo más junto a la apoptosis, que el complejo sistema del desarrollo embrionario utiliza para la formación del embrión como de la placenta (Rajagopalan y Long, 2012; Chuprin *et al.*, 2013; Davaapil *et al.*, 2017) y para la remodelación de tejidos durante el desarrollo embrionario (Nacher *et al.*, 2006; Muñoz-Espín *et al.*, 2013; Storer *et al.*, 2013; Zhao *et al.*, 2018a; Gibaja *et al*., 2019).

Aunque todavía no se ha descrito este proceso de senescencia en *killifish* (*N. furzeri*), gracias a la intervención de nuestro grupo, este programa del desarrollo fisiológico del embrión se ha descubierto que está implicado y conservado evolutivamente en el desarrollo de todos los vertebrados (Da Silva-Álvarez *et al.*, 2019). Se ha demostrado que este programa embrionario está encargado de regular el desarrollo de diversos tejidos en el pez cebra. Se ha descrito la presencia de senescencia embrionaria en el vitelo, la cloaca, el sistema nervioso central, intestino, hígado, conductos pronéfricos y cristalino. Además, la senescencia en estas estructuras en desarrollo desapareció tras el tratamiento con el compuesto senolítico ABT-263 (Da Silva-Álvarez *et al.*, 2020), que elimina específicamente las células senescentes.

En los embriones de pez cebra, los reguladores del ciclo celular p21 (*cdkn1a*) y p16 (*cdkn2a/b*), marcadores conocidos de senescencia celular, presentan un nivel de expresión más bajo a las 48 hpf (horas posfecundación), cuando la tinción de SA-β-Gal es más débil, en comparación a las 168 hpf, momento en el que la intensidad de SA-β-Gal es mayor. Además, el tratamiento con ABT-263 de los embriones, también impidió el aumento de la expresión de estos marcadores (Da Silva-Álvarez *et al.*, 2020).

2.3.1. Marcadores de Senescencia Embrionaria en pez Cebra

En el pez cebra el gen *cdkn1a* (p21) es el ortólogo de *CDKN1A* (p21), que al igual que en humanos aparece duplicado en el genoma. Su parálogo es el gen *CDKN1B* en humanos y *cdkn1b.* en pez cebra.

En el pez cebra únicamente existe un gen *cdkn2*, también llamado *cdkn2a*/*b* por ser el ortólogo de *CDKN2A* (p15) y *CDKN2B* (p16) en humanos. Este único gen, en el pez cebra, produce el RNA para ambas proteínas. En humanos, sin embargo, el único locus *CDKN2A* produce genes empalmados alternativamente, incluidos p14ARF y p16Ink4a, que regulan al alza la función de TP53 al unirse a MDM2 o inhiben las kinasas dependientes de ciclina 4 y 6 (CDK4 y CDK6. Su papel es el mantenimiento de la senescencia celular, tras la inducción de la senescencia. Se considera que la fase de predominancia de *p53* es aún reversible, mientras que la fase de *p16* ya es totalmente irreversible (Beauséjour *et al.*, 2003).

En los mamíferos, se pensaba que p15Ink4b, codificado por el locus *CDKN2B*, vecino del locus *CDKN2A*, se generó mediante la duplicación de genes y se creía que desempeñaba un papel redundante al de p16Ink4a. Sin embargo, ahora se sabe que está implicado en este mecanismo de inhibición de la proliferación y entrada en senescencia celular, durante el desarrollo embrionario. Aunque muestra una gran similitud con p16Ink4a en cuanto a secuencia de aminoácidos (~ 85 %), sigue sin estar claro en varios procesos tumorigénicos, pero puede que si su relación con el síndrome de CHARGE, por su gran implicación en la senescencia y el desarrollo embrionarios (Muñoz-Espín *et al.*, 2013; Storer *et al*., 2013).

USC DE COMPOSTELA

2.3.2. Marcadores de Senescencia Embrionaria en *Killifish*

En el *killifish*, según nuestros análisis realizados con las bases de datos del NFINtb (*Nothobranchius furzeri transcriptome browser*; https://nfintb.leibniz-fli.de/nfintb/) y el NCBI (*National Center for Biotechnology Information*; https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/), al igual que en humanos, el locus *cdkn2a/b*, también parece haber divergido evolutivamente y creado dos genes distintos o dos transcritos distintos: *cdkn2a* y *cdkn2b*.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

3. ORGANISMOS MODELO

Las técnicas de diagnóstico genético cada vez más avanzadas y precisas son muy importantes para el diagnóstico de los trastornos mendelianos raros como el síndrome de CHARGE (Gonzaga-Jauregui *et al.*, 2012). La **secuenciación del exoma completo** (WES, del inglés *Whole Exome Secuencing*) se ha convertido en una herramienta diagnóstica eficaz para los pacientes al descartar anomalías cromosómicas (Need *et al.*, 2012; Yang *et al.*, 2021; Lee *et al.*, 2014; Retterer *et al.*,2016). La secuenciación también ha llevado al descubrimiento muchas variantes raras para las que se desconoce el impacto funcional (Coventry *et al.*, 2010; Lupski *et al.*, 2011), y la interpretación puede ser difícil, ya que las personas sanas a menudo portan alelos que serían perjudiciales o letales en homocigosis (Gao *et al.*, 2015). Los estudios en organismos modelo y las técnicas de edición genética, pueden ser un recurso fundamental para comprender estas variantes.

La mayoría de los investigadores en el campo biomédico explotan un sistema modelo durante el transcurso de sus carreras. Ocasionalmente, puede cambiar de modelo, por lo que la selección de un sistema modelo adecuado es un paso crucial en el diseño de la investigación. Los factores a considerar incluyen la precisión del modelo como un reflejo de la enfermedad humana bajo investigación, la cantidad de animales necesarios y la facilidad de crianza, su fisiología y biología del desarrollo, la capacidad de aplicar la genética y sus herramientas y el aprovechamiento del modelo para el descubrimiento de fármacos. En nuestro laboratorio, usamos principalmente el pez cebra, pero lo combinamos con otros modelos animales y celulares. Este enfoque interdisciplinario se basa en ampliar los conocimientos básicos de los genes y las relaciones con las enfermedades humanas y el avance de fármacos candidatos a ensayos clínicos. Recientemente, ha surgido un nuevo modelo para el estudio del envejecimiento y la senescencia, el *killifish* (Kim *et al.*, 2016), el cual queremos incorporar como una herramienta para los estudios genéticos y de la senescencia embrionaria en el síndrome de CHARGE.

3.1. EL PEZ CEBRA (*Danio rerio*)

El pez cebra (*Danio rerio*; Fig. 2) es un ciprínido de agua dulce, que habita naturalmente en aguas tropicales del sur de Asia. Es bastante popular en el mundo de la acuariofilia y desde hace ya unas décadas también en los laboratorios que emplean modelos animales para el estudio de enfermedades humanas. La utilización del pez cebra como modelo para el estudio tanto del desarrollo de vertebrados como de las enfermedades genéticas humanas se debe a las amplias ventajas que ofrece como modelo sobre otras especies de vertebrados. Además, su alta fecundidad y el pequeño tamaño de los adultos (2-6 cm), permite instalarlos en altas densidades en un laboratorio.

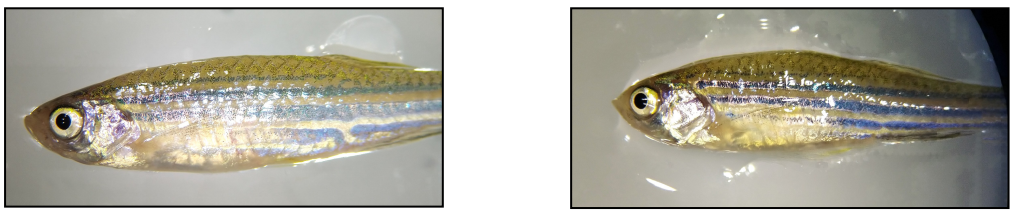


Figura 2. Peces cebra macho y hembra. Es apreciable el bajo dimorfismo sexual de la especie.

3.1.1. El Pez Cebra Como Modelo de Enfermedades Genéticas

El pez cebra alcanza la madurez sexual a los tres meses de edad, semejante a los ratones. Sin embargo, el desarrollo embrionario es mucho más rápido y la mayoría de los órganos y glándulas aparecen ya desarrolladas a los 5 **dpf** (días posfecundación) (Lohr y Hammerschmidt, 2011). Además, los embriones de pez cebra son relativamente traslúcidos, siendo útiles en una amplia variedad de técnicas de imagen. El pez cebra comparte muchos genes, células, tejidos, glándulas, órganos, además de la organización del cuerpo con los mamíferos, y aunque carece de la mayoría de las regiones cerebrales altamente desarrolladas, las estructuras evolutivamente más antiguas, como el sistema neuroendocrino, están muy conservadas (Pickart y Klee, 2014).

Otra gran ventaja del pez cebra es la cantidad de información disponible, en todas las bases de datos *online,* tanto generales de dominio público como NCBI, Ensembl o UniProt, como en repositorios y bases de datos exclusivas y propias de pez cebra, donde se ha hecho un gran esfuerzo por almacenar los datos que se obtienen en las investigaciones y las herramientas utilizadas para llevarlas a cabo, como ZFIN (*Zebrafish Information Network*) o el ZMP (*Zebrafish Mutation Project*). Estos dos últimos repositorios, son una valiosa herramienta tanto para los miembros de la comunidad del pez cebra como para el estudio de los genes y las enfermedades genéticas humanas.

Para el modelado eficaz de las enfermedades genéticas humanas es importante comprender la medida en que los genes del pez cebra y las estructuras de los genes están relacionados con los genes humanos ortólogos. El proyecto de secuenciación del genoma del pez cebra encontró que el pez cebra comparte aproximadamente el 70 % de los genes con los humanos, y que el 84 % de los genes conocidos que producen enfermedades en humanos, tienen un ortólogo en pez cebra (Howe *et al.*, 2013).

El pez cebra es un pez teleósteo. Los peces teleósteos son los más diversos de todos los peces, incluyendo alrededor de 30.000 especies de peces con aletas radiadas (Pasquier *et al.*, 2016). Esta gran diversidad probablemente se deba a un evento de duplicación de todo el genoma que ocurrió hace aproximadamente 350 millones de años (Pasquier *et al.*, 2016). La genómica comparativa determinó que el pez cebra retuvo aproximadamente el 20 % de todos los genes duplicados (Prince y Pickett, 2002).

Aunque apareció en los años 80 como un modelo útil para el estudio del desarrollo y embriología (Streisinger *et al*., 1981), en la última década ha revelado numerosas observaciones importantes que responden preguntas sobre el desarrollo embrionario de los vertebrados y en el campo de la biomedicina humano (Grunwald y Streisinger 1992; Amsterdam *et al.*, 1999). Gracias a los primeros exámenes de **mutagénesis aleatoria** a gran escala sin infraestructura sofisticada se empezaron a estudiar miles de mutaciones y su relación con la embriogénesis temprana (Driever *et al*., 1996; Hafter *et al*., 1996). La observación de la morfología embrionaria de los mutantes, dio como resultado el descubrimiento de genes necesarios para distintos pasos del desarrollo embrionario como la gastrulación (Hammerschmidt *et al.*, 1996), la morfogénesis cardiovascular (Stainier *et al*., 1996) y la hematopoyesis (Ransom *et al*., 1996).

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

3.1.2. El Pez Cebra Como Modelo del Síndrome de CHARGE

El gen ortólogo de *CHD7* en el pez cebra se localiza en el cromosoma 2 y se denomina *chd7*. En la base de datos Ensembl (Cunningham *et al.*, 2022; https://www.ensembl.org/) se pueden encontrar 4 isoformas, de las cuales 1 es una secuencia que no produce proteína, y las otras 2 son secuencias interrumpidas que no tienen homología con el gen *CHD7* de humanos. La secuencia del gen original sería ENSDARG00000075211. La alíneación de la secuencia genómica de *chd7* del pez cebra con la del gen *Chd7* de ratón y el gen *CHD7* de humano nos muestra que este gen está muy conservado a lo largo de la evolución. La proteína Chd7 también es muy similar a la de humanos, y conserva los mismos dominios funcionales que en mamíferos (Fig. 2). Además, los patrones de expresión así como sus funciones e implicaciones biológicas en el pez cebra son también muy semejantes a las de los humanos.

3.1.3. Expresión de *chd7* en Pez Cebra

La cantidad de RNA de *chd7* es elevada en el estadio de 2-4 células y comienza a variar entre las distintas etapas (Asad *et al.*, 2016). La transcripción cigótica comienza entre el estadio de 1000 células y el de domo, aproximadamente a las 3-4 hpf (O'Boyle *et al.*, 2007). Sin embargo, el mRNA de *chd7* parece no comenzar a transcribirse hasta la transición del estado de blástula a gástrula (White *et al.*, 2017). El mRNA de *chd7* presente entre en el cigoto hasta el estadio de 1000 células es indicativo de la contribución materna de este mRNA al óvulo no fecundado. El único tejido en el adulto con una expresión comparable a las primeras etapas embrionarias es el ovario. Sin embargo, existe también una elevada expresión relativa de *chd7* tanto en el ovario como en el testículo de pez cebra, sugiriendo que la contribución de *chd7* al cigoto podría ser de ambos padres (Asad *et al.*, 2016).

Al igual que en humanos, la expresión de *chd7* es dinámica tanto espacial como temporalmente. Tanto en los estadios de 2 y 8 células, como en los de esfera y 10 somitas se observa una expresión ubicua de *chd7* (Asad *et al.*, 2006). El gen *CHD7* tiene una función positiva en la biogénesis del RNA ribosómico en células madre (Zentner *et al.*, 2010; Bergman *et al.*, 2012), y ya que el pez cebra no transcribe mRNA hasta las 3-4 hpf, el gen *chd7* podría ser necesario en las primeras horas del desarrollo cuando la traducción del RNA materno es esencial para la rápida progresión del desarrollo embrionario. A las 24 hpf, la expresión se restringe a la cabeza, específicamente al ojo y al cerebro medio y posterior. A las 96 hpf, la expresión de *chd7* es visible en el complejo pineal, en el límite mesencéfalo-encefálico, en el ojo, en la región mandibular y en el tubo digestivo (Asad *et al.*, 2016).

3.1.4. Papel de *chd7* en el Desarrollo del Pez Cebra

Dado que el gen *chd7* del pez cebra es muy similar al gen *CHD7* humano y al *Chd7* de ratón, este organismo modelo, ha sido utilizado para evaluar el efecto patogénico de la pérdida de función del gen *chd7* durante el desarrollo, mediante el uso de **morfolinos** (**MO**) (Jacobs-McDaniel y Albertson, 2011; Patten *et al.*, 2012; Balow *et al.*, 2013; Huang *et al.*, 2013; Balasubramanian *et al.*, 2014; Asad *et al.*, 2016). Los resultados de esta técnica muestran que la pérdida de función de *chd7* da lugar a varios defectos tales como: curvatura del eje longitudinal del cuerpo, desarrollo anormal de la cresta neural craneal, anomalías otolíticas, ojos más pequeños y edemas pericárdicos.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

A lo largo de los años empleando esta técnica, se han conseguido desvelar numerosas implicaciones de *chd7* en el desarrollo del pez cebra. Todas ellas, demuestran una vez más la importancia de este gen para el correcto desarrollo embrionario y las nefastas consecuencias debidas a su ausencia durante la embriogénesis (Jacobs-McDaniels y Albertson, 2011; Patten et al., 2012; Balow *et al.*, 2013). Estas anomalías causarían una serie de características fenotípicas en el adulto, igual que ocurre en ratones y humanos, sin embargo, todavía no hay datos al respecto. Estos estudios con morfolino han demostrado que la deficiencia en *chd7* produce alteraciones en la proliferación y migración celulares y además aumenta la apoptosis (Balow *et al.*, 2013). Estos defectos en los programas celulares causan malformaciones en los tejidos programados para activar la senescencia embrionaria. Como se ha visto, las deficiencias en *chd7* también causan el aumento de expresión de *p53* y los inhibidores del ciclo celular *p15* y *p21*, marcadores de senescencia embrionaria, pero hasta la fecha no se ha hecho ninguna relación clara con las alteraciones en este proceso.

Desde 2017, pocos estudios han sido publicados que utilizan peces cebra mutantes para *chd7*, como modelo (Liu *et al.*, 2018; Prykhozhij *et al.*, 2017; Cloney *et al.*, 2018; Jamadagni *et al.*, 2021; Sun *et al.*, 2022). Aunque encuentran algún fenotipo asociado al síndrome, no recapitulan por completo el fenotipo morfante, y no aportan explicaciones sobre el comportamiento genético de estas líneas. Sin embargo, al contrario que en mamíferos, en alguno de estos estudios se documentan casos de homocigotos adultos para *chd7.*

3.1.5. Relación de *chd7* y *sox9* en el Desarrollo del Pez Cebra

Se ha demostrado que la proteína Chd7 de pez cebra puede unirse y activar los potenciadores de la expresión de *SOX9* en humanos (Bajpai *et al.*, 2010). Las proteínas SOX9 son factores de transcripción con funciones establecidas en la especificación del cartílago craneofacial. Resultados actuales sugieren que *sox9* podría ser un objetivo conservado evolutivamente de *CHD7* desde el pez cebra hasta los humanos. *sox9a* y *sox9b*, dos parálogos de *SOX9* en el pez cebra, regulan la condrogénesis en la cabeza (Yan *et al.*, 2005). Los embriones **salvajes** (**WT**, del inglés ***wild type***) tienen una expresión robusta de *sox9a* y *sox9b* en los arcos faríngeos I y II y en el pericondrio, respectivamente. Los embriones deficientes para *chd7* presentan una reducción severa en la expresión de los genes *sox9a* y *sox9b* (Asad *et al.*, 2016). Los mutantes para *sox9* de pez cebra revelan que *sox9* es necesario para la diferenciación de la retina y también para su correcta organización, ya que regula el número de células fotorreceptoras (Yokoi *et al.*, 2009). Por lo tanto, es probable que la pérdida de función de Chd7 interrumpa la red de genes crucial para el desarrollo y la organización celular del ojo y las estructuras cartilaginosas del aparato auditivo. Estas anomalías causarían una serie de características fenotípicas en el adulto, al igual que ocurre en ratones y humanos, aunque aún no hay datos al respecto en adultos de pez cebra.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

3.2. *KILLIFISH* (*Nothobranchius furzeri*)

El killifish turquesa (*Nothobranchius furzeri*) es un pez anual, de la familia de los cipríndos, de pequeño tamaño (2-5 cm) habita en charcas efímeras en el sureste de África. Se caracteriza por tener un ciclo de vida muy corto (3-7 meses), un crecimiento rápido y una maduración sexual temprana. Las charcas en las que viven se secan estacionalmente una vez pasada la época de lluvias. Durante los 4-6 meses que dura la charca, el killifish es capaz de producir y fecundar unos huevos que son resistentes a la sequedad y que consigue enterrar entre el barro, para que con la llegada de la nueva temporada de lluvias, la especie continúe adelante. Estos huevos sobreviven en su hábitat efímero en un estado de arresto del desarrollo denominado diapausa. Aunque su ecología y cría se conoce desde hace algún tiempo para los amantes de la acuariofilia, su uso como herramienta de investigación no llegó hasta hace menos de 2 décadas.

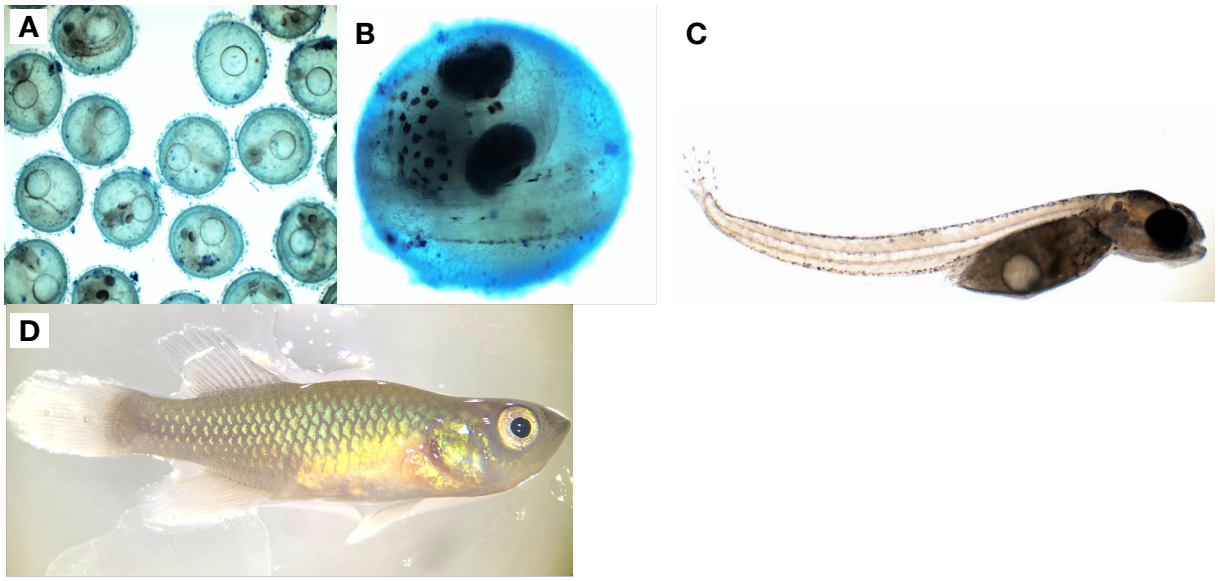


Figura 3. A. Embriones de killifish en distintos estadios de diapausa. B. Embrión de killifish en diapausa III. C. Embrión de killifish post-eclosión. D. Killifish hembra adulta.

3.2.1. El *Killifish* Como Modelo de Envejecimiento

El uso del *killifish* como modelo para la investigación del envejecimiento se sugirió por primera vez en 2003 cuando Valdesalici y Cellerino describieron la vida extremadamente corta de una cepa, en concreto la cepa GRZ del parque nacional de Gonarezhou en Zimbabue (Valdesalici y Cellerino, 2003). Es el vertebrado de vida más corta que se puede mantener en cautiverio, lo que supone una oportunidad única para realizar estudios longitudinales sobre envejecimiento en un vertebrado.

Gracias a que se conocen varias cepas de laboratorio que difieren en el tiempo de vida, y que parte del genoma de algunas ya ha sido secuenciado, se ha podido estudiar y caracterizar algunas "marcas distintivas del envejecimiento" de este modelo, como la agrupación de genes relacionados con el envejecimiento en regiones genómicas específicas (Graf *et al.*, 2012). Esto ha permitido establecer al *killifish* como un modelo novedoso en la investigación del envejecimiento, con la levadura, *Caenorhabditis elegans, Drosophila* y ratón.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

En investigación, el concepto clásico de envejecimiento como declive fisiológico continuo e irreversible que afecta igual a la mayoría de los organismos, se ha dividido en nueve categorías denominadas "*hallmarks of aging"* (López-Otín *et al.*, 2013), y ampliadas a doce este mismo año (López-Otín *et al.*, 2022). Estas comprenden la inestabilidad genómica, el desgaste de los telómeros, las alteraciones epigenéticas, la pérdida de proteostasis, la macroautofagia deshabilitada, la desregulación en la detección de nutrientes, la disfunción mitocondrial, la senescencia celular, el agotamiento de las células madre, las alteraciones en la comunicación intercelular, la inflamación crónica y la disbiosis. Estas características están relacionadas entre sí, e interconectadas a los "*hallmarks of health*" propuestos recientemente (López-Otín *et al.*, 2021) y que incluyen características organizativas de compartimentación espacial, mantenimiento de la homeostasis y respuestas adecuadas al estrés.

Se han observado ya muchos indicios que relacionan el envejecimiento del *killifish* con muchos de estos "*hallmarks of aging"*, como el acortamiento telomérico en células musculares y de la piel (Hartmann *et al.*, 2009), disfunción mitocondrial (Hartmann *et al.*, 2011) o la senescencia celular, así como un aumento de los marcadores típicos de senescencia observados en aumento en los killifish viejos en comparación con los jóvenes (Genade *et al.*, 2005; Graf *et al.*, 2013). Por lo tanto, *N. furzeri* parece un verdadero y valioso modelo para la investigación del envejecimiento.

Además de por su corto tiempo de vida, los *killifish* sobreviven en su hábitat efímero debido a ese estado de detención del desarrollo embrionario denominado diapausa, que le permite estar largos períodos de tiempo en condiciones ambientales desfavorables y predecibles, tales como temperaturas extremas, sequía o carencia de alimento manteniéndose en un estado de inactividad. Esta detención puede ocurrir en tres etapas de desarrollo distintas y puede durar más de 1 año (Fig. 3A). Es interesante notar que en el *killifish* se ha observado una conexión entre la tasa de desarrollo embrionario y los rasgos de historia de vida posteriores a la eclosión (Polacik *et al.*, 2014).

Si bien se ha informado sobre la regulación positiva relacionada con el envejecimiento de genes que codifican componentes de la maquinaria de traducción para tejidos humanos (Zahn *et al.*, 2006) y su expresión se ha correlacionado negativamente con la esperanza de vida individual en *killifish*, su regulación positiva en la diapausa de *killifish* es inesperada. Una explicación podría ser que los embriones en diapausa se preparan para poder ejecutar inmediatamente la expresión génica cuando las condiciones ambientales vuelvan a ser favorables. Al igual que la senescencia del desarrollo y en el envejecimiento son programas controlados y definidos, este proceso de diapausa podría ser un ejemplo de senescencia programada. Estos datos sugieren que el estudio de la diapausa y quizás también de la senescencia del *killifish* podrían revelar genes y vías que están asociados con el envejecimiento y la determinación de la esperanza de vida. Recientemente, se ha descrito que los genes que codifican componentes de la maquinaria de traducción se sobreexpresan durante el envejecimiento del cerebro de rata (Ori *et al.*, 2015) así como durante el envejecimiento replicativo en la levadura (Janssens *et al.*, 2015). Si bien no está claro si esto es una causa o una consecuencia de la pérdida de proteostasis durante el envejecimiento (Kaushik y Cuervo, 2015; Klaips *et al.*, 2018; Labbadia y Morimoto, 2015; López-Otín *et al*., 2013), la observación de que los genes "traduccionales" y "ribosómicos" se activan significativamente

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

en animales mayores implica que la pérdida de proteostasis, otro sello distintivo del envejecimiento, también ocurre durante la cría del *killifish*.

3.2.2. El *Killifish* Como Modelo del Síndrome de CHARGE

Aunque todavía no se han realizado estudios sobre este síndrome en el *killifish*, ni se ha generado ningún modelo para el gen *chd7*, muchas de las características de esta especie, tanto embrionarias como fisiológicas y la relación entre senescencia, envejecimiento y la diapausa, podrían convertirlo en un modelo interesante para el estudio de la función de *chd7* en el desarrollo y la senescencia embrionaria y dar luz sobre los problemas que ocurren en esos momentos.

3.2.3. Expresión de *chd7* en el *Killifish*

Aunque existe una base de datos de expresión de *killifish* (http://nfintb.leibniz-fli.de/) todavía no existen datos relacionados con la expresión de muchos genes. Los datos que se presentan en esta tesis puede que sean los primeros por lo menos en mostrar la expresión de *chd7* en estos momentos del desarrollo embrionario.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

4. TÉCNICAS PARA EL ESTUDIO DE ENFERMEDADES GENÉTICAS HUMANAS

Los enfoques para el estudio de las enfermedades genéticas en el pez cebra han cambiado mucho a lo largo de los años. Estos enfoques comenzaron con la genética clásica o genética directa, basándose en la búsqueda de los genes responsables de ciertos fenotipos hereditarios observados. Para llevarlos a cabo, se utilizan agentes mutágenos como el **ENU** (**N-etil-N-nitrosourea**), que inducen mutaciones aleatorias, para la aparición de fenotipos mutantes, que luego se seleccionan por cribado a gran escala (Driever *et al.*, 1996). Más tarde, con la acogida de la genética reversa, se pasó a evaluar la función de genes candidatos con secuencias conocidas, mediante la supresión de la expresión de ese gen. Los primeros esfuerzos fueron a través del uso de MO (Heasman *et al.*, 2000; Nasevicius y Ekker, 2000). La llegada de las nucleasas reprogramables, tales como las **ZFN (*Zinc Finger Nucleases*)** o las **TALEN (*Tal-Effector Nucleases*)**, facilitaron este enfoque al permitir la disrupción de secuencias génicas específicas. Actualmente, la tecnología **CRISPR** (***Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats***) se ha unido a este último grupo y está dominando el sector de la edición genética por su facilidad de diseño.

4.1. Genética Directa

Los primeros estudios con mutantes en el modelo de pez cebra, llegaron de la mano de los enfoques de la genética directa (***forward genetic***), para los que eran muy utilizados agentes mutágenos como los rayos gamma (Chakrabarti *et al.*, 1983; Walker y Streisinger, 1983) o el ENU (Mullins *et al.*, 1994; Patton y Zon 2001). Estas aproximaciones consistían en la **mutagénesis aleatoria** a gran escala y posterior cribado genético de los individuos afectados fenotípicamente durante el desarrollo embrionario, generando así lo que se conoce como **pantallas de cribado genético** (*genetic screens*).

4.1.1 ENU

En la década de 1990, se identificaron miles de mutantes de peces relacionados con el desarrollo embrionario temprano a través de los exámenes de mutagénesis aleatoria a gran escala, sin una infraestructura sofisticada y, utilizando las grandes ventajas, que supone el pez cebra se estableció como un modelo principal en la biología del desarrollo (Driever *et al.* 1996; Haffter *et al.* 1996). Los primeros cribados genéticos avanzados en el pez cebra se basaron en el uso de agentes mutágenos químicos de DNA, principalmente ENU altamente efectivo en la introducción de mutaciones aleatorias en células germinales posmeióticas y premeióticas del pez cebra. Los beneficios de la cría y la embriogénesis de este modelo en particular, el rápido desarrollo externo del embrión y su transparencia permiten la detección de una amplia variedad de fenotipos durante el desarrollo. La resistencia de los adultos y su capacidad para producir puestas de gran tamaño facilitaron el mapeo posterior de los genes mutantes causales (Lawson y Wolfe, 2011).

Estos experimentos establecieron al pez cebra como un modelo clásico para investigar la genética del patrón y desarrollo embrionario, ya que los fenotipos de estas perturbaciones genéticas eran fácilmente perceptibles y caracterizables (Amsterdam y Hopkins, 2006). Sin embargo, se han observado tres desventajas principales que limitan el uso de estos esquemas de mutagénesis aleatoria: en primer lugar, la clonación posicional de las mutaciones causales

USC UNIVERSIDADE DE COMPOSTELA

puede ser costosa y laboriosa (Haffter *et al.*, 1996; Driever *et al.*, 1996; Amsterdam *et al.*, 2004; Muto *et al.*, 2005). En segundo lugar, la mutagénesis aleatoria suele generar mutantes heterocigóticos, y es posible que no se detecten fenotipos heredados recesivos en estos exámenes de detección. Finalmente, resulta imposible inactivar cada gen en el genoma con la mutagénesis aleatoria, lo que significa que la profundidad y la integridad de estas estrategias de cribado genético son limitadas (Varshney *et al.*, 2015).

4.2. Genética Reversa

Los enfoques de genética reversa (***reverse genetic***), aparecieron en el pez cebra ya entrado el siglo XXI. La llegada masiva de datos de secuencias del exoma completo y del genoma completo, ha mostrado la gran cantidad de genes mutantes en humanos asociados a enfermedades, para los que no existían mutaciones en el pez cebra (Katsanis et al., 2013) y ha expuesto la necesidad de realizar enfoques genéticos reversos para evaluar la función de los genes. En otras palabras, modificar directamente la expresión de un gen de interés.

En lo referente a la genética reversa, una de las estrategias es el *knockdown* o silenciamiento de la expresión génica. Si bien no es una estrategia que induzca la modificación genética, es una de las más utilizadas en el pez cebra gracias a la introducción de los oligómeros de MO (Partridge, *et al.*, 1996). Sin embargo tiene sus limitaciones y las aproximaciones experimentales, aunque de bajo coste, no siempre son sencillas de realizar.

El mayor avance en las técnicas de genética reversa llego a mano de las nucleasas programables, capaces de unirse a loci específicos en el genoma y generar roturas de doble cadena (*double-strand breaks* o DSB) en esos sitios (Miller *et al.*, 2007; Christian *et al.*, 2010; Hwang *et al.*, 2013). Estos DSB activan los sistemas de reparación de DSB endógenos, activan los mecanismos de reparación del DNA, los cuales no son totalmente eficientes (Scully *et al.*, 2019). Existen dos vías de reparación principales: la reparación por unión de extremos (**NHEJ**, del inglés *Non-Homologous End Joining*) y la reparación dirigida por homología (**HDR**, del inglés *Homology-Directed Repair*).

1. Vía de reparación por NHEJ: las cadenas abiertas por DSB son accesibles a nucleasas, polimerasas y todo tipo de proteínas que se unen al DNA y provocan modificaciones de la secuencia. La DNA ligasa une los extremos sin reparar si faltan o se han añadido nucleótidos a la secuencia abierta, produciendo una reparación más rápida pero más propensa a cometer errores. Así se generan inserciones y/o deleciones (***indels***) en la secuencia que pueden alterar el marco de lectura del gen (***frameshift***) y generar proteínas truncadas (variantes *nonsense*) o con función alterada. Esta vía es la que interesa que ocurra para generar los modelos mutantes ***knockout***.

2. Vía de reparación por HDR: es una vía muy precisa, que no tiende a cometer fallos, ya que la reparación consiste en la introducción de los nucleótidos por complementariedad de bases a través de un DNA donante del mismo gen, de la cromátida hermana (Fig. 4) o los cromosomas homólogos. Esta vía es muy interesante en edición genética si lo que se quiere es introducir una secuencia concreta en una región concreta. A este método se le conoce como ***knockin***, pero también pueden ser transgénicos.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

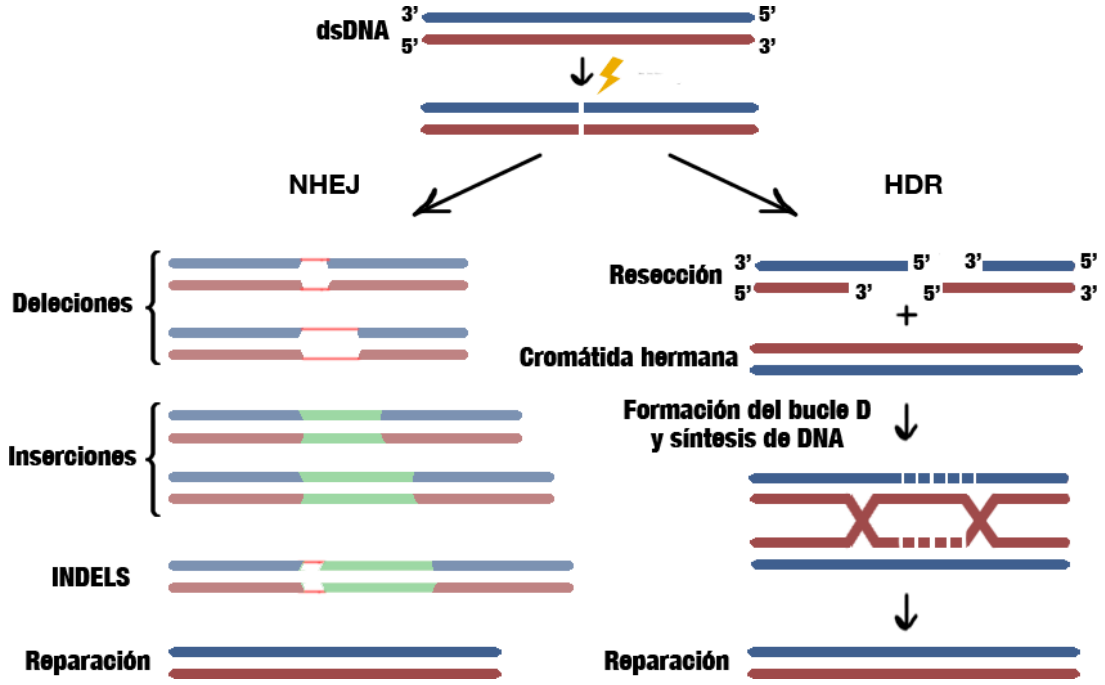


Figura 4. Esquema del los mecanismos de reparación celular del DNA tras un corte de doble cadena (DSB). *Non-Homologous End Joining* (NHEJ); *Homology-Directed Repair* (HDR).

Aprovechando esta debilidad de los sistemas naturales de reparación del DNA, se producen mutaciones en lugares concretos del genoma, lo que se conoce como edición genética o **mutagénesis dirigida**. Los primeros estudios se basaron en el uso de las ZFN (Doyon *et al.*, 2008; Meng *et al.*, 2008) y las TALEN, con una mayor especificidad que las anteriores (Cade *et al.*, 2012). Recientemente, con la llegada de la técnica CRISPR/Cas9 tras el descubrimiento de la nucleasa bacteriana programable Cas9 se ha conseguido con gran éxito introducir lesiones heredables en el genoma del pez cebra (Hwang *et al.*, 2013). La tecnología CRISPR/Cas9 es de todas la que mayor eficiencia de mutagénesis ofrece, y se basa en la aplicación de la técnica de microinyección de un complejo preensamblado *in vitro* de RNA guía (sgRNA) y la proteína Cas9, en la etapa de una célula de embriones de pez cebra.

4.2.1 Knockdown y Morfolinos

Las limitaciones de los enfoques de *forward genetic* y las pantallas genéticas, y la aparición de las técnicas de inhibición de la expresión génica por iRNA, hizo que emergiera una nueva forma de testar la función de los genes. La supresión de los genes inducida por iRNA se utilizó en el pez cebra con el fin de silenciar la expresión genética (Wargelius *et al.*, 1999). Sin embargo, esta técnica ha planteado preocupaciones como la aparición de efectos ***off-target*** (inespecíficos) en los niveles de transcripción, expresión proteica y fenotipo (Jackson et al., 2003, 2006a; Scacheri *et al.*, 2004; Lin *et al.*, 2005; Aleman *et al.*, 2007). Las evidencias apuntan a que estos efectos se deben a la unión a transcritos no diana, la activación de la respuesta inmune al interferón o la interferencia con las vías endógenas de micro-RNA (miRNA) (Jackson y Linsley, 2004; Cullen, 2006; Svoboda, 2007; Seok *et al.*, 2018). Sin embargo, existe evidencia de que las modificaciones químicas específicas del dsRNA pueden limitar los efectos fuera del objetivo (Jackson *et al.*, 2006b).

Los oligonucleótidos de Morfolino son oligómeros de 25 bases, que se dirigen a un mRNA de interés por complementariedad de bases. Estos oligonucleótidos de DNA están unidos a un anillo de morfolino, en lugar de desoxirribosa, y cuentan con un esqueleto de fosforodiamidato en lugar de fosfato que los dota de carga neutra (Summerton y Weller, 1997), dando como resultado moléculas con una alta afinidad al RNA y con un movimiento sin interacciones con la maquinaria celular que lo camufla de las proteínas que se unen a los ácidos nucleicos (Summerton, 2007; Bill *et al.*, 2009).

Los MO están diseñados para unirse próximos al codón de iniciación del mRNA o a los lugares de splicing (empalme) dentro del pre-mRNA (Morcos, 2007), bloqueando la **traducción** (*tanslation blocking*) o el corte y empalme (del inglés ***splicing***) de los exones (*splicing blocking*) respectivamente. Los MO también han sido utilizados como una herramienta tanto para reducir la expresión de los genes de contribución materna, como de los genes de expresión zigótica en el pez cebra (Ciruna *et al.,* 2002).

Su facilidad de aplicación y coste relativamente bajo ha hecho que los investigadores hayan utilizado los MO para estudios de múltiples procesos biológicos y enfermedades humanas. En concreto, se han utilizado ampliamente estos desde 2010 para estudiar las implicaciones de las deficiencias en *chd7* en el pez cebra y los problemas asociados en el síndrome de CHARGE (Asad *et al*., 2016; Balow *et al.*, 2013; Balasubramanian *et al.*, 2014; Huang *et al.,* 2013; Jacobs-McDaniels y Albertson, 2011; Patten *et al.*, 2012). Aunque inicialmente fue recibida con entusiasmo en la comunidad del pez cebra como una herramienta en la investigación biomédica y comprobar la función de los genes, la técnica de los MO presenta ciertas limitaciones que deben ser consideradas, como su efecto transitorio o los efectos *off-target* (Bill *et al.*, 2009; Summerton, 2007; Eisen y Smith, 2008).

La vida útil de los MO depende de varios factores. La vida útil de los MO depende de varios factores. Estos compuestos se formulan con el objetivo de no ser detectados por ningún enzima conocido y, por ende, no se eliminan fácilmente de la célula o de su progenie (Summerton y Weller, 1997). No obstante, su eficacia depende de su afinidad de unión. Deben ser inyectados a 0 hpf, en el estadio de 1 célula para que se reparta con cada división celular. La mayoría de los fenotipos morfantes, se identifican dentro de los primeros 3 días de desarrollo, aunque se han observado efectos a las 5 dpf (Smart *et al*., 2004). Este efecto transitorio implica que no se pueda estudiar la función génica a largo plazo, sino únicamente en los primeros períodos del desarrollo.

En muchos casos se han observado que la inyección de MO específicos de un gen para interrumpir el proceso de traducción, a menudo daba como resultado un fenotipo observable en los embriones inyectados o embriones morfantes (Nasevicius y Ekker, 2000). Estos fenotipos anormales inesperados se demostró que se debían a uniones inespecíficas del MO que podrían cambiar la expresión génica e inducir la apoptosis dependiente de *p53* (Robu *et al.*, 2007; Ekker y Larson, 2001; Pickart *et al.*, 2006; Amoyel *et al.*, 2005). Aunque es posible disminuir los efecto *off-target* reduciendo simultáneamente los niveles de expresión de *p53* (Robu *et al.*, 2007), se desconoce el mecanismo de activación de *p53*. Por esta razón se recomienda la utilización de una serie de pautas que controlen estos efectos *off-target* y verificar que los fenotipos observados no son producto de la manipulación de los embriones (Eisen y Smith, 2008; Stainier *et al.*, 2017). Las dos pautas más importantes a realizar, si es posible, serían:

USC UNIVERSIDADE DE COMPOSTELA

1. Coinyección de MO específicos para p53, para comprobar que los fenotipos no se deben a la respuesta al daño en el *DNA*.
2. Comprobar el rescate del fenotipo si es posible mediante la inyección de mRNA *WT*, para verificar que se revierten los fenotipos y el MO es específico.

Asimismo, es recomendable verificar los fenotipos en modelos mutantes estables, en los que los efectos *off-target* se ven reducidos y es posible establecer modelos a largo plazo.

4.2.2. El Origen del Sistema CRISPR/Cas9

Francisco Mojica, estudiaba los mecanismos moleculares involucrados en la adaptación a la variación en la concentración de las sales (Mojica *et al.*, 1993), cuando descubrió en el genoma de una arqueobacteria, *Haloferax mediterranei,* unas secuencias con repeticiones, en las inmediaciones de regiones relacionadas con la respuesta a la salinidad, aunque estas repeticiones parecían no guardar una relación con esta respuesta. Se trataban de secuencias reiteradas y parcialmente palindrómicas, con una disposición equivalente a la previamente descrita en bacterias por los grupos de Nakata y van Embden (Ishino *et al*., 1987; Hermans *et al*., 1991; Groenen *et al.*, 1993), y que parecían tener una estrecha relación con la regulación de la expresión génica.

Las secuencias palindrómicas, de entre 7 y 50 pares, poseían un patrón característico que se repite a lo largo del genoma. Aunque ya se conocían repeticiones palindrómicas en bacterias, estas secuencias recién descubiertas eran notablemente distintas, ya que estaban regularmente espaciadas por regiones de secuencia variable, a las que se denominaron espaciadores (Groenen *et al.*, 1993). El grupo de van Embden comprobó que existía una diversidad notable tanto en el tamaño de estas secuencias repetitivas como en la de las secuencias de los espaciadores, no solo entre especies, sino incluso entre distintos aislados (cultivos microbianos puros) de la misma especie.

Aunque se correspondían con secuencias que no reunían las características necesarias para la producción de proteínas, uno de los conjuntos repetición-espaciador de *H. mediterranei* daba lugar a transcritos de RNA de pequeño tamaño. Mojica supuso que la función de las secuencias repetitivas, a las que denominaron SRSR (del ingles *Short Regularly Spaced Repeats*), no guardaba relación con la adaptación a un ambiente particular (Mojica *et al*., 2000). Sin embargo, el hecho de tener una estructura similar a las secuencias repetitivas encontradas en bacterias y la enorme distancia evolutiva con las arqueas, parecía darles un mismo origen y, por lo tanto, debían estar implicadas en algún aspecto muy general de la biología de los procariotas. Estos conjuntos repetición-espaciador, a los que el grupo de Mojica llamó SRSR, posteriormente pasaron a llamarse SPIDR (del inglés *Spacers Interspersed Direct Repeats*) por van Embden y Schouls, del Instituto Nacional de Salud Pública y Protección Ambiental de Holanda, y por Gaastra y Janssen, de la Universidad de Utrecht (Janssen *et al.*, 2002), finalmente para evitar controversias pasaron a llamarse agrupaciones CRISPR (en inglés *CRISPR array*) por consenso de estos grupos (Janssen *et al.*, 2002b; Mojica & Rodríguez-Valera, 2016).

Paralelamente, este último grupo también identificaron cuatro familias de genes que denominaron genéricamente ***Cas*** (genes asociados a CRISPR, del inglés *CRISPR/associated genes*), seguido de un número (del 1 al 4), ya que se localizaban siempre en las regiones

USC UNIVERSIDADE DE COMPOSTELA

adyacentes al conjunto CRISPR, y que parecían tener una función de reparación del DNA. Lo que sugería que existía una relación funcional y que ambos elementos actuarían en conjunto (Janssen *et al.*, 2002b). Más tarde se descubrirían hasta 45 familias. Las secuencias genéticas de algunas proteínas Cas es muy similares a la de otras proteínas implicadas en el metabolismo del DNA o en la expresión génica, por lo que en principio se pensó que podrían presentar algún tipo de actividad relacionada con los ácidos nucleicos (Janssen *et al.*, 2002b). Sin embargo, la clave para descubrir la función del sistema, llegó con el análisis de las secuencias de las agrupaciones CRISPR.

Mojica y Christine Pourcel, en publicaciones independientes, describieron que las secuencias de los espaciadores no se correspondían con el genoma de arqueas y bacterias (Mojica *et al*., 2005, Pourcel *et al*., 2005), sino que tenían un origen exógeno. Estas secuencias provenían concretamente de virus y plasmidos, que tenían secuencias idénticas a estos espaciadores de los procariotas, por lo que se las llamó protoespaciadores. Estas secuencias insertadas en el genoma de los procariotas, volvía a estos virus y plasmados incapaces de infectar a los hospedadores con el espaciador homólogo correspondiente en una agrupación CRISPR. También se observó que estas regiones iban siempre precedidas de una secuencia de varios cientos de pares de bases (**secuencia *leader***) (Fig. 5).

Ver todos estos datos en conjunto: la transcripción de algunas de las agrupaciones CRISPR, la asociación entre los genes *Cas* y las agrupaciones CRISPR y el rechazo espaciador-protoespaciador, condujo a la idea de que las regiones CRISPR/Cas podrían tener una función biológica importante, dotando a arqueas y bacterias de una especie de inmunidad adquirida y heredable frente al genoma exógeno, como una especie de "vacuna genética" (Mojica, *et al.*, 2005).

Años más tarde, gracias a un estudio de genómica comparativa, se abandonó la idea de que las proteínas Cas tuvieran una función en la reparación del DNA y se propuso que las regiones CRISPR/Cas son un sistema procariótico de defensa contra fagos y plásmidos que funciona a través del mecanismo de RNA interferentes (**iRNA**) análogo al de eucariotas (Makarova, *et al.*, 2006).

Figura 5. Esquema de los principales componentes del sistema CRISPR; proteínas Cas, secuencia leader y array CRISPR (repetición-espaciador).

Finalmente, se demostró la asociación funcional entre proteínas Cas y las agrupaciones CRISPR, y que ambos elementos son necesarios para conferir protección frente a virus (Barrangou *et al.*, 2007), que las moléculas de RNA transcritas a partir de las regiones CRISPR actúan como guías para reconocer moléculas "invasoras" (secuencias diana) (Brouns

USC UNIVERSIDADE DE COMPOSTELA

et al., 2008), y que las secuencias diana sufren un corte siempre en la misma posición, en un motivo de secuencia conservada unido a los protoespaciadores de (Garneau *et al*., 2010). Este motivo, denominado motivo adyacente al protoespaciador (**PAM**, del inglés *Protospacer Adjacent Motif*) por el grupo de Mojica, determina que tamaño de genoma vírico será introducido y en qué lugar dentro del genoma del huésped, pero varía tanto en secuencia como en tamaño (entre 2 y 5 pares de bases) entre sistemas CRISPR/Cas, incluso entre aquellos pertenecientes al mismo tipo.

4.2.2.1. Sistemas CRISPR/Cas9 *in vivo*

En 2011, en una colaboración en la que participaron más de 10 grupos de investigación, se descubrió finalmente que las agrupaciones CRISPR y las proteínas Cas actúan de forma conjunta, y se propuso un mecanismo de acción para este sistema, que consta de tres etapas principales: adaptación, expresión e interferencia (Makarova *et al.*, 2011).

Los sistemas CRISPR/Cas se dividen en las clases I y II dependiendo de las proteínas Cas que actúen. La clase I a su vez, se subdivide en tipo I, III y IV, y la clase II en tipo II, V y VI, en función de qué nucleasas principales intervienen (Shmakov *et al.*, 2017; Clark *et al.*, 2019). Además de la proteína Cas implicada, existen otras partes del mecanismo que varían según el tipo de sistema CRISPR/Cas, como la naturaleza del ácido nucleico diana (RNA, DNA o ambos), el requerimiento de motivos PAM específicos o la clase de corte (de doble cadena, de cadena sencilla, único o múltiple).

No obstante, en rasgos generales, el funcionamiento básico no difiere significativamente, entre los distintos sistemas. El sistema CRISPR/Cas9, el más ampliamente utilizado en diversas aplicaciones y el mejor caracterizado de todos por su facilidad de uso, emplea la nucleasa Cas9, perteneciente al tipo II, en la etapa de interferencia (Fig. 6).

1. La fase de adaptación (Fig. 6.1) es el proceso inicial mediante el cual se insertan nuevos espaciadores en una región CRISPR, adquiridos mediante la fragmentación del genoma patógeno, cuando una bacteria es infectada por un virus o plásmido. Mientras atraviesa la célula procariota, las proteínas Cas1 y Cas2 reconocen una secuencia específica de PAM del protoespaciador del patógeno, la fragmentan y, a continuación, estas mismas proteínas guían el fragmento para que se integre en una región repetitiva de las agrupaciones CRISPR, generando de esta forma un nuevo espaciador. La colaboración de ambas proteínas es esencial para la fase de adaptación en todos los sistemas CRISPR/Cas (Makarova *et al.*, 2006).

2. La fase de expresión (Fig. 6.2) se inicia tras una nueva exposición al patógeno. En esta etapa se transcribe la agrupación repetición-espaciador, gracias a la secuencia *leader* que contiene una región promotora de la transcripción, y se genera un RNA denominado preliminar derivado de CRISPR (pre-crRNA). Este después será digerido en cada repetición, y dará lugar a los RNA derivados de CRISPR (**crRNA**, CRISPR-RNA), que contienen únicamente la secuencia de un espaciador, complementaria a las secuencias protoespaciadoras del patógeno, flanqueada por fragmentos de repeticiones. En esta etapa, se transcriben otros RNA pequeños no codificantes denominados RNA transactivador de CRISPR (**tracrRNA**), situados aguas arriba de las agrupaciones CRISPR, y con complementariedad con las regiones

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

repetitivas. De esta manera crRNA y tracrRNA se unen formando un dúplex crRNA:tracrRNA. Esta etapa también se conoce como fase de biogénesis.

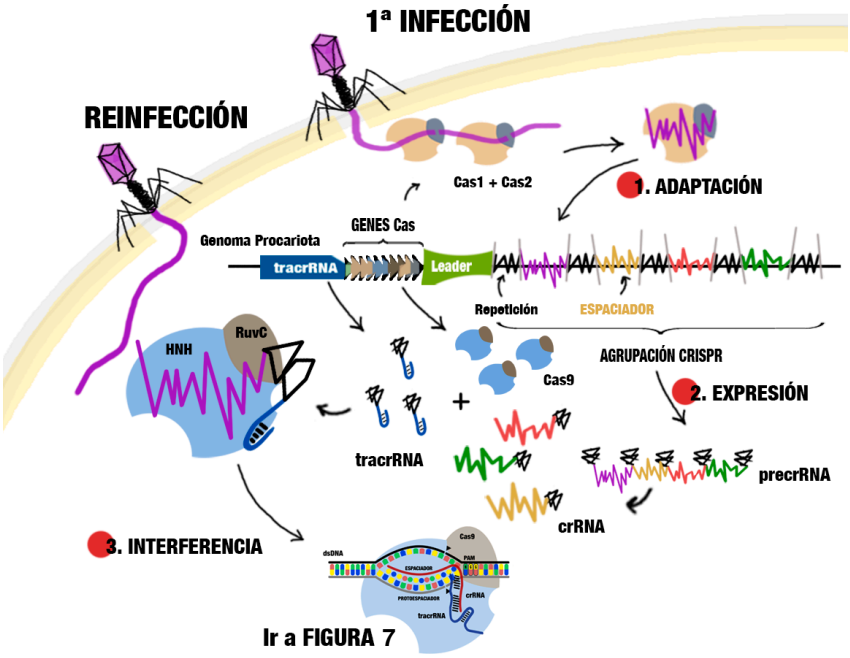
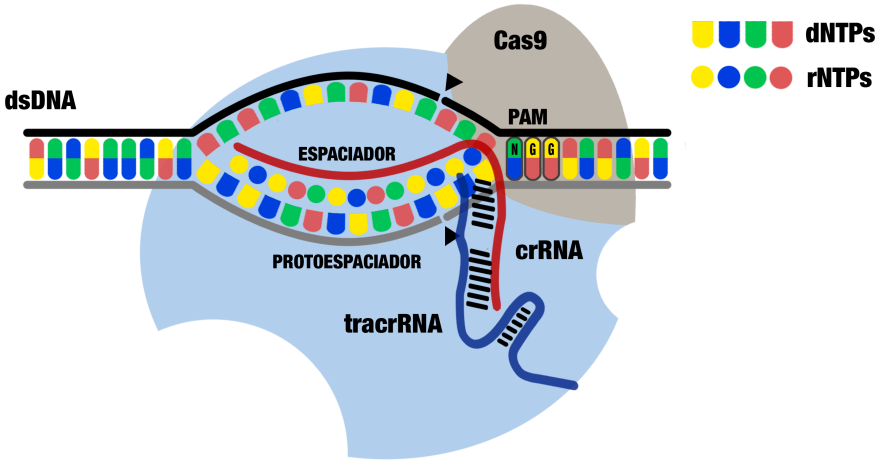


Figura 6. Fases del sistema CRISPR/Cas9. 6.1. Fase de Adaptación; 6.2. Fase de Expresión y biogénesis de RNAcr; 6.3. Fase de Interferencia.

3. En la fase de interferencia (fig. 6.3 y 7), los dúplex crRNA:tracrRNA forman complejos ribonucleoproteícos con las proteínas Cas9, que localizan y se unen a las secuencias protoespaciadoras (secuencias diana del patógeno), complementarias al crRNA. Gracias a la actividad endonucleasa de la proteína Cas9, y sus dominios enzimáticos, RuvC y HNH, que producen DSB en la diana (secuencia patógena) justo en el motivo PAM a continuación de la secuencia protoespaciadora, dando lugar a la fragmentación de un plásmido o del genoma de un virus invasor (Loureiro y Da Silva, 2019).



USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Figura 7. Componentes sistema CRISPR/Cas9 *in vivo*, reconocimiento de secuencia PAM y corte en DNA.

4.2.2.2. Sistemas CRISPR/Cas9 *in vitro*

La técnica CRISPR/Cas9 (Doudna y Charpentier, 2014) es la más utilizada en la generación de líneas mutantes en pez cebra. Emplea la nucleasa Cas9 de bacterias para realizar los cortes en el DNA, y cuenta con la participación de un RNA guía (del inglés *single guide* RNA, sgRNA) una secuencia de RNA de entre 20-25 nucleótidos que se une y se dirige junto con la proteína Cas9 hacia una región del genoma complementaria a la secuencia sgRNA. Estos sgRNA se sintetizan de forma que contenga el tracrRNA, con la región de reconocimiento y unión a la Cas9 o *scaffold*, y el crRNA, con la secuencia complementaria a la región diana del genoma a editar (Fig. 8) o espaciador (Jinek *et al.*, 2012, 2013).

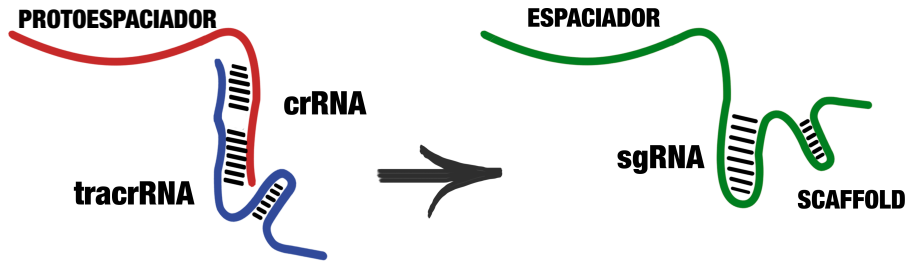


Figura 8. Complejo tracrRNA:crRNA y derivación a las guías de RNA (sgRNA)

Dado que la secuencia de reconocimiento a la Cas9 del tracrRNA es siempre la misma, únicamente debe encontrarse una región de 25 nucleótidos en el gen que nos interese editar, que sea única y yuxtapuesta a una secuencia PAM. De esta forma generamos una secuencia que sería equivalente a los protoespaciadores de los crRNA (Fig. 8). Para la Cas9 la secuencia PAM es la secuencia de tres nucleótidos NGG, lo que quiere decir que seguida a la secuencia diana debe encontrarse cualquiera de las 4 bases (A, C, T, G) seguida de dos guaninas (G).

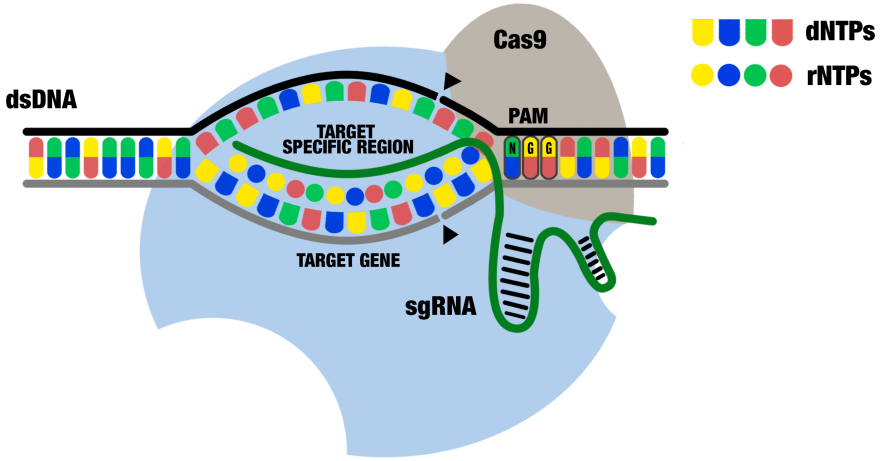


Figura 9. Componentes sistema CRISPR/Cas9 *in vitro*, reconocimiento secuencia PAM y corte en DNA.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Estos RNA guía, por lo tanto, son muy fáciles de generar, por ejemplo, introduciendo la secuencia de interés (espaciador) en plásmidos transcribibles que contengan la secuencia tracrRNA y una región promotora de la transcripción. Luego este plásmido sería transferido a bacterias para su amplificación y producción de los guías en su interior. En esta tesis explicamos en el apartado de Resultados una forma más sencilla y rápida de generar estos guías de RNA. El uso de estos dos únicos componentes: la nucleasa Cas9 y los sgRNA abarata los costes y hace más sencilla su producción, facilitando su aplicación en investigación frente a los ZFN y las TALEN. Únicamente hay que introducir estos componentes en el organismo de interés, y una vez en su interior, se forman los complejos sgRNA-Cas9, que se dirigen específicamente a la región de interés (diana del gen) provocando DSBs (Fig. 9) en el motivo PAM. En este momento se desencadenan los mecanismos celulares de reparación, que darán lugar a la producción de *indels* debido a su ineficiencia y así se genera el modelo mutante para un gen de interés (gen diana) (Fig. 4). Actualmente existen dos estrategias posibles que se aprovechan de la tecnología de edición genética basada en CRISPR/Cas9 para estudiar la función de los genes en el pez cebra:

— La primera y la más tradicional consiste, en inyectar los RNA guías junto con el mRNA o la proteína de Cas9, en los embriones recién fertilizados de una célula para dirigirse a un gen específico de interés, obteniendo los embriones de la generación F0 inyectados. Esta F0 se deja crecer hasta la madurez sexual y los adultos con una línea germinal en mosaico se cruzarán con individuos WT (cruzamiento ***outcross***) para aislar los diferentes alelos, en una F1 de heterocigotos portadores de la mutación (50 % según las proporcione mendelianas). Los mutantes heterocigotos de la F1 se cruzan entre si para obtener embriones mutantes homocigotos F2 (25 % según las proporcione mendelianas).

— La segunda estrategia, consiste en observar los fenotipos de los embriones F0 inyectados conocidos como **CRISPant** (Fig. 10). Estos embriones portan mutaciones LoF bialélicas en mosaico, y se observan directamente para estudiar la función cigótica de un gen (Burger *et al*., 2016; Jao *et al*., 2013; Shah *et al*., 2015; Shankaran *et al*., 2017; Trubiroha *et al*., 2018; Wu *et al*., 2018). También se pueden inyectar y dejar crecer para estudiar los efectos maternos del gen (Moravec *et al*., 2021). Esta mayor eficiencia permite también la observación de fenotipos de efecto materno en la generación F1 en lo que llamamos embriones CRISPant "maternos" (Fig. 10). Según el proceso de desarrollo de interés, los embriones CRISPant permiten la detección del fenotipo de los genes candidatos específicos en unas pocas horas o unos pocos días.

Con la primera de las aproximaciones se tarda un mínimo de entre 4-6 meses para establecer la línea en el pez cebra, y se conoce como línea mutante *knockout* isogénico estable, ya que dura mucho más tiempo en comparación con el enfoque de CRISPant o *knockout* transitorio, donde los embriones son analizados directamente. Sin embargo, el *knockout* isogénico estable permite obtener cientos de embriones F2 con diferentes genotipos, incluidos homocigotos WT (25 %), heterocigotos (50 %) y homocigotos mutantes (25 %) que podrían usarse para evaluar las funciones paralelas de los genes entre los tres genotipos (Hwang *et al*., 2013; Cornet et al., 2018). Los investigadores y la comunidad de pez cebra han sugerido que este fenotipo mutante mediado por *knockout* se convierta en una estrategia estándar para el estudio de la función génica en el pez cebra, mientras que la estrategia mediada por *knockdown* basada en la inyección de MO podría ser una técnica complementaria para lograr el estudio de la función

USC UNIVERSIDADE DE COMPOSTELA

génica fiable en los modelos de pez cebra (Kok *et al*., 2015). En contraste, estudios recientes informaron de diferencias significativas en los fenotipos entre CRISPant y el pez cebra *knockout* estable debidos a la activación de mecanismos de compensación genética en los mutantes estables, pero no en los morfantes ni en los CRISPant (Li *et al*., 2017; Terzenidou *et al*., 2017; She *et al*., 2019; Buglo *et al*., 2020).

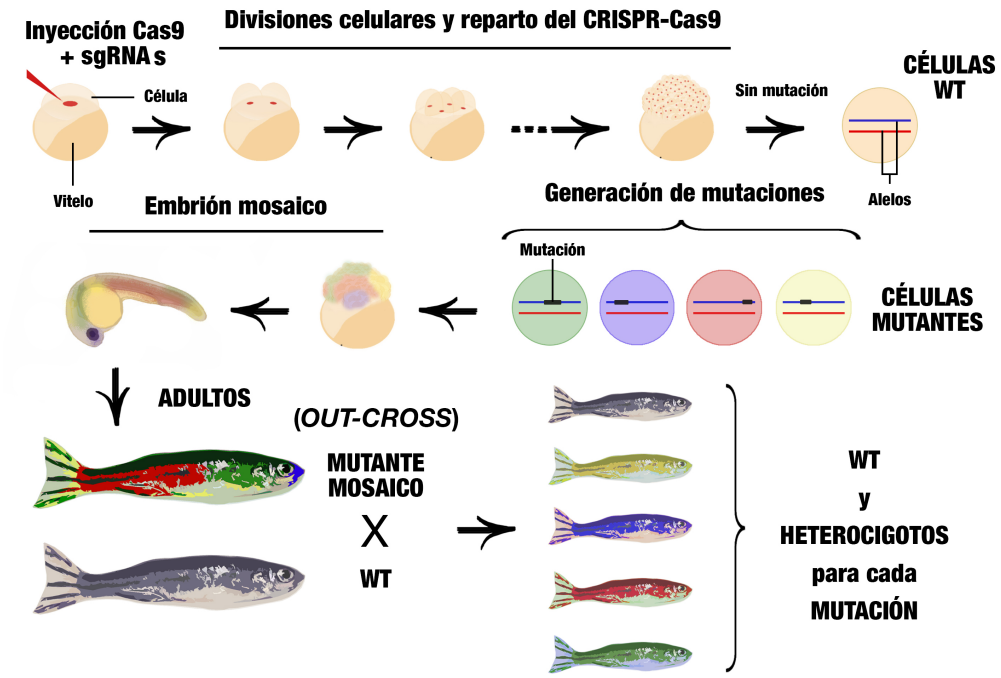


Figura 10. Generación de mutantes F0 mosaico por CRISPR/Cas9 (CRISPant) y establecimiento de la línea F1 CRISPant "maternos" mutante heterocigota.

5. DISCREPANCIA FENOTÍPICA Y CONTROVERSIAS ENTRE TÉCNICAS

Cuando modificamos o interrumpimos un gen por *knockout*, para inactivar la proteína codificada, los organismos deberían tener efectos más severos que simplemente reduciendo el nivel de expresión génica realizando *knockdown*, no obstante, en ocasiones ocurre lo contrario (Rossi *et al*., 2015). La desactivación de un gen por *knockout* a veces no tiene un impacto perceptible, mientras que la reducción de la expresión del mismo gen provoca defectos importantes (Kok *et al*., 2015). El debate de los enfoques *knockdown* versus *knockout* en la comunidad del pez cebra han estado en curso durante más de una década, y algunos investigadores han abogado por limitar el uso de morfolinos a los casos en que se puede hacer una comparación con un fenotipo mutante *knockout* (Schulte-Merker y Stainier, 2014; Lawson, 2016; Stainier *et al*., 2017), mientras que otros proponen continuar con el uso de morfolinos incluso en ausencia de un mutante *knockout* para mantener el progreso en la investigación biológica (Blum et al., 2015).

En 2015, el grupo de Kok *et al*. informaron de la existencia de una importante discrepancia entre los fenotipos observables en los embriones morfantes y mutantes del pez cebra para un mismo gen. Algunas mutaciones, generadas en condiciones estables no lograron recapitular los fenotipos esperados, mientras que los morfantes presentan graves defectos en sus fenotipos. Los autores seleccionaron 24 genes y mediante el uso de las tecnologías de edición génica, generaron mutantes para comparar los fenotipos con el de los mutantes registrados en el *Zebrafish Mutation Project* (ZMP) de Sanger. El 80 % de los genes tenían fenotipos observados en los morfantes que no se observaron en los embriones mutantes (Lawson y Wolfe, 2011). Existen varias razones adicionales que explican la discrepancia fenotípica entre los modelos *knockdown* y *knockout* que deben tenerse en cuenta para la comparación de las diferencias entre los fenotipos mutantes y morfantes, y que probablemente hayan sobreestimado los efectos *off-target* de los MO. En muchos de los estudios citados por Kok *et al*. *(*2015), la dosis de morfolino no se controló adecuadamente (Lawson, 2016), un factor que se ha demostrado experimentalmente, tiene profundos efectos morfológicos graves *off-target* en el pez cebra (Zimmer et al., 2019). Sin embargo, hay dos factores genéticos muy importantes en el modelo genético del pez cebra que explican mejor esta discrepancia fenotípica.

— En primer lugar, se ha observado una gran capacidad de adaptación transcripcional en algunos mutantes de pez cebra que puede conducir a la **compensación genética** de vías genéticas relacionadas funcionalmente (El-Brolosy y Stainier, 2017).

— En segundo lugar, la contribución materna en forma de RNA del pez cebra provoca que la descendencia mutante LoF completa, generada a partir de padres heterocigotos, podría llevar suficiente mRNA materno WT, pudiendo mantener así la función génica normal en ausencia de mRNA cigótico WT en el desarrollo temprano (Wu *et al*., 2003).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

5.1. Compensación genética

Aunque se ha visto que a menudo los responsables de esta discrepancia fenotípica son los efectos *off-target* o tóxicos de la inyección del reactivo (sobre todo morfolinos en pez cebra), esto no siempre es así. Se ha observado que en algunos mutantes estables, ocurre una respuesta de compensación genética (**GCR**, del inglés ***Gentetic Compensation Response***), pero no en los morfantes, que podría ser la causa de que los organismos mutantes no exhiban los mismos defectos fenotípicos severos (Rossi *et al*., 2015). A través de la GCR, estos mutantes regulan al alza un conjunto de genes y proteínas como un efecto compensatorio debido a la mutación deletérea. (Rossi *et al*., 2015; Moreno *et al*., 2018; She *et al*., 2019) Estas discrepancias entre mutantes y morfantes para un mismo gen llevaron a cuestionar el uso de los MO para el estudio de la función génica.

No obstante, el análisis de los CRISPant informó también de la existencia de una discrepancia fenotípica entre mutantes *knockout* transitorios y mutantes *knockout* estables para un mismo gen (Li *et al*., 2017; She *et al*., 2019; Buglo *et al*., 2020). Mientras que algunos mutantes *knockout* estables no recapitulan el fenotipo morfante tras el cruzamiento de individuos mutantes, manteniéndose el gen incluso en homocigosis, y sin observarse activación de la GCR, los organismos CRISPant o *knockout* transitorio sí comparten muchos fenotipos observados en morfantes para ese mismo gen (Moravec *et al*., 2021). Además, se ha observado que la respuesta de compensación genética por la GCR, que se observa en algunos *knockout* estables de pez cebra, no se observa en CRISPant (Buglo *et al*., 2020).

Al imitar los fenotipos morfantes, el uso del análisis directo de la generación F0 del pez cebra CRISPant podría ser un enfoque alternativo, atractivo y potencial para estudiar la función génica *in vivo*. Este método sirve como un método abreviado que evita la carga de meses e incluso años de cría de animales para generar mutantes de pez cebra y el tiempo necesario para genotipar y confirmar una línea mutante estable. Es importante dar valor a los análisis directos con el método F0/CRISPant, ya que además de una citotoxicidad mínima o nula al no presentar apenas efectos *off-target* en comparación a los modelos morfantes, tampoco activan la GCR, a diferencia de los modelos de mutantes estables.

5.1.1. Compensación Genética Mediada por NMD y las PTCs

En 2019, los grupos de El-Brolosy *et al*. (2019) y Ma *et al*. (2019) descubrieron que la regulación al alza de los genes compensadores se desencadenaba específicamente por mutaciones que involucraban la degradación del mRNA debido a las mutaciones *nonsense* y la generación de secuencias de nucleótidos cortas conocidas como codones de terminación prematuros (PTC, del ingles *Premature Termination Codons*) (El-Brolosy *et al*., 2019; Ma *et al*., 2019). Tanto la reducción en la expresión por degradación del mRNA, como la presencia de PTCs en los genes mutantes observados, condujeron a la especulación de que la vía NMD (del inglés *Nonsense Mediated Decay*) podría estar involucrada en la respuesta de compensación genética, que también participa en la compensación de dosis (Yin *et al*., 2009). La vía NMD es una vía de vigilancia que existe en todos los eucariotas, cuya función principal es la de comprobar anomalías en la vía del mecanismo transcripcional. Esta vía reduce los errores en la expresión génica al eliminar las variantes de transcripción del mRNA que contengan PTC (Baker, 2004), y regula al alza la expresión de sus genes parálogos correspondientes, y por tanto, compensadores, así como la expresión de la copia WT en los embriones heterocigotos (El-Brolosy *et al*., 2019). Cabe destacar que para la activación de la GCR necesario que el gen se exprese previamente. Los genes mutantes que no se pueden transcribir no producen compensación genética (El-Brolosy *et al*., 2019).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Aunque la degradación del mRNA parece un factor clave para inducir la compensación genética, es la transcripción del mRNA portador de PTC, lo que inicia el proceso de la GCR (Ma *et al*., 2019). Además de un PTC, se requiere de similitud de secuencia para regular al alza los genes de compensación e inducir la GCR y probablemente los diferentes genes tengan diferentes GCR (Ma *et al*., 2019). Ma *et al*. (2019) describieron con bastante fiabilidad un mecanismo por el cual el mRNA portador de PTC provoca una respuesta de compensación genética (Fig. 11) mediada por la interacción entre el factor de NMD *Upf3a*, los modificadores de histonas, los remodeladores de cromatina y componentes del complejo COMPASS como *wdr5* (El-Brolosy *et al*., 2019; Ma *et al*., 2019). Además, observaron que la activación del GCR se acompaña de una mejora de la trimetilación de la histona H3 Lys4 (H3K4me3) en las regiones del sitio de inicio de la transcripción de los genes compensatorios.

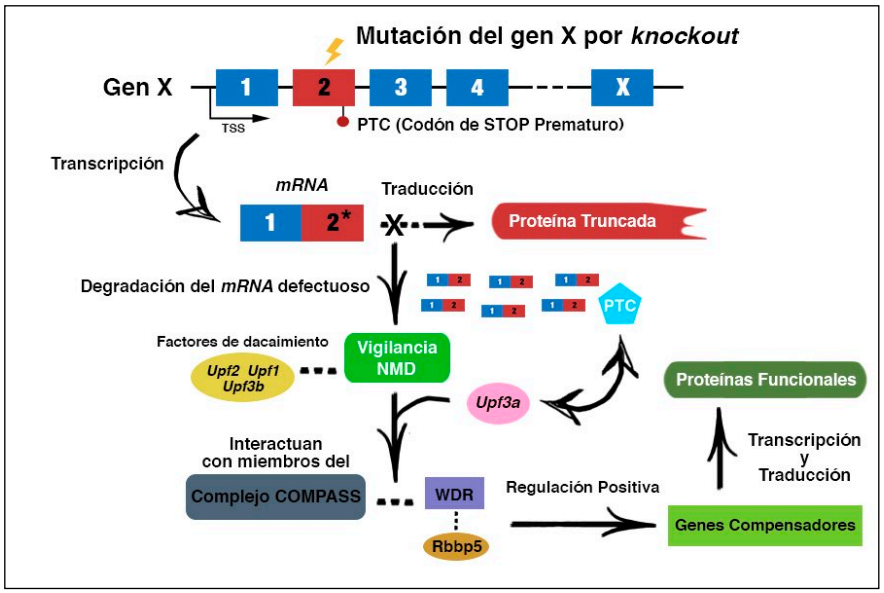


Figura 11. Esquema del mecanismo de GCR en el pez cebra inducido por la activación de PTCs y la activación de genes compensadores descrito por Ma *et al.* (2019).

5.1.2. La Compensación Genética, una Cuestión Temporal

Varios estudios realizados a partir de 2019, relacionan esta activación del mecanismo de compensación genética con una dependencia del tiempo. Se observó que esta respuesta compensatoria aparecía en los peces más viejos, pero no en los mutantes más jóvenes (Houbrechts *et al*., 2019). En algunos casos de embriones CRISPant, los defectos embrionarios observados, también son transitorios, y en pocos días, debido a la regulación positiva de genes compensatorios, recuperan un fenotipo casi normal (Cardenas-Rodríguez *et al*., 2021). Algunos mutantes, a pesar de no mostrar fenotipo en el embrión, al llegar al estado adulto, aunque de forma leve, comienzan a presentar diferentes grados del fenotipo (Zhu *et al*., 2017; Cardenas-Rodríguez *et al*., 2021).

Estos hallazgos validan la importancia de estas familias de genes durante el desarrollo temprano del pez cebra y proporcionan evidencia de una redundancia transcripcional específica de genes consistente con la compensación genética. Estos datos demuestran que la duplicación del genoma del pez cebra junto con la activación de la GCR parece ser un mecanismo evolutivo heredable, que aporta robustez genética, para la supervivencia de la

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

especie y para el completo y óptimo desarrollo de los individuos en caso de mutaciones en genes importantes para el desarrollo.

5.2. Contribución Materna

Al inicio de la embriogénesis temprana, el embrión se encuentra en un estado transcripcionalmente inactivo. Un conjunto de productos maternos (MP, del ingles *Maternal Products*), como *RNA*, proteínas y otras biomoléculas, que se generan durante la oogénesis y se suministran al óvulo, son los responsables de impulsar los procesos del desarrollo hasta el momento en el que ocurre la activación del genoma cigótico (ZGA, del inglés *Zygous Genome Activation*), que ocurre después de un número estereotipado de ciclos celulares (Baroux *et al.*, 2008, Tadros y Lipshitz, 2009) En este momento el control del desarrollo pasa a ser dirigido por los productos del genoma nuclear activado o producto cigótico (ZP, del inglés *Zygous Product*), durante un período llamado transición materno-cigótica (MZT, del inglés *Maternal-Zygous Transition*).

Durante la MZT ocurren dos eventos importantes:

1. Uno es el aclareamiento materno, la eliminación de las instrucciones maternas (mRNA y proteínas) necesarias para la maduración de los ovocitos, la homeostasis y las primeras etapas de la embriogénesis, pero que se vuelven innecesarias o perjudiciales a medida que se desarrolla el embrión.
2. Instalación de nuevas instrucciones cigóticas a través de la expresión génica y la ZGA, proceso que es activado por el programa materno.

Estas dos actividades íntimamente relacionadas, se combinan para dar lugar a un embrión reprogramado, en el cual se remodela drásticamente el paisaje de expresión génica embrionaria y las identidades celulares, que se revisarán a lo largo del desarrollo y la edad adulta a medida que las células se diferencian y regeneran. El efecto de la contribución materna se refiere al fenómeno genético en el que un fenotipo está causado por una mutación en el genoma materno en lugar de una mutación propia. Existe una mayor influencia materna en el desarrollo de la progenie que paterna, debido al gran depósito de transcritos citoplasmáticos o proteínas en los ovocitos (Fig. 12), por los que esta contribución es muy importantes para las primeras etapas del desarrollo, hasta que el genoma cigótico se activa (Tadros y Lipshitz 2009; Bennett *et al*. 2007; Langley *et al*., 2014).

Debido a esta gran contribución materna del MP (**carga materna**), se genera un mutante cigótico cuando se usa una hembra heterocigota en el cruce con un homocigoto mutante para dar lugar a una progenie homocigota (ver Situación 1 de la Fig. 12). Por el contrario, se obtiene un mutante materno-cigótico cuando se usa una hembra homocigótica en el cruce con un macho heterocigótico para producir un homocigoto (ver Situación 2 de la Fig. 12). En la Situación II también se obtiene un heterocigoto (-/+) que carece únicamente de la carga materna, pero sí tiene ZP, lo que daría lugar a un mutante materno.

La impronta genómica es un fenómeno epigenético que ha sido muy estudiado en mamíferos euterios, marsupiales y plantas, pero poco conocimiento hay en pez cebra (McGowan y Martin, 1997, Li *et al*., 2010). Una característica de la impronta genómica es la

USC UNIVERSIDADE DE COMPOSTELA

expresión específica del origen parental de los genes improntados. Aunque los mecanismos moleculares que subyacen a la impronta genómica han sido poco estudiados en pez cebra, se presume que la pérdida gradual de las huellas de metilación del DNA genómico hereditario en muchas divisiones celulares podría explicar la discrepancia espacial y temporal entre el defecto molecular causante y el fenotipo observado en los mutantes (Li *et al*., 2010).

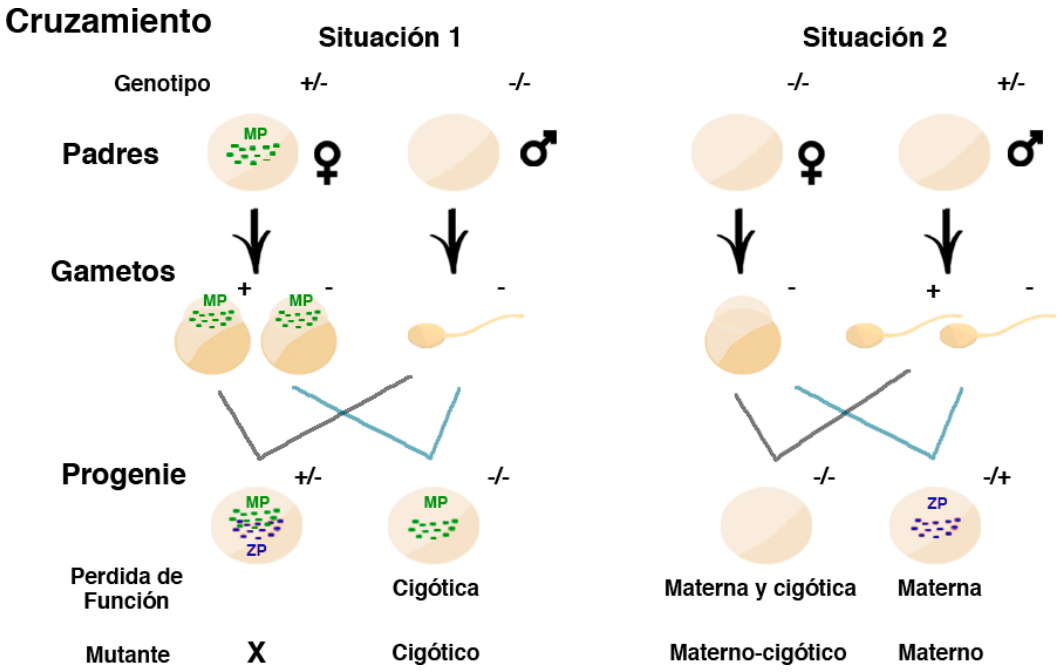


Figura 12. Esquema de la contribución materna del pez cebra y generación de mutantes maternos, cigóticos y materno-cigóticos. MP: producto materno; ZP: producto cigótico.

Los efectos maternos suelen manifestarse antes de la transcripción de los genes cigóticos (Bennet *et al*., 2007; Stitzel y Seydoux, 2007). En el ratón, la transcripción cigótica no comienza hasta la etapa de 2 células (Schultz, 2002). En el pez cebra, se ha observado un período de transcripción cigótica robusta que sigue a la MBT (del inglés *MidBlastula Transition*) cuando los ciclos celulares comienzan a alargarse (Kane y Kimmel, 1993). Sin embargo, algunos genes se transcriben mucho antes. Por ejemplo, el MBT del pez cebra ocurre en la etapa de 1000 células, no obstante, varios estudios indican que la transcripción primaria de algunos genes podría ocurrir ya en la etapa de 64 células (Mathavan *et al.*, 2005; Giraldez *et al.*, 2006; O'Boyle *et al.*, 2007; Lindeman *et al.*, 2011,).

Los ciclos celulares embrionarios tempranos son cortos, e imponen un límite de tiempo en los genes que se pueden expresar, ya que la transcripción se detiene en la mitosis y las transcripciones incompletas se eliminan (Shermoen y O'Farrell, 1991, Tadros y Lipshitz, 2009). Por tanto, el corto ciclo celular durante la embriogénesis temprana restringe el potencial de expresión génica a genes cortos (McKnight y Miller, 1976, Rothe *et al.*, 1992; McHale *et al.*, 2011). Alternativamente, los embriones tempranos pueden haber desarrollado mecanismos para anular el aborto de la transcripción; si es así, podría ocurrir la expresión de genes más largos (Mathavan *et al.*, 2005).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Algunos fenotipos causados por la pérdida de productos genéticos maternos no se manifiestan hasta mucho después del período de transición materno-cigótico, incluso en la edad adulta (Leader *et al.*, 2002; Payer *et al.*, 2003; Wagner *et al.*, 2004). En un examen reciente a gran escala de genes de efecto materno en pez cebra, se encontró que un número significativo de mutantes aislados causaron una detención del desarrollo en la MBT, posterior al período de MZT (Wagner *et al.*, 2004).

Las mutaciones estables generadas por CRISPR/Cas9 en estos genes donados por la madre, necesitan de una generación adicional y así obtener adultos homocigotos mutantes, para la observación de fenotipos, lo que requiere de recursos adicionales. Estudios recientes han demostrado que los CRISPant maternos permiten la identificación efectiva y la caracterización primaria de estos genes de efecto materno en una sola generación, lo que facilita el análisis genético de los factores maternos que que parecían fundamentales, no solo de los humanos(Moravec *et al.*, 2021).

Cuando el *knockout* produce la muerte o pérdida de la viabilidad reproductiva, los investigadores han recurrido la progenie mutante homocigota F2 de padres heterocigotos para evaluar los resultados mRNA LoF. En estos casos, los padres mutantes heterocigotos pueden transmitir suficiente mRNA de WT del gen diana a la descendencia mutante, lo que da como resultado la expresión durante el desarrollo temprano de la proteína diana del mRNA materno (Wu et al., 2003). Alternativamente, el reemplazo de la línea germinal (Ciruna et al., 2002) puede usarse para generar hembras WT con líneas germinales mutantes homocigotas para obtener descendencia mutante sin la contribución del mRNA materno; sin embargo, este método no sería factible si el gen de interés es esencial para el desarrollo de la línea germinal. Por el contrario, el iRNA y los morfolinos que bloquean la traducción pueden derribar la expresión de transcripciones tanto maternas como cigóticas, descubriendo fenotipos que pueden no observarse en experimentos LoF cuando se usan descendientes mutantes generados a partir de padres heterocigotos. En los casos en que las proteínas maternas se depositan directamente en embriones, las comparaciones cuidadosas de mutantes generados a partir de cruces heterocigotos y homocigotos pueden ayudar a dilucidar la función del gen de interés (Cote et al., 2007). Los MO se dirigen a los mRNA maternos y cigóticos simultáneamente, proporcionando una situación ventajosa para el estudio del desarrollo temprano.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS 1.

La introducción del modelo *knockout* estable para el gen *chd7,* igual que para muchos otros genes que parecían fundamentales, no solo de los humanos, sino también del pez cebra, ha puesto en duda su función exclusiva e imprescindible para el desarrollo embrionario de los vertebrados. Las afecciones causadas por la deficiencia del gen *chd7* han sido estudiadas en la última década, en el pez cebra, mediante la utilización de MO. A falta de recapitulación fenotípica con el modelo *knockout*, tanto en nuestro grupo como en otros laboratorios que utilizan el modelo de pez cebra, ha quedado patente la necesidad de profundizar no solo en la función cigótica del gen *chd7* y la posible compensación genética, sino también en la posible función materna y materno-cigótica del mismo. Las alteraciones fenotípicas observadas en los embriones cigóticos para *chd7* de pez cebra se deben en su mayoría a alteraciones maternas y materno-cigóticas, que muchas veces se corrigen durante el desarrollo embrionario. La gran importancia de la carga materna en forma de RNA de estos genes maternos, en los que también podría ocurrir una compensación genética, y la gran actividad de la GCR en estadios tempranos del desarrollo de los embriones de pez cebra, podrían causar alteraciones de la expresión transcripcional debido a mutaciones *nonsense* y *frameshift* que causan PTCs y sobreactivan estos mecanismos de compensación genética en el pez cebra en las etapas materna y materno-cigóticas independientemente del genotipo del embrión.

OBJETIVOS 1.

1.1 Análisis Comparativo entre Técnicas para el Estudio de la Función Génica.

1.1. Análisis de la susceptibilidad genética a la recapitulación fenotípica.

1.2. Análisis de los efectos de los tipos de mutación sobre la susceptibilidad genética a la recapitulación fenotípica.

1.2. Generación y Validación del Modelo de Pez Cebra Mutante *chd7.*

2.1. Caracterización fenotípica y molecular de los embriones maternos, cigóticos y materno-cigóticos, y comparación con el fenotipo morfante y otros modelos mutantes para *chd7.*

2.2. Estudio de la contribución y la función materna de *chd7.*

HIPÓTESIS 2.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO

La relación entre el gen *CHD7,* el fenotipo del síndrome de CHARGE y la senescencia embrionaria es cada día más evidente. Además de la coexpresión espacio-temporal de *CHD7,* la actividad SA-β-Gal de los tejidos en desarrollo y de los inhibidores del ciclo celular p15 y

p21 relacionados con senescencia embrionaria, se ha observado un papel imprescindible de *CHD7* para la inhibición de la expresión de *p53* y la activación de la senescencia celular. Sin embargo las alteraciones de la senescencia como la causa principal de la patología del síndrome de CHARGE no está tan clara. Los pacientes con síndrome de CHARGE no presentan alteraciones más allá de las causadas durante el desarrollo, y cuando nacen no suelen presentar mayores complicaciones que las causadas por los defectos embrionarios. Además, los adultos con mutaciones en el gen *CHD7* y síndrome de CHARGE no presentan una relación clara con la etiología de la deficiencia en *CHD7* y las alteraciones en la senescencia de los adultos relacionadas con la senescencia celular, la regeneración de los tejidos o el cáncer. Es por eso que la compensación cigótica es altamente probable en los pacientes con síndrome de CHARGE y mutaciones en el gen *CHD7*, y que el establecimiento correcto de la senescencia embrionaria seguramente contribuya a la recuperación y disminución de los defectos materno-cigóticos del embrión y el buen desarrollo posterior. Las alteraciones en la senescencia embrionaria, por tanto, podrían provocar la pérdida de homocigosidad de estas variantes de *CHD7.*

OBJETIVOS 2.

2.1. Estudio de la Senescencia Embrionaria en el Síndrome de CHARGE.

2.1.1 Estudio de la función materna, materno-cigótica y cigótica de *chd7* en la senescencia embrionaria.

2.2. Estudio de la Relación entre *CHD7* y la Senescencia Celular.

2.2.1. Estudio de la función materna, materno-cigótica y cigótica de *chd7* en la senescencia celular.

HIPÓTESIS 3.

A su vez, la similitud en la variabilidad fenotípica y genética de los modelos de pez cebra mutantes en *chd7* con las variabilidades fenotípicas y genéticas observadas en el síndrome de CHARGE, nos conducen a pensar que esta importancia de la carga materna, podría estar ocurriendo también en humanos. La explicación de que las alteraciones fenotípicas en humanos son debidas a la haploinsuficiencia cigótica del gen *CHD7* no concuerdan del todo con la realidad observada actualmente. La penetrancia de las mutaciones en el gen *CHD7* como causa del síndrome de CHARGE disminuye a la vez que aumentan las evidencias de que la enfermedad tiene múltiples relaciones genéticas y epigenéticas con otros genes y síndromes del desarrollo. El intercambio de la contribución materna por la impronta genética, podría explicar muchas de las alteraciones en las funciones genéticas maternas del desarrollo en el fenotipo CHARGE con y sin mutaciones en *CHD7* debido a una pérdida de proteostasis. Además, es importante destacar como igual que en el pez cebra para el gen *chd7* y para muchos otros genes maternos, las mutaciones *nonsense* y *frameshift*, provocan la mayoría de los casos de síndrome de CHARGE con fenotipos más penetrantes y expresivos. Mientras, las mutaciones *missense* explican pocos casos de la enfermedad y están más relacionadas con otras anomalías genéticas. La acumulación de RNA con PTCs en las gónadas parentales

USC UNIVERSIDADE DE COMPOSTELA

podría explicar la aparición de muchos fenotipos CHARGE y de otros síndromes del desarrollo sin una mutación en el gen causal debido a las alteraciones maternas y materno-cigóticas del desarrollo. Los genes materno-cigóticos, igual que los remodeladores de la cromatina como *CHD7*, también tienen funciones en el adulto en la diferenciación y regeneración de tejidos. La implicación tan grande de *CHD7* en la senescencia celular mediante la inhibición de p53, descrita recientemente, nos conduce a pensar que también podría tener una importancia en la senescencia celular en la regeneración de tejidos.

OBJETIVOS 3.

5. Estudio de la Relación entre *CHD7* y la Reparación Tisular.

5.1. Estudio de la función en el adulto de *chd7* en la reparación tisular.

HIPÓTESIS 4.

Las alteraciones de la senescencia embrionaria, relacionadas con la contribución materna de *CHD7* y de las redes génicas en las que este regulador epigenético interviene durante el desarrollo embrionario y adulto de los vertebrados, guardan un vínculo con los denominados "*hallmarks of aging*". La pérdida de proteostasis y las alteraciones transctiptómicas, que ocurren durante el envejecimiento de los mamíferos, podrían estar muy relacionadas también con la enfermedad del síndrome de CHARGE y el aumento de los PTCs provocado por las variantes *nonsense* y *frameshift,* observadas con una frecuencia muy alta durante el síndrome de CHARGE y otras enfermedades del desarrollo. Las mutaciones en estos genes producen fenotipos muy solapados pero con una expresividad y penetrancia muy variable, y muchas veces no se encuentra un gen causal. La pérdida de proteostasis y las alteraciones de las redes genéticas en las que intervienen en común estos genes, podrían ser la verdadera causa de este solapamiento fenotípico y no la mutación concreta en un gen causal.

OBJETIVOS 4.

6. Establecimiento del *Killifish* como Modelo para el Estudio de CHD7 y la Senescencia.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

MATERIAL Y MÉTODOS

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

MATERIALES Y MÉTODOS

1. GENERACIÓN DE LA LÍNEA MUTANTE *chd7*-CRISPR DE PEZ CEBRA

La generación del mutante de pez cebra para *chd7* se realizó mediante la técnica de edición genética CRISPR/Cas9, por la gran facilidad técnica y de manejo en esta especie, y la alta eficiencia en dirigir las mutaciones a regiones concretas. En este apartado realizaremos un resumen de los pasos seguidos, para mas información acudir a Arana (2016).

1.1. Selección y Análisis de la Secuencia Diana del Gen *chd7*

Se seleccionaron 3 secuencias diferentes para los sgRNA que van a reconocer la región de interés para realizar el corte (Fig. 2A en Arana, 2016). Para ello se utilizaron diferentes bases de datos disponibles *online*. La secuencia de *chd7* de pez cebra se buscó en Ensembl (Cunningham *et al.*, 2022) y se comprobó la presencia de parálogos que son el resto de miembros de la familia CHD, los cuales presentaban una baja homología. De esa secuencia se escogió el exón 2 como región diana para hacer el corte (Fig. Sup. 1A). Luego se buscaron secuencias de 20-25 bases que podían ser utilizadas como sgRNA, a través de la herramienta CRISPRscan (http://www.crisprscan.org; Moreno-Mateos *et al*., 2015) en el buscador UCSC (genome.ucsc.edu). De todas las secuencias obtenidas, se seleccionaron las 3 que mostraron una mejor puntuación según el CFD *score* (Doench *et al*., 2014) para la generación de sgRNA sin efectos *off-target*.

1.2. Inyección de los sgRNA y Cas-9

Las inyecciones fueron realizadas en el Centro Andaluz de Biología del Desarrollo (CABD) en la Universidad Pablo de Olavide (UPO) en colaboración con la investigadora Ana Fernández Miñán responsable del Servicio de Genómica Funcional. Se realizaron en combinaciones de 2 sgRNA junto a una Cas9 *homemade* (sintetizada por el Servicio de Proteómica del centro) para aumentar la eficacia de corte de la secuencia, y en embriones de 0 hpf antes de la primera división celular (Fig. Sup. 1B).

1.3. Detección de Mutantes por Clonación en Bacterias del Gen *chd7*

Los embriones inyectados se divide en grupos de 50 en placas p100, y de cada grupo se hacen pools de 10 embriones para extraer el DNA. Tras la amplificación de un fragmento de interés del gen mutado por reacción en cadena de la polimerasa (PCR, del inglés Polimerase Chain Reaction), se clona el fragmento en bacterias. Después, se analizan 10 colonias de bacterias de cada grupo, y si se encuentra alguna mutación, se deja crecer ese grupo para identificar individuos mutantes adultos (Fig. Sup. 1C). Si la técnica ha funcionado, los peces de la F0 serán mosaicos celulares, es decir, tendrán poblaciones de células WT y poblaciones de células mutantes con mutaciones distintas entre ellas (Fig. 10 en la Introducción). Los únicos mutantes que nos interesan, para generar una línea knockout estable, son aquellos que

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO

presenten mutaciones en la línea germinal, y que puedan transmitir la mutación a la descendencia. Cuando la F0 llega al estado reproductor, se cruza con individuos WT, y se analiza la descendencia para identificar las mutaciones de la línea germinal, y también se cría para generar la línea F1 heterocigota knockout estable (Fig. Sup. 1D).

2. LÍNEAS, CRÍA Y MANTENIMIENTO DE PEZ CEBRA Y *KILLIFISH*

Todos los procedimientos aquí recogidos, han sido llevados a cabo con la aprobación del Comité de Bioética de la Universidad de Santiago de Compostela, y conforme a la Ley 6/2013, del 11 de junio, de modificación de la Ley 32/2007, del 7 de Noviembre, para el cuidado de los animales, en su explotación transporte, experimentación y sacrificio.

Para las dos especies, se empleó el compuesto metasulfonato de tricaína 4 mg/ml, para anestesía (15 gotas en 20 ml) y en sobredosis para el sacrificio.

2.1. Líneas de Pez Cebra y *Killifish*

Para este estudio se emplearon varias líneas de pez cebra (*D. rerio*):

1. Línea WT del tipo AB/Tübigen (AB/TU)
2. Línea mutante ENU para el gen *chd7* (Sa19733) del ZIRC.
3. Línea mutante CRISPR para el gen *chd7* (Arana, 2016)
4. Línea mutante *knockin* MPEG
5. Línea mutante *knockin* CRE-*sox9b*

También se empleó una línea de *killifish* (*N. furzeri*):

1. Línea WT de la cepa GRZ.

2.2. Cría y Mantenimiento de las Líneas de Pez Cebra y *Killifish*

Las líneas tanto de pez cebra como de *killifish* son mantenidas en un animalario dentro de un sistema de peceras que recircula el agua, la filtra a través de 3 filtros: 2 físicos y 1 biológico; y mantiene unas condiciones de temperatura, pH, conductividad y luminosidad constantes e iguales para ambas especies. El animalario es un lugar estanco y sin ventanas, para mantener un fotoperíodo que simula su ambiente natural (14 horas de luz y 10 de oscuridad), y una temperatura de 28 ºC, muy importante para controlar los ciclos reproductivos. Las paredes, suelo y techo están forrados de material impermeable y de fácil desinfección. Los peces se mantienen en peceras y se separan según la especie, mutación, y fecha de nacimiento en grupos de entre 20 y 50 peces según la capacidad de la pecera. Cada pecera posee un ojal cubierto con una rejilla para evitar el escape de los peces que funciona por rebosamiento, de este modo, el agua sucia cae a un colector y es conducida hacia el sistema de filtros provisto de esponjas, perlón y biobolas. La calidad del agua debe de ser revisada periódicamente, realizando seguimientos del pH y la conductividad eléctrica, así como las concentraciones de nitratos, nitritos y amonio. Al tratarse de especies tropicales y de agua dulce, la temperatura óptima es en torno a los 28 ºC, y los requerimientos de conductividad se encuentran en torno a los 300-1500 µS. Para obtener el agua adecuada, se emplea agua de ósmosis, de modo que en

USC UNIVERSIDADE DE COMPOSTELA

cada sala existe un tanque de agua a 600 µS y otro de agua osmotizada (0 µS), al cual se le añaden unos 63 g de sal marina por cada 300 l.

2.2.1 Cría y Mantenimiento de las Líneas de Pez Cebra

Los huevos de pez cebra, así como los embriones hasta los 7 dpf, se colocan en placas de 14 cm con agua de ósmosis reversa y E3, que actúa como antifúngico, y se mantienen en una estufa a 28 ºC. Si los peces van a ser utilizados para mantener la línea, a los 7 dpf, se introducen en peceras, conectadas al sistema.

Los peces cebra en la naturaleza son depredadores de presas que se encuentren por encima de ellos, por ello tienen la boca orientada hacia arriba, por lo que sus alimentos deben flotar, al menos un rato. Para ello se emplean piensos en forma de gránulos de distintos tamaños, dependiendo de la edad de los individuos y que contienen una composición de nutrientes específica para el estado de desarrollo. También se les da comida viva, en este caso Artemia salina, que se prepara en el mismo laboratorio y aumenta la vitalidad de los peces y mejora las puestas. Los peces comen dos veces al día, por la mañana, a primera hora y a la tarde. La artemia solo se les da una o dos veces por semana como un suplemento.

Para mantener las líneas debemos reproducirlas en el animalario, para ello debemos separar los machos y las hembras el día antes de la puesta, habitualmente se colocan 2-3 hembras por cada macho en una misma pecera especial denominada paridera. Este recipiente tiene el tamaño de una pecera normal, pero posee un doble fondo. Este fondo es curvo simulando una orilla en uno de los extremos, es decir, cuenta con una zona profunda que progresivamente avanza hasta un área en la que los peces pueden frezar en una altura de agua mínima. Esto simula su ecosistema natural, donde frezan en los márgenes pedregosos de los arrozales. El doble fondo también permite que los progenitores no canibalicen los huevos tras la puesta. Dichas parideras cuentan con una pieza que separa la pecera en dos para colocar los machos a un lado y las hembras en otro. El día de la puesta a primera hora, nada más encenderse las luces, se retira el separador y se juntan machos con hembras. Posteriormente, se devuelven los progenitores a su pecera correspondiente y se filtra el agua con los huevos de sobre un colador milimétrico. Este colador será luego bañado en agua de ósmosis reversa para depositar los huevos en una placa Petri donde se podrán entonces limpiar de posibles restos fecales con una pipeta Pasteur.

2.2.1.1. Cruces, procedimiento experimental y almacenamiento de las muestras

Los peces adultos mutantes heterocigotos para *chd7*-ENU y *chd7*-CRISPR se cruzaron entre ellos, o un macho o hembra mutante heterocigota con un individuo WT del sexo contrario. Para el estudio de la contribución materna de pez cebra *chd7*, se realizaron diferentes tipos de cruzamientos *outcross* maternos y paternos con líneas WT y mutantes *knockin*, además de cruzamientos ***incross***.

Los cruzamientos *outcross* consisten en el cruzamiento de un mutante macho (paterno) o hembra (materno) con un individuo de genotipo WT. Los mutantes *knockin* empleados son la línea MPEG y la línea CMR-*sox9b* que podrían considerarse de genotipo WT. En estos cruzamientos se obtiene: 50 % de individuos con genotipo WT y 50 % con genotipo mutante. heterocigoto. Sin embargo la proporción de mutantes maternos y cigóticos puede ser variable.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

En los cruzamientos *incross* que consisten en el cruzamiento entre mutantes machos y hembras para *chd7*, la proporción obtenida sería de: 25 % WT, 25 % mutantes homocigotos y 50 % mutantes heterocigotos. También se realizaron cruzamientos *incross* de las líneas WT y *knockin* para la inyección de morfolinos.

La proporción en este caso de mutantes maternos, cigóticos y materno-cigóticos en estos cruzamientos puede ser más variable y dependiente de la contribución del padre y/o de la madre. Tras revisar los huevos fecundados y viables en una lupa, se individualizan en placas de 24 pocillos y se identificaron con un número para después extraer el DNA y examinar su genotipo.

2.2.2. Cría y Mantenimiento de las Líneas de *Killifish*

Los *killifish* son peces de agua dulce procedentes del sureste de África, los cuales tienen una vida muy corta (entre 3 y 5 meses) y un modo de cría similar al del pez cebra. Las condiciones para su cría en cautividad consiste en su desarrollo a 28 ºC en una placa p100 dentro de una incubadora, hasta el momento de la eclosión. Para favorecer la eclosión, se baja la temperatura a 20 ºC, y tras la eclosión, los embriones ya móviles son llevados al animalario, donde se mantienen fuera del sistema en una pecera con medio litro de agua del sistema y no más de 10 embriones por pecera.

Durante una semana se mantiene un flujo de oxígeno constante para favorecer que los embriones inflen la vejiga natatoria. A la semana después de la eclosión se les añade otro medio litro de agua y se mantienen fuera del sistema. Dos semanas después de la eclosión ya pueden ser introducidos dentro del sistema con el flujo de agua y las condiciones ya mencionadas. Cuando los individuos empiezan a mostrar rasgos de diferenciación sexual, se separan los machos, ya que pueden ser bastante agresivos, **y no más de 3 hembras por macho**.

La alimentación del *killifish* consiste únicamente de alimento vivo. Cuando es un embrión se le proporciona diariamente 2 o 3 dosis de nauplios de artemia. Cuando ya empieza la etapa juvenil, el alimento se le puede cambiar por gusano rojo verdevas o artemia adulta.

2.2.2.1. Cruces, procedimiento experimental y almacenamiento de las muestras

Para la reproducción se junta un macho con entre una y tres hembras, en una pecera con un cuenco lleno de arena de grano fino. Los huevos son puestos sobre la arena y enterrados tras la fecundación. Para obtener los huevos recogemos el cuenco y filtramos la arena con un colador. Los huevos son puestos en placas p100 con agua de osmosis y E3 y llevados a la incubadora a 28 ºC

Algunos de los embriones fueron donados en algún caso por el grupo de Juan Tena y Silvia Naranjo, del grupo Epigenomics un Disease and Aging del CABD, gracias a la colaboración de la Investigadora Marta Moreno. Otros fueron comprados a la empresa MicroBioTests (**https://www.microbiotests.com/nothobranchius-furzeri/**). Esta empresa ofrece huevos sin eclosionar que han sido desinfectados con lejía y han sido mantenidos fuera del sistema varias semanas después de la eclosión.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

3. ANÁLISIS GENOTÍPICO DE EMBRIONES Y ADULTOS

El análisis genotípico de los embriones y adultos se realizó mediante diferentes técnicas dependiendo del número de muestras y la necesidad de obtener resultados rápidos o precisos.

Independientemente del método posteriormente utilizado para conocer el genotipo de adultos y embriones, en los primeros pasos, se extrajo el DNA a partir de las aletas de adultos o las colas de los embriones, y posteriormente se realizó una PCR del fragmento del gen *chd7* que contiene la región en la que se produjeron las mutaciones (Arana, 2016).

3.1. Extracción del DNA

La extracción del DNA se realizó por ebullición de las colas con 100 µl de Chelex® 100 al 10 % durante 15 min a 100 ºC. A continuación se añadieron 3,1 µl de Proteinasa K (PK) a 20 mg/ml y se incubó durante 1 hora a 56 ºC y 15 min a 100 ºC para completar la lisis.

3.2. PCR del Gen *chd7*

Se utilizaron las herramientas moleculares de PCR de la marca Applied Biosystems. Para ello se mezclaron: 1 µl del DNA extraido, 1,5 µl de tampón 10X, 1,05 µl de Mg2+ 25 mM, 0,75 µl de desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTPs) 25 mM, 2,26 µl de los cebadores (1,13 µl del Forward y 1,13 µl del Reverse) a 10 µM, 0,1 µl de Taq Polimerasa 5 U/µl y se completó con agua Milli-Q® hasta los 15 µl.

El programa de PCR que se utilizó cuenta con una fase de desnaturalización de 10 min a 95 ºC, una fase de amplificación que consta de 45 s a 94 ºC para desnaturalizar el DNA, 50 s a 59 ºC para favorecer el anillamiento de los cebadores al DNA, 50 s a 72 ºC para la elongación que se repite durante 35 ciclos, una fase de 10 min a 72 ºC para terminar la elongación de todos los productos que estuvieran incompletos y una fase final de 4 ºC para enfriar y conservar la reacción.

3.3. Comprobación de la Amplificación por Electroforesis en Gel de Agarosa

Con el objetivo de comprobar la amplificación del DNA, se realizó una electroforesis en gel de agarosa (iNtRON Biotechnology) al 1 % en TAE (Tris-Acetato-EDTA) 0,5X y *SYBR® Safe DNA Gel Stain* 10000X (Invitrogen) al 0,5 para visualizar los fragmentos en el transiluminador UVA. Se utilizó el marcador Hae III, como *ladder* o marcador de peso molecular, para garantizar que el tamaño del fragmento amplificado es el correcto.

Para cargar las muestras en el gel se mezclaron 6 µl de muestra con 1 µl de tampón de carga (azul de bromofenol 10 X), y para el *ladder* 1 µl con 5 µl de agua Milli-Q® y 1 µl de tampón de carga y se corren en el gel a 70 V inicialmente para permitir la salida de las muestras, y posteriormente se subió a 120 V para la migración.

3.4. Análisis del Tamaño de los Fragmentos Amplificados

Como consecuencia del tipo de mutación introducida, la diferencia entre los fragmentos mutante y WT, no resultó ser suficiente como para poder distinguirlos por electroforesis en gel de agarosa. Para ello se utilizaron técnicas más precisas como la electroforesis capilar, o técnicas moleculares que permiten la distinción de genotipos como la formación de heterodúplex.

USC DE COMPOSTELA

3.4.1. Electroforesis Capilar en Secuenciador ABI 3730

Cuando el número de muestras era muy grande se realizó un análisis del tamaño de los fragmentos amplificados de *chd7* con el secuenciador ABI *Prism* 3730 *GeneticAnalyzer*. Si las mutaciones son inserciones y/o deleciones de la secuencia WT pueden diferenciarse por su tamaño usando como referencia el tamaño de la secuencia WT depositada en las bases de datos como el NCBI (fhttps://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/) o Ensembl (Cunningham *et al.*, 2022). Para el reconocimiento y diferenciación de las secuencias, los fragmentos amplificados se marcaron con 6-Carboxifluoresceína (6-FAM) un colorante fluorescente con una longitud de onda de absorción de 495 nm y una longitud de onda de emisión de 517 nm, que se une al extremo 5' de uno de los cebadores y de esta forma se añade el marcaje a una de las cadenas del amplicón durante la PCR.

Al producto de PCR amplificado con este primer marcaje se le añade formamida y el *GeneScan* 500 LIZ dye (Applied Biosystems), un estándar de tamaño que contiene 16 fragmentos monocatenarios de entre 30 y 500 pb marcados con el fluoróforo LIZ con emisión a 655 nm. Las muestras se desnaturalizan 3 min a 97 ºC en el termociclador, y luego se introducen en el secuenciador ABI *Prism* 3730 *GeneticAnalyzer*. Las muestras se absorben por unos capilares y se someten a alto voltaje, haciéndolas pasar a través de un polímero (POP-7™ de ThermoFisher) que hace que las moléculas se separen en función de su tamaño. Un láser excita los diferentes marcajes, y se recibe fluorescencia de distintas longitudes de onda. De esta forma se compara la posición de nuestra muestra y la del estándar de tamaño y finalmente se analizan los resultados en el programa GeneMapper.

Esta técnica permite diferenciar individuos homocigotos, tanto mutantes como WT, así como individuos heterocigotos.

3.4.2. Detección de Heterodúplex por Electroforesis en Gel de Acrilamida

En ocasiones el número de muestras disponible no fue lo suficientemente grande como para realizar una electroforesis capilar en ABI 3730, pues este que requiere de 96 muestras para que su uso sea rentable. De esta forma y por sugerencia del Dr. Miguel González Blanco del Grupo de Reparación del DNA e Integridad Genómica en el CiMUS de Santiago de Compostela, se comenzó a determinar la presencia de mutaciones a través de la detección de heterodúplex mediante electroforesis en gel de acrilamida, una estrategia mucho más rápida y barata, pero menos precisa en cuanto al tipo de mutación, pues permite detectar la presencia o ausencia de mutaciones y el genotipo de los embriones (homocigotos y heterocigotos), pero con cierta limitaciones.

Esta técnica permite diferenciar las distintas mutaciones dentro de un pool de amplicones para un mismo fragmento. Es decir que nos sirve detectar variantes distintas del mismo gen en un mismo individuo, lo cual es óptimo para encontrar mosaicos en la F0 y mutantes heterocigotos (con un alelo mutante y otro WT), sin conocer el tipo de mutación.

Los geles de acrilamida se prepararon con acrilamida/bisacrilamida 29:1 30 % (Bio-Rad), Tris-Borato-EDTA 5X (TBE, Invitrogen), agua destilada, persulfato de amonio 10 % (Bio-Rad) 10 % y tetrametiletilendiamina (TEMED, Bio-Rad). Para cargar las muestras se añadió 1 µl de tampón de carga y 8 µl de muestra y los geles se corrieron en cubetas de electroforesis verticales *Mini-PROTEAN Tetra Vertical Electrophoresis Cell* de Bio-Rad con TBE ak 1X a

USC UNIVERSIDADE DE COMPOSTELA

140 V. Los geles se tiñeron durante 20 min con *SYBR® Safe DNA Gel Stain* 10000X diluido 1:25 en agua destilada, en agitación y oscuridad.

Como se mencionó con anterioridad, esta técnica permite detectar individuos heterocigotos o mosaico, sin embargo, la mayor limitación es que no permite distinguir entre homocigotos en los que la diferencia de tamaño entre los alelos no es muy grande. Por ello recurrimos a otras técnicas moleculares que nos permitan su discriminación.

3.4.3. Detección de Heterodúplex en Homocigotos Problema

Mezclando DNA de los individuos homocigotos mutantes con DNA de individuos WT y realizando una PCR, la amplificación resultante sería igual que la de un individuo heterocigoto, como consecuencia de la mezcla de alelos.

Así, para los individuos en los que no se pudo determinar mediante formación de heterodúplex por electroforesis en gel de acrilamida si se trataban de homocigotos mutantes o WT, se comprobó su genotipo mediante la realización de una PCR basada en la mezcla el DNA problema con un DNA WT conocido, y realizando de nuevo la electroforesis en gel de acrilamida.

Cómo podemos observar en la Figura 16 (apartado de Resultados), los individuos WT no forman heterodúplex, mientras que los individuos mutantes formarían un heterodúplex (fragmento WT y fragmento mutante) permitiendo así su discriminación.

Esta técnica aparece descrita en la tesis de mi compañera Alba Pensado (Pensado, 2022)

3.5. Secuenciación Sanger

La secuenciación Sanger es un método que permite conocer la secuencia de bases exacta de un fragmento de tamaño concreto a partir de un *pool* de amplicones con el mismo tamaño. Sin embargo se requieren secuencias relativamente puras, es decir que no haya prácticamente variaciones entre ellas, para que la lectura sea correcta y no se superpongan secuencias distintas. La imposibilidad de utilizar esta técnica en muestras de individuos heterocigotos o mosaicos de la F0 inyectados, debido a la superposición de alelos mutante y WT, nos obliga a recurrir a la clonación bacteriana para separar estos fragmentos en bacterias. Estas colonias formarán distintas colonias con un único fragmento que sí permitirá realizar su secuenciación correctamente.

3.5.1. Clonación Bacteriana

La clonación genética consiste en introducir un fragmento o inserto dentro de un vector, y lograr su multiplicación dentro de organismos receptores. En el caso de la clonación bacteriana, el fundamento general, consiste en introducir un único vector en el que se ha ligado el fragmento de interés en el interior de bacterias, por transformación bacteriana. Esas bacterias formarán colonias aisladas, con ese único vector, por lo que de esta forma se produce la amplificación del fragmento de interés insertado. De esta forma, de un *pool* de amplicones distintos, se aísla cada uno en poblaciones bacterianas distintas, pudiendo así separarlos y posteriormente diferenciarlos. Existen muchos tipos de clonación. En nuestro caso recurrimos a la clonación de tipo TA. Este método aprovecha que la Taq polimerasa produce extremos protuberantes de adenina en el extremo 3´ del amplicón durante la PCR,

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

mientras que el vector línearizado posee extremos protuberantes de timina, pudiendo producirse así la ligación de extremos por complementariedad de bases.

3.5.1.1 Reacción de ligación

El producto de PCR se liga al vector pCR®2.1 línearizado de 3900 pb y que tiene extremos protuberantes de timina. Se calculó la cantidad (ng) de producto de PCR necesario para mantener una relación apropiada entre el inserto y vector (Ecuación 1) a partir del número de bases del inserto, el número pares de bases del vector y la cantidad de vector (ng).

Para las reacciones de ligación se siguieron las recomendaciones del fabricante del vector pCR®2.1 a 25 ng/µl, el tampón de reacción de T4 DNA ligasa 10X (NEB), T4 DNA ligasa 400.000 U/ml (NEB), agua libre de nucleasas y el inserto. Se incluyó un control negativo de la reacción, en el que se añadió agua en lugar del inserto y un control positivo, en el que se utilizó como inserto un DNA control proporcionado por el kit *The Original* TA *Cloning* (Invitrogen). Las reacciones se incubaron a 10 min a temperatura ambiente (TA) y tras ello, 10 min a 65 ºC para inactivar la ligasa. Las muestras se conservaron a -20 ºC hasta su uso.

Ecuación 1. Cálculo de la cantidad de inserto necesario

ng inserto=3* [((X pb inserto)*(50 ng vector))/(3900 pb vector)]

3.5.1.2. Transformación bacteriana

Para la transformación se utilizaron bacterias competentes comerciales (*Escherichia coli* NEB®5-α competentes de alta eficiencia) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se hizo una mezcla de estas células bacterianas competentes con el producto de ligación y se incubó la mezcla en hielo durante 30 min, y posteriormente un choque térmico de 30 segundos a 42 ºC. Las muestras se pasaron a hielo durante 5 min y a continuación se añadió medio líquido de crecimiento SOC (NEB) y se mantuvieron 1 hora 37 ºC con agitación constante para estimular la multiplicación bacteriana. Las muestras se centrifugaron 3 min a 3.000 rpm y se retiró el sobrenadante. Las bacterias se sembraron en placas de medio LB agar con ampicilina 100 µg/ml, X-Gal a 80 µg/ml e IPTG a 0,3 mM y se incubaron a 37 ºC durante toda la noche (ON, del inglés *overnight*).

El vector contiene un gen de resistencia a la ampicilina, y en el lugar en el cual se introduce el inserto se interrumpe el gen lacZ encargado de degradar la galactosa y produce una coloración azul en el medio. De esta forma, las bacterias transformadas serán resistentes a ampicilina, y crecerán en el medio. Las que hayan introducido vectores con el inserto presentaran coloración blanca por la disrupción del gen lacZ, mientras que aquellas que no introdujesen vectores sin el inserto presentarán un color azulado.

3.5.1.3. PCR de colonias y electroforesis en gel de agarosa

Las colonias de coloración blanca se recogieron de la placa con ayuda de una punta de micropipeta y se diluyeron en 10 µl de agua Milli-Q®. De estas diluciones se utilizó 1 µl para la reacción de PCR, que se estableció.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

3.5.2. Secuenciación

Para realizar la reacción de secuenciación por el método Sanger se emplean deoxinucleótidos y dideoxinucleótidos, nucleótidos de DNA que carecen del grupo hidroxilo del carbono 3'. Al no tener el extremo 3'-OH cada vez que uno de estos nucleótidos se une a la cadena de DNA en crecimiento, esta cadena no puede continuar elongándose, al no poder producirse el enlace fosfato con el siguiente nucleótido.

3.5.2.1. Purificación de los productos de PCR

Los productos de PCR se sometieron a una purificación enzimática con la exonucleasa I y la fosfatasa alcalina de gamba (SAP, del inglés *Shrimp Alkaline Phosphatase*). Para ello, 10 µl de los productos de amplificación se trataron con 0,03 µl de exonucleasa I a 20 U/µl (ThermoFisher), 0,3 µl de SAP a 1 U/µl (Sigma) y 1,67 µl de agua Milli-Q®, y se incubaron a 60 ºC durante 1 hora y a 85 ºC durante 15 min.

3.5.2.2 Reacción de secuenciación

Para la reacción de secuenciación de los productos de PCR purificados se utilizó el kit *BigDye Terminator* v3.1 *Cycle Sequencing* (Applied Biosystems) y placas de 96 pocillos de la marca 4titude, recomendadas para este protocolo. Se siguieron las instrucciones del fabricante del kit, y se incubaron las muestras durante 1 minuto a 96 ºC y se continuó con 25 ciclos: 10 segundos de desnaturalización a 96 ºC, 5 segundos de hibridación de los cebadores a 50 ºC y 4 min de elongación a 60 ºC.

3.5.2.3. Purificación de la reacción de secuenciación

Las reacciones de secuenciación se purificaron mediante lavados con agua Milli-Q®, EDTA 8 mM y EtOH absoluto y se incubaron durante 15 min a TA y oscuridad. Después se centrifugaron 30 segundos a 4.000 rpm, se descartó el sobrenadante y se centrifugaron 1 minuto a 1.300 rpm. A continuación, se añadieron 60 µl de EtOH al 70 %, se centrifugó 15 min a 1.300 rpm, se descartó de nuevo el sobrenadante y se centrifugó de nuevo 1 minuto a 1.300 rpm.

3.5.2.4. Secuenciación

Para realizar la secuenciación se añaden 10 µl de formamida (Applied Biosystems) a cada una de las muestras y se introducen en el secuenciador de 96 capilares ABI Prism 3730 GeneticAnalyzer de Applied Biosystems. Los datos de las secuencias obtenidas se analizan mediante el software online benchling (https://benchling.com/, [Biology Software], 2022).

4. *KNOCKDOWN* DEL GEN *CHD7* MEDIANTE MICROINYECCIÓN DE MORFOLINOS

Los morfolinos se compran en viales del gen de interés individualizados para el experimento.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

4.1. Preparación del *Stock* de Morfolino

El *stock* se hidrató a una concentración de 300 nmol, y se hicieron alícuotas a una concentración de 0,2 mM con agua destilada. Antes de la inyección, los morfolinos se templaron en un baño a 60 ºC y se añadió rojo fenol para facilitar la inyección.

4.2. Inyección

Para la inyección se empleó un microinyector neumático PC-10 de Narishige, agujas de inyección y una lupa binocular Leica de 4,5 aumentos. La inyección debe realizarse en huevos de 0 hpf observando una única célula en el huevo, ya que el objetivo es que el morfolino actúe en todas las células. Se inyectaron 1 nL y 5 nL aproximadamente.

Se emplearon dos tipos de morfolinos para el gen *chd7*:

— *Splicing blocking*: *chd7*-MOsb

— *Translation blocking*: *chd7*-MOtb

Como control se usó un morfoliono para *p53* en coinyección con *chd7* para controlar posibles efectos *off-target*. Para todos los morfolinos se hicieron controles de dosis para evaluar la concentración tóxica, y fueron inyectados a una dosis no letal alta y baja para los experimentos.

Tabla 3. Cebadores para el estudio de la expresión de los genes relacionados con el desarrollo embrionario-1

ID	Símbolo	Secuencia	Tipo
ZDB-MRPHLNO-131211-1	**chd7-MOsb**	5' - ACCTACAATGAAGGAAATAGGCCGT - 3'	Splice-blocking MO.
ZDB-MRPHLNO-111012-1	***chd7*-MOtb**	5' - TGCAGCCAAGCTTAGAAGCAGGAC - 3'	Translation-blocking MO.
ZDB-MRPHLNO-050107-3	***p53*-MO**	5' - AGAATTGATTTTGCCGACCTCCTCT - 3'	Splice-blocking MO.

chd7-MOsb — (Balow et al., 2013; Asad et al., 2016)
chd7-MOtb — (Patten et al., 2012; Liu *et al*., 2018)

5. CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE EMBRIONES Y ADULTOS

Para la adquisición de imágenes de los embriones se utilizaron varios microscopios distintos. Un microscopio AZ100 Multizoom de Nikon en la Facultad de Veterinaria (Lugo) de la Universidad de Santiago de Compostela, y con un Leica en el IDIS (Instituto de Investigación Sanitaria de Santiago de Compostela). Las imágenes de fluorescencia fueron tomadas con un microscopio Leica en el I3S de Porto. Las medidas para la caracterización fenotípica se realizaron sin que el observador conociera los genotipos de los individuos en todos los caracteres seleccionados.

5.1. Selección y Análisis de Caracteres Morfológicos

Los caracteres se seleccionaron con base en la literatura para poder hacer una descripción y comparación fenotípica conforme a lo ya descrito previamente. Se seleccionaron 2 caracteres cualitativos: presencia de curvatura en el eje longitudinal del cuerpo, y presencia de microcefalia. Estos caracteres son muy subjetivos y difíciles de cuantificar, ya que dependen de muchas cuestiones como el estado del desarrollo, la posición del pez en el momento de

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO

fotografiar, el criterio del investigador…, por lo que se evaluaron de forma binaria como presencia/ausencia del carácter (0 = ausencia; 1 = presencia). Se seleccionaron también 4 caracteres cuantitativos en los que los errores al por la posición del embrión son menores y pueden ser más indicativos del retraso en el desarrollo: altura del ojo, distancia entre otolitos y tamaño del otolito anterior y posterior. Estos caracteres cuantitativos se relativizaron también en función del tamaño del embrión. Los caracteres se midieron con el programa de análisis fotográfico para imágenes científicas Fiji de ImageJ.

5.2. Control de Calidad y Análisis de Datos

Tanto el control de calidad como la manipulación de los datos se realizaron con el programa de análisis estadístico R studio. Los valores cuantitativos se transformaron en cualitativos, como caracteres binarios de presencia ausencia del carácter (0=ausencia; 1=presencia), estableciendo como presencia de cada carácter un valor a partir del cual el número de mutantes con presencia del carácter fuera mayor que el de WT. Se sumaron los valores de los caracteres cualitativos con el fin de obtener el número de caracteres que presentaba cada individuo. Determinamos como fenotipo CHARGE si el embrión presentaba 3 o más de los 5 caracteres.

5.3. Tinción Azul Alcián

Los embriones se sacrificaron a los 4 dpf, se fijaron ON en PFA (Parformaldehido) 4 % y se lavaron tres veces durante 2 min en PBS 1X, y posteriormente se incubaron ON en una solución de azul alcián al 0,1 mg/ml (Sigma) y una mezcla de etanol (EtOH) y ácido acético glacial (Panreac) en proporción 8:2, filtrada con un filtro para jeringuillas de 0,22 µm (Sigma). Tras la incubación las muestras se trataron con hidróxido de potasio (KOH, Panreac) al 1 % y peróxido de hidrógeno (H2O2, Sigma) al 0,5 % durante 2 horas. A continuación se lavaron durante 5 min en PBS 1X y se incluyeron en glicerol a través de una serie ascendente de KOH 0,5 % y glicerol ≥ 99 % (Sigma) (9:1, 7:3, 5:5, 3:7, 1:9).

5.4. Tinción Rojo Alizarina

Los adultos de 2 años de edad, se sacrificaron en agua helada durante 1 hora y luego se fijaron en formalina al 5 %, Triton X-100 al 5 %, y KOH al 1 % durante 24-48 h a TA. Al día siguiente se incubaron en la solución de tinción de rojo alizarina al 0,05 % 20 % etilenglicol, 5 % Triton X-100, 1 % KOH. Finalmente,las muestras se lavaron minuciosamente en una solución de aclarado precalentada que contenía Tween 20 al 20 % y KOH al 1 % a TA ON y en agitación. A continuación se lavaron durante 5 min en PBS 1X y se incluyeron en glicerol a través de una serie ascendente de KOH 0,5 y glicerol ≥ 99 % (Sigma) (9:1,7:3, 5:5, 3:7, 1:9).

6. ANÁLISIS HISTOLÓGICO DE LA SENESCENCIA

Para comprobar la actividad SA-β-Gal como indicador tanto de la senescencia embrionaria durante el desarrollo embrionario, como de la senescencia celular durante la reparación de tejidos en los adultos utilizamos la tinción SA-β-Gal.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

6.1. Tinción SA-b-Gal

La tinción se realizó inmediatamente tras el sacrificio de los embriones. Los embriones de entre 4 y 144 dpf fueron cortados a la mitad para analizar su genotipo a partir de las colas (punto 4.5) y se lavaron 2 veces con PBS 10X y se fijaron en formaldehído al 2 % y Glutaraldehído al 0,2 % disuelto en PBS. Tras una incubación de 30 min a TA y en agitación, se retiró la solución de fijación y se lavaron 3 veces en PBS 10X. Las muestras se incubaron ON en la solución de tinción SA-β-Gal que contiene: buffer ácido cítrico/fosfato pH=6 a 40 mM, NaCl 150 mM, ferrocianuro de potasio (K4[Fe(CN)6]) a 5 Mm, ferricianuro de potasio (K3[Fe(CN)6]) a 5 mM, MgCl a 2 mM y 1 mg/ml de 5-bromo-4-cloro-3-indolil (X-gal) en un agitador, y al día siguiente, se lavaron 3 veces con agua destilada. Por último se deshidrató el tejido con EtOH al 50 % durante 30 min, y a continuación EtOH al 70 %. El tejido se conservó a 4 ºC en EtOH 70 % hasta su inclusión en parafina.

6.2. Fijación, Inclusión en Parafina

Se fijaron las muestras en formalina, y se deshidrataron con EtOH e isopropanol. El parafinado, se realizó con una mezcla del 50 % isopropanol y 50 % parafina a 65 ºC en agitación, y a continuación parafina a 65 ºC.

6.3. Cortes Histológicos y Contratinción

Los cortes histológicos de los embriones para el estudio de la senescencia se realizaron en la unidad de Anatomía Patológica del Complejo Hospitalario Universitario de Santiago de Compostela (CHUS). Se cortaron secciones de la región anterior del cuerpo de 60 µm con un microtomo Leica RM2255.

Los cortes histológicos de los adultos se realizaron en el departamento de Anatomía de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Santiago de Compostela (USC, Campus Terra) gracias al profesor Pablo Sánchez Quintero. Se realizaron cortes longitudinales del plano sagital del eje anteroposterio de embriones fijados en liquido de Bouin e incluidos en parafina**,** en secciones de 7 µm con un microtomo Leica RM2255.

Finalmente, los cortes histológicos se contratiñeron con rojo nuclear.

6.4. Fotografía y Análisis de Senescencia

Los cortes histológicos se fotografiaron con un microscopio AXIO Vert.A1 de Zeiss, y el análisis de la senescencia se evaluó observando la presencia o ausencia de células senescentes en los distintos tejidos y órganos embrionarios del pez cebra.

7. DETERMINACIÓN DE LA EXPRESIÓN RELATIVA DEL mRNA

Se midieron los niveles de expresión del mRNA de los genes *cdkn1a* y *cdkn2a*/*b*, dos inhibidores de las kinasas dependientes de ciclina, y a la vez marcadores de la senescencia embrionaria. Además, también se midió la expresión de *chd7* y de varios genes relacionados con el desarrollo embrionario, como se detalla en el siguiente apartado.

La expresión se normalizó utilizando otro gen como normalizador de la carga (*housekeeping*) cuyas expresiones se mantiene constante independiente del estadio embrionario. El gen *housekeeping* elegido como control para el análisis de la transcripción de

USC UNIVERSIDADE DE COMPOSTELA

los genes relacionados con el desarrollo embrionario fue el de la β actina 2 (*actb2*), mientras que para el análisis de los genes relacionados con la senescencia embrionaria fue el de la proteína ribosomal S11 (*rps11*). Los cambios en la expresión de los genes se expresaron como el porcentaje de cambio frente al gen normalizador. Para este análisis empleamos las siguientes técnicas:

7.1. Selección de Genes Implicados en el Desarrollo y Relacionados con *chd7*

Se seleccionaron 7 genes candidatos a mostrar alteraciones en la expresión, por su relación con *chd7* o con determinados procesos biológicos relacionadas con el desarrollo embrionario, afectados durante el síndrome de CHARGE. Se buscó en la base de datos de Ensembl (Cunningham *et al.*, 2022) los ortólogos de *chd7* y de cada uno de estos genes, y se seleccionó aquel que presentara una mayor homología. El momento del desarrollo embrionario en el que se expresan fue comprobado a través del atlas de expresión de pez cebra del EMBL-EBI (White *et* al., 2017; Papatheodorou *et al.*, 2020; https://www.ebi.ac.uk/gxa/home), y se revisó la literatura, en busca de posibles efectos ya descubiertos relacionados con la redundancia genética del pez cebra.

Las secuencia de los *primers* (cebadores), así como para la *actb2*, fueron diseñadas con ayuda del programa *Primer BLAST* (Ye *et al*., 2012, https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/) y se muestran en la tabla 3.

Tabla 3. Cebadores para el estudio de la expresión de los genes relacionados con el desarrollo embrionario

Nombre	Símbolo	Primers (5'—>3')	RefSeq Accession
beta actina	***actb2***	**F**: ACTTCACGCCGACTCAAACT **R**: ATCCTGAGTCAAGCGCCAAA	NM_181601.5
SRY-box transcription factor 2	***sox2***	**F**: CACCAACTCCTCGGGAAACA **R**: GGGGTTCTCCTGTGCCATTT	NM_213118.1
jagged canonical Notch ligand 1b	***jag1b***	**F**: GCTTCGGGTGCAACAAGTTC **R**: CAGATCGCTGTGTTGCAGTC	NM_131863.2
autosomal dominant nonsyndromic deafness 5	***dfna5***	**F**: CATTTGTGCTGACGGTTGGG **R**: ACACTGGCTATCACGGGAGT	NM_001001947.1
MYC proto-oncogene, bHLH transcription factor a	***cmyc***	**F**: TATGCTGCAAGTGACCGGAG **R**:TCACCGGCATTTTGACACTTG	NM_131412.1
MYCN proto-oncogene, bHLH transcription factor	***nmyc***	**F**: GAGGATGATGAGGAAGATGATGAAG **R**: CCTGCCTGAGAGTTGGAGAC	NM_212614.2
HRas proto-oncogene, GTPase a	***hrasa***	**F**: AGCCAAAACCAGGCAAGGTG **R**: TCACGACACAACACATCGGC	NM_001017623.1
HRas proto-oncogene, GTPase b	***hrasb***	**F**: CACGACAGGGAGTGGAAGAT **R**: CGACACAGCGGCAGTTCATA	NM_001020629.1
tumor protein p53	***p53***	**F**: GGGCAATCAGCGAGCAA **R**: ACTGACCTTCTTGAGTCTCCA	NM_131327.2

7.2. Selección de los Genes Marcadores de Senescencia y *chd7*.

En el caso de los genes relacionados con la senescencia, se analizó la expresión de los dos marcadores principales conocidos en pez cebra, los inhibidores del ciclo celular *cdkn2a*/*b* (p15) y *cdkn1a* (p21). Además, se evaluó la expresión de *chd7* para observar si existían cambios o no en la expresión de este gen en los mutantes para *chd7.*

Los cebadores para los marcadores de senescencia utilizados se muestran en la Tabla 4:

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Tabla 4. Cebadores para el estudio de la expresión de los genes relacionados con la senescencia embrionaria

Nombre	Símbolo	Primers (5'—>3')	RefSeq Accession
ribosomal protein S11	***rps11***	**F**: ACAGAAATGCCCCTTCACTG **R**: GCCTCTTCTCAAAACGGTTG	NM_213377
chromodomain helicase DNA binding-protein 7	***chd7***	**F**: ACAGAAATGCCCCTTCACTG **R**: GCCTCTTCTCAAAACGGTTG	XM_692864
Cyclin-dependent kinase inhibitor 1A	***cdkn1a***	**F**: AACGCTGCTACGAGACGAAT **R**: CGCAAACAGACCAACATCAC	NM_001128420
Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A/B	***cdkn2a/b***	**F**: CCGCACGGTGTCAATGAATC **R**: ATTTTCCCCCTCTCCAGGTG	XM_002660468

7.3. Extracción de RNA

La extracción del RNA se realizó con el kit RNA *isolation* de Nucleospin® de la casa Macherey Nagel. Para el lisado se realizaron *pools* de 5-15 embriones en tubos de microcentrífuga de 2 ml con cierre de seguridad y base redonda. Luego, se añadieron 600 µL del buffer de lisis RA1 y 6 µL de β-mercaptoetanol (β-ME) y se introdujo en cada tubo una bola de acero inoxidable para posteriormente lisar las muestras en el TissueLyser II de QIAGEN®. El lisado se pasó a través de una columna de filtración con una membrana en la cual se retienen los restos de tejido. Se añadió al filtrado 600 µL de EtOH al 70 % y se homogenizó la mezcla subiendo y bajando 10 veces con la pipeta. La mezcla resultante se filtró a través de una columna con una membrana de Sephadex™ en la que quedan fijados los ácidos nucleicos por adsorción. Se añadió DNasa a la membrana de la columna, y se incubó a TA durante 15 min para digerir el DNA. Variando la adición de solventes como recomienda el kit y mediante centrifugaciones, se eliminó la DNasa y por último se eluyó el RNA en 30 µL de agua libre de RNasas.

7.4. Amplificación de RNA en Tiempo Real, o RT-rtPCR:

Para la reacción de retrotranscripción (RT del inglés Reverse Transcription) se usó el kit *High-Capacity* cDNA *Reverse Transcription* de Applied Biosystemx en el termociclador MultiGeneTM OptiMax de la casa comercial Labnet International, y para la rtPCR (PCR en tiempo real) usamos el Brilliant III SYBR® Master Mix de Agilent Technologies en el equipo de AriaMx Realtime PCR System® de Agilent Technologies.

7.4.1. RT

Para la reacción de retrotranscripción, se siguieron las recomendaciones del fabricante. Por cada 10 µl de RNA extraido de los pools se añaden: 2 µl de RT Buffer 10X, 0,8 µl de 25X dNTPs Mix (100 mM), 2 µl de 10X RT *Random Primers*, 1 µl de MultiScribe Reverse Transcriptase y completamos hasta los 10 µl con agua libre de nucleasas. La RT comienza a 25 ºC durante 10 min, pero la verdadera reacción comienza cuando aumenta la temperatura a 37 ºC durante 120 min. Con el objetivo de inactivar la retrotransciptasa y degradar el RNA, la temperatura aumenta hasta 85 ºC durante 5 min. A continuación, la muestra se enfría a 4 ºC, y está lista para su conservación a -20 ºC hasta su posterior uso en la rtPCR. Esta reacción está ajustada de forma que, la proporción de RNA contenidos en los 10 µl de muestra, se mantenga en forma de **cDNA** (DNA complementario) en los 20 µl de reacción.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

7.4.2. rtPCR

La concentración de cDNA de cada muestra se ajustó añadiendo agua libre de RNAa en función de las concentraciones obtenidas en el Nanodrop® y solo se consideraron útiles las muestras que con ratios de absorbancia 260/280 nm cercanas 2 y 260 nm/230 nm cercanas a 1.8. Para la qPCR, por cada 2 µl de cDNA de cada muestra se añadieron: 2,5 µl de H2O mQ, 0,5 µl (0,25 µl del Forward y 0,25 µl del Reverse) de los cebadores de cada uno de los genes a determinar su expresión, por separado, y 5 µl de Brilliant III SYBR® Master Mix. Para las reacciones usamos un programa de PCR, que consistió en: 1 paso de 3 min a 95 ºC, seguido de 40 ciclos: 30 segundos a 95 ºC, 30 segundos a 60 ºC y 1 minuto a 72 ºC. Al acabar los 40 ciclos un último paso de 1 minuto a 95 ºC, 30 segundos a 55 ºC y otros 30 segundos a 95 ºC.

7.4.3. Cuantificación Relativa

Las amplificaciones fueron realizadas en el equipo de PCR en tiempo real AriaMx Real-Time PCR System®, el cual permite la realización de cuantificaciones relativas. Todos los resultados obtenidos en las distintas muestras fueron comparadas frente al gen normalizador, de forma que la cuantificación fuese relativa respecto al valor del normalizador.

8. HIBRIDACIÓN *IN SITU*

La **hibridación *in situ*** (HIS) se utilizó para ver en qué tejidos se localiza la expresión del gen *sox9b* a las 48 hpf y comprobar alteraciones en los patrones de expresión de este gen en individuos deficientes de *chd7*.

8.1. Síntesis y Purificación de la Ribosonda Antisentido de RNA

Para la síntesis de una sonda que se una específicamente a una región del RNA de nuestro gen de interés, debemos diseñar unos cebadores basándonos en la secuencia de ADNc y añadir la secuencia promotora de la enzima polimerasa T7 al extremo 5' del cebador reverse para su posterior transcripción. En este caso los primers fueron cedidos por el Dr. José Bessa investigador principal del grupo *Vertebrate Development and Regenetarion Lab* (VDR) del *Instituto de Investigación e Innovación en Saúde - Instituto de Bioloxía Molecular e Celular* (I3S) de Porto y la ribosando se sintetizó en su laboratorio.

8.2. Transcripción *in vitro* y Purificación de la Ribosonda antisentido

Para la transcripción de los productos de PCR se hicieron reacciones en las que por cada 1 µg de producto de PCR se añadieron: 10 µl de tampón de transcripción 5X (Promega), 5 µl de DTT 50 mM (Promega), 5 µl de DIG RNA Labelling Mix (Sigma), 1 µl de RNase Out (Invitrogen), 2,5 µl de polimerasa T7 (Promega) y completamos con agua Milli-Q® hasta alcanzar los 50 µl. Las muestras se incubaron 2 horas a 37 ºC tras lo que se añadió 1 µl de DNasa I y se incubaron a 37 ºC durante 30 min. Las sondas transcritas se purificaron con el kit Quick Spin Columns for radiolabeled RNA purification (Roche), según las indicaciones del fabricante.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

8.3. Reacción de HIS

Los embriones se criaron en una solución de agua de ósmosis reversa con feniltiourea 75 µM (PTU, Sigma) para evitar la formación de pigmentos. A las 48 hpf se sacrificaron y se incluyeron en PFA 4 % a 4 ºC ON. Las muestras se lavaron 2 veces durante 5 min en solución PBT 1X (PBS 1X y Tween-20 0,1 % 1:1) y a continuación se deshidrataron en una serie ascendente de metanol disuelto en PBT 1X de 3 min cada paso, al 25 % 50 % y 75 % y se conservaron en MeOH 100 % a -20 º. Al día siguiente se hidrataron con la serie inversa y se trataron con proteinasa K 10 µg/ml en solución PBT 1X durante 5 min. Se lavaron dos veces durante 2 min en PBT 1X, y se fijaron en PFA 4 % durante 20 min. Tras una serie de lavados en PBT 1X y en agitación, las muestras se incubaron durante 3 horas a 70 ºC con el tampón de hibridación HYB+ (formamida 50 %, SSC 5X (Promega), heparina 50 µg/ml (Sigma), yeast tRNA 0,5 mg/ml (Sigma), Tween-20 0,1 % y ácido cítrico 9,2 mM pH 6.0). Luego se cambia el medio y se añade el tampón HYB+ con la sonda disuelta a 1,5 ng/µl y se incubaron ON a 70 ºC. Al día siguiente se realizaron lavados ascendentes de 10 min con la solución HYB- (formamida 65 %, SSC 5X y Tween-20 0,1 %) a 70 ºC al 25 %, 50 % y 75 % en SSC 2X, dos lavados de 30 min en SSC 0,05X, un lavado de 5 min a TA y con agitación de SSC 0,05X y PBT 1X, y dos lavados en PBT 1X. A continuación las muestras se incubaron 1 hora a TA con agitación en tampón de bloqueo (PBT, suero de oveja al 2 % (Sigma) y albúmina de suero bovino a 2 mg/ml (BSA) (Sigma), y después de 2 horas a TA con el anticuerpo anti-digoxigenina de oveja conjugado con fosfatasa alcalina (Sigma) disuelto 1:2000 en tampón de bloqueo. Tras varios lavados de 10 min a TA y con agitación en PBT, las muestras se conservaron a 4 ºC, ON. A la mañana siguiente se realizaron 3 lavados de 10 min con el tampón NTMT (Tris-HCl 100 mM pH 9.5, MgCl2 50 mM, NaCl 50 mM y Tween-20 0,1 %) y se realizó el revelado en oscuridad con la solución BM-Purple (Sigma) hasta conseguir una señal que permita distinguir los tejidos de manera definida. Tras unos lavados en PBT se realizó una última fijación en PFA 4 % a Pb hasta.

9. ANÁLISIS DE MOVILIDAD DE LA LÍNEA CRISPR PARA *CHD7*

Para el análisis de comportamiento se seleccionaron 4 individuos adultos con fenotipo visible de la generación F2, heterocigotos para la mutación *chd7*-CRISPR, y 3 WT. Se analizó el movimiento total durante el tiempo en luz y oscuridad establecido por el protocolo.

Para analizar posibles diferencias en la movilidad general de los embriones del modelo mutante CRISPR, se seleccionaron 48 individuos descendientes de un cruzamiento *incross* de heterocigotos para *chd7*, y 48 individuos WT de 5 dpf y se analizaron en el dispositivo Zebrabox con el software Zebralab de Viewpoint Life Sciences.

Para el seguimiento automático de la actividad de los peces, se introdujeron en la cámara de habituación y se estableció un programa de análisis de 60 min, con tres ciclos intermitentes de luz blanca y oscuridad, cada uno de ellos con una duración de 10 min. Todas las grabaciones se realizaron al mismo tiempo durante el período diurno.

Se registró el movimiento total, luego, cuantificado utilizando el software ZebraLab (Viewpoint, Lyon, Francia) y trazado en unidades “actinteg" (u.a.), que es la suma de todos los cambios de píxeles detectados durante el período experimental. También se analizan la

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

cantidad y el tiempo de duración de los movimientos en estado de agitación, en estado de actividad media y en estado de reposo.

Los datos obtenidos se convirtieron a formato Microsoft Excel y se analizaron mediante con la prueba T de Student en el programa SPSS Statistics. La significación se estableció en $p< 0,05$.

10. REVISIÓN Y ANÁLISIS COMPARATIVO DE DIFERENTES TÉCNICAS DE ANÁLISIS FUNCIONAL Y MODIFICACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA.

Se realizó una revisión de 138 artículos experimentales. Estos artículos comprenden un total de 49 genes, de los que se han analizado 245 mutantes y 147 morfantes, lo que supone en algunos casos para un mismo gen se analizó más de un mutante y/o morfante.

Para el análisis se realizó un control de los datos extraídos, eliminando los genes para los que no existían mutantes con un fenotipo descrito y manteniendo los que sí tenían modelos caracterizados previamente para ambas técnicas. Para la realización del análisis y la generación de los gráficos, se utilizó el programa de análisis estadístico RStudio.

En primer lugar, se determinó la correlación fenotípica que existe entre morfantes y mutantes para un mismo gen. A continuación, se describió cada mutante (técnica de mutagénesis, fenotipo mutante, tipo de mutación, etc.), y para cada morfante se hizo una revisión de los diferentes métodos que siguieron para su generación y confirmación: coinyección de p53, coinyección de mRNA, variación en la concentración de morfolino y análisis de expresión.

Finalmente, se analizaron todos los datos y se realizó una descripción general, para buscar alguna relación entre los datos y la existencia de correlación fenotípica entre un mutante y su morfante para un mismo gen.

11. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Todos los análisis estadísticos de la caracterización fenotípica, de expresión genética y de supervivencia presentados en esta tesis fueron realizados con el programa Prism 6 de GraphPad. Para el estudio de los distintos caracteres fenotípicos se realizó un test de normalidad de Shapiro-Wilk (para $N < 30$), mientras que para analizar los datos de los experimentos de comportamiento se utilizó un test de Kolmogorov-Smirnov (para $N \geq 30$). Los datos que siguieron una distribución normal se analizaron mediante una prueba t de Student con corrección de Welch para la comparación de dos muestras, y un análisis ANOVA de comparación múltiple para más de dos muestras. Los análisis de la expresión relativa de RNA se realizaron mediante el método de delta-delta Ct ($\Delta\Delta$Ct) y el análisis estadístico para determinar la significación se realizó por medio de la prueba t de Student. Solo se consideraron significativos aquellos valores de $p < 0.05$. P**ara el análisis de los caracteres cualitativos se utilizó el método de chi cuadrado**

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

RESULTADOS

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

RESULTADOS

1. COMPARACIÓN ENTRE DIFERENTES TÉCNICAS PARA EL ESTUDIO DE ENFERMEDADES GENÉTICAS HUMANAS EN PEZ CEBRA

1.1. ANÁLISIS COMPARATIVO DE LAS TÉCNICAS DE MODIFICACIÓN GENÉTICA

Las discrepancias entre las técnicas de *knockout* y *knockdown* en el pez cebra, nos llevaron a la realización de este estudio comparativo. Como hemos explicado en material y métodos, para muchos de los genes del estudio tenían más de 1 mutante y/o morfante estudiados, mientras que para otros solo había uno de los dos descrito, por lo que solo se analizaron aquellos genes que presentaban en la literatura al menos un morfante y al menos un mutante para la comparación. En los datos en bruto, sin realizar este filtrado, se puede observar que en los mutantes generados por ENU, igual que en los TALEN, se observó fenotipo en más de un 50 % de las ocasiones (Fig. 13A). La técnica de mutagénesis que más veces produjo mutantes con fenotipo fue la técnica CRISPR, mientras que la que peores resultados mostró fueron los ZFN. Para los mutantes generados por TOL2 y mutantes espontáneos solo se incluyó en el análisis 1 artículo; sin embargo, fueron incluidos en las técnicas de mutagénesis dirigida y aleatoria respectivamente (Fig. 13B) para análisis internas y aumentar la heterogeneidad.

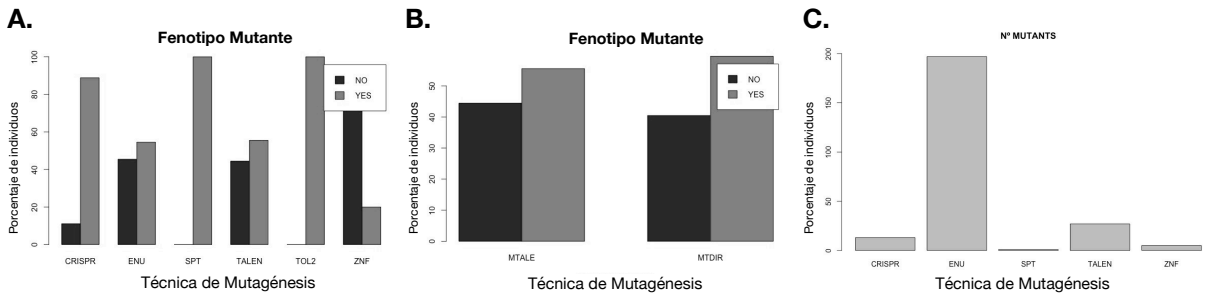


Figura 13. A. Porcentaje de mutantes con y sin fenotipo de cada técnica de mutagénesis dividida (CRISPR, ENU, SPT, TALEN, TOL2, ZFN) **y B. agrupada** (MTALE: mutagénesis aleatoria; MTDIR: mutagénesis dirigida). **C. Número de mutantes para cada técnica de mutagénesis.**

La mayoría de los mutantes estudiados fueron generados por la técnica de mutagénesis aleatoria ENU (Fig. 13C), sin embargo, solo un porcentaje muy pequeño de estos han sido estudiados, o no tenían un morfante descrito para comparar. La técnica con menor representación en el momento del estudio fueron los ZFN seguido del CRISPR. De todas las técnicas de mutagénesis analizadas, los mutantes ENU son los más utilizados en los distintos estudios, seguidos por los mutantes generados por TALEN (Fig. 13C), en el momento del análisis. La proporción de mutantes que recapitulan el fenotipo morfante es igual para las técnicas de mutagénesis aleatoria y mutagénesis dirigida. El número de individuos dentro de

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

algunas técnicas era bajo. Se decidió agrupar estas técnicas en mutagénesis aleatoria (ENU, Spontaneous) y mutagénesis dirigida (CRISPR, TALEN, ZNF, TOL2). De esta forma el número de mutantes caracterizados se igualó, igual que la proporción de presencia y ausencia de fenotipo mutante (Fig. 13B), siendo en ambos casos de entre el 50-60 % el número de mutantes que sí fenocopiaban para ambas técnica.

1.2. La baja correlación fenotípica se debe a la ausencia de fenotipo en los mutantes.

La generación de mutantes que fenocopien o recapitulen el fenotipo morfante, es independiente de la técnica de mutagénesis. Uno de los resultados más llamativos del estudio es que en el 96 % de los casos los genes que presentan algún mutante con fenotipo todos los mutantes lo presentan (Tabla 5), independientemente de la técnica de mutagénesis aleatoria o directa que se use.

Tabla 5. Genes y nº de mutantes encontrados con o sin fenotipo para cada gen

GEN	Fenotipo Mutante		GEN	Fenotipo mutante		GEN	Fenotipo mutante		GEN	Fenotipo mutante	
	NO	YES		NO	YES		NO	YES		NO	YES
flt4	0	5	*egfl7*	0	2	*pdgfrb*	1	1	*hsp90ab1*	1	0
ccbe1	0	2	*srsf5a*	2	0	*bmp7a*	1	2	*glcci1*	1	0
gata2a	0	1	*grhl3*	0	1	*ptenb*	0	1	*hspg2*	1	0
amot	2	0	*ttna*	0	9	*usp33*	1	0	*htra1a*	1	0
amotl-2a	0	2	*dag1*	0	2	*zbtb4*	1	0	*lratb*	2	0
amotl-2b	0	0	*lamc1*	0	4	*tcf7*	0	1	*itga2b*	1	0
elmo1	1	0	*tll1*	0	9	*ift88*	0	1	*pcm1*	1	0
ets1	1	0	*fam38a*	1	0	*wnt1*	0	0	*mfn2*	1	0
etv2	0	1	*linc:birc6*	2	0	*pak4*	2	0	*ptger4a*	2	0
edn1	0	1	*appl1*	1	0	*foxc1a*	0	4	*atp6v1h*	0	1
fmnl3	1	0	*bmper*	1	0	*tmem88a*	0	1	–	–	–
mmp2	1	0	*ccdc78*	1	0	*arrb1*	1	0	–	–	–
nrp1a	2	0	*cep290*	2	0	*col2a1a*	1	0	–	–	–

Tabla 6. Relación entre la correlación fenotípica mutante morfante y la presencia o ausencia de fenotipo en los

	Correlación Fenotípica	
Fenotipo mutante	NO	YES
YES	0	51
NO	38	0

Además, no existen mutantes con fenotipo distinto al del morfante, y en todos los artículos de esta revisión, los morfantes siempre presentan fenotipo (Tabla 6). Por lo tanto, siempre que se observa un mutante con fenotipo, este se correlaciona con el fenotipo morfante para ese mismo gen, parcial o totalmente, sin embargo, cuando en un mutante no se encuentra un fenotipo o presenta un fenotipo WT, el morfante difiere en cuanto

USC DESANTIAGO DE COMPOSTELA

estudio, *pdgfrb*, existía un mutante que presentaba fenotipo, y otro mutante que no. El mutante que presentaba fenotipo era un mutante ENU con una mutación puntual, mientras que el que no lo presentaba era un mutante TALEN con una deleción de 4 bases. Las mutaciones producidas en el DNA por parte de las técnicas de mutagénesis aleatoria y mutagénesis dirigida son efectivamente distintas. Como se puede observar en la Tabla 7, para todos los genes analizados en los mutantes generados por mutagénesis aleatoria, presentaban casi exclusivamente mutaciones puntuales. Mientras tanto, los mutantes generados por mutagénesis dirigida, presentaban mutaciones más complejas (inserciones, pequeñas deleciones, *indels*…), y ninguno presentaba mutaciones puntuales.

Tabla 7. Cantidad de cada tipo de mutación producidas por cada técnica de mutagénesis.

Técnica Mutagénica	Complex	Indel	Insertion	Point Mutation	Small Delection	Translocation
CRISPR	0	1	5	0	7	0
ENU	0	0	1	195	0	1
Spontaneus	0	0	0	1	0	0
TALEN	1	3	0	0	23	0
ZNF	0	0	1	0	4	0
Mutagénesis Aleatoria	–	–	1	196	–	1
Mutagénesis Dirigida	1	4	6	–	34	–

1.3. El uso de los *GUIDELINES* con morfolinos no aumenta la recapitulación fenotípica.

Quisimos también comprobar si la discrepancia fenotípica entre los mutantes y los morfantes podría estar causada por no llevar a cabo las *guidelines* necesarias para el control de los morfolinos y la confusión de fenotipos debido a los efectos *off-target*. De todas ellas escogimos aquellas que consideramos más importantes evaluar, y que llevan más tiempo utilizándose. La mayoría de artículos no cumplen o no documentan haber cumplido con los controles recomendados para el estudio de los morfantes, seleccionados en este estudio (Tabla 8). Sin embargo, no se ha visto que incumplir o no cumplir rigurosamente con los controles, sea la causa de la no recapitulación fenotípica en los mutantes.

Tabla 8. Uso de los guidlines en las investigaciones necesarios para los experimentos con morfolinos

p53		mRNA		Δ Concentration		Expression Assay	
NO	YES	NO	YES	NO	YES	NO	YES
123	24	84	63	92	55	44	103

También hemos observado una tendencia en aumento (datos no representados) en el uso de los controles necesarios. Sin embargo esta tendencia no es significativa, ya que muchos autores siguen sin documentar correctamente el uso o no uso debido a la ya confirmación de su efectividad o no en otros artículos, lo que complica analizar los datos.

1.4. La falta de recapitulación fenotípica es una pérdida de homogeneidad fenotípica de los mutantes con el morfante para un mismo gen.

Todos los artículos de morfantes presentan fenotipo, y cuando se presentaba un fenotipo en el mutante para el mismo gen, este es igual o semejante al fenotipo morfante. Basamos entonces

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

nuestro análisis de la capacidad de fenocopia o recapitulación del fenotipo morfante de un gen, como presencia o ausencia de fenotipo en los mutantes para ese mismo gen. En la Figura 14 observamos que no existen diferencias en cuanto al porcentaje de fenocopia del fenotipo entre las técnicas de mutagénesis dirigida y mutagénesis aleatoria. Sin embargo, individualmente, de todas las técnicas analizadas, la tecnología CRISPR es la que posee mayor porcentaje de individuos que fenocopian al morfante cuando se compara con las otras dos técnicas más empleadas, ENU (Fig. 14C) y TALEN (Fig. 14B). Este resultado se hace más evidente al comparar CRISPR con el resto de técnicas de mutagénesis agrupadas (Fig. 6). Sin embargo, este resultado se debe tomar con precaución teniendo en cuenta la baja cantidad de mutantes CRISPR con la que contábamos en el momento que se realizó el estudio.

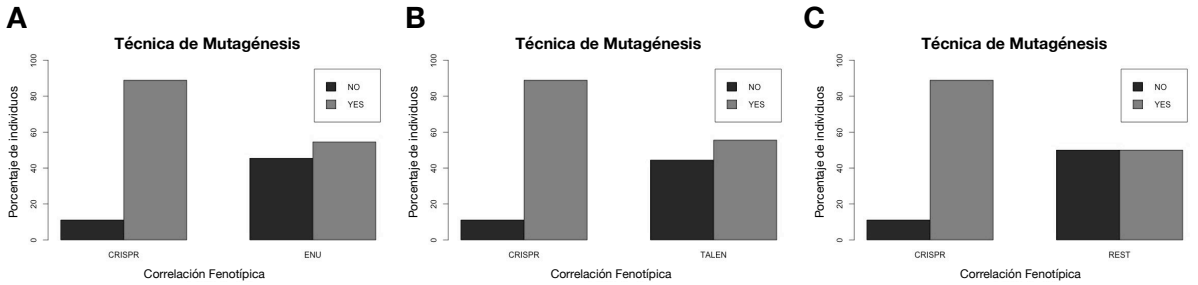


Figura 14. A. Correlación fenotípica entre: CRISPR y ENU; B. CRISPR y TALEN; C. CRISPR y el resto de técnicas de mutagénesis agrupadas (REST).

A pesar de que estos resultados evidencian al sistema CRISPR como el mejor para producir mutaciones que fenocopien los fenotipos morfantes, deberían tomarse con cautela. Es evidente que para el resto de técnicas existe lo que llamaremos a partir de ahora una pérdida de homogeneidad fenotípica del 50 %. La pérdida de homogeneidad fenotípica sería por lo tanto lo contrario al aumento de la discrepancia fenotípica entre mutantes y morfantes. El sistema CRISPR no debería actuar de una manera distinta al resto de técnicas de mutagénesis dirigida. Pero la reciente llegada de los sistemas CRISPR, el seguimiento de las *guidelines* y controles para el uso de los morfolinos por parte de los autores, y el descubrimiento de la GCR podrían explicar el aumento en la homogeneidad fenotípica.

Estos resultados, aunque simples, nos llevaron a decidir la continuación del modelo de *chd7*-CRISPR mutante, y a realizar un estudio un poco más completo de las implicaciones que podrían tener el gen y su déficit. Por lo que, sin descartar los datos expuestos en estudios anteriores (Arana, 2016), comenzamos a retomar la investigación teniendo en cuenta muchos de los factores y cuestiones del pez cebra que podrían estar afectando a la caracterización correcta del modelo.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

2. OPTIMIZACIÓN DEL PROTOCOLO DE CRISPR

Uno de los grandes avances técnicos obtenidos durante el desarrollo de esta tesis fue la optimización del protocolo de CRISPR/Cas9 para la generación de mutantes en pez cebra. Junto a mis compañeros, hemos mejorado algunos de los procedimientos o cambiado por otros que resultan más sencillos o rápidos pero igual de precisos para el fin propuesto. Al modificar y optimizar estas técnicas, hemos logrado una eficacia del 70-80% en la generación de mutantes, y hemos reducido el tiempo en el proceso de generación de sgRNA y detección de mutantes, además de reducir costes.

La primera ventaja de nuestro protocolo en cuanto a tiempo, es la generación de los sgRNA, los cuales, transcribimos *in-vitro* por PCR usando únicamente dos *primers* (Fig. 15). Uno de los *primers*, llamado *primer* universal porque se usa el mismo en todas las reacciones para generar los sgRNA, contiene la secuencia de reconocimiento de la Cas9 y una secuencia complementaria al *primer* diana. El *primer* diana, contiene la secuencia de reconocimiento de la RNA polimerasa T7, seguido de la secuencia exacta a la región diana del gen de interés, y una región complementaria al primer universal. Ambos *primers* hibridan en esta región, y tras la PCR se genera un *DNA* bicatenario que contiene todas las partes de nuestros guías en la dirección y complementariedad deseadas. De esta forma, directamente tras la transcripción se producen los sgRNA completos. En otros protocolos se suele recurrir a la clonación en vectores especiales para luego transformar en bacterias, extraer el plásmido y después transcribir los guías. Con este protocolo podemos tener los sgRNA en 1 día de trabajo, mientras que de la otra forma serían 2 o 3 días. Este mismo sistema también se utilizaba para generar sondas de RNA o fragmentos de mRNA in-vitro

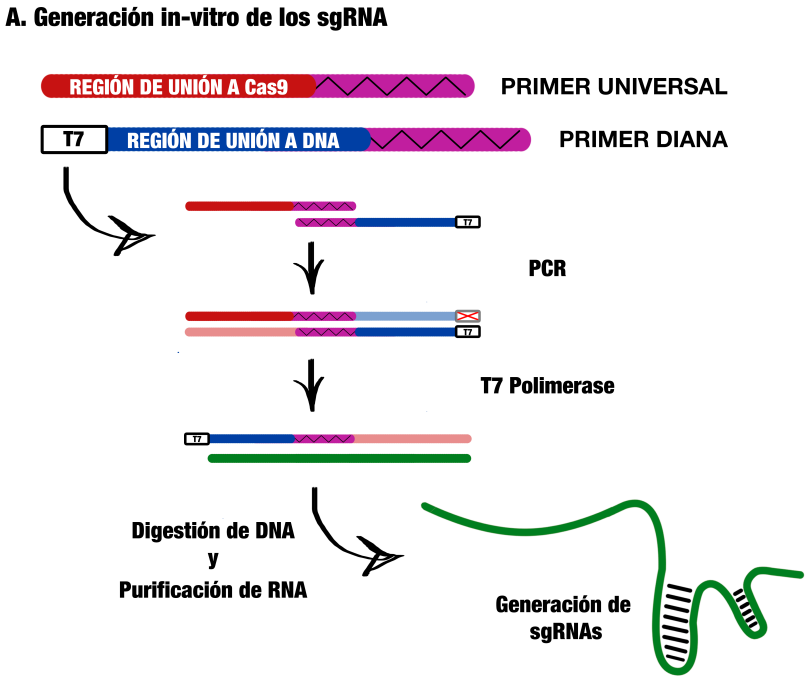


Figura 15. A. Los RNA guías (sgRNA) se generaron mediante la transcripción de un dúplex de DNA que contenía un primer con la región promotora de la T7 polimerasa seguido a la región diana del gen y otro primer que contiene una región complementaría al anterior seguida de la región de reconocimiento de la Cas9.

La Cas9 que utilizamos es una proteína comercial (Invitrogen) muy eficaz en pez cebra. Con respecto a la Cas9-*homemade* de Sevilla usada para la generación del mutante *chd7-CRISPR,* no tiene a penas diferencias en cuanto la eficacia de corte, pero sí que es mucho mayor que inyectando el mRNA de *Cas9* para que se transcriba *in vivo* (comunicación personal). Producir el mRNA es una opción más económica, pero más engorrosa y requiere más tiempo. Aunque no hay datos experimentales de ello, hemos observado que la mortalidad de los embriones se reduce al menos un 20 % gracias al uso de KCl para disminuir el choque osmótico que se produce en el proceso de inyección.

El verdadero ahorro económico y en tiempo lo obtuvimos en la caracterización genotípica (genotipado) de los embriones F0 inyectados, en los F0 adultos y en la F1. Este proceso lo realizamos por detección de heterodúplex en geles de acrilamida (Fig. 16). Un procedimiento mucho más rápido y económico que la clonación bacteriana y secuenciación, pudiendo tener los resultados de más de 60 individuos, en menos de 24 horas desde que comenzamos la extracción del *DNA*.

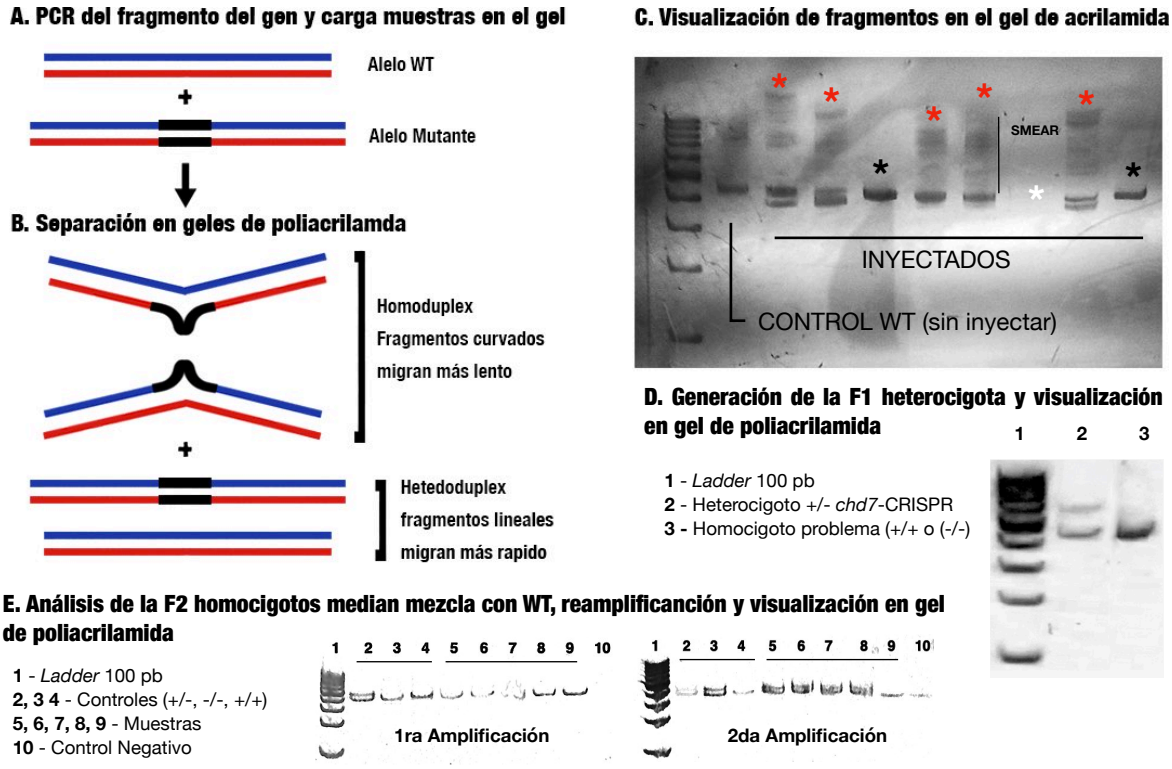


Figura 16. Detección de mutantes heterocigotos y homocigotos por formación de heterodúplex gel de acrilamida. A. Los alelos WT y mutantes de las células heterocigotas se mezclan, por complementariedad de bases, durante la desnaturalización y renaturalización del DNA, en condiciones in vitro como la PCR o la electroforesis en gel de acrilamida, formando así DNA bicentenario heterodúplex. **B.** Al correr el DNA extraído y amplificado por PCR de un individuo heterocigoto se observan homodúplex y heterodúplex del gen amplificado **C.** Estos heterodúplex forman estructuras como bucles en los lugares que contienen la mutación, por lo que migran a posiciones superiores. En los individuos mosaicos de la F0, los heterodúplex y homodúplex que se forman son varios, dando lugar a multitud de fragmentos visibles pero difuminados (SMEAR) en la parte superior del fragmento de interés. Asteriscos rojos: individuos mosaicos; Asteriscos negros: individuos WT; Asterisco blanco: no amplificado. **D**. Cuando la línea se estabiliza en la F1 a una línea heterocigota, únicamente veremos una o dos bandas del heterodúplex, la banda del gen WT y puede que la de la mutación dependiendo de la complejidad de estas. **E.** En la F2 muchas veces los homocigotos no pueden distinguirse de los WT en el gel de acrilamida por presentar un tamaño muy similar y tener una baja capacidad de resolución, por tanto, desarrollamos una técnica que consiste en mezclar las muestras homocigoto con DNA WT y repetir la PCR.

Los heterodúplex son estructuras de *DNA* bicatenario que se forman cuando hibridan dos fragmentos de *DNA* monocatenario no idénticos pero con mucha complementariedad. Tales moléculas tendrán distorsiones estructurales en los pares de bases no coincidente y en las bases no apareadas donde se ha producido una inserción o una deleción en la secuencia de nucleótidos. Estas distorsiones estructurales hacen que el heterodúplex migre más lentamente que un homodúplex durante la electroforesis en gel de acrilamida.

Se ha demostrado que la extensión de este retraso es proporcional al grado de divergencia entre las dos secuencias (Delwart *et al.*, 1995). Se sabe que la presencia de una base no apareada influye en la movilidad de un heterodúplex más que un nucleótido desapareado (Cai *et al*., 1991; Wang et al., 1991).

Lo importante en este paso es saber que la técnica CRISPR/Cas9 ha funcionado en la F0, que los embriones F0 que han llegado a adultos tienen alguna mutación y que la mutación se transmite a la descendencia. Sin embargo, no nos interesa conocer que mutaciones son, porque son las mismas que se van a transmitir a la descendencia.

2.1. Identificación de los mutantes homocigotos

Además de la secuenciación Sanger y el análisis de fragmentos por electroforesis capilar, se desarrolló otra técnica de genotipado para distinguir entre hermanos WT, heterocigotos y homocigotos mutantes *chd7*-CRISPR.

La técnica consta de dos o tres pasos. El primero consiste en la formación de heterodúplex de DNA en gel de acrilamida, lo cual nos permite distinguir heterocigotos de homocigotos por la formación de híbridos de DNA entre el alelo mutante y el WT. Estos híbridos forman estructuras tridimensionales en la molécula y provocan una migración más lenta a través del gel que la de los homodúplex.

Sin embargo, esto no nos permite distinguir entre homocigotos WT y homocigotos mutantes. Tras la confirmación de los heterocigotos, realizamos una segunda PCR de los homocigotos en la que añadimos a cada reacción, DNA de un individuo homocigoto WT. De esta forma, tras una nueva electroforesis en geles de acrilamida, solo formarán heterodúplex aquellos que sean homocigotos mutantes (Fig. 16E).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

3. GENERACIÓN, VALIDACIÓN Y ESTABLECIMIENTO DE LA LÍNEA MUTANTE KNOCKOUT ESTABLE *CHD7-CRISPR*

La generación del mutante de pez cebra para el gen *chd7* se realizó con el fin de validar su fenotipo para utilizarlo como herramienta para el estudio del gen *chd7* y el síndrome de CHARGE en el pez cebra. El gen *chd7* ya había sido estudiado en pez cebra, en trabajos con morfolinos y se había descrito que el *knockdown* transitorio de este gen causaba un fenotipo característico durante el desarrollo (Tabla 2), pero hasta la fecha hay pocos estudios que utilicen mutantes para este gen.

3.1. Establecimiento del Mutante CRISPR para *chd7*

La generación de la línea aparece explicada en estudios anteriores (Arana, 2016), no obstante, resulta conveniente hacer un breve resumen, y usarlo como hilo conductor para dejar claras algunas de las cuestiones que no se pudieron llevar a cabo en el trabajo mencionado. Además, la continuación de este trabajo se debe a los resultados en él expuestos

A partir de la secuencia del gen *chd7* disponible en Ensembl y en el NCBI, se comprobó que no existían genes duplicados del mismo, y los únicos genes parálogos con una homología suficiente como para suponer un problema eran *chd8* y *chd6,* miembros de la familia *chd*.

Decidimos dirigir la acción de la proteína Cas9 al exón 2 de la secuencia genómica diana, ya que es el primer exón codificante, y por recomendación personal de la investigadora Ana Fernández Miñán del Centro Andaluz de Biología del Desarrollo (CABD), para producir cortes dirigidos en este gen, y promover la formación de mutaciones lo más cerca posible del inicio de transcripción, provocando la traducción de proteínas truncadas (Fig. 17A).

Para el establecimiento de las líneas, el primer paso es realizar un *outcross* de los mutantes de la F0, los cuales serían mutantes mosaicos. Es decir, un mutante mosaico se cruza con un WT para así aislar las distintas mutaciones de la línea germinal en los gametos haploides. El porcentaje de mutantes en la descendencia F1 se mantiene para conocer qué individuos de la F1 eran heterocigotos para la mutación en *chd7*.

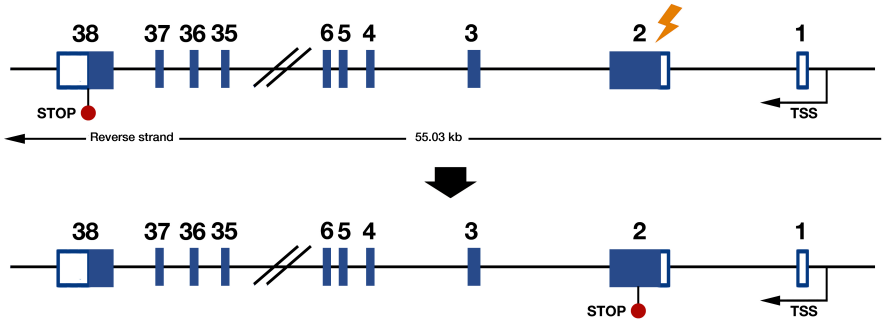
El siguiente paso sería generar una línea homocigota para *chd7*, realizando *incross* de la F1, es decir, cruzando heterocigotos con heterocigotos. Sin embargo, cuando se analizaron los adultos, no se encontró ningún mutante homocigoto y solo se consiguió establecer una colonia con los heterocigotos portadores de una deleción de 5 nucleótidos. Los portadores de esta mutación fueron capaces de poner o fecundar huevos y transmitir la mutación a la descendencia.

Un resultado novedoso es la secuencia de la mutación generada por el sistema CRISPR (Fig. 17 y 18). La mutación presente en esta F1 heterocigota, una deleción de 5 nucleótidos, se comprobó en verdad se trataba de un *indel*, más concretamente una deleción de 6 bases y una inserción de 1 base (*Δ6ins1*) (Fig. 17B). La mutación se sitúa en el primer exón codificante, y en la misma región que las mutaciones encontradas para la F0 y que dirigimos a esa región concreta del genoma con los sgRNA inyectados.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

La traducción *in-silico* de la secuencia nos permitió comprobar que la proteína que se genera no contiene ninguno de los dominios funcionales descritos para *chd7* (Fig. 18A) y que además se genera un PTC prematuro. El análisis de la secuencia demostró que se trataba de una mutación *nonsense frameshift* que trunca la proteína en el glutámico 18 (G18STOP o G18X), lo que se traduciría como una proteína aberrante de tan solo 28 aminoácidos (Fig. 18C y 18D). La secuenciación del genoma de los mutantes nos permitirá conocer multitud de cuestiones sobre si realmente esta variante genética puede ser o no patogénica, y ser la causa de la baja correlación fenotípica y la ausencia de fenotipos.

A. Esquema de la secuencia de *chd7* y mutación *chd7-CRISPR*



B. Secuencia de *chd7 WT* y mutante *chd7-CRISPR*

chd7 wt TTGACTCATAGGATTTGTCTGACCTTGAGGGTAGCCACAGTCCCCTAGGCCCTCCAACTCATC

chd7$^{\Delta 6\ ins1}$ TTGACTCATAGGATTTGTCTGACCTc*****TAGCCACAGTCCCCTAGGCCCTCCAACTCATC

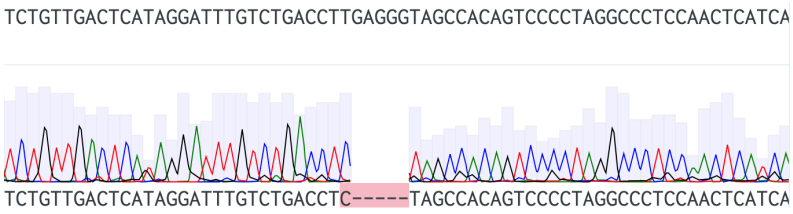


Figura 17. Caracterización y análisis de la mutación *chd7*-CRISPR en la secuencia nucleotídica del gen *chd7* en pez cebra.

Decidimos comparar los resultados con un mutante ENU del ZMP que también producía una proteína truncada con un PTC prematuro y tampoco conserva los dominios funcionales (Fig. 18C) y así observar los diferentes resultados entre las técnicas de mutagénesis aleatoria y dirigida y los modelos *knockout* con morfolinos. Se ha verificado que al cambiar el marco de lectura se generarían proteínas anómalas; no obstante, queda pendiente la cuestión de si la proteína inicia la traducción en un comienzo de traducción alternativo, que debería ser a partir de la cuarta Met (metionina; Fig. 18A).

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

A.

N′→ C′

Met A D P G Met Met S L F G D D G N L F S D E L E G L G D C G Y P Q G Q T N P Met S Q Q Met P H E H Q G Y G Q L P P S L H L S S P A V P G Q A K L G
H H F D P F N Q Y E Q P K Met H P Met D Q Q G G R Met Met G N G P V N G Met S S P H S R Y H G A Q A G A G G A A G H H V Y P G A Q G D G R S Q S F
P D S G N T W G A Q P Met Q V P E Q T R P P F Q Q Q P P Q A S S H Q H G P A G P Q G H A H Q Met G P F I G R G D Y A I Q G H N Q T Q T P P R Met N H
F P Q G L P Q E A N H F L G H V G Met T Q N P G Met S G P P I R H L A Q P S Q Q H Q Q P N Q Q F L H R P G Q G P V H P D S V A S H N P Q F P Q S P S
R Q Q Q Q Q Q Q V Met G G R P H Q N Met G F N Met H N Q Q V P S N T V N S S G Q Y P P Y S S Y G N L N Q G L A N T S G Met S P N L S L T T S S N S N
P N A P V T Q V Q R Y P A P A G P Q R Y P T P G G Q Q G P L H Q Q P I H V N Q I N T Q P Met H P A Q N Q A T A Q P K L Q Q H L P P P P Q G S Y S S P P S
Met S P Met R N L A T P A G T P P P Q Q V R P P S A G L A T D V G G Y P G V P H Q S Q G P Met A H A Q R G A G P Met N A A Q P L P H Q Q L P S H S T H
P H P P T T Q Met Y A A L S P N H R A T A A Q G R S S T T P G G N H T E P P G P Q D Q R L H A Q Q A Q C Q Q L Q K P P L P F Q Q Q Q L Q Q V H T P P S I
P P S Q T H L A A H H Q S S P P S Q Q A W A P T H Q S P P P Met Q K V P H Met L H S P P D P S L E I I T S S K T P A Met G P N L Q P A N C D L Q Q K E S
E L K P K K K K K K K A K V S E G Q Q E C N N I S S E A G G E V T A L Met N E G D S L I T P V E K P A E K K S K K K P K E K E P K E P K E P K T P K T P K T
P K T P K E P K E P K E K K V K T A T P K P K S S K K P S A K K S D S E S G N S T K K E A K R K R E P S V T S D V E K T P P Q S P E E E D D D D G V Q K R
R S S R Q V K R K R Y T E D L E F R I S D D D D G D D S A G P K S P T T S E Q Q E L P D A E G P V V E K I Met G Met R Met G K K E L A S G E E I E V E E
F Y V K F K G F S Y L H C R W A D I E E L E K D K R I Q Q K I K R F R A K Q A L S T F V T E Met D D E P F N P D Y V E V D R V L D V S E S T D E N G E L V
T L Y L V K W C S L P Y E D S T W E L K A D I D Q V K I E E F E R V Met A R E P Q L K R V E R P P T S D W Q K S E S S R E Y K N A N A L R E Y Q L E G V
N W L L F N W Y N T R N C I L A D E Met G L G K T I Q S I T F L Y E I Y L K G I H G P F L V I A P L S T I P N W E R E F R T W T E L N V V V Y H G S Q A S R K
T I Q A Y E Met Y Y R D T Q G R I I K G A Y K F H A V I T T F E Met I L T D C P E L R N V P W R C V I I D E A H R L K N R N C K L L E G L K Met Met D Met E
H K V L L T G T P L Q N T V E E L F S L L N F L E P D R F P S E S T F Met Q E F G D L K T E E Q V Q K L Q G I L K P Met Met L R R L K E D V E K N L A P K
E E T I I E V E L T N V Q K K Y Y R A I L E K N F A F L S K S G A G G G S G G G G G G S N V P N L L N T Met Met E L R K C C N H P Y L I N G A E E K I Met E E
F R E T H P L D Q P E F H L Q A Met I Q A A G K L V L I D K L L P K L K A G G H R V L I F S Q Met V R C L D I L E D Y L I Q R R Y P Y E R I D G R V R G N L R
Q A A I D R F S R P D S D R F V F L L C T R A G G L G I N L T A A D T C I I F D S D W N P Q N D L Q A Q A R C H R I G Q S K S V K I Y R L I T R N S Y E R E
Met F D K A S L K L G L D K A V L Q S Met S G R E N A A N G V Q Q L S K K E I E D L L R K G A Y G A L Met E E E D E G S K F C E E D I D Q I L Q R R T Q T
I T I E S E G K G S T F A K A S F V S A G N R T D I S L E D P D F W Q K W A K K A E L D L D A I N G R N N L V I D T P R V R K Q T R H Y S S Met K E D D L
Met E Y S E L E S D S E D K P I Q K P R R P Q D R T Q G Y P R S E C F R V E K N L L V Y G W G R W G D I L S H G R F K R P L R E R D V E T I C R A L L A
Y C L L H Y R G D E N I K G F I W D L I T P T E D G Q S R T L T N H S G L S A P V P R G R K G K K G K L P V A Q T R Met P Q A D W L A D C N P D L L L Q E
D S Y K R H L K H H C N K V L L R V R Met L Y Y L R Q E V I G D Q A D R I L E G T D S S E L D I W I P Q P F H A D V P T D W W D L D A D K S L L I G V F K
H G Y E K Y N S Met R A D P T L C F L E R V G Met P D A K A I A A E Q R G A D Met Met A D G V E G E E E D P E Y K P L R Met S F K D D L D D F T N S P L
D D N N D G Met D G E T G E A P K L G E N G K P G N L Y W P P A S A L T A R L R R L I T A Y Q R T H K R E Q L R Q E A Met A K P D R R R R R P R D D I L
A Met V T E G G A Y V P D G A V A F Met A D G G A F Met A K G S P F I P D S A A L L A D S A A Y F K E R R Q R W T R R E E A D F Y R V V S T F G V V Y D V
H R Q C F D W S Q F R A F A R L D K K T D E S L E K Y Y C S F V A Met C K R V C R Met P L K S E T E L P D P T I I I D P I T E E R A S R T L Y R I E L L R R I
R E Q V L P H P L L E E R L S L C Q P S P D L P A W W E P G R H D R D L L R G A A K H G V S R T D Y H I L N D P E L S F L E A Y R K F T Q G K G V E L P
V I V S D P L T P L T L P K D E E V K E E Q G D V T L P K V E N G S I E D V K E E K S E A L S P K K E V K N E E D E N G L G P K Q E P K E E K Met E V E E
K D V T E F K T D V E Q V C P V D G Met V E K K P Met D Q E P T D T L P S S E D K N A Q D E K E L P T G N K L S T E K A S E D E E E K Met D E D D K S
E K S S Q A E V G A L S E R K N F D E E S N A S L S T A R D E T N E T R D C F S V D D V E P S A S Q Met F S E R S L F S F W P K D R V Met I N R Met D N
I C E A V Met K G K W P S N R R Q F F D F P G L L P G Y S S Met A T E S P L Q R R S L G D L S L V G Q T S Y S G S E D L T Met S P Q V N K D D A L S L S
V P R Q R R R R R R K I E I E A E R A A K R R N L Met E Met V A Q L R E S H A E G Q A Q A I D L T K A L H S V S S S S S A S A F P G A Met A S S A T L K A Q
Met E L L Q P G A S S R P R A N G S L L D T E L P N R R K R G R R K N V E G L E L L F Met G N K R G Q L S A E L S D G T K A F V D G R T H L A Met P S P
A Q K A S G E G L D E G S L Q G E D G S S T K D L R E W L R Q H P T Y T Met D Met P G Y V P K N E D L L L S Q F A K P K Q K R H R C R N P N K I D I N T
L T G E E R V P V V N I R N G R K Met G G A Met A P P Met K D L P R W L V E N P E Y A I A P D W T D I V K Q S G F L P E S Met F D R L L T G P V V R E E
G V R R R G R R P K A E I A K A T A A A Q A A A A A A A A A T T S G V N P L L Met N G L F G S Met D L T S L Q G L Q N L Q S L Q L A A G L Met G F P T A L G
G G A D A K H A A A Met L P L Met L P G Met G G L P N Met F S L G S L F G G N L A A A A T A T N G A S S T E Q A E S E E N S K P K T D E E T K G E G D E K
E E K Q A E K S S E T V E S A D A T G D A A A L N A A A A A A A A G Met S T G T L A F N P F L L S T Met A P G L F Y P S Met F L P P S L G G L A I P G F P Q A
S L A D L Q S A V S G A L G A T G E D K E S D K G P R T N Q D P N A S V A D V E T A D N T L E D S D S E E S Q N K T A D S S V L D D D L A G P A E E Met
D S Met E G G Met D D E D D D D D D D D D D D D P A D E D D K S D Stop

B.

N′→ C′

Met A D P G Met Met S L F G D D G N L F S D E L E G L G D C G Stop

C.

N′→ C′

Met A D P G Met Met S L F G D D G N L F S D E L E G L G D C G Y P Q G Q T N P Met S Q Q Met P H E H Q G Y G Q L P P S L H L S S P A V P G Q A K L G
H H F D P F N Q Y E Q P K Met H P Met D Q Q G G R Met Met G N G P V N G Met S S P H S R Y H G A Q A G A G G A A G H H V Y P G A Q G D G R S Q S F
P D S G N T W G A Q P Met Q V P E Q T R P P F Q Q Q P P Q A S S H Q H G P A G P Q G H A H Q Met G P F I G R G D Y A I Q G H N Q T Q T P P R Met N H
F P Q G L P Q E A N H F L G H V G Met T Q N P G Met S G P P I R H L A Q P S Q Q H Q Q P N Q Q F L H R P G Q G P V H P D S V A S H N P Q F P Q S P S
R Q Q Q Q Q Q Q V Met G G R P H Q N Met G F N Met H N Q Q V P S N T V N S S G Q Y P P Y S S Y G N L N Q G L A N T S G Met S P N L S L T T S S N S N
P N A P V T Q V Q R Y P A P A G P Q R Y P T P G G Q Stop

D.

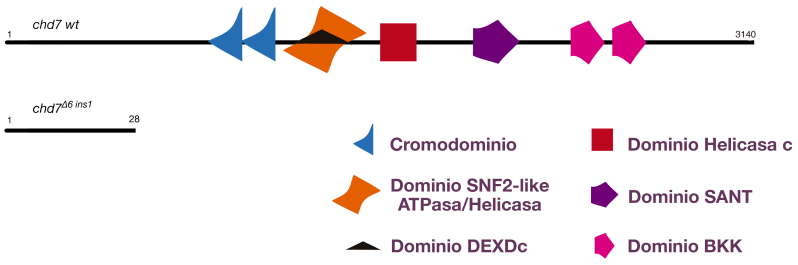


Figura 18. A. Secuencia aminoacídica de Chd7 de WT. B. Secuencia aminoacídica de Chd7 del mutante *chd7*-CRISPR. C. Secuencia aminoacídica de Chd7 del mutante *chd7*-ENU. D. Dominios de la proteína Chd7 (*chd7wt*) y ausencia total de dominios en la proteína Chd7-CRISPR (*chd7Δ6ins1*).

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

3.2. CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA *chd7-CRISPR*

Cuando empezamos a trabajar en la caracterización fenotípica (fenotipado) de los mutantes no conocíamos si la mutación iba a responder, o si podría ser un gen materno, o si se desencadenaría la GCR. Por lo que en primer lugar realizamos cruzamientos *outcross* para asemejarnos lo máximo posible a lo que ocurre durante la enfermedad del síndrome del CHARGE que está causada por heterocigosis del gen *CHD7*. Los primeros análisis fenotípicos se realizaron en embriones descendientes de cruzamientos de mutantes heterocigotos *chd7*-CRISPR con individuos WT.

Se examinaron los embriones para detectar defectos en el desarrollo embrionario entre los 3 y los 6 dpf. Se observó la morfología del cuerpo, la cabeza, el ojo y los otolitos, y la presencia o ausencia de otros defectos fenotípicos observados en estudios anteriores con MO. Los embriones fueron genotipados una vez evaluados con el fin de identificarlos como individuos WT y mutantes heterocigotos para *chd7*.

3.2.1. El *Outcross* de los Mutantes Heterocigotos *chd7-CRISPR* Reproduce Parcialmente el Fenotipo Morfante

Los embriones heterocigotos *chd7*-CRISPR descendientes de un *outcross* muestran pocos defectos o ninguno en comparación con los descritos en morfantes y en algunos casos mostraron los mismos defectos que sus hermanos WT. Se observa una mayor tendencia a presentar curvaturas en el eje longitudinal del cuerpo, significativa desde las 72 hpf hasta las 144 hpf. Esta tendencia también se observa en cuanto al tamaño de la cabeza, siendo mayor en los WT, pero solo es significativa a las 144 hpf (Fig. 19). La mayoría de los defectos se hacen notables a las 144 hpf, momento en el que también se encontraron diferencias significativas con respecto a la altura del ojo (Fig. 19).

A diferencia de lo observado en estudios con morfantes para *chd7*, no se observan diferencias significativas entre embriones mutantes heterocigotos y WT tales como la distancia entre otolitos, el tamaño de los otolitos anterior y posterior y la diferencia de tamaño de los mismos. Muchos embriones mutantes heterocigotos para *chd7* presentan deformidades en los otolitos en todas las etapas, sin embargo, esta diferencia no es significativa con respecto a lo observado en embriones WT. Aunque existe una fuerte tendencia, la relación entre los mutantes y una distancia menor entre los otolitos no ha sido significativa en ninguna de las etapas embrionarias.

En estos cruzamientos no se ha encontrado una mayor proporción de individuos mutantes que presentaran otolitos más juntos, y no se han encontrado individuos con los otolitos fusionados, ni individuos con otolitos de más o de menos, en ninguno de los momentos observados. Del mismo modo, tampoco hemos encontrado una presencia de edemas elevada, en ninguno de los momentos del desarrollo, tanto en WT como en mutantes heterocigotos.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

3.2.2. Los Mutantes Heterocigotos *Chd7*-CRISPR Descendientes de un *Outcross* Presentan un Fenotipo Distintivo

El diagnóstico del síndrome de CHARGE, se realiza con base en la presencia de varias características físicas que los pacientes presentan en asociación. La detección de estas características en los pacientes ofrece una gran eficacia de diagnóstico, al identificar a aproximadamente el 65 % de los pacientes como portadores de una mutación para el gen *CHD7*. Como nuestros mutantes presentaban una leve diferencia que se hacía tendencia a las 144 hpf, para la mayoría de las medidas analizadas, quisimos comprobar si en los embriones de pez cebra mutantes heterocigotos para *chd7*, podríamos encontrar una mayor presencia de anomalías asociadas en los caracteres analizados, en comparación con los embriones WT, y llama a esta asociación de defectos, fenotipo CHARGE.

Muchos individuos WT presentan fenotipo CHARGE, y muchos de los individuos mutantes heterocigotos para *chd7*-CRISPR parecen completamente sanos, se ha observado una mayor frecuencia en la presencia del fenotipo CHARGE en los embriones mutantes heterocigotos que en los WT (Table 1 dentro de la Fig. 19) y que aumenta significativamente a las 144 hpf.

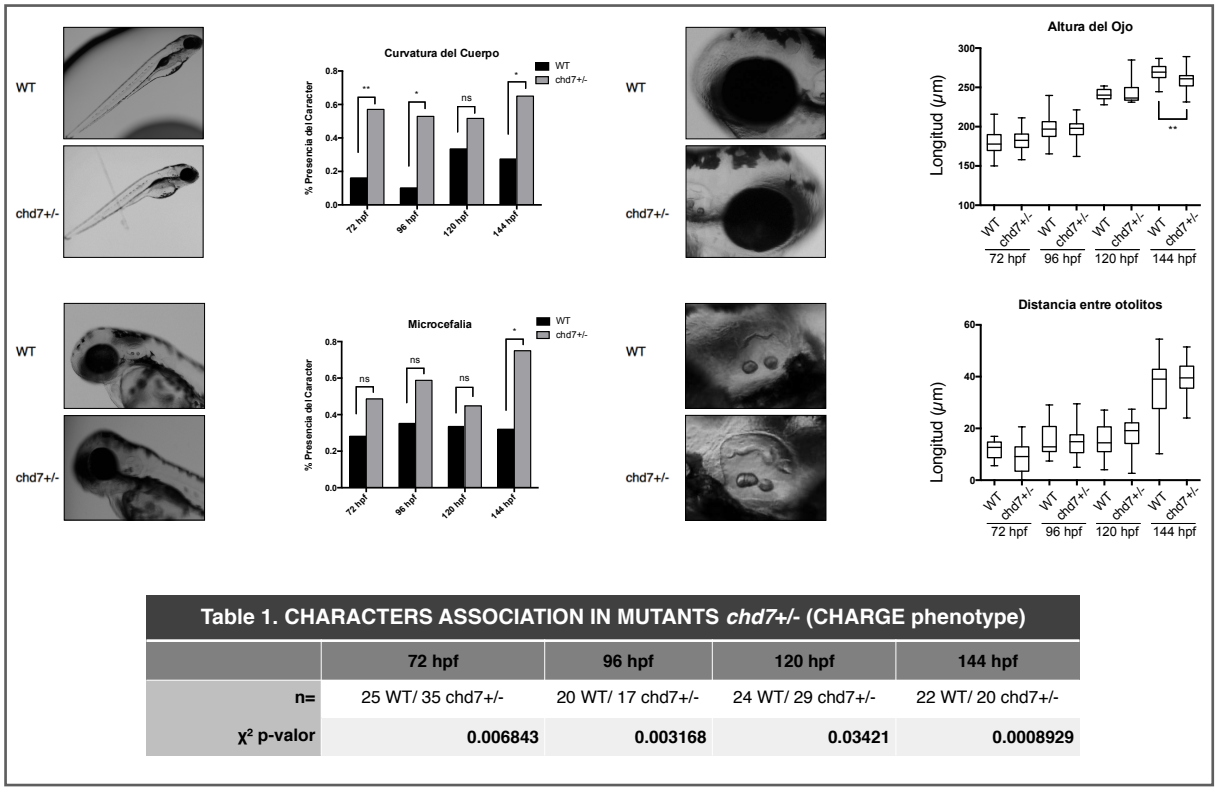


Table 1. CHARACTERS ASSOCIATION IN MUTANTS *chd7+/-* (CHARGE phenotype)				
	72 hpf	**96 hpf**	**120 hpf**	**144 hpf**
n=	25 WT/ 35 chd7+/-	20 WT/ 17 chd7+/-	24 WT/ 29 chd7+/-	22 WT/ 20 chd7+/-
χ^2 p-valor	**0.006843**	**0.003168**	**0.03421**	**0.0008929**

Figura 19. Figuras y resultados del análisis fenotípico de los embriones *chd7*-CRISPR descendientes de un *incross* y obtención de fenotipo CHARGE. Análisis fenotípico de embriones hermanos heterocigotos *chd7*-CRISPR y WT de un cruzamiento *outcross*. En las gráficas se muestra los porcentajes de presencia/ausencia para cada grupo de: curvatura del eje del cuerpo, microcefalia; y los valores de la mediana, los cuartiles y las desviaciones para: altura del ojo, distancia entre otolitos. La significación estadística se realizó mediante la prueba de chi-cuadrado y el análisis de la varianza mediante un *unpaired t-test*: * = (p<0,05); ** = (0,01). En la **Table 1** la asociación del fenotipo entre hermanos de un cruzamiento *outcross* para *chd7* se realizó mediante un Resultados extraidos de Arana, 2016.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

3.2.3. El *Incross* de los Mutantes Heterocigotos *Chd7-CRISPR* Agrava el Fenotipo

Los resultados fenotípicos y su aparición tardía nos llevaron a pensar en un efecto materno del gen. Esto, sumado a la ausencia del homocigoto, hizo que con el transcurso del tiempo se empezasen a realizar otros cruzamientos, *outcross* paterno y materno y también *incross,* para obtener los diferentes mutantes maternos, cigóticos y materno-cigóticos (Fig. 20), que pudiéramos obtener, y analizarlos fenotípica y molecularmente. A estos individuos descendientes de un *incross* los llamaremos a partir de ahora mutantes *chd7*-CRISPR, sin tener en cuenta el genotipo, a excepción de análisis particulares donde se muestra su genotipo.

Cuando se realiza un *incross* de estos mutantes *chd7*-CRISPR se produce la presencia de un fenotipo mucho más grave. Sin embargo, sigue habiendo WT qué lo presentan y mutantes que no. Aunque la frecuencia de las puestas de los mutantes es muy baja, las hembras ponen muchos huevos, pero estos huevos son de peor calidad que los de un *outcross* o un cruce entre WT. Más de la mitad de los huevos se coagulan antes de las 24 hpf, y comienza a formarse una telilla entre ellos, que no ocurre cuando coagulan los huevos WT ni en otras líneas mutantes de nuestro laboratorio.

Las mayores limitaciones en este trabajo han sido la baja cantidad de puestas que se obtuvieron de los cruzamientos mutantes, y la alta mortalidad observada durante los primeros días del desarrollo en estas líneas. Además, la línea ENU acabo perdiéndose debido a la falta de reposición de embriones. El desarrollo embrionario de la descendencia *incross* (materno-cigóticos) de estas líneas mutantes no es sincrónico, y los embriones exhiben diferentes grados de retraso en el desarrollo. Además, en algunos individuos se observan muchos defectos muy graves observados también en individuos morfantes para *chd7* (Fig. 20).

En todos los momentos analizados, desde las 22-25 hpf hasta las 120 hpf, la mayoría de los embriones descendientes de este cruzamiento presentan malformaciones como curvatura del eje del cuerpo. Es muy alta la presencia de edemas pericárdicos y vitelinos y falta de pigmentación del tegumento. Estos mismos fenotipos han sido observados en morfantes para *chd7* y mutantes *chd7*-ENU en nuestro laboratorio (Fig. 20).

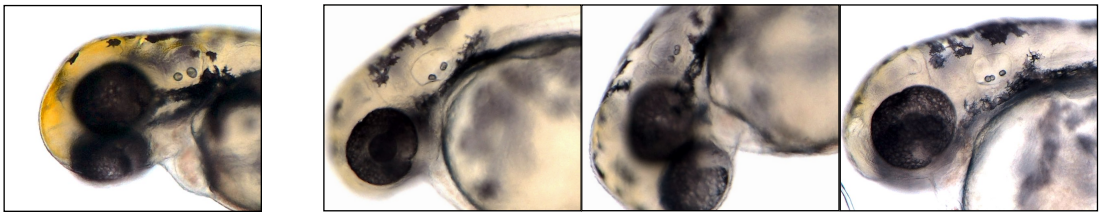


Figura 20. Embrión WT (izquierda) y embriones chd7-CRISPR *incross, chd7*-ENU *incross y* morfante para *chd7* (derecha) a las 48 hpf.

3.2.4. Los Embriones *Chd7*-CRISPR *Incross* Presentan una Pérdida Total de la Homocigosidad Entre las 120 Hpf y 144 Hpf

En humanos no se conoce ningún caso de homocigosis en *CHD7*, y se ha comprobado que son letales tanto para humanos como para ratones. Nuestros datos de genotipado parecen apuntar a que la mutación en homocigosis de *chd7*-CRISPR resulta letal en pez cebra. Los resultados del análisis genotípico de la línea *chd7*-CRISPR indican que las proporciones mendelianas se conservan hasta las 120 hpf (Fig. 21). A partir de las 144 hpf no se ha encontrado ningún embrión mutante homocigoto *chd7*-CRISPR.

USC DE COMPOSTELA

En adultos, se han encontrado 2 individuos homocigotos *chd7*-CRISPR, en dos ocasiones aisladas y cientos de adultos genotipados. Uno era macho y otro hembra, y ambos murieron antes de los 2 años después del genotipado. En ambos casos no se observaron malformaciones macroscópicas a simple vista, y los tejidos están conservados para su análisis.

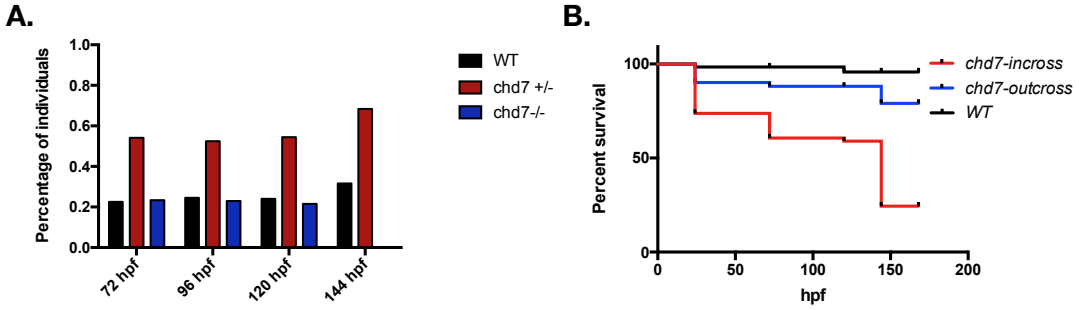


Figura 21. Datos de mortalidad de los embriones heterocigotos CRISPR y de los cruzamientos *outcross* (embriones cigóticos) e *incross* (embriones materno-cigóticos) de la línea *chd7*-CRISPR. A. Porcentaje de supervivencia de los individuos de cada genotipo en el cruzamiento *incross*. B. Porcentaje de supervivencia de los cruzamientos *outcross*, *incroos* y WT. El 78 % de los peces heterocigotos mutantes *chd7*-CRISPR sobrevive hasta los 144 hpf, mientras que solo el 1 % de los homocigotos sobrevive la proporción mendeliana predicha. La significación se halló mediante prueba de chi cuadrado (valor p < 0.0001).

Los embriones homocigotos para chd7, mueren entradas las 144 hpf (Fig. 21A). La mayoría de los peces mutantes heterocigotos *chd7*-CRISPR *outcross* sobreviven hasta las 120 hpf con pequeños eventos de mortalidad entre las 24-72 hpf (Fig. 21B). No hay relación entre la mortalidad de los individuos y el genotipo hasta las 144 hpf (Fig. 21A y 21B). En el cruzamiento *incross* la mortalidad es muy alta en el momento de la puesta. De los que sobreviven, solo el 25 % llega a las 144 hpf independientemente del genotipo (Fig. 21B). No hemos encontrado ningún homocigoto pasadas las 144 hpf, sin embargo, hemos encontrado 2 adultos homocigotos en dos ocasiones distintas, por lo que menos del 1 % de los homocigotos sobreviven hasta las 144 hpf (Fig. 21B).

La mortalidad de los embriones mutantes *chd7*-ENU era muy alta, pero no se hicieron estudios de supervivencia. Las puestas eran muy escasas y no se encontró ningún adulto ni embrión homocigoto *chd7*-ENU (Sa19733).

3.2.5. Los Embriones *Chd7*-CRISPR Presentan Defectos del Desarrollo Temprano.

El retraso en el desarrollo es mucho más evidente en los mutantes *chd7*-CRISPR que en los mutantes *chd7*-ENU o los morfantes para *chd7*. A las 22 hpf, los embriones WT, descendientes de un cruzamiento WT, se encuentran en el estadio de segmentación de más de 26 somitas. Ya tienen la vesícula óptica y ótica formada, y ya se empiezan a observar los otolitos. Los otolitos son estructuras redondeadas, situadas en la parte anterior al ojo y formadas por acreciones de carbonato cálcico cristalino y proteína, ancladas a la mácula por una membrana otolítica gelatinosa.

A las 24 hpf los otolitos aumentan de tamaño, adquiriendo formas y tamaños distintivos durante el período larvario, pueden ser incluso 3, pero con el paso del tiempo en los WT siempre se acaban fusionando 2 y antes de las 25 hpf solo se observan 2. En este momento comienza la pigmentación temprana y la vesícula óptica ya está casi formada completamente.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO

Esta vesícula completa su cierre a partir de las 25 hpf, y en la retina, así como en gran parte del tegumento, ya se observa bastante pigmentación (Fig. 22A).

Los mutantes *chd7*-CRISPR presentan diferentes grados de retraso en el desarrollo entre las 22 y las 25 hpf (Fig. 22B), incluso parece que en un mismo individuo hay procesos que logran completar antes que otros. A diferencia de los morfantes o los mutantes ENU, la pigmentación tarda mucho en aparecer en los individuos mutantes CRISPR, y siempre se observan los embriones más claros.

Esto no pasaba en los cruzamientos *outcross* de mutantes *chd7*-CRISPR. La vesícula ótica está muy deformada en la mayoría de los mutantes *chd7*-CRISPR y en ocasiones totalmente ausente. El vitelo presenta un tamaño mayor en mutantes y morfantes *chd7*, y es muy normal la presencia de edemas, tanto vitelino como pericardio. Es normal encontrar vesículas con 3 o más otolitos, y también individuos sin vesícula ótica o sin otolitos.

Los morfantes para *chd7* entre las 22 y 25 hpf tienen un retraso en el desarrollo (Fig. 22C), pero este desarrollo parece más sincrónico entre individuos. Aunque hay casos extremos y muchos fenotipos graves, que dependen de la dosis. Estos mismos fenotipos o muy similares han sido observados también en nuestros mutantes *chd7*-CRISPR *incross*.

En general, tanto el morfolino SB en coinyección con p53-MO como el morfolino TB parecen conducir a la expresión de un mismo fenotipo menos grave y hay un fenotipo que solo hemos observado en mutantes y morfantes para el *chd7*-MOb y en los mutantes *chd7*-CRISPR materno-cigóticos (Fig. 23A).

Este fenotipo parece ocurrir en individuos que han detenido parte de su desarrollo en el algún punto, pero otros tejidos han seguido desarrollándose. Se observa sobre todo un menor tamaño del embrión, con una cola muy reducida, y diferentes grados de severidad en las anomalías en ojos y oídos. Se ha realizado un seguimiento de estos embriones siempre que hemos podido, y parecen conducir a un fenotipo muy similar, por lo menos hasta las 144 hpf.

3.2.6. Los Defectos del Desarrollo de los Embriones *Chd7*-CRISPR *Incross* Se Mantienen, Se Recuperan o Se Agravan a las 48 Hpf.

La mortalidad en los embriones cigóticos (*outcross*) y materno-cigóticos (incross) aumenta significativamente entre las 48 y 120 hpf (Fig. 21B). A partir de las 48 hpf, se observa una gran variabilidad fenótipica (Fig. 24), pero algunos fenotipos desaparecen, pudiendo ser a causa del aumento de la mortalidad o un rescate cigótico. Aun así, algunos embriones recuperan parte de su fenotipo y continúan desarrollándose de manera saludable, independientemente de su genotipo.

Los fenotipos más graves, como edemas vitelino o pericárdico, malformaciones oculares, malformaciones óticas, falta de pigmentación y curvaturas severas del eje del cuerpo, se agravan o continúan en estas etapas del desarrollo (Fig. 24). Estos fenotipos han sido observados en mutantes *chd7*-CRISPR y ENU maternos-cigóticos, y morfantes para *chd7* (Fig. 23A y 23B). Sin embargo, algunos de estos fenotipos, como la ausencia de vesículas óticas, malformaciones graves en los ojos, ciclopía o ausencia grave de pigmentación, no fueron observados en los mutantes cigóticos ni en los morfantes rescatados en coinyección con p53-MO. Este hallazgo sugiere que la presencia de diferentes genotipos y factores ambientales así como la contribución materna podrían influir en la aparición y gravedad de estos fenotipos.

USC DIGITALIZADO DE COMPOSTELA

3.2.7. Los Embriones *Chd7*-CRISPR *Incross* Sufren una Alteración Materno-Cigótica o una Compensación Cigótica

La variabilidad fenotípica observada podría explicar la gran contribución materna de *chd7* en el desarrollo del embrión. Además, las alteraciones materno-cigóticas en los embriones WT y la recuperación fenotípica en los embriones materno-cigóticos podrían estar relacionadas con una activación de los sistemas de compensación genética (GCR) o la homología funcional con alguna proteína durante la etapa cigótica. La ausencia de fenotipos en los mutantes chd7-CRISPR outcross y los datos de expresión génica entre cruzamientos podrían ayudar a entender mejor la compensación de *chd7* y la recuperación cigótica de la función de *chd7*.

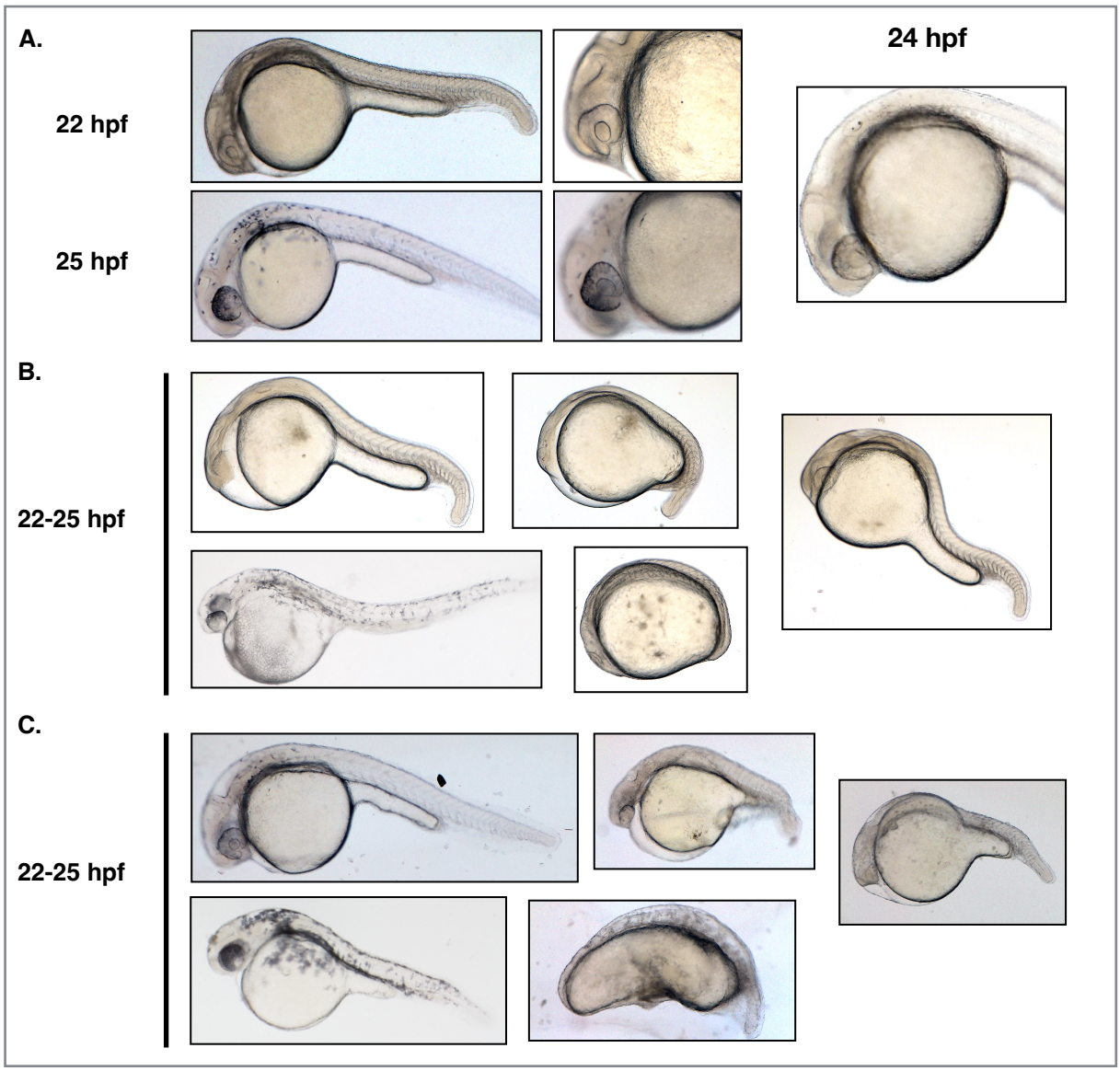


Figura 22. A. Desarrollo normal de los embriones WT *chd7*-CRISPR (*outcross*) entre las 22-25 hpf. Se muestran las rápidas diferencias que ocurren entre las 22-24 y 24-25 hpf en el ojo y la pigmentación. **B. Desarrollo mutantes *chd7*-CRISPR *incross* 22-25 hpf.** Grave retraso de los mutantes *chd7*-CRISPR materno-cigóticos entre las 22-25 hpf. Se observan múltiples malformaciones en estructuras como ojos y vesícula óptica, además de edemas, ausencia de órganos y falta grave de pigmentación. **C. Desarrollo morfantes *chd7*-MO 22-25 hpf**. Se observan malformaciones graves iguales o muy similares a las que observamos en los mutantes *chd7*-CRISPR, sin embargo, la falta de pigmentación y la ausencia total de estructuras no ocurre en morfantes coinyectados con *p53*-MO.

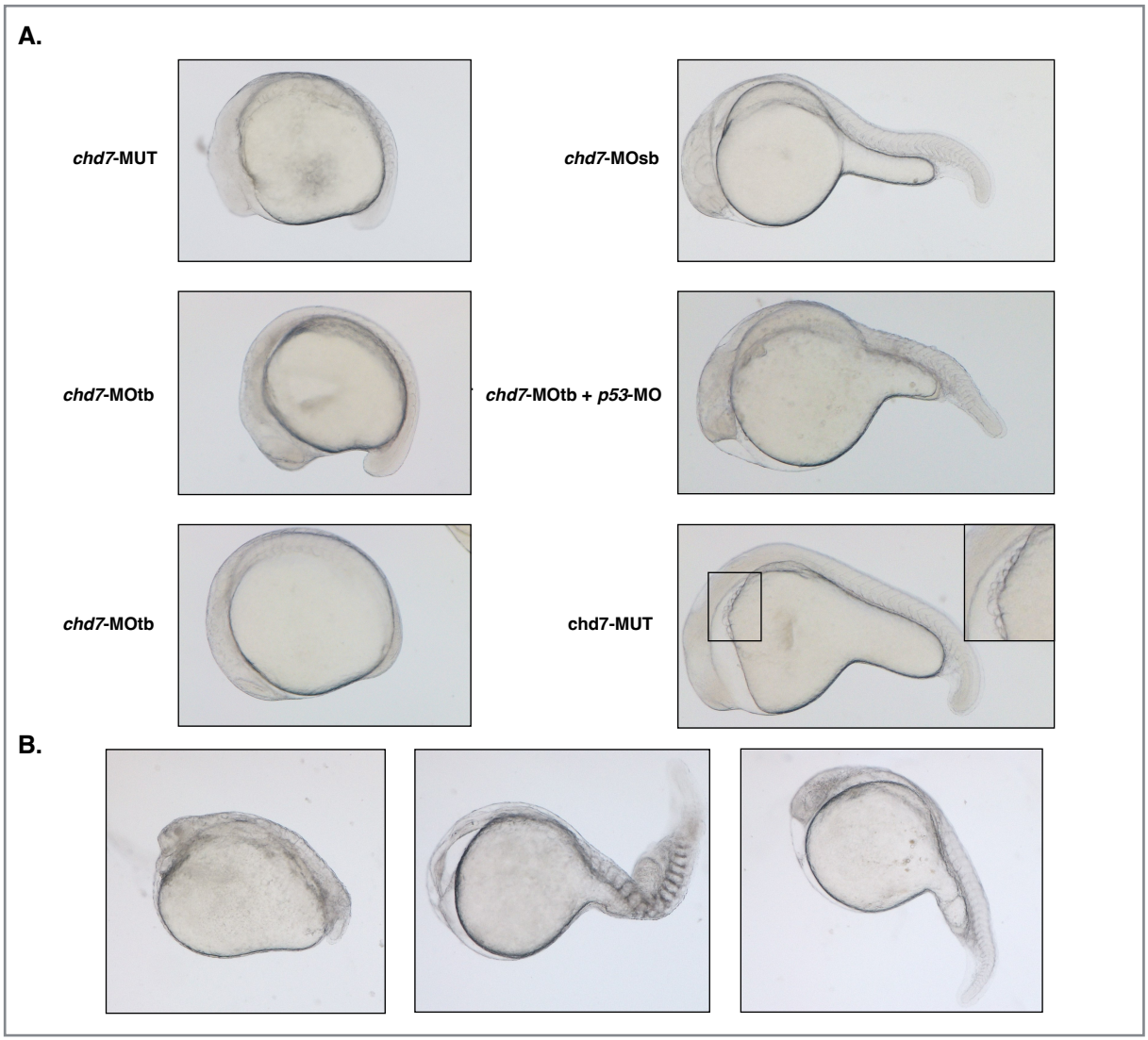


Figura 23. A. Fenotipos observados en mutantes materno-cigóticos chd7-CRISPR (*incross*) y rescate fenotípico parcial entre las 22-24 hpf de los embriones morfantes para *chd7* en coinyección con *p53*-MO. B. Fenotipos similares observados en *chd7*-CRISPR mutantes materno-cigóticos (*incross),* indicando el rescate por la contribución cigótica, y defectos por la mala contribución materna y desequilibrio materno-cigótico, causando variabilidad fenotípica independiente del genotipo.

Tanto en los mutantes *chd7*-CRISPR *incross* como en todos los morfantes analizados, se observan dos momentos en los que se pierde la integridad celular. El primero parece ocurrir por la pérdida de la contribución materna, y produce una reducción del número de células entre las 5-6 (hpf). Estos mismos fenotipos son observados cuando se inyecta morfolino para *cdh2* (n-cadherina; Harrington *et al*., 2007). El segundo fenotipo ocurre alrededor de las 20 hpf, causando una pérdida de la integridad celular dentro del vitelo (Fig. 23A y B). Estos fenotipos no son rescatados por la inhibición de *p53*, lo que sugiere que la pérdida de esta adhesión celular es independiente de la subida de expresión de *p53* y probablemente se deba a la alteración materno-cigótica. Es posible que la pérdida de integridad celular en estos momentos del desarrollo embrionario sea debido a una disminución en la expresión de proteínas relacionadas con la adhesión celular, causando una disminución en la capacidad de las células para mantenerse unidas entre sí.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

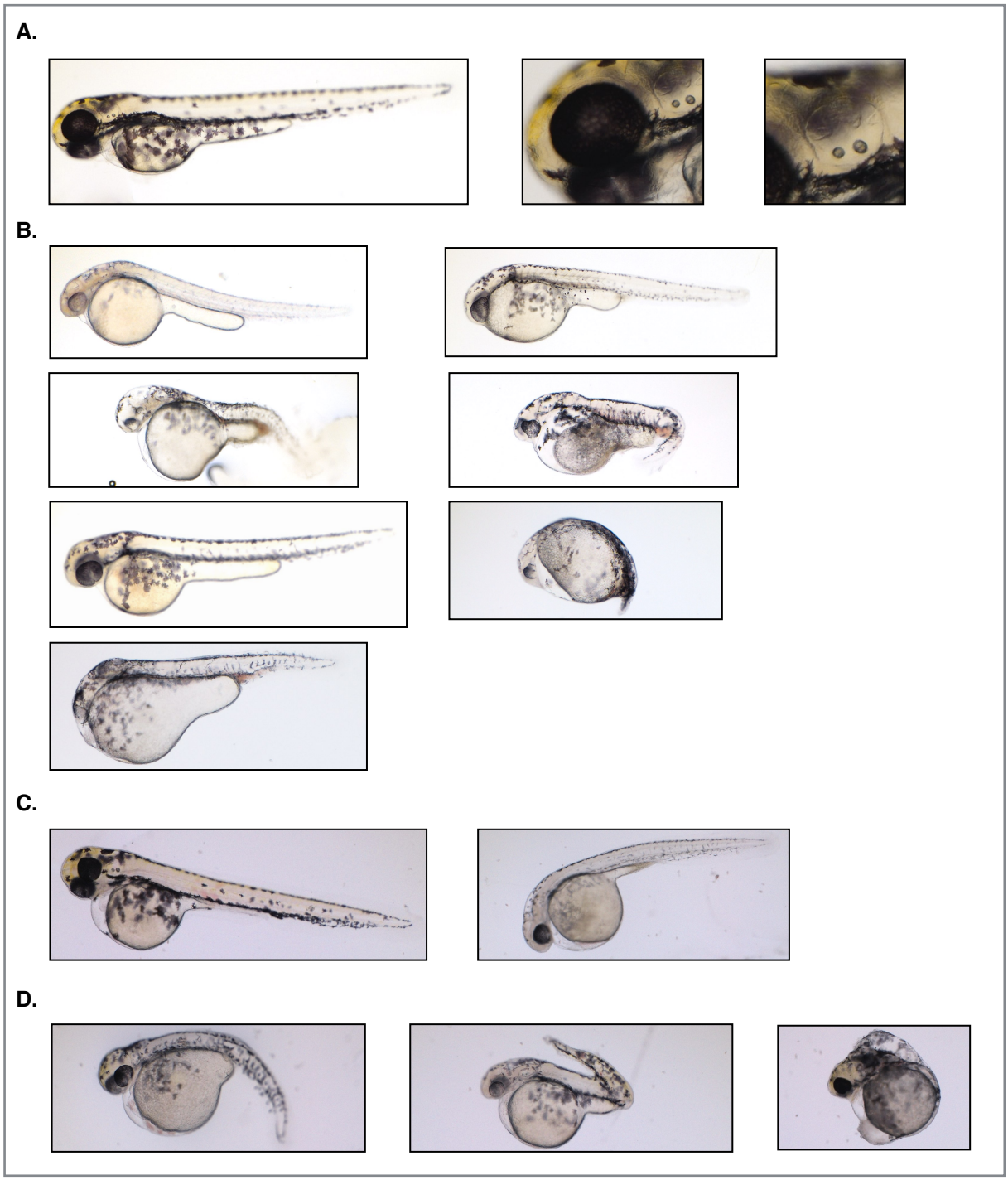


Figura 24. A. Estado de desarrollo de los embriones *chd7*-CRISPR *outcross* (WT y mutantes cigóticos) a las 48 hpf. B. Estado de desarrollo de los embriones mutantes *chd7*-CRISPR *incross* (WT y mutantes maternos-cigóticos) a las 48 hpf. C. Estado de desarrollo de los embriones mutantes *chd7*-CRISPR morfantes chd7-MO + p53-MO. D. Estado de desarrollo de los embriones mutantes *chd7*-CRISPR morfantes chd7-MO.

En estudios adicionales, se ha descubierto que los mutantes *chd7*-CRISPR *incross* también presentan una disminución en la capacidad de migración celular. Esta disminución podría estar relacionada con la disminución en la expresión de proteínas relacionadas con la migración celular, como los receptores de integrina y citoquinas.

3.3. El efecto materno-cigótico de *chd7* provoca malformaciones ópticas y óticas.

Nos hemos querido centrar en el desarrollo de las malformaciones ópticas y óticas, dos de los síntomas más presentes en el síndrome de CHARGE, y además muy fáciles de observar, y con manifestación muy grave en algunos de nuestros mutantes *chd7*-CRISPR materno-cigóticas (*incross*). Se ha hecho un seguimiento del desarrollo de los otolitos, así como de los ojos desde las 22-25 hpf hasta las 120 hpf (Fig. 27.1 y 27.2).

Hemos observado que en algunos casos las anomalías encontradas en los otolitos, como que están muy juntos o la fusión de otolitos de más, se acaban corrigiendo (Fig. 27.1.E), pero no en cuanto a la presencia de un solo otolito, o la ausencia de vesícula ótica. En los ojos parece que esta recuperación del fenotipo normal no ocurre tan fácilmente. Mucha de las afecciones son graves, como la ausencia de ojos, la ciclopía, o el cierre incompleto de la vesícula ótica a edades tardías (Fig. 22, 23, 24, 27.2). Sin embargo, la falta de pigmentación en el cuerpo o algunas de las malformaciones menos serias acaban remitiendo a las 96 hpf, y son casi ausentes a las 120 hpf. En los morfantes y mutantes ENU para *chd7,* el comportamiento fenotípico fue similar al de los mutantes cigóticos y materno-cigóticos.

En cortes histológicos de mutantes heterocigotos para *chd7* y hermanos WT (*outcross*) entre las 120-144 hpf, observamos algunas anomalías un tanto particulares que se agravan en los embriones mutantes cigóticos (Fig. 25). Las células de la retina pigmentaria del ojo presenta un mayor desorden en la mayoría de los mutantes, mientras que los WT presentan una estructura más sólida y menos densa. Sin embargo, esta mayor o menor densidad de células de la capa pigmentaría parece gradual entre los individuos.

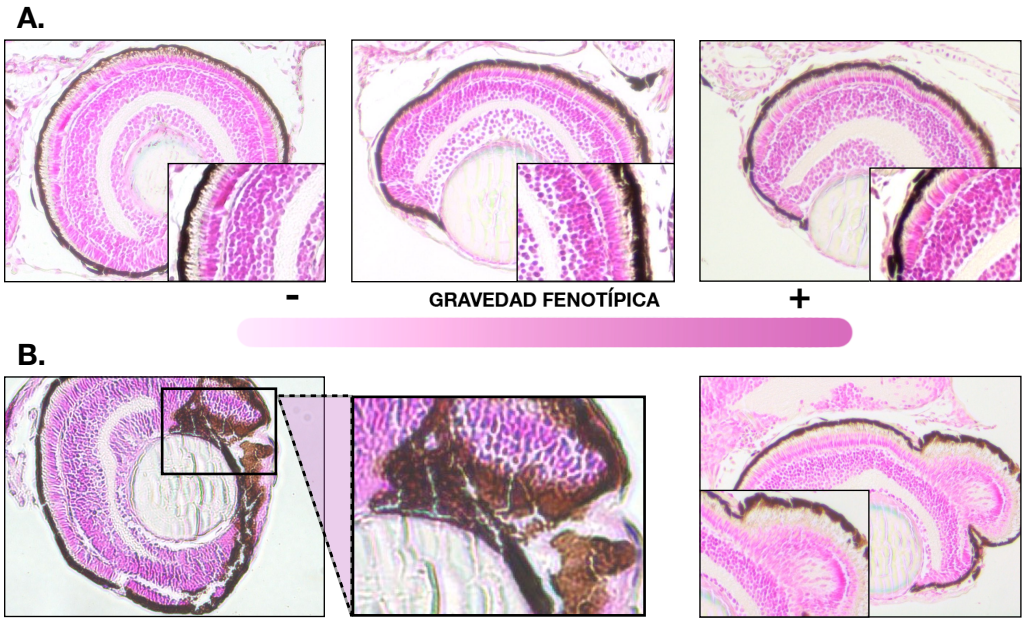


Figura 25. Caracterización del fenotipo ocular de los embriones *chd7*-CRISPR. A. Gravedad fenotípica observada en las distintas capas del ojo de los embriones *c.hd7*-CRISPR. Aunque no se observan apenas diferencias en cuanto a la desorganización celular entre los mutantes y sus hermanos WT, si parece haber diferencias en cuanto a la compactación de las células en el órgano, sobre todo en el pigmento y las células de la retina pigmentaria. En el nervio óptico (NO), también se observan diferencias en cuanto a densidad o forma pero no significativas. **B. Anomalías más graves observadas en embriones *chd7*-CRISPR *outcross.*** La introducción de células pigmentarias o pigmento en el interior del ojo se ha observado varias veces, así como la formación de protuberancias puede que debido al cierre incompleto del ojo (coloboma).

UAB

3.3.1. Los Embriones *Chd7*-CRISPR *Outcross* Rescatan el Fenotipo a Través de la Activación Cigótica del Programa de Senescencia Embrionaria

En general, se pueden diferenciar algunas malformaciones de la vesícula ótica en los cortes completos del individuo. Sin embargo, los cortes no son muy precisos en ese tejido, por lo que es muy complicado realizar una relación entre las anomalías observadas y el genotipo de los embriones. Se han encontrado alteraciones en las estructuras cartilaginosas del aparato auditivo de algunos individuos mutantes y WT del cruzamiento *outcross* para *chd7*-CRISPR. Se ha observado una mayor desorganización de las células del cartílago auditivo, muy próximas al condrocráneo, debido al mal apilamiento de los condrocitos (Fig. 26)

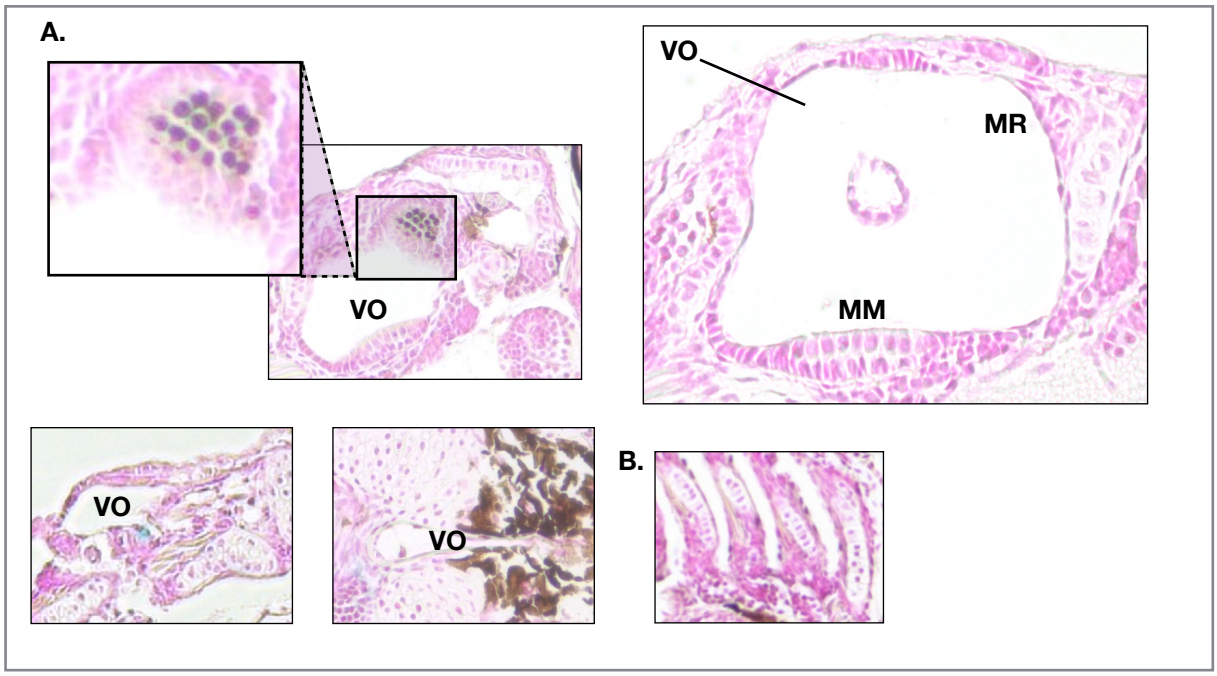


Figura 26. Caracterización del fenotipo craneofacial de los embriones *chd7*-CRISPR. A. Caracterización de la vesícula ótica de embriones *chd7*-CRISPR *outcross.* B. Caracterización de los arcos faríngeos de los embriones *chd7*-CRISPR *outcross.* En la Figura 26A a la derecha se describen distintas estructuras encontradas en lel oído interno de los embriones de pez cebra: VO: vesícula ótica; MM: mácula media; MR: mácula rostral; CC: condrocraneo

En la Figura 26A, se observa un corte del oído interno en el que podemos ver y diferenciar mejor las diferentes partes del oído, para situarlas en los distintos cortes del embrión y utilizarla como herramienta para la investigación de la senescencia embrionaria y los análisis morfológicos y moleculares. Además de observar varias malformaciones cartilaginosas debidas al mal apilamiento de los condrocitos, los casos las infiltraciones de los melanocitos o de pigmento citoplasmático también son abundantes alrededor de las vesículas óticas de los embriones *chd7*-CRISPR. En la Figura 26 se puede observar cómo en la mácula rostral de un individuo aparecen células apiñadas, como un quiste de células senescentes, cubriendo lo que parecen estos melanocitos. En algunos embriones el aumento del pigmento también parece implicar la muerte celular. Esto podría indicar que la activación de la senescencia embrionaria está actuando a favor del rescate fenotípico, y eliminado las células que no deberían estar en ese lugar. Por lo que la recuperación de la función cigótica del gen *chd7* podría estar ocurriendo a pesar de tener un alelo mutado.

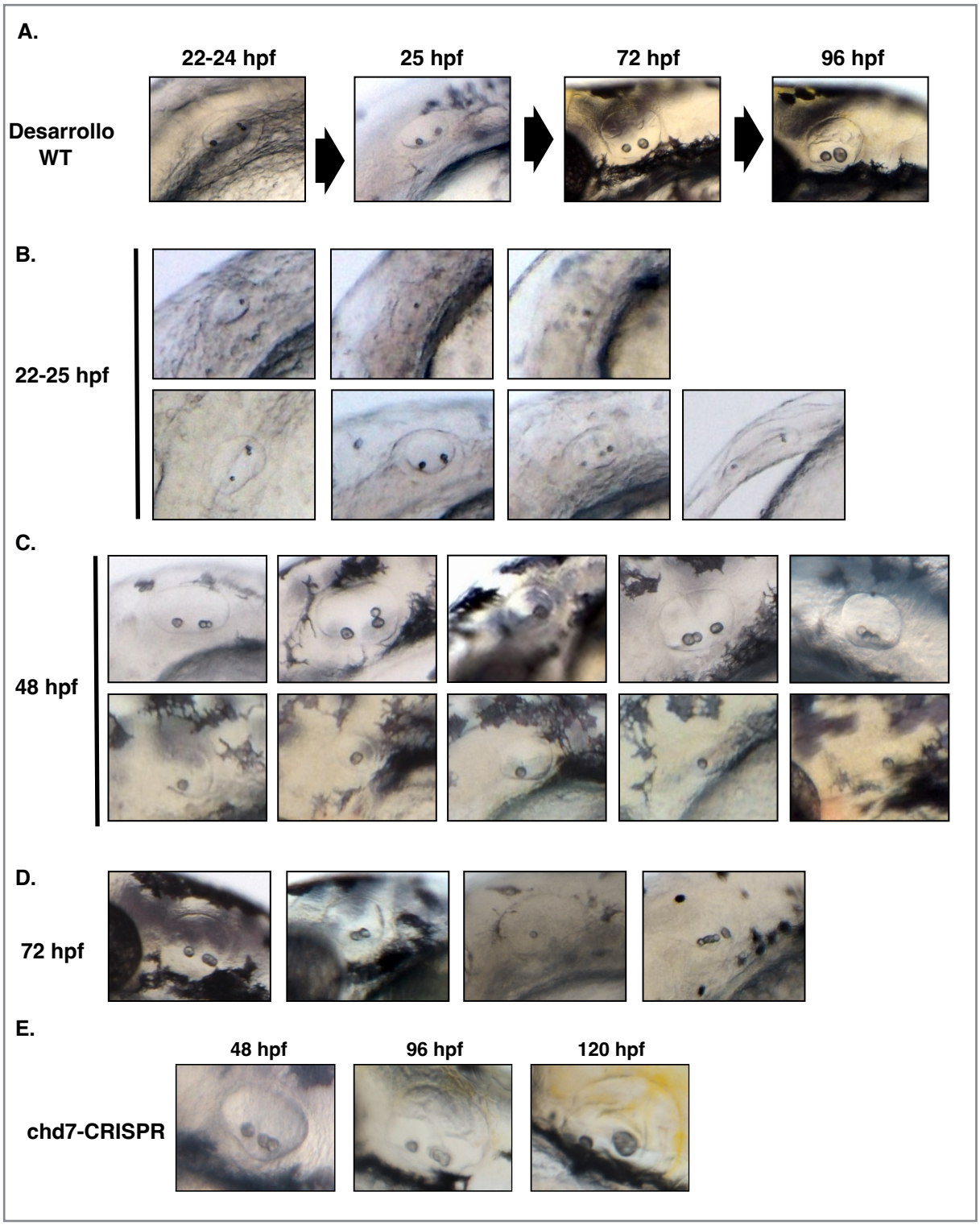


Figura 27.1. Caracterización del desarrollo de los ojos y vesículas óticas de embriones *chd7*-CRISPR *incross*. A. Desarrollo normal de los otolitos entre las 22 y las 96 hpf **B.** Desarrollo y malformaciones de diferentes individuos chd7-CRISPR mutantes materno-cigóticos en los otolitos y la estructura de la vesícula óptica entre las 22-25 hpf. **C.** Malformaciones y ausencia de estructuras de diferentes individuos *chd7*-CRISPR mutantes materno-cigóticos en los otolitos y la vesícula ótica a las 48 hpf. **D.** Malformaciones y ausencia de estructuras de diferentes individuos *chd7*-CRISPR mutantes materno-cigóticos en los otolitos y la vesícula ótica a las 72 hpf. **E.** Seguimiento de los otolitos en mutantes chd7-CRISPR a las 96 hpf. **(**)**Siguiente figura.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

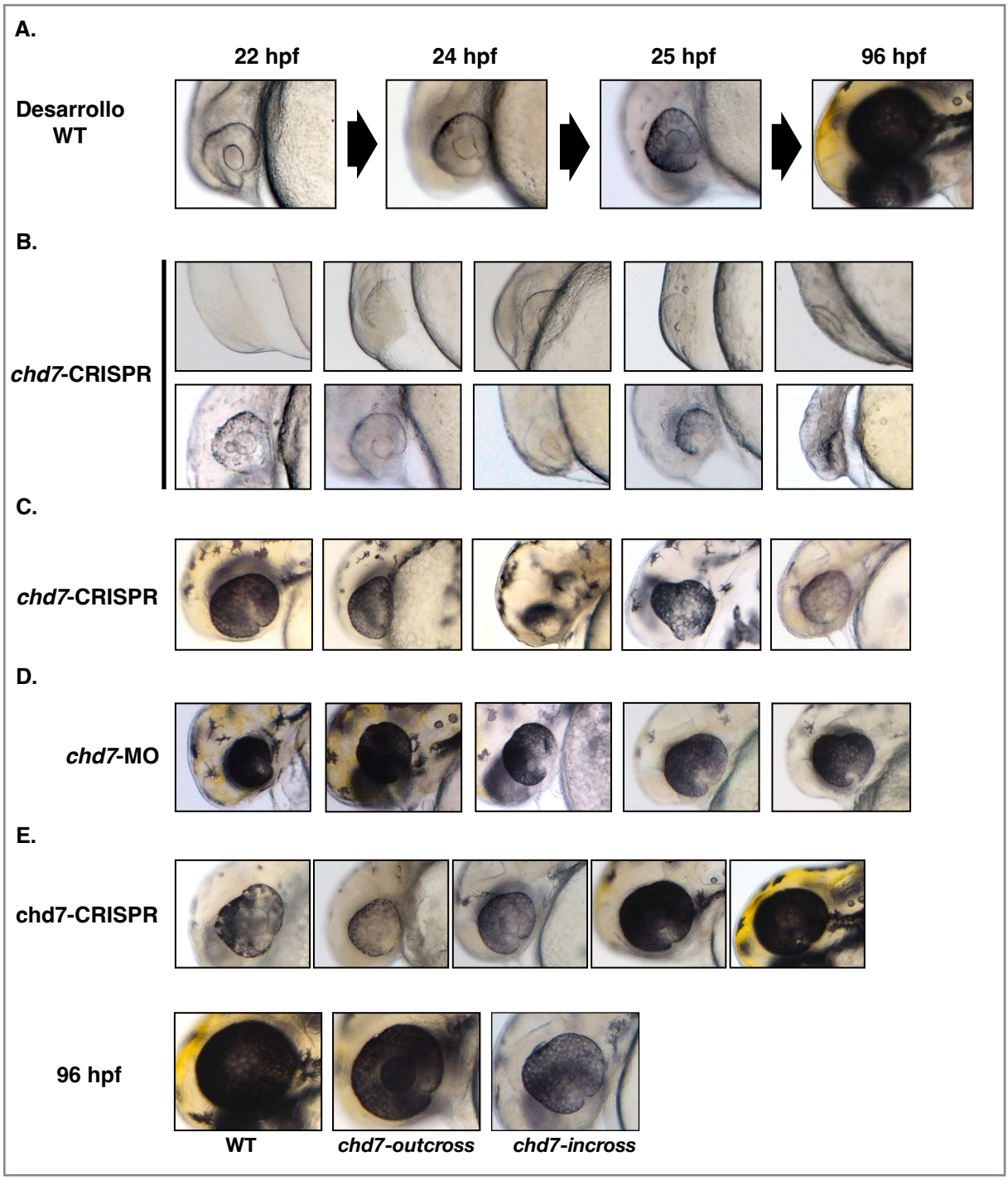


Figura 27.2. Caracterización del desarrollo de los ojos y vesículas óticas de embriones *chd7*-CRISPR *incross*. A. Desarrollo normal del ojo en embriones WT entre las 22-25 hpf. **B.** Embriones *chd7*-CRISPR mutantes materno-cigóticos (*incross*) entre las 22-25 hpf. **C.** Embriones *chd7*-CRISPR mutantes materno-cigóticos (*incross*) entre las 48-96 hpf. **C.** Embriones *chd7*-CRISPR morfantes para *chd7* entre las 48-96 hpf. **D.** Embriones *chd7*-CRISPR morfantes para *chd7* entre las 48-96 hpf. **E.** Emriones *chd7*-CRISPR mutantes materno-cigóticos (*incross*) a las 48-72 hpf y 96 hpf. **(**)** Los tiempos mencionados son orientativos del estado del desarrollo. Los embriones fueron observados según el estado de desarrollo, no el tiempo real desde la puesta (96 hpf). *chd7*-CRISPR = *chd7-incross*: embriones mutantes *incross* (mutantes materno-cigóticos); *chd7*-MO: embriones morfantes para *chd7*. *chd7-outcross*: embriones mutantes *outcross* (mutantes cigóticos y maternos).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

3.3.2. En los Embriones *Chd7*-CRISPR Ocurren Efectos Materno-Cigóticos Tardíos Independientemente del Genotipo.

Esta mayor acumulación de células pigmentarias o melanocitos se observa en casi todos los embriones *chd7*-CRISPR, independientemente del genotipo y muy levemente en embriones WT. Sin embargo, es mucho grave en embriones cigóticos o heterocigotos para chd7-CRISPR *outcross*, observando la aparición de melanomas más graves en algunos individuos (Fig. 28.1 y 28.2), con una disposición anormal y sin patrón definido, apareciendo no en la superficie sino infiltrando glándulas y los epitelios (Fig. 28.1) Esta mayor acumulación de células pigmentarias también se observa alrededor de los órganos o de manera longitudinal al eje del cuerpo, en individuos WT hermanos de los mutantes *chd7*-CRISPR en comparación con individuos WT (Fig. 28.1 y 28.2).

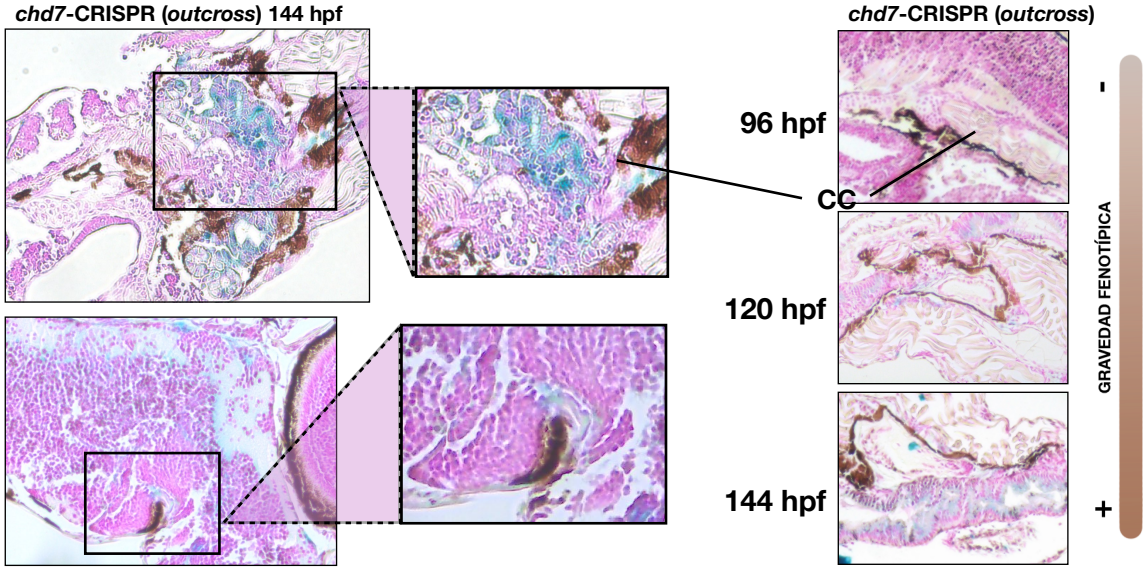


Figura 28.1. Caracterización del tejido pigmentario y gravedad fenotípica en embriones *chd7*-CRISPR *outcross*. Infiltraciones de melanocitos y pigmento en los tejidos. Aunque la disposición parece aparentemente normal, las malformaciones en los tejidos asociados indican una mayor deposición del pigmento o las propias células pigmentarlas que deforma el tejido. En algunos casos llegan a recubrir el tejido completo como en el pronefro, el intestino y la vesícula ótica. Este aumento en el tejido pigmentario parece comenzar entre las 72-96 hpf e irse reduciendo a medida que avanza la senescencia embrionaria en los tejidos asociados. Sin embargo, el retraso en la entrada de la senescencia embrionaria podría agravar el fenotipo.

La concentración en el epitelio y los tejidos aumenta entre las 48-72 hpf en condiciones normales y a las 96 hpf parece especificarse a regiones concretas. En los embriones *chd7*-CRISPR *incross* esta regulación de los melanocitos a posiciones concretas no parece definirse correctamente. A las 96 hpf se puede ver cómo el mayor desorden y difusión de los melanocitos en los tejidos agrava el fenotipo de los embriones *chd7*-CRISPR *outcross* (Fig. 28.1). En los embriones a las 96 los melanocitos presentan un patrón definido, siguiendo las regiones dorsales y ventrales y rezagándose en algunas zonas de la cabeza y vientre, formando patrones de manchas definidas (Fig. 28.2 y 29). Esto podría deberse a errores anteriores en la capacidad de migración y diferenciación de estas células. Además de aumentar en número y tamaño, esos patrones definidos en los embriones *chd7*-CRISPR *incross* a las 72 hpf son mucho más ramificados y menos concentrados cuanto más graves es el fenotipo. Algunos embriones presentan quistes de melanocitos en el interior de algunos tejidos (Fig. 28.2).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO

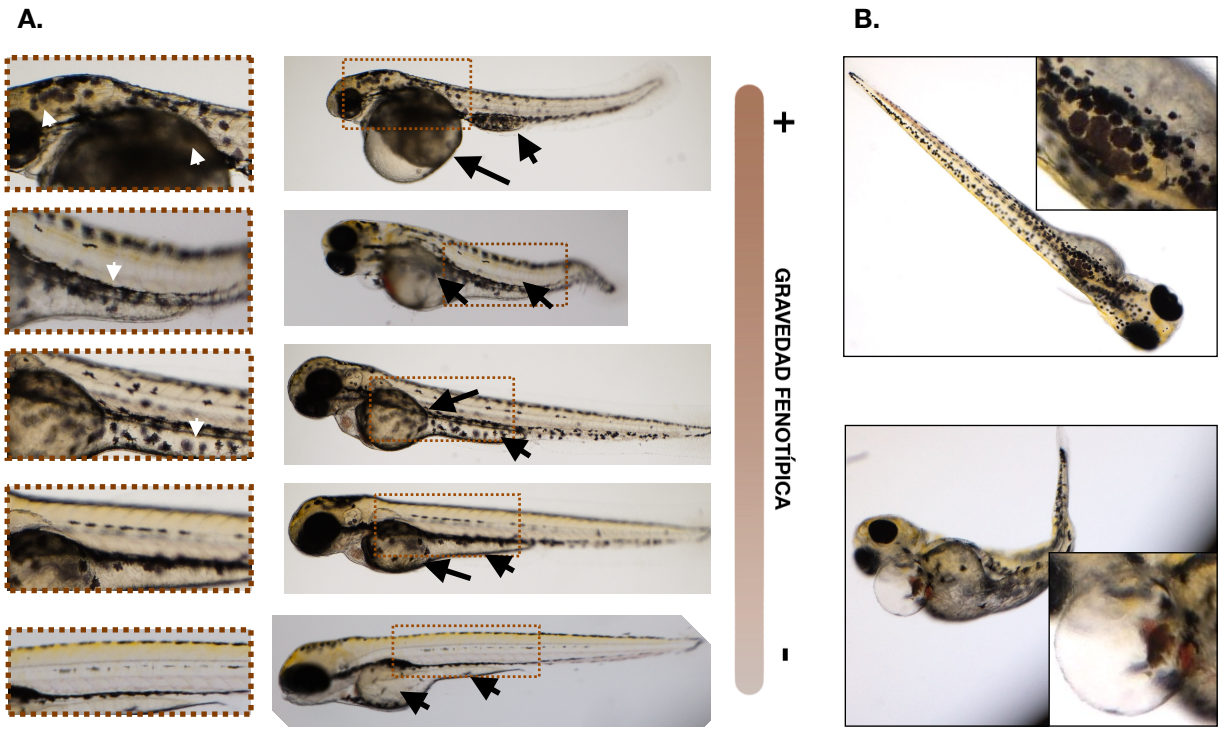


Figura 28.2. A. Caracterización del tejido pigmentario y gravedad fenotípica en embriones *chd7*-CRISPR *outcross*. Gravedad fenotípica según la infiltración de melanocitos y pigmento en los tejidos. B. Melanomas presentes en diferentes tejidos afectados embriones como el pericardio.

Este aumento de los melanocitos o del tejido pigmentario, parece ocurrir por una desregulación materno-cigótica en la transición cigótica del embrión. Los melanocitos eran deficientes a las 48 hpf, incapaces de migrar y aglutinarse. Sin embargo, a las 96 estos son muy abundantes, pero se disponen erróneamente invadiendo tejidos y epitelios (Fig. 28.1 y 28.2). Esto provoca dos problemas en el desarrollo del pez cebra. La difusión del pigmento en los tejidos, como el vitelo o el tegumento, parece tener una relación con el retraso en el desarrollo de los embriones, mientras que la mayor infiltración de pigmento en el interior del embrión está asociado a malformaciones en los tejidos.

3.3.3. La Carga Materna de *Chd7*-CRISPR Influye en la Variabilidad Fenotípica

Esto podrían ser efectos materno-cigóticos en la migración celular, que se ven más afectados en los mutantes cigóticos, debido a la haploinsuficiencia de *chd7* y haber tenido una contribución materna óptima, produciendo así la graduación fenotípica en ese momento. Sin embargo, estos defectos no llevan a la muerte de los embriones. Por lo que la función cigótica recupera el fenotipo de los heterocigotos. El factor de la contribución materna y la activación de los mecanismos de compensación podrían afectar también a esta graduación fenotípica. En esos individuos, la actividad SA-β-Gal, parece ser más intensa (Fig. 22, 23, 24 y 27), pudiendo ser la senescencia embrionaria la que contribuye a la recuperación del fenotipo al recuperarse la función cigótica del gen *chd7*.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

En este sentido, parece que el establecimiento de la senescencia embrionaria, juega un papel tanto en la salud como en la enfermedad del síndrome de CHARGE, en la regeneración e inhibición de la proliferación y migración celular a través de *chd7*, contribuyendo a la estabilización y remodelación del órgano. Los análisis de gravedad fenotípica muestran que el fenotipo no tiene correlación con ningún genotipo concreto, pero sí cierta tendencia, por lo que parece que hay un importante componente materno influyendo en los resultados (Fig. 29).

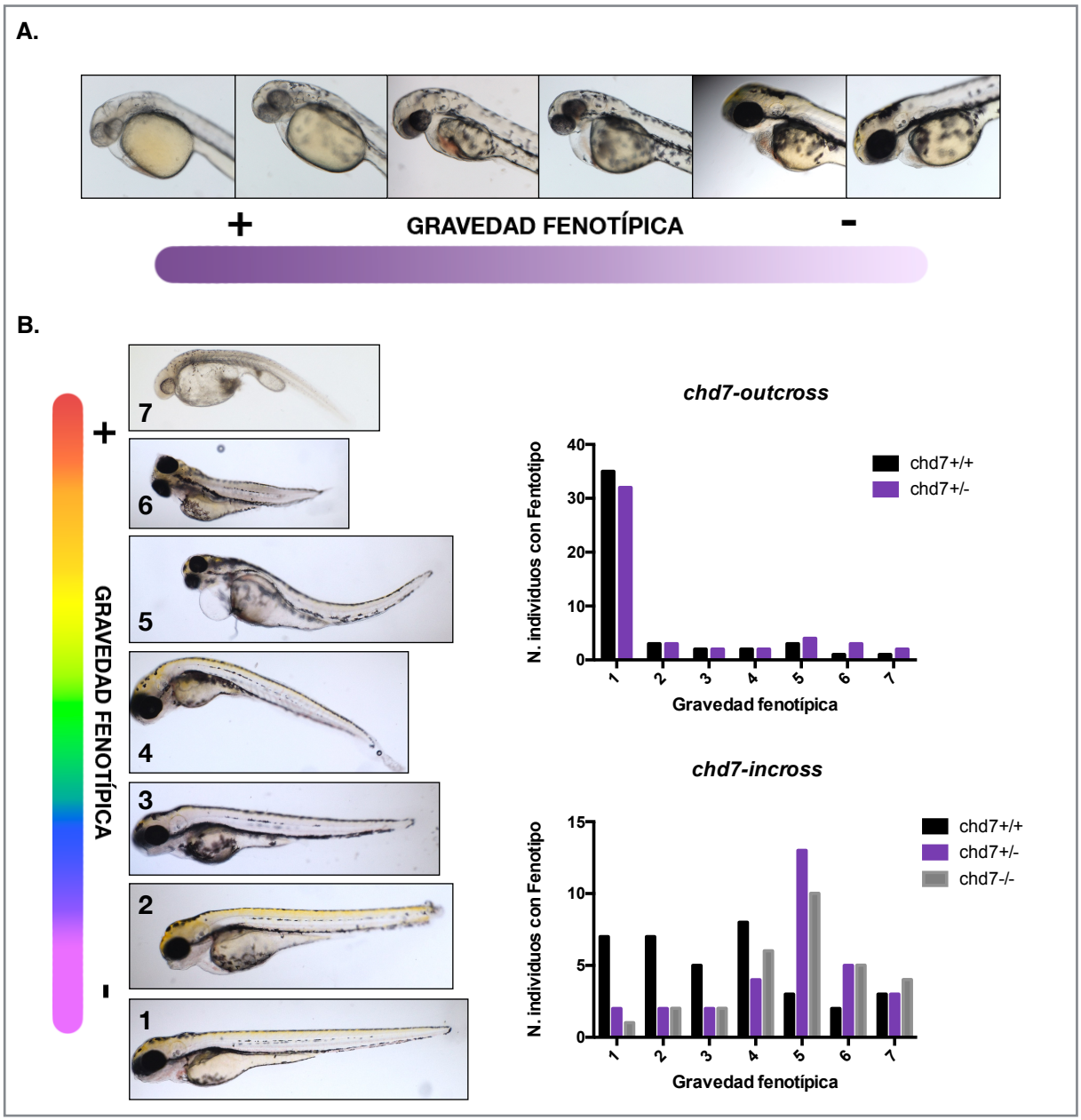


Figura 29. A. Gravedad fenotípica de los embriones *chd7*-CRISPR *incross* a las 72 hpf. B. Gravedad fenotípica de los embriones *chd7*-CRISPR *incross* a las 96 hpf. Las gráficas muestran los análisis de correlación genotipo-fenotipo para 7 grados de fenotipo basados en la presencia o ausencia de estructuras y malformaciones y el criterio del observador a las 96 hpf. Los resultados para ninguno de los análisis de gravedad fenotípica no han desvelado ninguna correlación entre fenotipo concreto con un genotipo concreto.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

La no activación materna del programa de senescencia embrionaria por *chd7* (desajustes del efecto materno), implica la no formación del órgano o que el individuo no llega a desarrollarse. Su activación implica el establecimiento del programa. Pero los fallos en la regulación de *chd7* (desajustes del efecto materno-cigótico y cigótico) implican una mala proliferación y migración celulares, apoptosis y desajustes en el programa de senescencia embrionaria. Los efectos tardíos en la fase cigótica del WT solo podrían deberse a una mala contribución materna, pero que produzca algún efecto tóxico en el desarrollo. Además, tanto los mutantes maternos como cigóticos rescatan el fenotipo en la fase cigótica.

Los fenotipos materno-cigóticos tardíos están más presentes en los embriones cigóticos, sin embargo, también se presenta en los individuos WT (mutantes maternos). Los embriones del *incross* presentan fenotipos más graves hasta las 72 hpf, pero a las 96 hpf solo quedan unos pocos individuos con fenotipos graves que acaban falleciendo, y la presencia de fenotipos graves es mayor en los individuos homocigotos y los más sanos en WT, aunque no existe correlación.

3.4. Los Embriones *chd7*-CRISPR Descendientes de un *Incross* Presentan Varias Anomalías Cartilaginosas

Antes de realizar la tinción azul alcián, no se observan diferencias fenotípicas en el tamaño de la cabeza entre hermanos de un mismo *outcross* para chd7-CRISPR. Estos embriones *outcross* (mutantes cigóticos) fueron teñidos a las 96-120 hpf para observar anormalidades morfológicas en los cartílagos. Entre los hermanos no se observaron diferencias notables en los defectos mandibulares en cuanto al genotipo, pero sí con controles WT (Fig. 30).

En los descendientes del cruzamiento *incross* (mutantes materno-cigóticos), los defectos mandibulares se agravan, llegando a desaparecer la estructura completa de la mandíbula. Muchos de los embriones no presentan ninguna anomalía visible, otros presentan un ceratohial más ancho y menos puntiagudo, ocasionando una cabeza más ancha y plana en la parte anterior. Aproximadamente el 40 % no presentaban los arcos faringes (Fig. 30B) y el 10 % de estos carecían del cartílago de Meckel, o estaba muy atrofiado (Fig. 30C). Muy pocos embriones presentaban ausencia total de las estructuras craneales (Fig. 30D). Sin embargo, no se ha encontrado relación alguna en cuanto al genotipo entre los miembros de este cruce. Esta ausencia total de estructuras también fue observada en morfantes *chd7*-MO.

Al comparar los embriones de este cruzamiento, sin tener en cuenta el genotipo, con embriones WT de un cruce entre WT, se observan diferencias estadísticamente significativas (Fig. 30B). El cartílago de Meckel es mayor en los embriones WT en comparación con los descendientes del *incross* de mutantes *chd7*-CRISPR, y el ángulo de este, al igual que el del ceratohial, es menor en los WT. No se encontraron WT que presentasen ausencia de Meckel o de los huesos ceratobranquiales (Fig. 30A (A)). El resto de medidas, aunque mostraron cierta tendencia, no mostraron diferencias estadísticamente significativas. La ausencia total de estructuras cartilaginosas solo es observada en morfantes y mutantes materno-cigotos del cruzamiento *incross* y en los morfantes *chd7*-MO sin coinyección de p53, mientras que una aleta más corta, la ausencia de arcos faríngeos, cartílago de Meckel, ceratohiales y basohiales, o las malformaciones en estas estructuras, se observa también en los mutantes cigóticos del cruzamiento *outcross*.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

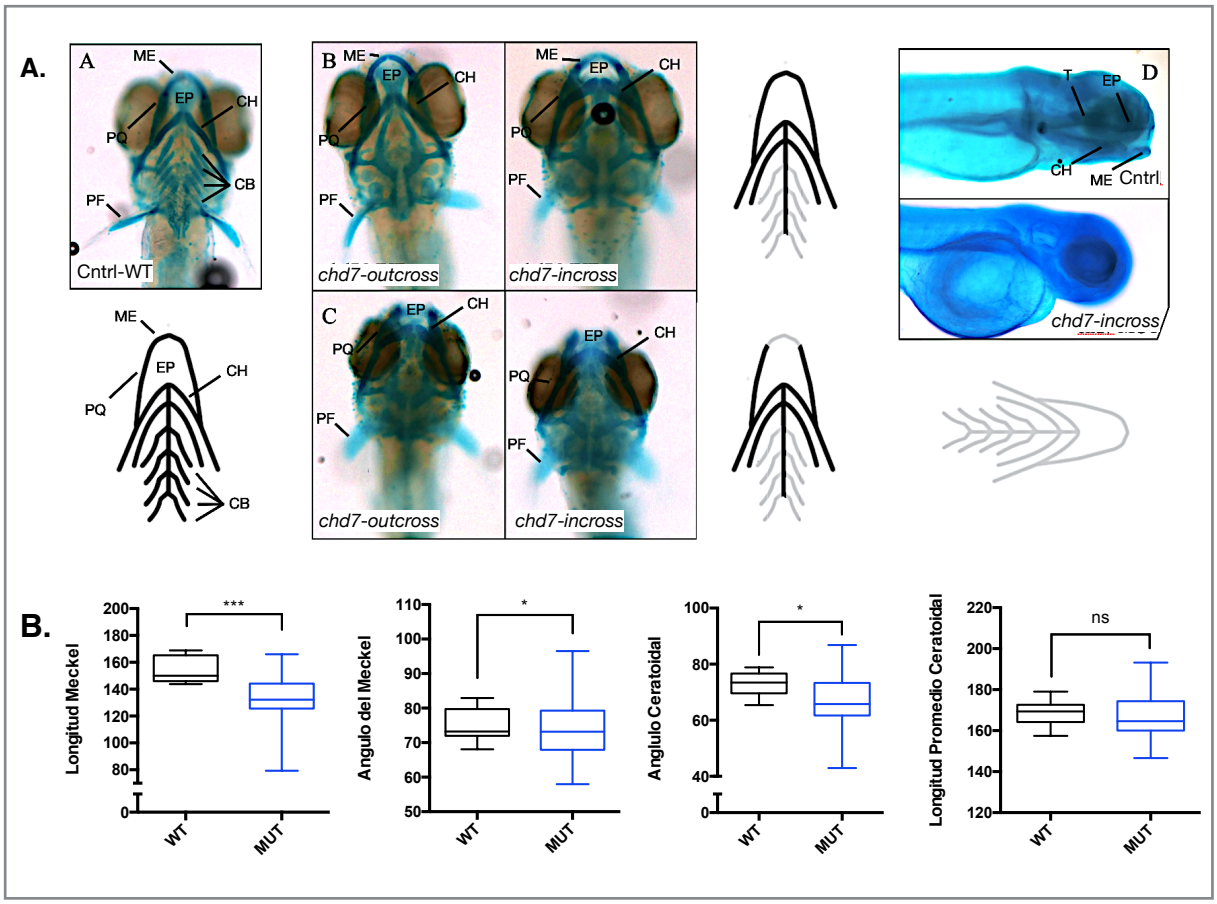


Figura 30. A. Morfología de las estructuras cartilaginosas observadas en WT y *chd7*-CRISPR a las 96 hpf: Se observaron defectos en los cartílagos craneofaciales en comparación a individuos normales WT **(A). Entre los embriones *chd7*-CRISPR *outcross* e *incross* se observó una alta heterogeneidad fenotípica, independientemente del genotipo y no todos los embriones sufrían el mismo grado de malformación. En algunos casos de mutantes de *chd7*-CRISPR *outcross* existía agenesia de los cartílagos ceratobranquiales (B), y en otros casos se produjo la pérdida adicional del cartílago de Meckel (C). En menos de un 10 % de los embriones *chd7*-CRISPR *incross* se observó una ausencia total de cartílagos craneofaciales (D).** ME: cartílago de Meckel; EP: placa etmoidal; PQ: palatoquadrate; PF: aleta pectoral; CH: ceratohial; CB: ceratobranquial; T: *trabeculacranii*. **B. Gráficas análisis de la longitud y de los ángulos del cartílago de Meckel y el ceratoihal.** Se muestran la mediana, los cuartiles y las desviaciones típicas para: Cntrl=WT: embriones WT de un cruzamiento incross de WT; *chd7-outcros* = MUT: embriones mutantes cigóticos del *outcross chd7*. *chd7-incross*: embriones mutantes del *incross chd7*-CRISPR (n = 144; WT: n = 48; *chd7-outcross*: n = 96). La significación se halló mediante *unpaired t-test*: (* < 0,05; *** < 0,0001).

3.4.1 los Embriones *chd7*-CRISPR Descendientes de un *Incross* Presentan Asociación Fenotípica en los Defectos Cartilaginosos

Parece haber una serie de fenotipos asociados en cuanto la estructuras cartilaginosa y el efecto materno o cigótico del gen (Fig. 31). La ausencia del cartílago de Meckel está asociado a una aleta más corta y ausencia de arcos faríngeos, pero un fenotipo más leve. (Fig. 30) Esto podría deberse al leve retraso en el desarrollo, lo que podría implicar la recuperación de estructuras, o una pérdida de la función materna y una recuperación cigótica, implicando la pérdida total de esa estructura, pero una recuperación sana. La formación del cartílago de Meckel no implica el desarrollo de los arcos faríngeos, pero sí la recuperación de la aleta (Fig. 30 y 31A). Hay individuos que forman el Meckel y tienen las aletas pectorales largas, pero no tienen arcos faríngeos Sin embargo, el subdesarrollo del Meckel está asociado a anomalías en

USC UNIVERSIDADE DE COMPOSTELA

los arcos faríngeos y deformaciones en las aletas. Los fenotipos que muestran estos cartílagos y los arcos faríngeos subdesarrollados y amorfos están asociados a un fenotipo más grave y problemas como edema vitelino y pericárdico. Los defectos más graves, sin pérdida de estructuras, podrían ser complicaciones del establecimiento de la función materno-cigótica del gen. También se observa una mayor distinción entre el fenotipo y la dispersión de condrocitos (Fig. 31C) que migran desde diferentes tejidos hacia los arcos faríngeos.

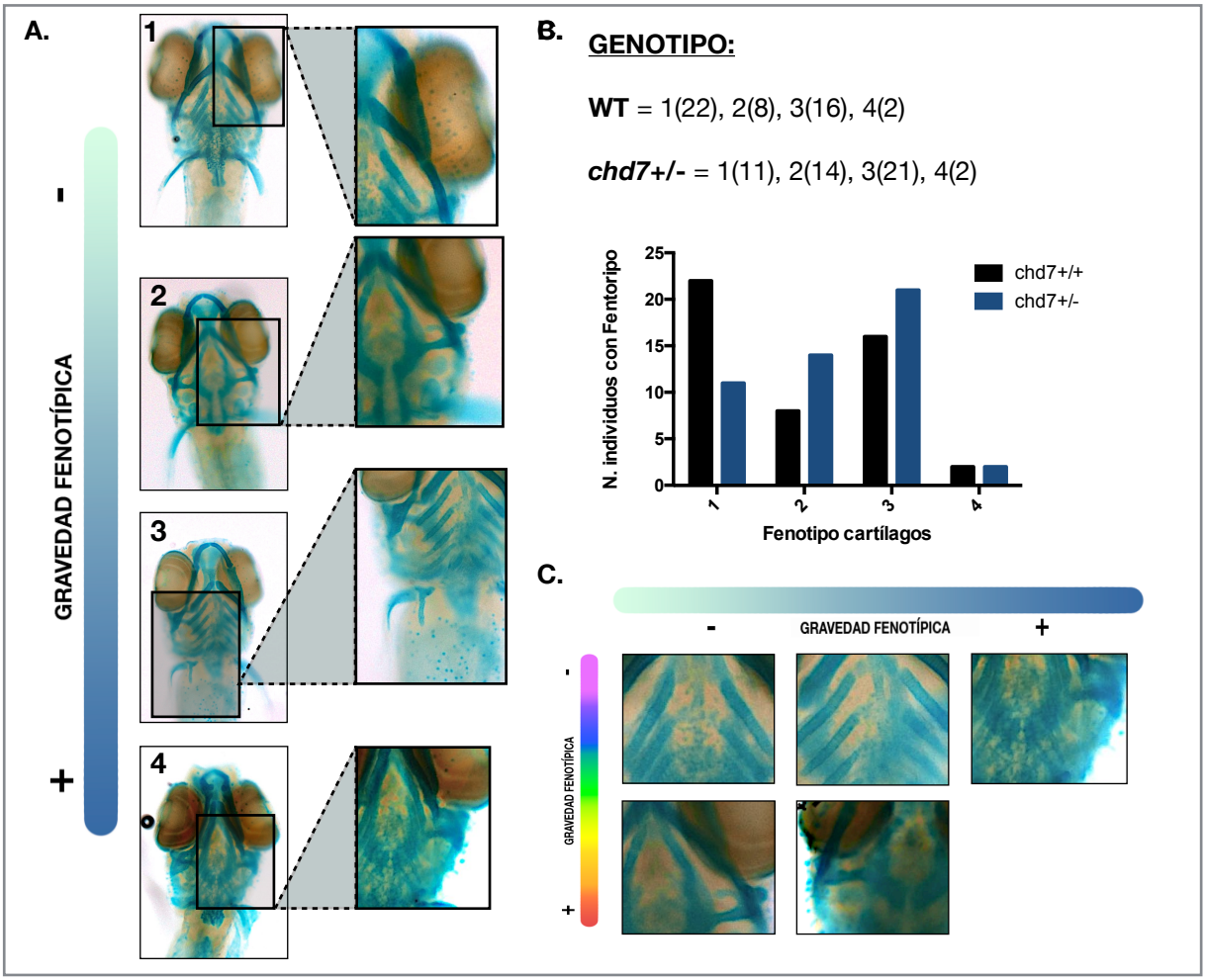


Figura 31. A. Relación entre la gravedad fenotípica y la morfología de las estructuras cartilaginosas en embriones *chd7*-CRISPR mutantes cigóticos (*outcross*) a las 96 hpf. La imagen de gran aumento muestra la mayor o menor dispersión de condrocitos en los tejidos. El apilamiento de condrocitos está interrumpido en los mutantes *chd7*-CRISPR materno-cigóticos (*incross*) y parcialmente en cigóticos, y se ha encontrado un apilamiento gravemente desorganizado en los mutantes cigóticos (*outcross*). **B. Cuantificación de la morfología en heterocigotos *chd7*-CRISPR cigóticos y maternos (mutantes y hermanos WT del *outcross* de *chd7*-CRISPR):** (WT; n = 46; chd7+/- = 50). **C. Relación entre la gravedad fenotípica y la dispersión de condrocitos en embriones *chd7*-CRISPR mutantes cigóticos (*outcross*) a las 96 hpf.** No se ha encontrado significación entre hermanos *chd7*-CRISPR *outcross.* La pérdida de la función materna provoca la pérdida de los arcos faríngeos, el acortamiento de las aletas o la pérdida del cartílago de Meckel. El desajuste de la función materno-cigótica provoca las deformaciones en las 3 estructuras y la mayor dispersión de condrocitos. La recuperación cigótica del gen o una contribución materna parcial, produce la recuperación del fenotipo y una transición aparentemente sana sin esas estructuras cartilaginosas.

No se hallaron relaciones significativas en cuanto al genotipo de los individuos (Fig. 31B). Los fenotipos con menor dispersión de células presentan menos estructuras cartilaginosas

como el cartílago de Meckel y los arcos faríngeos, pero una mejor formación del resto de estructuras (Fig. 31C). Los que presentan una mayor dispersión presentan una mayor formación de estructuras pero defectuosas. Pero la mayor o menor dispersión de estas células o la ausencia de dispersión no depende de la formación o no de arcos faríngeos, ni de la ausencia de Meckel o unas aletas más cortas.

Además, las deformaciones en los arcos faríngeos están asociados con unas aletas deformes. Sin embargo, la gravedad del fenotipo no depende de la formación o no de las estructuras cartilaginosas, pudiendo estar causado por un retraso en el desarrollo embrionario o por una contribución materna positiva hasta la entrada de la función cigótica de gen *chd7*.

Es decir:

1. Si el Meckel no crece, no crecen la aleta ni los arcos faríngeos.
2. Si la aleta crece, el Meckel crece o se subdesarrolla, pero no los arcos faríngeos no tienen por qué crecer.
3. Si el Meckel crece o se subdesarrolla, la aleta y los arcos faríngeos crecen o se subdesarrollan.
4. Si los arcos faríngeos crecen o se subdesarrollan, la aleta y el Meckel crecen o se subdesarrollan.

Esto parece indicar que la formación del cartílago de Meckel y de las aletas están relacionadas. Si se recupera uno se recupera el otro. Pero no implica la recuperación de los arcos faríngeos. Sin embargo, la incapacidad de recuperar el cartílago de Meckel y las aletas, también causa la incapacidad de formar correctamente los arcos faríngeos. Por lo que parece que la formación de los arcos branquiales y el crecimiento de la aleta dependen de la función materna, mientras que la formación de los arcos faríngeos depende de la función materno-cigótica.

3.5. Los Embriones *chd7*-CRISPR Descendientes de un *Incross* Presentan Defectos en la Migración Celular Debidos a la Contribución Materna.

Quisimos observar si los errores en la maduración, migración y proliferación celulares, relacionados con la alteración materno-cigótica de la expresión de *chd7*, ocurrían independientemente de la línea celular, o por el contrario, solo ocurría en las células derivadas de la cresta neural. Una de las primeras células con capacidades migratorias antes del cierre del tubo neural observadas en el desarrollo del pez cebra, son los macrófagos derivados del saco vitelino (Herbomel *et al*., 1999). Decidimos cruzar los mutantes heterocigotos adultos *chd7*-CRISPR con unos peces transgénicos de la línea MPEG, que producen células fluorescentes dibido a la expresión de **GFP** (proteína fluorescente verde, del inglés *Green Fluorescent Protein*) en los macrófagos. En los embriones a las 48 hpf se observa un gran número de macrófagos en todas las partes del embrión (Fig. 32A). Los cruzamientos *outcross* de esta línea con WT no produce un menor número de estas células fluorescentes, aunque puede que sí una menor intensidad de la fluorescencia que no es estadísticamente significativa.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Al cruzarlos con nuestros mutantes *chd7*-CRISPR, los embriones de este cruzamiento *outcross* mostraban no solo una menor intensidad de la fluorescencia global, sino también un menor recuento de macrófagos (Fig. 32A y 32B). Los macrófagos se encuentran principalmente en la región de la cabeza. Estos fenotipos eran graduales, habiendo individuos con una expresión de células e intensidad de fluorescencia similar a la de los WT. Esto parece indicar que la capacidad de producción y de diferenciación de estas células seguramente se vea comprometida por la deficiencia en *chd7*. Sin embargo, sigue habiendo un efecto muy grande dependiente de la carga materna. Los resultados, en cuanto a una mayor o menor expresión de células y la intensidad de la fluorescencia, eran independientes del genotipo del embrión. Los fenotipos se recuperaban a las 72-120 hpf en todos los embriones, independientemente del genotipo.

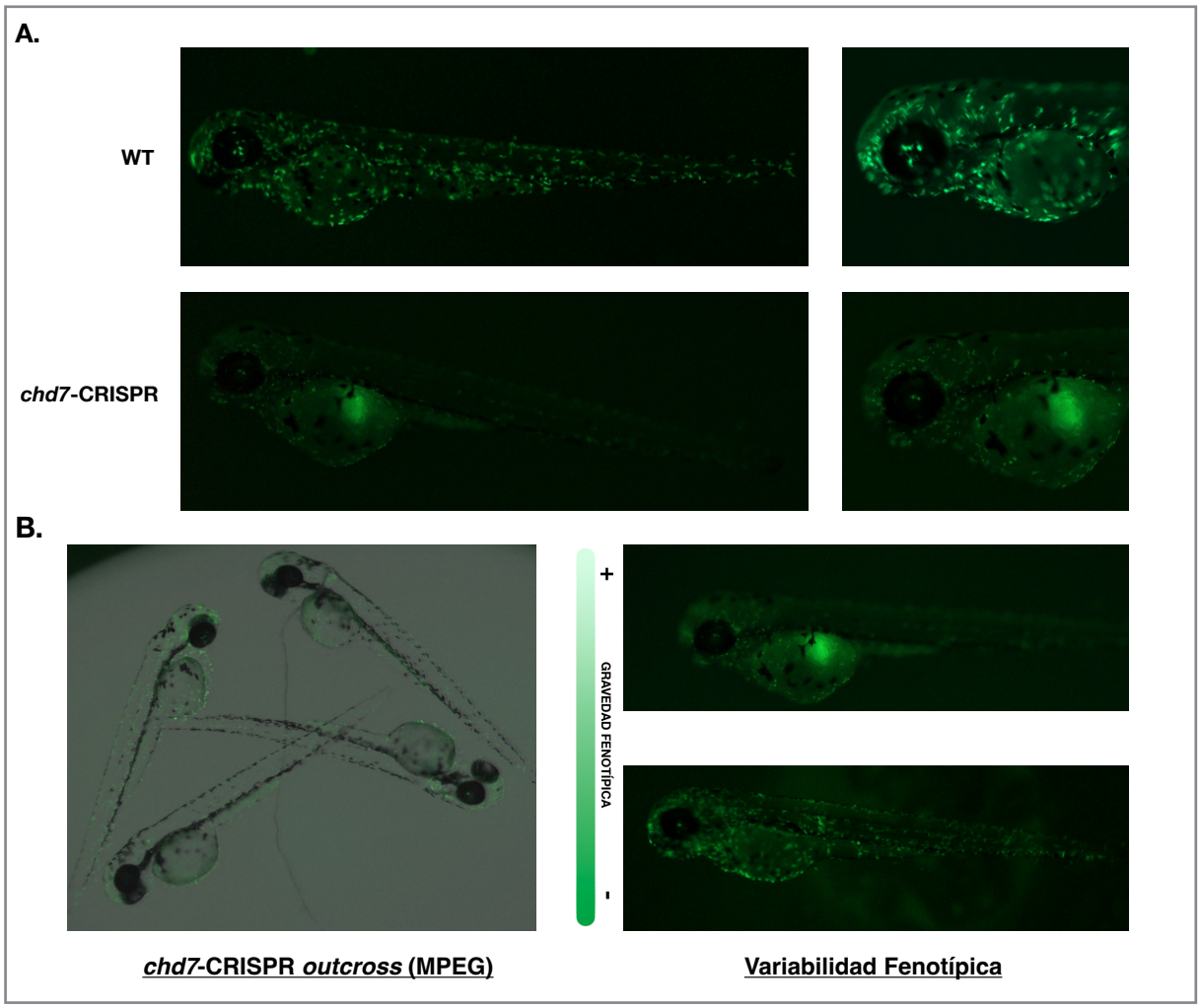


Figura 32. A. Embriones WT-MPEG y *chd7*-CRISPR-MPEG *outcross* 48 hpf. B. Variabilidad fenotípica de los embriones outcross *chd7*-CRISPR en la expresión de células de macrófagos MPEG. Los embriones mutantes chd7-CRISPR heterocigotos, no muestran diferencias con sus hermanos WT en la intensidad ni número de células fluorescentes, lo que implicaría un componente únicamente materno para el linaje de estas células. La pérdida de estos macrófagos tan tempranos en el desarrollo podría implicar un mal establecimiento del resto de tejidos.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

3.6. LOS EMBRIONES *CHD7*-CRISPR DESCENDIENTES DE UN *INCROSS* PRESENTAN ALTERACIONES EN LOS PATRONES DE EXPRESIÓN GÉNICA

Al contrario que en los embriones mutantes heterocigotos descendientes de un *outcross* (Arana, 2016) donde no se observan diferencias, a las 96 hpf la expresión de *chd7* aparece aumentada en los embriones heterocigotos y significativamente aumentada en los homocigotos descendientes de un *incross*, en comparación con sus hermanos WT (Fig. 33). En el caso de otros genes del desarrollo estudiados que guardan relación con *chd7*, no se han encontrado diferencias significativas entre los distintos genotipos. En algunos casos, la expresión del homocigoto es comparable a la de los WT y distinta a la de los heterocigotos, pero en otros casos, la expresión sigue una tendencia ascendente o descendente conforme gana alelos mutados (Fig. 33).

Para estudiar las alteraciones en los patrones de expresión del desarrollo debidas a la deficiencia en *chd7* por la mutación *chd7*-CRISPR, se agruparon embriones de 96 hpf, descendientes de un *incross*, separándolos según su genotipo, WT, mutantes heterocigotos y homocigotos, y se extrajo su RNA para comparar alteraciones en la expresión de algunos genes con respecto a la de los hermanos WT.

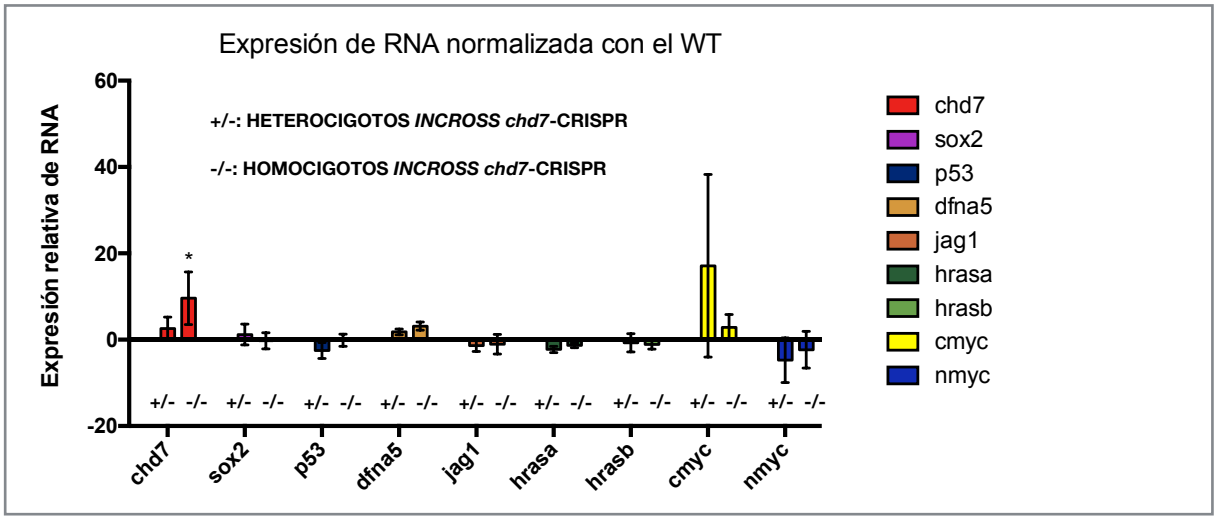


Figura 33. Expresión relativa de RNA a las 96 hpf embriones *chd7*-CRISPR. Se hicieron grupos de embriones de un cruzamiento *incross chd7*-CRISPR para el mismo genotipo, WT, heterocigotos (+/-) y homocigotos (-/-). Se normalizó el valor de los mutantes con respecto a la expresión de los hermanos WT. Se representan las medias ± SEM. La significación se halló mediante *unpaired t-test* de los mutantes entre ellos. * = $p < 0,05$. Se observa una desregularización para todos los genes, sin embargo, no se observa una tendencia clara entre heterocigotos y homocigotos para *chd7*-CRISPR. Las variaciones observadas son muy grandes dentro de los grupos, lo que indica que no todos los individuos presentan patrones de expresión iguales. Los aumentos en la expresión de *chd7* parece implicar que el mecanismo de compensación genética u otros mecanismos están afectando a la expresión de *chd7*, aumentándola, pero las variaciones tan grandes indican que esta compensación afecta de manera independiente al genotipo. No todos los heterocigotos u homocigotos compensan de igual forma, lo que podría implicar una expresión específica de alelos o genes compensadores.

El gen *chd7* estaba sobreexpresado en estos grupos de individuos y algunos de los genes del desarrollo estudiados, estaban desregulados al alza o a la baja, usando como normalizador la expresión de los embriones hermanos WT (Fig. 33). Los resultados entre individuos del mismo grupo muestran una variabilidad muy amplia entre individuos, sobre todo entre los individuos heterocigotos, pero también en los WT. Con esta variabilidad dentro de los grupos, utilizar a los hermanos WT de cruzamientos *incross* como normalizador no es aconsejable.

USC DE SANTIAGO

3.6.1. Los Embriones *Chd7*-CRISPR Descendientes de un *Incross* Presentan un Fenotipo en la Expresión de Genes Relacionado con la Gravedad Fenotípica

Quisimos observar entonces, si la variabilidad genética de la expresión dentro del grupo se hacía más uniforme, si seleccionábamos a los individuos según el fenotipo en lugar del genotipo, y utilizar a los embriones *chd7*-CRISPR (mutantes maternos) WT descendientes de un cruce *outcross* como control. En este experimento, se realizaron *pools* de embriones de 96 hpf, descendientes de un *incross*, seleccionándolos según su fenotipo, y se extrajo su RNA para comparar las diferencias en la expresión con respecto a la de individuos WT.

Encontramos una variabilidad menor entre los grupos, y las tendencias se hacen significativas para casi todos los genes. La mayoría de los genes analizados, como *sox2, dfna5 o p53,* muestran una desregulación al alza de la expresión (Fig. 34), mientras que otros como *jag1b* están desregulados a la baja en el grupo de mutantes homocigotos con fenotipo grave. Estos resultados todavía están pendientes de confirmación. Además, se debería comprobar si esta desregulación dependiente de fenotipo, afecta igual a todos los fenotipos y genotipos: salvajes, mutantes, maternos o cigóticos.

Las diferencias entre los mutantes maternos y cigóticos observadas en los cruzamientos *outcross*, nos llevan a decir que la contribución materna es muy grande en el pez cebra. Hemos observado que los fenotipos en los cruzamientos *outcross* con una madre mutante, los fenotipos son más graves que con el padre mutante. Lo que implica la gran contribución de *chd7* al ovocito. Sin embargo, tenemos indicios de que los fenotipos de los embriones podrían estar agravándose con la edad de los progenitores.

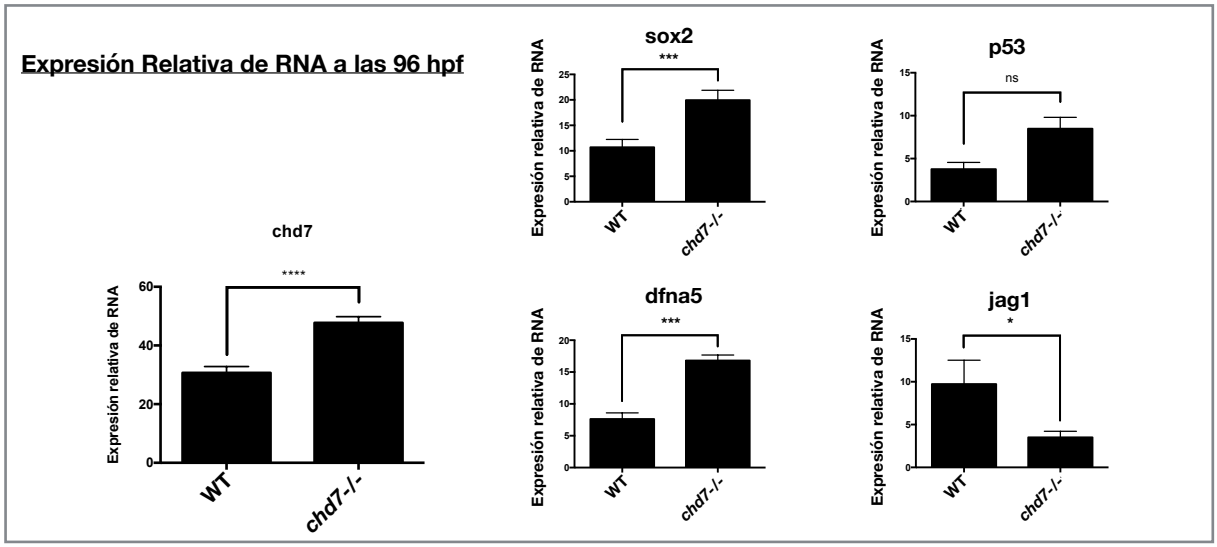


Figura 34. Expresión relativa de RNA a las 96 hpf. Embriones WT y embriones *chd7*-CRISPR seleccionados fenotípicamente con fenotipo CHARGE grave de un cruzamiento *incross* (mutantes materno-cigóticos). WT: embriones WT de 96 hpf. *chd7-/-*: embriones seleccionados fenotípicamente para *chd7*-CRISPR de 96 hpf.

3.6.2. La Deficiencia en Chd7 Produce Alteraciones en la Expresión de *Sox9B*

A falta de embriones mutantes para *chd7*, por la falta escasez de las puestas, en algunas ocasiones recurrimos al uso único de los morfolinos para el estudio del gen *chd7* y sus implicaciones en el desarrollo, a la espera de que volvieran las puestas. El gen *sox9b* es un factor involucrado en muchos de los procesos del desarrollo de órganos como el oído, la morfogénesis de la aleta pectoral del embrión, y la diferenciación de iridóforos en el ojo.

En la ISH para *sox9b*, tanto en WT como en morfantes para *chd7* a las 48 hpf, podemos observar expresión en las mismas estructuras (Fig. 35). Sin embargo, la expresión de *sox9b* parece estar alterada. Presenta una menor intensidad, lo que implicaría una menor expresión, una menor densidad de células o células más pequeñas en ese tejido. En cualquier caso, también se observan malformaciones en todas las estructuras marcadas como la vesícula ótica, el bulbo de la aleta pectoral, los arcos faríngeos, la retina, o la zona ventricular del cerebro.
En un experimento realizado en el I3S de Porto (Portugal), inyectamos morfolinos contra *chd7* en embriones transgénicos, que contienen un gen *reporter* de GFP, para las células que expresan *sox9b,* a través de un promotor (CRE, del inglés, cis-*Regulatory Element*) pancreático de este gen. Así, en las mismas células en las que se induce la expresión de *sox9b* se induce la expresión de GFP. En los embriones WT de 22-25 hpf se observa que la expresión medida a través del GFP inducida a través del promotor, se localiza en el *forebrain*, en el *midbrain*, en el bulbo de la aleta pectoral y en el ojo. La expresión de GFP está reducida o ausente en MO-*chd7*. Esto demuestra que la proteína de pez cebra *chd7* tiene la capacidad de regular el CRE pancreático humano de *SOX9* generado en el i3S (Porto). por el investigador João Pedro Amorim del grupo de Jose Bessa (VDR).

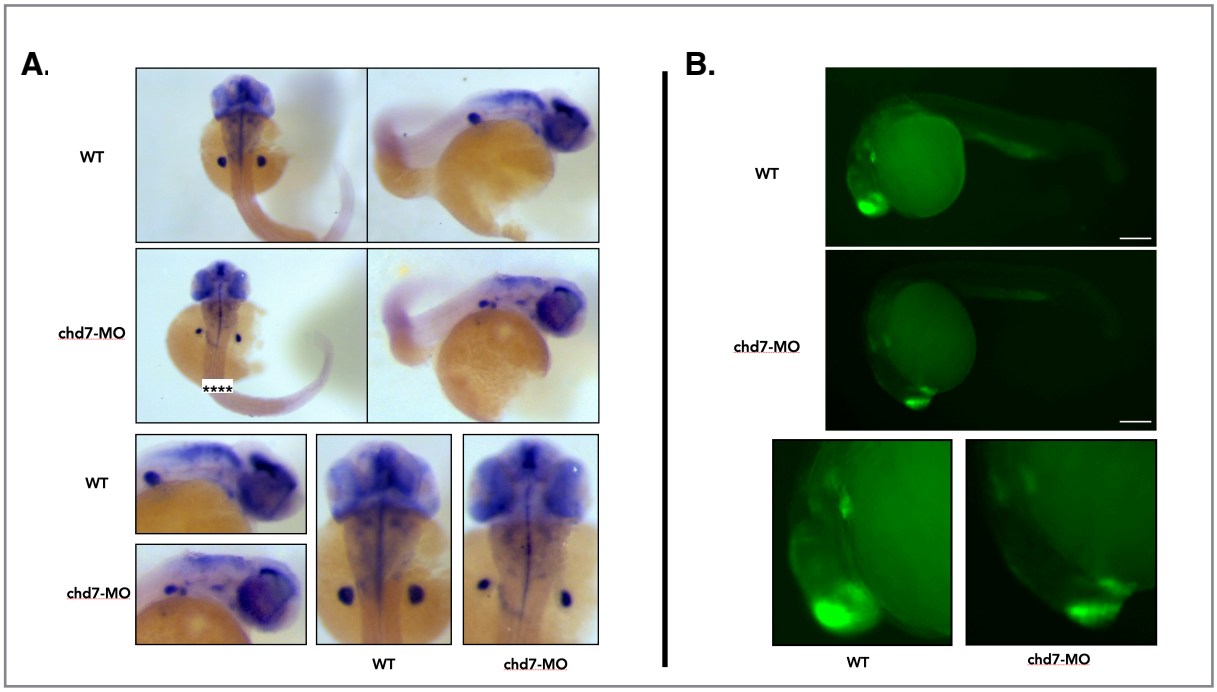


Figura 35. Embriones morfantes para *chd7* a las 48 hpf marcados por hibridación *in situ* para *sox9b. 35*B. Embriones morfantes para *chd7* que muestran la expresión relativa de *sox9b* por fluorescencia en las células que expresan *sox9b* entre las 22-25 hpf. La deficiencia de *chd7* produce una reducción en la expresión de los genes *sox9,* los cuales se expresan en los arcos faríngeos y en el pericondrio. En los embriones WT a las 48 hpf se observa la expresión de *sox9b* en tejidos como la retina, *midbrain* y *forebrain*, los bulbos de las aletas pectorales y la vesícula ótica. Estos tejidos coinciden espacio-temporalmente con la expresión de *chd7*, la senescencia embrionaria y aparecen afectados en nuestros mutantes *chd7*-CRISPR. Mientras en la hibridación *in situ* a penas se puede valorar la diferencia de expresión de *sox9b*, en los morfantes para *chd7* que emiten fluorescencia relacionada con la expresión de *sox9b* se observa una disminución en estos tejidos. Esta alteración en la expresión de *sox9b* debida a la deficiencia de *chd7* podría ser la causa de las irregularidades y alteraciones observadas en mutantes y morfantes para *chd7,* pudiendo mencionarse las malformaciones de los cartílagos craneofaciales y de las aletas pectorales, las anomalías óticas, y las alteraciones en el desarrollo de los ojos e incluso las alteraciones del comportamiento de los mutantes adultos *chd7*-CRISPR.

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

3.7. LOS ADULTOS HETEROCIGOTOS DE *CHD7*-CRISPR PRESENTAN UN FENOTIPO DISTINTIVO

Los síntomas observables en los pacientes con síndrome de CHARGE son las que se observan después del desarrollo. Al nacer ya presentan malformaciones faciales muy notables. En los ojos más del 80 % presentan coloboma e incluso ceguera, y en los oídos presentan malformaciones tanto del oído interno como externo. Al criar los peces de la F3 y llegar a la edad adulta, observamos un fenotipo similar en algunos de los mutantes heterocigotos para *chd7*-CRISPR adultos morfológicamente visibles, pero no en los homocigotos WT (Fig. 36). La capacidad de identificar fenotipos adultos viables presenta una oportunidad para desarrollar modelos de pez cebra para enfermedades genéticas humanas,Al llegar a los 2 años de infantiles y adultas. Estos mutantes muestran (Fig. 36A, 36B y 36C), forma corporal alterada (diez), ojos más grandes (ocho), defectos en las aletas (cinco), comportamiento alterado (tres), huesos más anchos (uno), mandíbula prominente (cinco).

Al llegar a los 2 años de edad, los adultos sin genotipar de un grupo de descendientes de heterocigotos *chd7*-CRISPR comenzaron a presentar este fenotipo característico de malformaciones que los hacía distinguibles. Se genotiparon todos los individuos de la pecera y se comprobó que aquellos que presentaban este fenotipo eran mutantes heterocigotos *chd7*-CRISPR. Más tarde este fenotipo se volvió a ver en otros individuos de otros cruces de heterocigotos *chd7*-CRISPR. En los peces heterocigotos mutantes *chd7*-CRISPR el ojo y la pupila son significativamente más grandes que en los individuos WT, y en algunos individuos se pueden apreciar manchas en los ojos que no se observaron en individuos WT. También se encontraron malformaciones histológicas en las distintas capas que forman el ojo (Fig. 36C). Sin embargo, estos individuos sí que parecen mostrar algún tipo de fotosensibilidad, ya que parecen comportarse de manera distinta cuando hay luz y cuando están a oscuras.

Es bastante notable una joroba situada en la parte media dorsal del cuerpo y una mandíbula inferior más prominente, sobre todo en hembras. Los *chd7*-CRISPR, en general, exhiben un comportamiento más voraz, además estos son más grandes y pesan más que sus hermanos WT. La cavidad ocular significativamente mayor (Fig. 36B). En un ensayo piloto observamos que los peces adultos heterocigotos *chd7*-CRISPR parecen tener los huesos más anchos que los peces WT (Fig. 36B). La aleta pectoral es significativamente más pequeña en los mutantes *chd7*-CRISPR que la de los adultos WT (Fig. 38A). Mientras, los peces mutantes tienen las aletas más anaranjadas y curvas, los peces WT presentan una aleta pectoral de color amarillo pálido y con forma de abanico. Un menor tamaño de las aletas también se observa en algunos de los embriones descendientes de un *incross* de *chd7*-CRISPR, pero esta diferencia no ha sido significativa entre los diferentes genotipos de descendientes (Fig. 30).

En el caso de los dos únicos homocigotos que llegaron a la edad adulta se caracterizaban por presentar, a diferencia de los heterocigotos, un tamaño notablemente más pequeño y compacto que los WT. Por desgracia no tenemos registro fotográfico ni morfométrico. La razón de la falta de registro, es la muerte prematura de ambos. Pasan dos o tres meses hasta que el pez ya es adulto y se puede genotipar con facilidad a partir del corte de la aleta. Estos individuos hasta entonces se desconoce su genotipo. La muerte prematura de ambos podría estar relacionado con precisamente el momento de comenzar a manipularlos, y el estrés que eso les genera.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

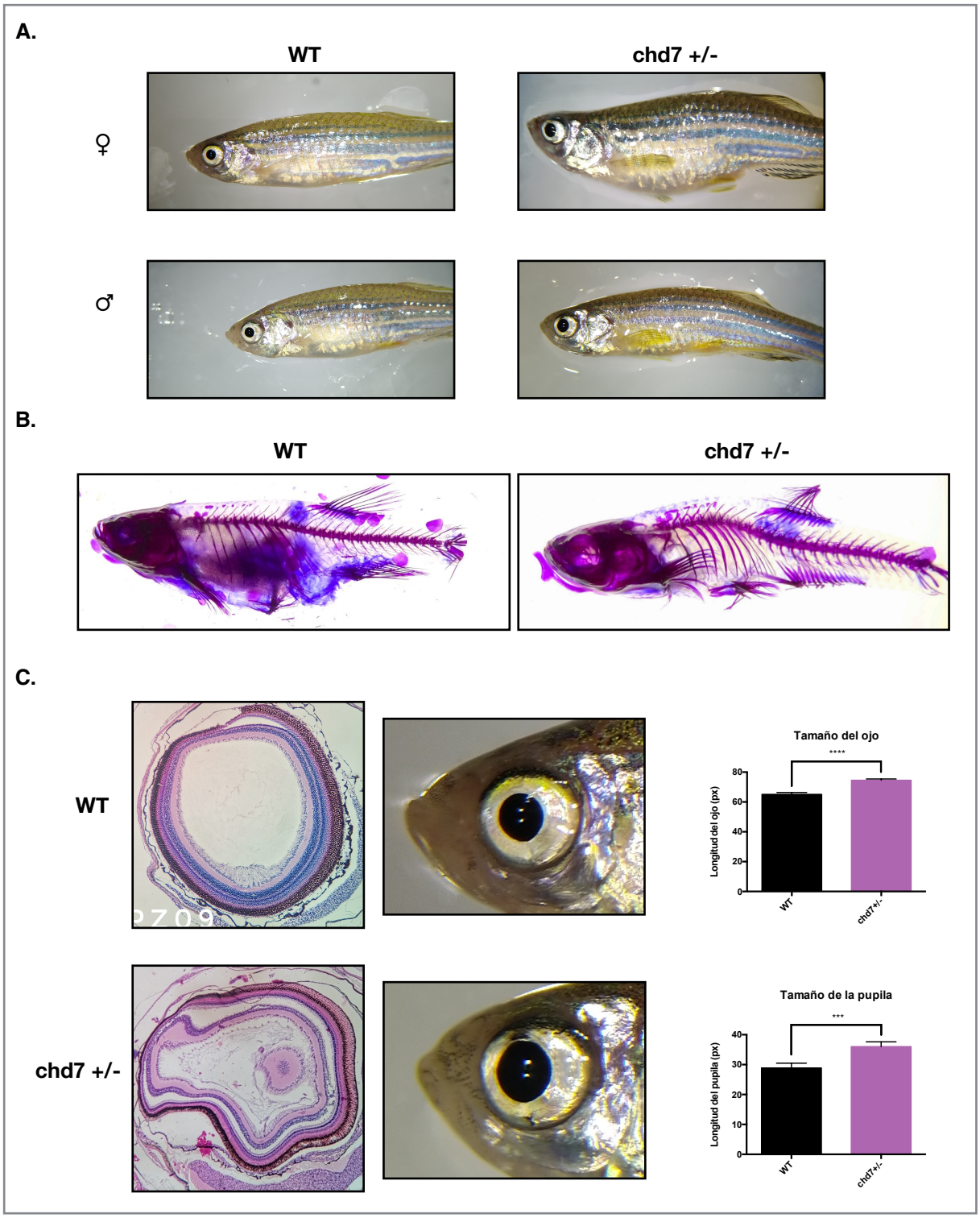


Figura 36. A. Diferenciación fenotípica entre individuos adultos WT (WT) y adultos *chd7*-CRISPR (chd7+/-) heterocigotos. B. Adultos teñidos con rojo alizarina para observar las estructuras óseas. C. Defectos ópticos microscópicos e histológicos de los ojos de los adultos chd7-CRISPR y gráficas del análisis de las estructuras. Se observan defectos histológicos graves en ojos e intestinos (imágenes no mostradas). Microscópicamente, se observa un mayor tamaño del ojo, el globo ocular y la pupila de los mutantes *chd7*-CRISPR. El tamaño y peso de los mutantes adultos también es mucho mayor que él de sus hermanos WT y otros WT. El comportamiento es muy voraz, aunque no se asocia agresividad. En general, entre individuos del mismo cruzamiento, no suele destacar un comportamiento anormal en la población, ni individualmente, entre otras poblaciones. La significación se halló mediante *unpaired t-test* (*** = $p < 0{,}001$; **** = $p < 0{,}0001$).

3.8. Los mutantes *chd7*-CRISPR presentan alteraciones en los patrones de comportamiento

Aunque similar en la mayoría de los casos, el comportamiento de algunos mutantes heterocigotos adultos para *chd7*-CRISPR es distinto al de los WT (Fig. 37A y 37B). Ambos tienen mayor actividad cuando están a oscuras, pero la actividad en ambos momentos, aunque no de manera significativa, es mayor en los mutantes. Algunos mutantes estaban más agitados cuando estaban a oscuras, mientras que cuando tenían luz estaban más tranquilos, reducían el tiempo y los momentos de agitación y aumentaban el tiempo en reposo (Fig. 37C.1).

El número de eventos en cada estado es muy variable entre individuos (Fig. 37C.2), por lo que habría que buscar otra forma de analizar este dato, probablemente de forma individual. Aun así, se observa que el mutante tiene una mayor tasa de eventos de todos los tipos en comparación con los individuos WT.

La duración de estos eventos parece más estable en los WT que en los mutantes en los casos de actividad media, tanto en luz como oscuridad (Fig. 37C.3). Los mutantes parecen tener una mayor actividad media en los períodos de luz. Los estados de actividad son iguales tanto en luz como en oscuridad en los WT, mientras que los mutantes están más agitados durante los períodos de oscuridad, y menos incluso que los WT cuando hay luz. En el estado de reposo es en donde los WT parece varían al alza este tiempo en los momentos de oscuridad en comparación con los mutantes.

Los individuos WT presentaron mayor movilidad total en los momentos de actividad lumínica (Fig. 37C.1). En general, parece que los mutantes permanecen más paralizados, mientras que los WT realizan movimientos más bruscos (Fig. 37C), lo que puede explicar por qué estos últimos tienen valores de movilidad total más altos. También parece que ambos individuos están más paralizados en oscuridad que en actividad lumínica. En las imágenes podemos observar cómo ambos nadan tanto cuando hay luz como cuando están oscuras como queriendo buscar una salida, por lo que acaban dando vueltas en círculos (Fig. 37B). Pero cuando hay luz, mientras los mutantes *chd7*-CRISPR y WT cruzan de un lado a otro de la pecera, algunos mutantes apenas hacen cruces por el centro, o hacen menos cruces que sus compañeros WT.

Cuando están a oscuras, aunque también dan vueltas alrededor de la pecera como los WT (Fig. 37B), estos mismos mutantes *chd7*-CRISPR nadan por el centro sin apenas movimientos rápidos y con muchas paradas (Fig. 37C.2), como si el estímulo de la ausencia lumínica los tranquilizase. En cambio, los individuos WT rodean la pecera sin cambiar de dirección y con movimientos más fluidos y acelerados (37C.1), sin atravesar la pecera, como si sintieran inseguridad al cruzar por el centro o estuvieran buscando la salida, pegados al borde (Fig. 37B).

Los cambios en el comportamiento de los peces mutantes heterocigotos *chd7*-CRISPR indican que, a pesar de la deficiencia y de los defectos aparentes en los ojos de los adultos, estos individuos son fotosensibles de algún modo, sin embargo el mecanismo de recepción o de respuesta o los estímulos probablemente estén alterados por algún problema neuronal asociado al desarrollo.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

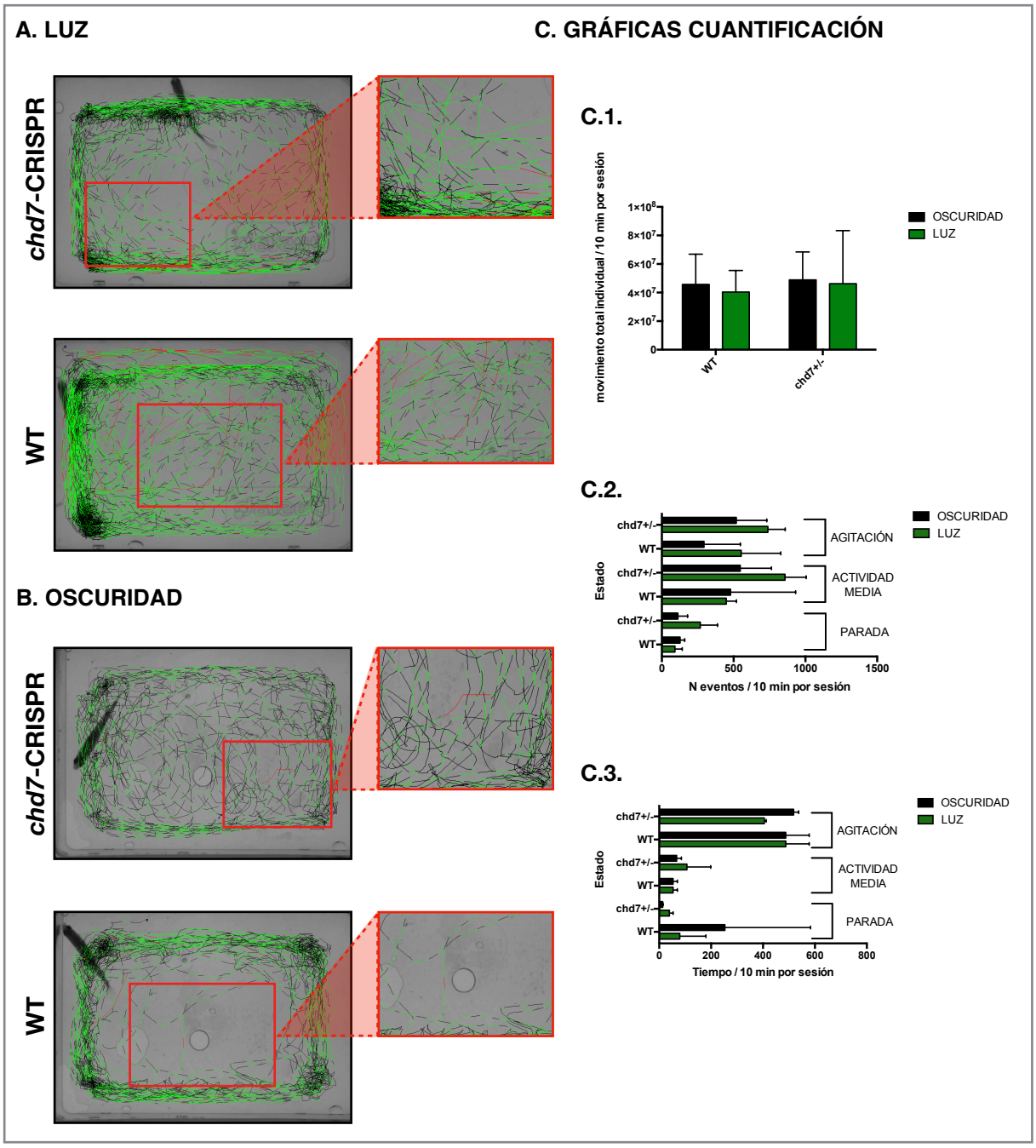


Figura 37. A. Seguimiento de los peces adultos heterocigotos *chd7*-CRISPR y WT en los momentos de actividad lumínica (LUZ). B. Seguimiento de los peces adultos heterocigotos *chd7*-CRISPR y WT en los momentos de inactividad lumínica (OSCURIDAD). Para ambos seguimientos se mide la locomoción del animal y su centro de gravedad. Presentación de los estados umbrales de locomoción del movimiento: ACTIVIDAD BAJA: línea color negro; ACTIVIDAD MEDIA: línea color verde; AGITACIÓN: línea color rojo Para cada uno de estos estados se miden los siguientes resultados: recuento/frecuencia, duración y distancia **C.1. Cantidad global de movimiento del animal en los tanques y su frecuencia. C.2. Recuento del número de eventos en cada estado: PARADA, ACTIVIDAD MEDIA AGITACIÓN. 36C.3. Duración total en cada estado:** PARADA, ACTIVIDAD MEDIA, AGITACIÓN. No se halló significación alguna para estos resultados. Los peces adultos WT (WT) presentan una mayor actividad (líneas verdes y negras), y un patrón de movimiento rectilíneo y regular tanto en luz como oscuridad. Los adultos heterocigotos *chd7*-CRISPR *incross* (MUT) apenas muestran movimiento rectos completos, la mayoría de los movimientos no completan la trayectoria y se desvían del camino. El número de eventos de agitación, actividad media y parada, parece aumentar en los mutantes, pero no el tiempo de duración, lo que parece que son sensibles a los estímulos, pero rápidamente pierden la conexión, lo que explicaría los cambios de trayectoria.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Además de diferencias en el comportamiento de los adultos, quisimos también analizar si existían diferencias, entre WT y embriones descendientes de un *incross* para *chd7*-CRISPR, en las pautas del comportamiento y las respuestas que ocurren en momentos tempranos en el desarrollo. Recordemos que, aunque siga siendo un embrión, los embriones de pez cebra a las 48 hpf ya son móviles, y deben estar en contacto y alerta a los estímulos del medio externo al que se enfrenta, y en el que continúan su desarrollo tras la eclosión del huevo.

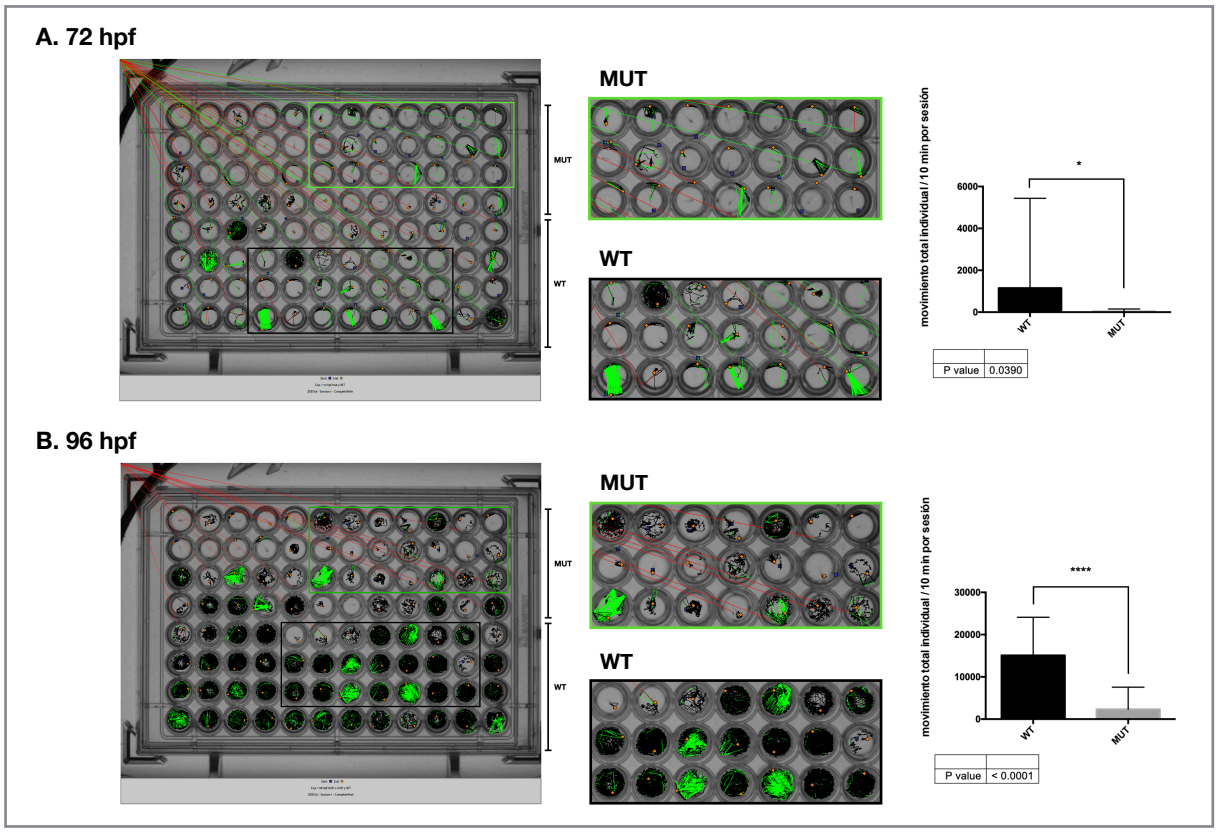


Figura 38. A. Seguimiento y estudio del comportamiento de los embriones *chd7*-CRISPR *incross* y WT en los momentos de actividad lumínica e inactividad lumínica a las 72 hpf. B. Seguimiento y estudio del comportamiento de los peces embriones *chd7*-CRISPR *incross* y WT en los momentos de actividad lumínica e inactividad lumínica a las 96 hpf. Los embriones WT (WT) presentan una mayor movilidad (líneas verdes y negras), y un patrón de movimiento rectilíneo y regular. Los embriones *chd7*-CRISPR *incross* (MUT) apenas muestran movimiento, y la mayoría presentan movimientos circulares o atípicos. A las 72 hpf 29/48 mutantes no realizaron ningún movimiento, frente a 21/48 WT que no se movieron. A las 96 hpf 10/48 mutantes no realizaron ningún movimiento, mientras que todos los individuos WT se movieron. Para ambos seguimientos se midió la cantidad global de movimiento del animal en los tanques y su frecuencia. ACTIVIDAD BAJA: línea color negro; ACTIVIDAD MEDIA: línea color verde; AGITACIÓN: línea color rojo. Se representan las medias en u.a. (unidades *actinteg*) individuales de cada grupo y las barras de error de la desviación estándar. La significación se halló mediante *unpaired t-test* (* = $p < 0,05$; **** = $p < 0,0001$).

En la primera placa de 96 pocillos se introdujeron 48 embriones descendientes de mutantes *chd7*-CRISPR materno-cigóticos (*incross*) y 48 embriones con genotipo WT de 72 hpf (Fig. 38A). Tanto en luz como en oscuridad a las 72 hpf, los resultados obtenidos revelaron una movilidad significativamente menor entre los mutantes de *chd7*-CRISPR, recorriendo distancias más cortas y poco líneales. Incluso había muchos embriones sin movimiento. Los WT, al contrario, se movieron en su gran mayoría, realizando trayectorias múltiples y rectas. Los mutantes se movían con movimientos circulares y erráticos.

USC UNIVERSIDADE DE COMPOSTELA

En la segunda los observamos los mismos 48 embriones descendientes de mutantes *chd7*-CRISPR materno-cigóticos (*incross*) y 48 WT a las 96 hpf (Fig. 38B). En este segundo experimento se observó una mayor diferencia entre los embriones WT y mutantes *chd7*-CRISPR. Los individuos WT presentaron movimiento todos los individuos, mientras que los mutantes, aunque se movieron más que a las 72 hpf, la movilidad total seguía siendo significativamente menor que en WT y presentaban todavía movimientos pobres y erráticos. Como se puede observar, muchos de los embriones descendientes del *incross* no se movieron en todo el experimento. Igual que para el análisis de caracteres fenotípicos, los embriones que se usaron para el estudio de comportamiento fueron los descendientes de un *incross,* los adultos de la generación F2 heterocigota, sin tener en cuenta el genotipo correspondiente. Por lo tanto, en la población tanto de 48 como de 72 hpf mutante cabría esperar que hubiera hermanos heterocigotos y homocigotos mutantes y WT para *chd7*.

3.9. Los peces adultos *chd7*-CRISPR mutantes heterocigotos presentan alteraciones en la regeneración tisular debidas a la alteración de la senescencia embrionaria

Quisimos comprobar si además de una función cigótica en el desarrollo, la función de *chd7* como inhibidor de p53, también podría jugar algún papel en el adulto y en la regeneración tisular. En un experimento de regeneración de la aleta de adultos, se comprobó que el ritmo de regeneración tras el corte es menor y acompañado de malformaciones. Al comenzar el ensayo, la aleta de los mutantes *chd7*-CRISPR heterocigotos era significativamente menor que la de los WT (Fig. 39).

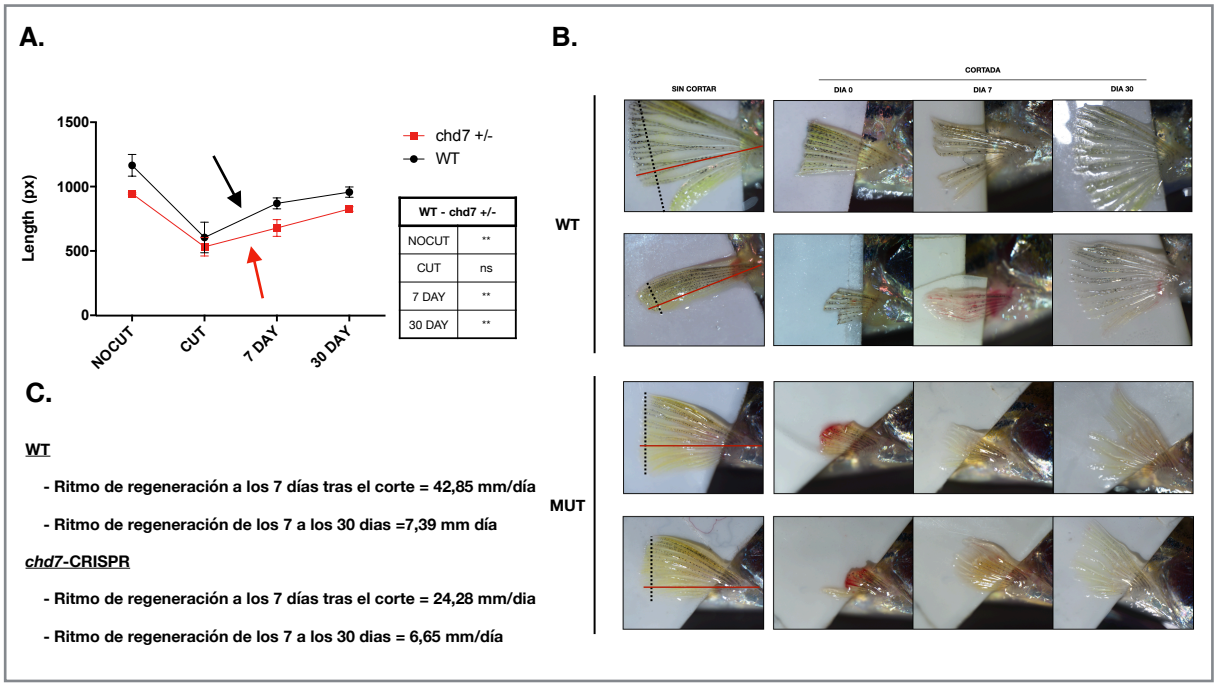


Figura 39. Estudio de regeneración de la aleta pectoral en peces cebra adultos mutantes *chd7*-CRISPR heterocigotos A. Medidas de las aletas sin cortar (NOCUT) cortada (CUT) y tras el corte a los 7 días (7 DAY) y a los 30 días (30 DAY). B. Imágenes de las aletas sin cortar (NOCUT) cortada (CUT) y tras el corte a los 7 días (7 DAY) y a los 30 días (30 DAY). C. Ritmo de regeneración de la aleta tras el corte a los 7 días y de los 7 a los 30 días. Los experimento fueron realizados con adultos WT (WT) y adultos heterocigotos *chd7*-CRISPR (MUT). Las aletas se midieron desde el pliegue de la articulación hasta el punto tangente perpendicular al límite vertical exterior (Fig. 38B). La significación se halló mediante *unpaired t-test* (** = $p < 0,01$; ****).

USC
BIBLIOTECA HISTELA

Al acabar el experimento, a los 30 días tras el corte, las aletas de todos los peces adultos se regeneraron, aunque más lentamente en los mutantes *chd7*-CRISPR (Fig. 39A). Los WT recuperaron prácticamente el tamaño original a los 30 días. Sin embargo, las aletas de los mutantes exhibía un fenotipo de regeneración aberrante y morfológicamente tenían los extremos más abiertos y curvados (Fig. 39B). Observamos que el ritmo de regeneración en los mutantes *chd7*-CRISPR es mucho más lento y progresivo (Fig. 39C), mientras que en los WT, el ritmo de regeneración es muy rápido durante los 7 primeros días, y luego se hace más lento hasta completar la regeneración.

En este sentido, pensamos que igual que en el desarrollo embrionario, la deficiencia en *chd7* podría estar causando algún daño en el mecanismo de reparación de tejidos a través de la senescencia celular. En las aletas teñidas con SA-β-Gal se observa que los embriones son capaces de activar el programa de senescencia celular para la regeneración de tejidos, y parece que en mayor intensidad que los WT (Fig. 40), lo que podría implicar una regeneración más lenta, y las malformaciones observadas.

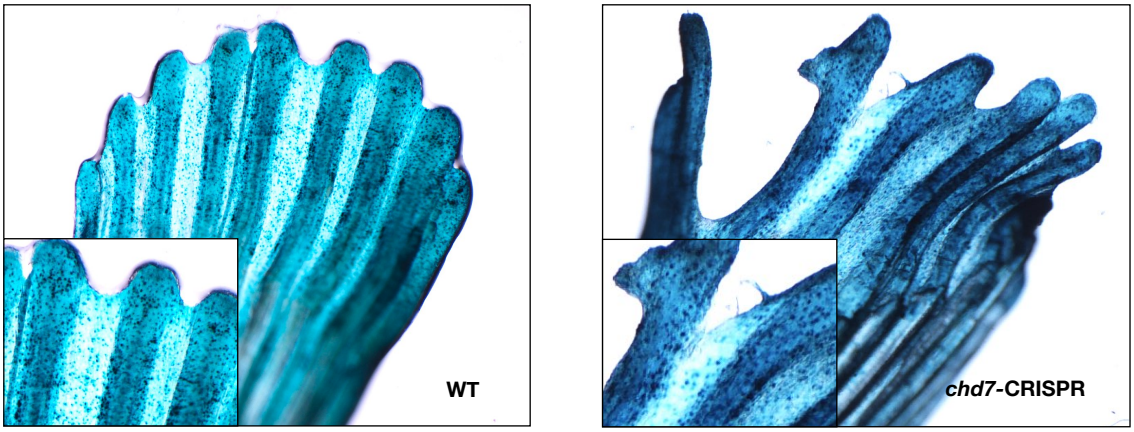


Figura 40. Aletas cortadas y regeneradas tras 30 días teñidas con SA-β-Gal. Las diferencias en la intensidad pueden deberse a errores en la tinción. El experimento fue realizado con n = 4 (WT: n = 3; chd7-CRISPR: n = 1).

Las alteraciones en el programa de senescencia podrían provocar también las malformaciones en el tejido. Aunque el patrón de intensidad y la disposición de las células senescentes son bastante llamativos, la mayor intensidad de la tinción puede deberse al propio tejido o los tiempos de exposición a la tinción, por lo que este resultado hay que confirmarlo y utilizar técnicas de cuantificación más precisas.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

4. RELACIÓN ENTRE LA EXPRESIÓN DE *CHD7* Y LA SENESCENCIA EMBRIONARIA

La senescencia embrionaria ocurre durante el desarrollo embrionario como un programa bien establecido, en unos momentos y en lugares concretos. Los peces cebra tienen la característica de que los descendientes de una misma puesta de un cruce de WT tienen un desarrollo sincrónico, lo que permite observar bien estos eventos de senescencia embrionaria en un número elevado de individuos.

- Los embriones descendientes de los *incross* de *chd7*-CRISPR además de una alta mortalidad (Fig. 21), presentan un desarrollo embrionario desincronizado (Fig. 22, 23 y 24), lo que dificulta encontrar a individuos en el mismo estadio del desarrollo para realizar los experimentos.
- Los embriones descendientes del *outcross* de mutantes *chd7*-CRISPR presentan una mortalidad más reducida (Fig. 21) y a penas presentan defectos del desarrollo (Fig. 19; Arana, 2016), además de que tienen una escasa, casi nula, variabilidad fenotípica entre genotipos, en comparación con los *incross*.

Como dijimos, en un principio decidimos analizar a los descendientes de este primer cruce y observar las diferencias en la senescencia embrionaria entre hermanos WT y heterocigotos para *chd7-CRISPR*, pero más tarde volvimos a realizar los experimentos con los descendientes del *incross* seleccionándolos individualmente en el estadio del desarrollo que nos interesaba y estudiarlos fenotípica y molecularmente y comparar los resultados de ambos experimentos con WT de un cruce *incross* de WT y morfantes para *chd7* y sus controles.

4.1. LA DEFICIENCIA EN *CHD7* PRODUCE UN RETRASO TEMPORAL EN EL PROGRAMA DE SENESCENCIA EMBRIONARIA EN PEZ CEBRA

Igual que con los resultados fenotípicos para los descendientes del cruzamiento *outcross*, la intensidad de la tinción SA-β-Gal, aunque variable entre individuos, esta variación era independiente del genotipo. Sin embargo, sí se observa cierto retraso en la activación de la actividad SA-β-Gal en algunos tejidos concretos entre los descendientes mutantes heterocigotos y WT de los cruces *outcross* de *chd7*. Algunos de los resultados expuestos en estudios previos realizados en 2016 (Arana, 2016), se confirman con los resultados publicados por Da Silva-Álvarez *et al*. en 2020, como la presencia de actividad SA-β-Gal muy intensa en diferentes órganos como el saco vitelino, los conductos pronéfricos, el esófago, el intestino, así como el hígado y la lente del cristalino (Fig. 41-43). Sin embargo, en la mayoría de los tejidos, esta actividad aparece por lo menos 24 hpf antes de lo observado incluso en los hermanos WT.

Antes de la publicación de Da Silva-Álvarez *et al.* (2020) se contaba con muy pocas referencias sobre la senescencia embriones en peces cebra WT, y, por lo tanto, la única herramienta comparativa que con la que se contaba en aquel momento eran los peces cebra hermanos WT. Esto apoya todavía más la idea de la contribución materna en los hermanos WT, alterando su fenotipo y produciendo un retraso en el desarrollo de los mismos.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

4.1.1. La Deficiencia en *Chd7* Produce Alteraciones Locales en la Senescencia del pez Cebra Mutante *Chd7*-CRISPR

A diferencia de lo descrito en estudios previos (Arana, 2016), esta vez sí se ha observado la presencia de actividad SA-β-Gal en la médula espinal, así como en muchas otras zonas del sistema nervioso central (Fig. 41). La actividad SA-β-Gal comienza a ser visible a las 72 hpf, además de en algunas regiones del cerebro que no se distinguen con claridad (Fig. 41). En la médula espinal, las células con actividad SA-β-Gal se sitúan en la región dorsal, aunque con una actividad reducida.

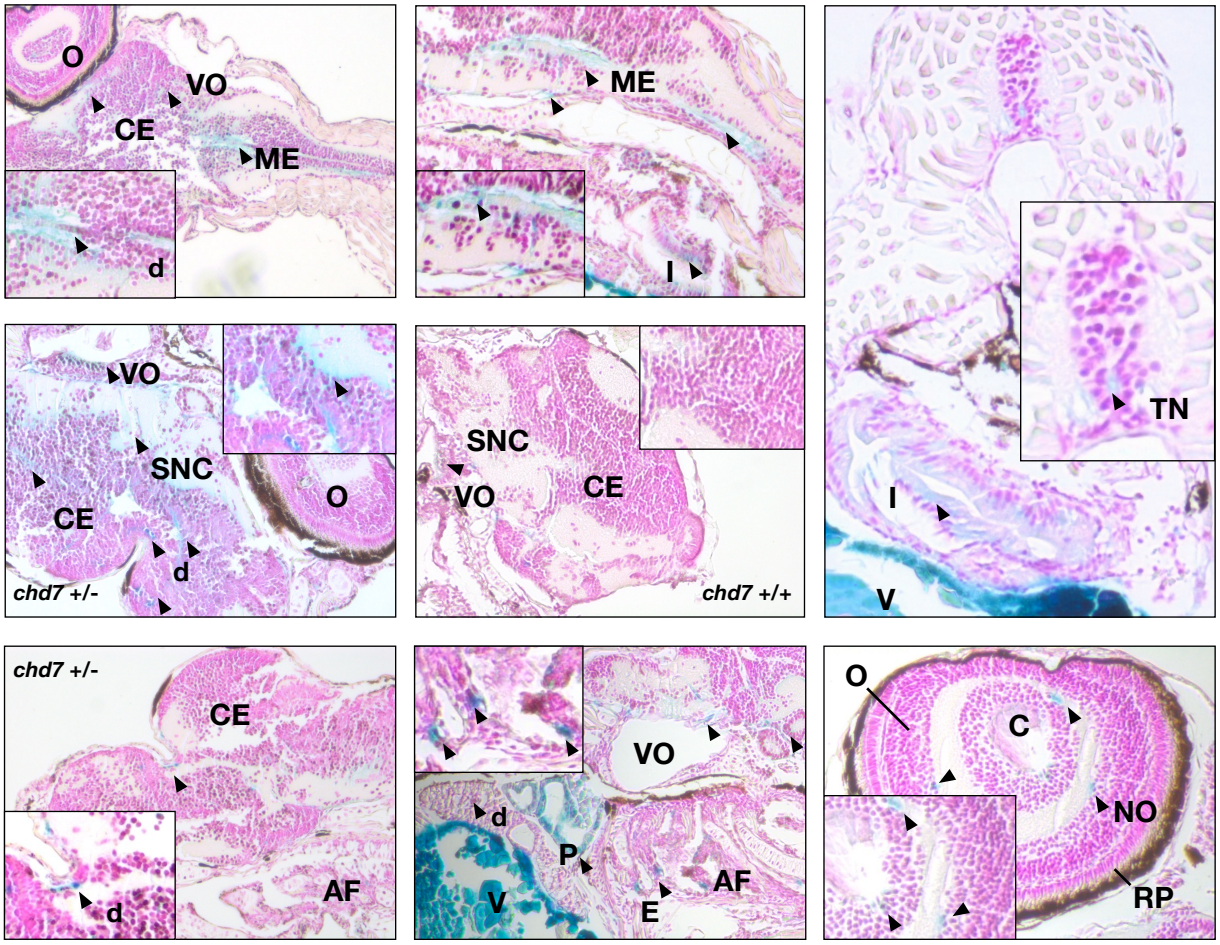


Figura 41.1 Caracterización de la senescencia embrionaria en el sistema nervioso central y de embriones *chd7*-CRISPR (*outcross*) de entre 120-144 hpf teñidos con tinción SA-β-Gal. Puntas negras: actividad SA-β-Gal en tejidos concretos: O: ojo (C: cristalino; RP: retina pigmentaria; NO: nervio óptico); SNC: sistema nervioso central (TN: tubo neural; ME: médula espinal; CE: cerebro); P: pronefros; I: intestino; VO: vesícula ótica; AF: arcos faríngeos; V: vitelo; d: desconocido.

El tejido nervioso presenta una actividad SA-β-Gal muy intensa en los heterocigotos mutantes para *chd7* y con una dispersión muy amplia, cubriendo diferentes tejidos del cerebro. En los cortes de los WT, la senescencia parece estar únicamente en el sistema nervioso central, y más recluida al tejido. En varios mutantes y unos pocos WT, también se pueden observar diferentes zonas del cerebro y los ojos, y algunas zonas sin identificar próximas a los arcos faríngeos, que presentan actividad SA-β-Gal, pero no se recubre totalmente un tejido concreto, sino que parece afectar a unas pocas células.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

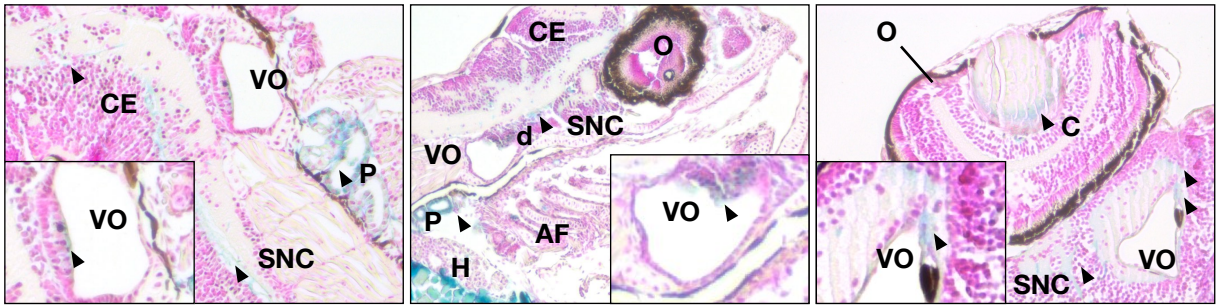


Figura 41.2 Caracterización de la senescencia embrionaria en el sistema nervioso central y los órganos sensoriales de embriones *chd7*-CRISPR (*outcross*) de entre 120-144 hpf teñidos con tinción SA-β-Gal. Puntas negras: actividad SA-β-Gal en tejidos concretos: O: ojo; C: cristalino; H: hígado; SNC: sistema nervioso central (TN: tubo neural, CE: cerebro); CE: cerebro; P: pronefros; I: intestino; VO: vesícula ótica; AF: arcos faríngeos; V: vitelo; d: desconocido.

La localización del oído interno en los cortes histológicos nos permitió observar más detenidamente este órgano. Aquí observamos actividad SA-β-Gal principalmente en las células de la mácula media y rostral y en algunas ocasiones en el tejido nervioso asociado al oído. No hemos conseguido establecer diferencias entre individuos mutantes y WT. En los embriones *outcross para chd7*-CRISPR la actividad SA-β-Gal en estos tejidos aparece a las 120 hpf y aumenta a las 144 hpf. En los individuos completos, observamos que la senescencia en la vesícula ótica comienza entre las 22 y 24 hpf (Fig. 41) independientemente del genotipo.

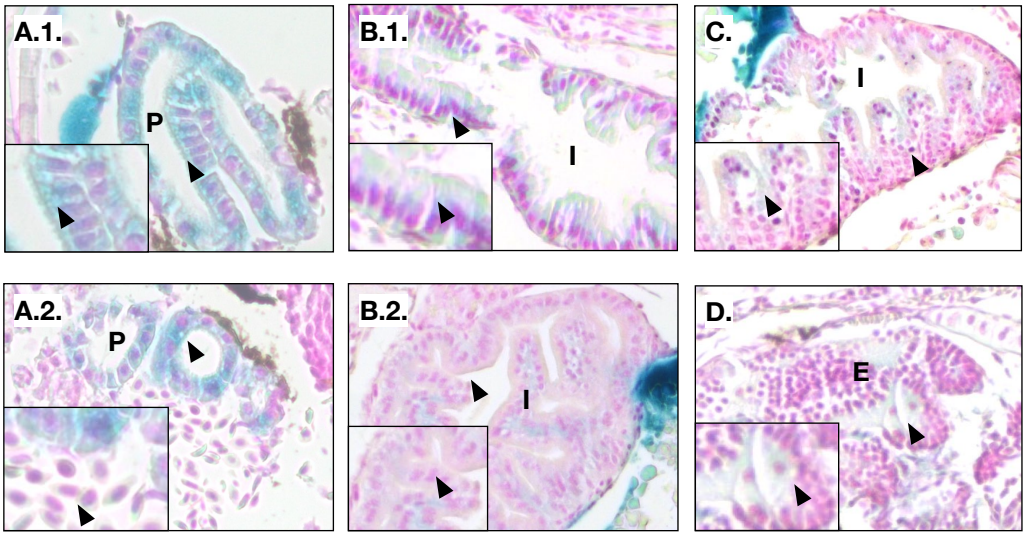


Figura 42. Actividad SA-β-Gal en órganos troncales y abdominales de los embriones *chd7*-CRISPR (*outcross*) de entre 120-144 hpf teñidos con tinción SA-β-Gal. A.1. Vista longitudinal del pronefros. **A.2.** Vista transversal del pronefros. **B.1.** Vista longitudinal del intestino. **B.2.** Vista transversal del intestino. **C.** Vista sagital del intestino. **D.** Vista transversal longitudinal del esófago. En los recuadros se muestra la actividad SA-β-Gal en la vesícula ótica. Puntas negras: actividad SA-β-Gal en tejidos concretos: P: pronefros; I: intestino; E: esófago.

En algunas ocasiones como el pronefros o el esófago (Fig. 42), gracias a la rotura del tejido, podemos observar como la senescencia no ocurre únicamente en las células que forman parte del órgano, sino que también existen células pequeñas adheridas al tejido que presentan también actividad SA-β-Gal (Ampliación Figura 42A.2.). Estas células podrían ser células migratorias de la cresta neural.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

4.1.2. Los Tejidos en los que Se Produce Actividad SA-B-Gal Son los Mismos Tejidos que Están Afectados en el Síndrome de CHARGE

Hemos querido observar con más detalle la senescencia de los dos órganos en los que se observa una mayor actividad SA-β-Gal que serían, el pronefros y el intestino. En las secciones longitudinales de ambos tejidos se observa una intensa actividad, pero el color y la localización en interior de la célula parecen distintos. Mientras en las células del conducto pronéfrico la actividad SA-β-Gal se encuentra en todo el interior celular, en las células del intestino parece que la localización es apical.

En las secciones transversales se observa más claramente esta diferencia. La actividad SA-β-Gal aparece únicamente en las células de la parte interna. En los cortes sagitales y en los cortes de esófago vemos que la actividad SA-β-Gal en las células más internas de estos órganos parece más tenues, mientras que en las células más superficiales del mismo parece más intensa. Las células de estos tejidos presentan un fenotipo mucho más alargado y plano que en el caso del pronefros, que son más cuadradas y anchas.

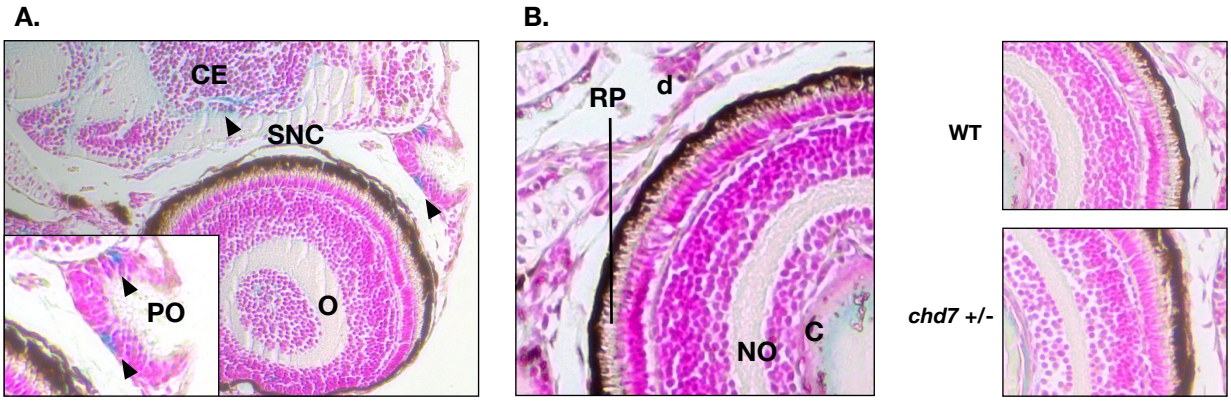


Figura 43. Actividad SA-β-Gal en embriones *chd7*-CRISPR en órganos sensoriales, tejido olfativo (A) y tejido óptico (B) entre las 120-144 hpf teñidos con tinción SA-β-Gal. Puntas negras: actividad SA-β-Gal en tejidos concretos: O: ojo (C: cristalino, RP: retina pigmentaria; NO: nervio óptico); SNC: sistema nervioso central (CE: cerebro); V: vitelo; d: desconocido. PO: placoda olfatoria.

Además de actividad SA-β-Gal durante el desarrollo embrionario en el sistema nervioso central, en los nervios ópticos y óticos, próxima a los arcos faríngeos, en varias zonas del aparato auditivo y en todos los tejidos ya descritos anteriormente en pez cebra, también se han encontrado claras evidencias de actividad SA-β-Gal en unas células de los órganos olfatorios. Aquí la actividad SA-β-Gal a las 144 hpf se presenta en una posición muy definida y de manera bilateral (Fig. 43A). Estas células pertenecen a las células de la placoda olfatoria.

Como ya suponíamos, todos los tejidos que producen senescencia aparecen afectados en el síndrome de CHARGE. Esta correlación es tan grande, que siempre que se encuentra un tejido con actividad SA-β-Gal durante el desarrollo embrionario, este suele estar afectado en los pacientes con fenotipo CHARGE. Parece que la senescencia embrionaria puede ser la causante de las malformaciones en estos tejidos por una mala entrada en senescencia o desregulaciones en el programa. Sin embargo, en todos estos tejidos ante de la senescencia también ocurren otros muchos procesos, que también están relacionados con *chd7*, y algunas afecciones parecen ocurrir antes del inicio del programa.

Además de en el cristalino y el nervio óptico (Fig. 43B), hemos encontrado una leve actividad SA-β-Gal tanto en la retina pigmentaria como en la del ojo (Fig. 43B), tanto en mutantes como WT. En los mutantes *chd7*-CRISPR esta actividad es mucho más difícil de ver

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

por el elevado número de células pigmentadas que se condensan en la retina. Sin embargo, existe y no parece menor que en los WT, pudiendo estar controlando el aumento de esas células. En este sentido, puede que la actividad SA-β-Gal controle la proliferación o migración exageradas de los tejidos y órganos que una alta actividad en estadios anteriores. Podría incluso contribuir a la mejor de los individuos o a evitar problemas más graves. Sin embargo, es evidente que la senescencia ocurre en aquellos tejidos con capacidades proliferativas, migratorias y apoptóticas, que expresan *chd7*, y que en el síndrome de CHARGE están afectados.

4.2. La deficiencia del gen *chd7* produce alteraciones en la senescencia embrionaria del pez cebra mutante *chd7*-CRISPR.

Con el objetivo de observar alteraciones en los patrones de senescencia en tejidos concretos y en estadios definidos, seleccionamos embriones mutantes y morfantes basándonos en el fenotipo y no en el tiempo transcurrido desde su fertilización. De esta forma podemos observar en qué sentido está alterada la senescencia embrionaria en un estadio determinado, en los modelos para el estudio de la deficiencia en *chd7*. La actividad SA-β-Gal presenta un patrón similar tanto en embriones WT como en todos los modelos *chd7* analizados (Fig. 44, 45 y 46). Los tejidos que presentan actividad SA-β-Gal en los embriones WT, no parecen tener un aumento o disminución en esta actividad. En la vesícula ótica esta actividad es muy notable en los embriones de 25 hpf (Fig. 45). Esta actividad aparece muy recluida en las células del interior de la vesícula tanto en embriones WT como mutantes chd7-CRISPR y morfantes para *chd7*, aunque únicamente en las de la zona ventral.

Entre los mutantes y morfantes no parece haber diferencias en cuanto a la intensidad, aunque parece haber una mayor desorganización, o zonas con mayor intensidad que otras. A las 33 hpf esta actividad SA-β-Gal se recluye aún más a la zona anterior ventral del otolito, y también en las células del interior. Esta zonalización de la senescencia se observa en embriones tanto WT como mutantes *chd7*-CRISPR y morfantes para *chd7*, y continúa siendo así por lo menos hasta las 48 hpf (Fig. 44, 45 y 46). En la lente del ojo de los embriones la actividad SA-β-Gal no se observa en los embriones de 25 hpf, pero sí en los de 33 hpf (Fig. 44). A las 48 hpf la pigmentación del ojo no hace posible observar la presencia de actividad SA-β-Gal. Sin embargo, sabemos por los datos de los *outcross* y observaciones de nuestro grupo que sí que hay senescencia embrionaria y actividad SA-β-Gal en ese momento en la lente del ojo. En unos pocos embriones mutantes y morfantes para *chd7* con fenotipo más grave (Fig. 45D, 47A y 48H), observamos actividad SA-β-Gal en poblaciones aisladas de células, como cúmulos o quistes de células senescentes aislados, pero en zonas concretas del embrión de la cabeza o la cola. Esta senescencia recuerda mucho a la que se observa en la regeneración de tejidos y muy relacionada con la apoptosis y la acumulación de macrófagos.

A las 24 hpf (Fig. 47), comienza a observarse actividad SA-β-Gal en las colas de los embriones, concretamente entre los somitas, incluso formando nódulos en posiciones concretas. En este tejido, la actividad SA-β-Gal a las 48 hpf se reduce en los mutantes y morfantes para *chd7*. Sin embargo, a las 48 hpf, comienza a notarse una actividad SA-β-Gal muy intensa entre la aleta anal y ventral, que se hace mayor en los embriones mutantes y morfantes para *chd7* (Fig. 47). Esta actividad a las 24 hpf parece menor en los mutantes y morfantes, incluso llegando a ser casi indetectable (Fig. 45). No obstante, en estos mismos organismo deficientes en *chd7* a las 48-72 hpf esta actividad se extiende (Fig. 47B).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO

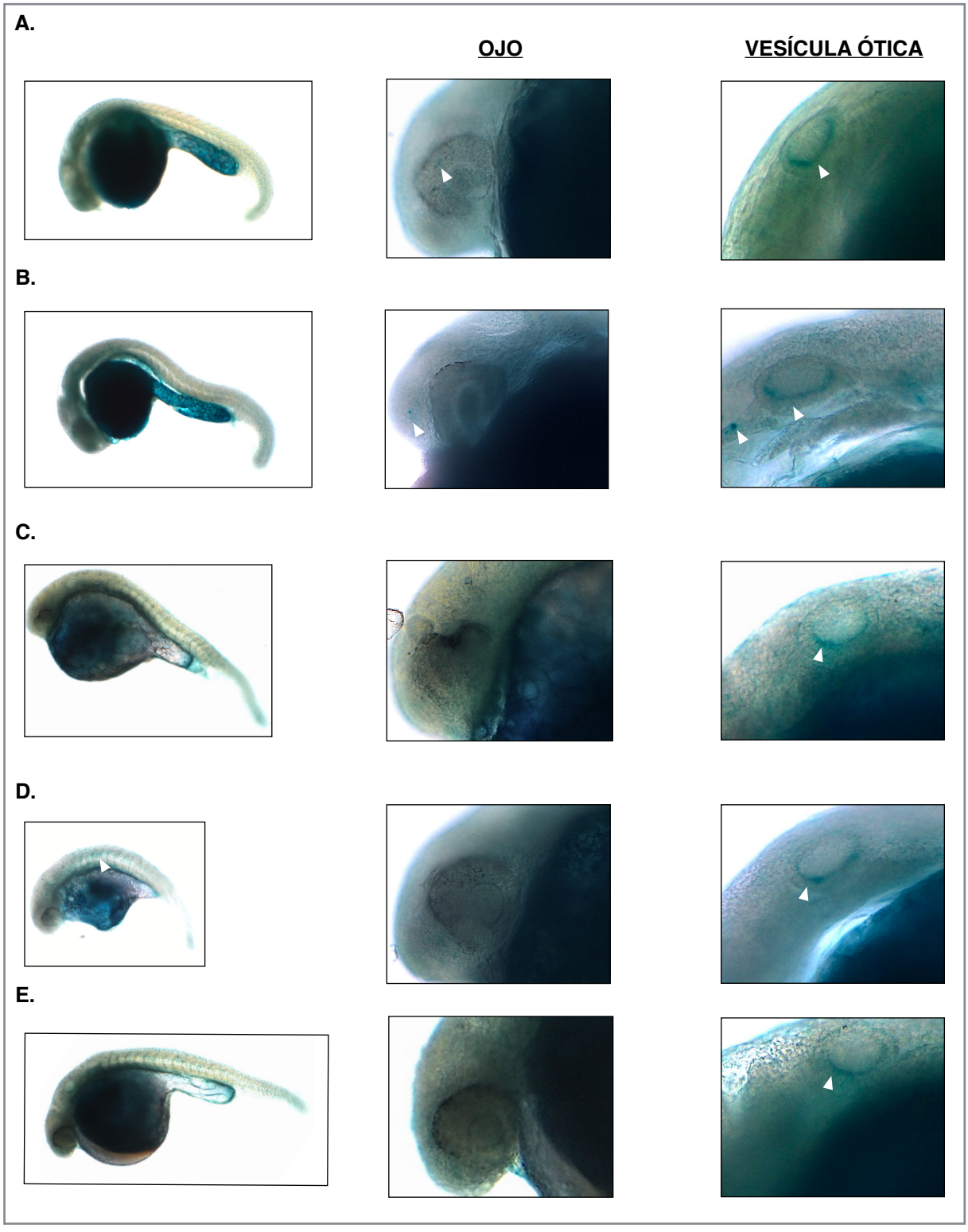


Figura 44. A. Embrión mutante *chd7*-CRISPR mutante cigótico (*outcross*). B. Embrión *chd7*-CRISPR mutante materno-cigótico (*incross*) C. Morfante *chd7*-MOtb. D. Morfante chd7-MOsb. E. Morfante *chd7*-MOb + *p53*-MO.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

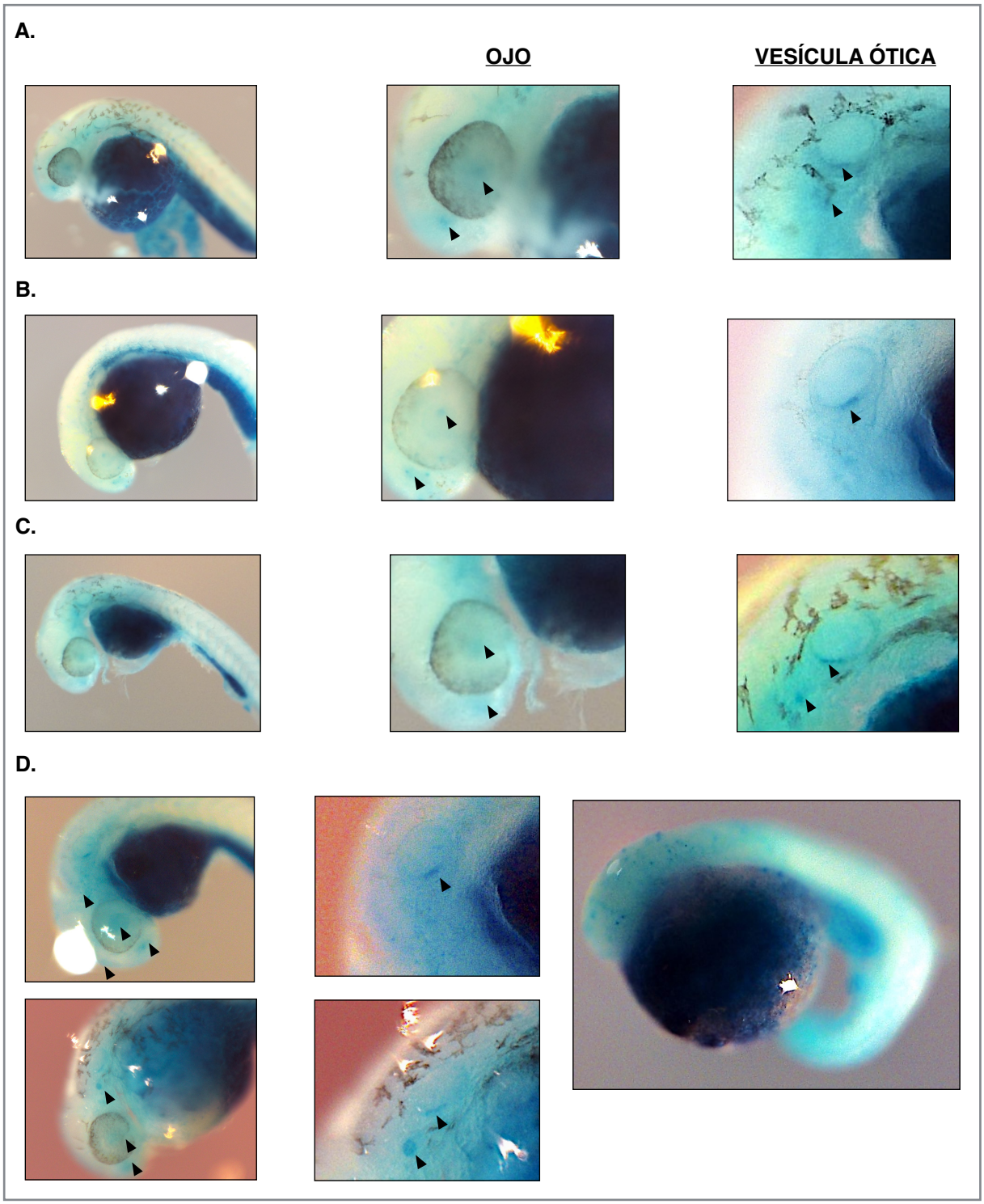


Figura 45. A. Embrión WT *chd7*-CRISPR mutante materno (*outcross*) a las 33 hpf. B. Embrión *chd7*-CRISPR mutante cigótico (*outcross*). C. Embrión morfante *chd7*-MOb y *chd7*-MO + *p53*-MO a las 33 hpf. D. Embriones *chd7*-CRISPR mutantes materno-cigóticos (*incross*) a las 33 hpf. E. Embrión *chd7*-CRISPR WT (*incross*) a las 33 hpf (ampliación en la Figura 48H).

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

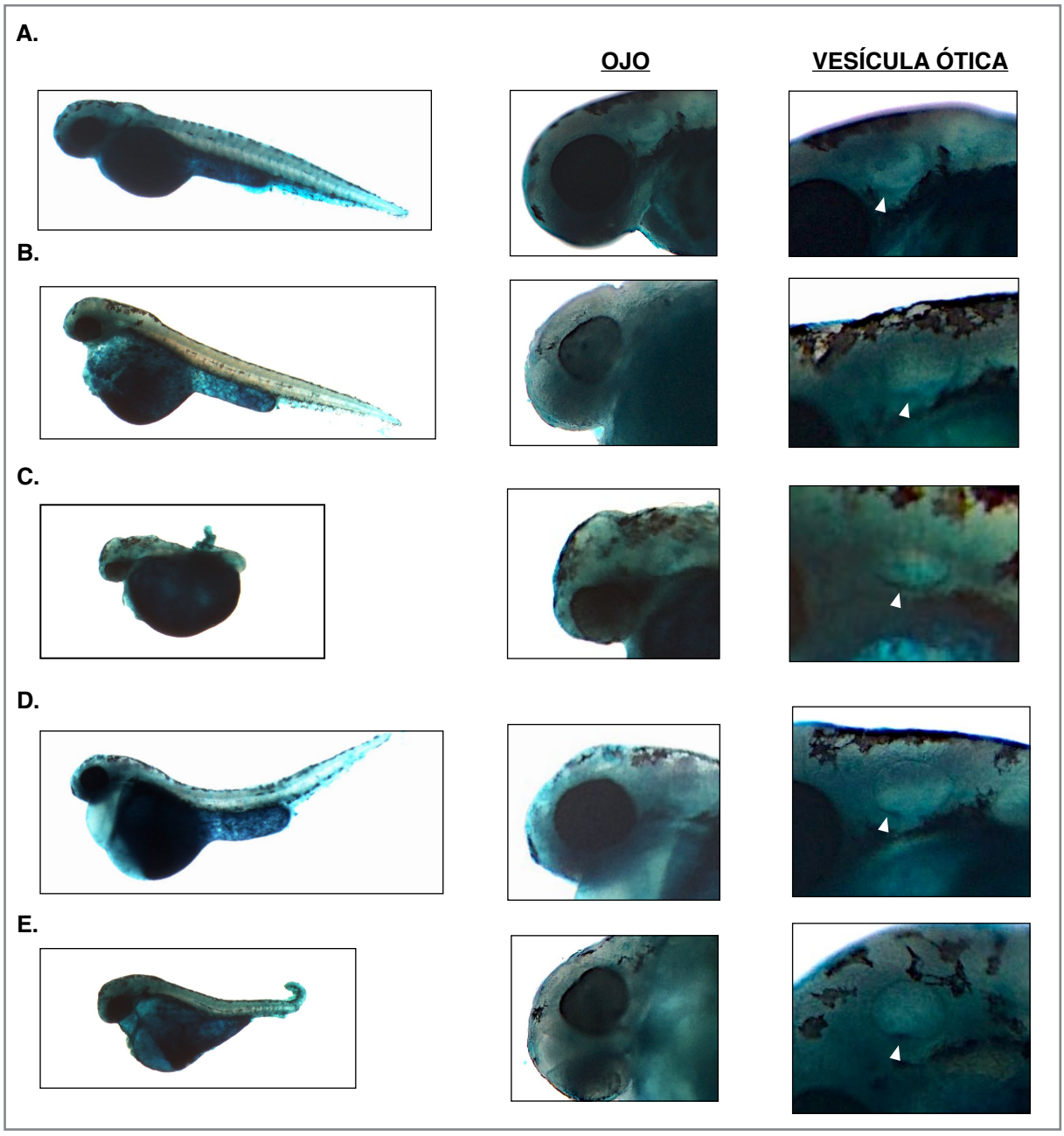


Figura 46. A. Embrión WT *chd7*-CRISPR mutante materno (*outcross*) a las 48 hpf. B. Embrión *chd7*-CRISPR mutante cigótico (*outcross*). C. Embrión *chd7*-CRISPR mutante materno-cigótico (*incross*). D. Embrión morfante *chd7*-MO + *p53*-MO. E. Embrión morfante *chd7*-MO

Los embriones tanto morfantes como mutantes *chd7* en algunos casos no tienen el tejido en el que se produciría en ese momento el proceso de senescencia embrionaria, como pueden ser los ojos o la vesícula ótica (Fig. 22, 23, 24, 27 44, 45, 46 y 48). En esos casos los niveles de senescencia embrionaria observables del embrión se reducen. El retraso en el desarrollo puede suponer que la actividad SA-β-Gal se vea afectada por una cuestión temporal. Los embriones WT comenzarían la senescencia en un estadio determinado, mientras que los embriones mutantes y morfantes todavía no habrían alcanzado ese estadio. Cuando los embriones WT hubieran terminado ese estadio, los embriones mutantes y morfantes podrían esta iniciando el programa.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO

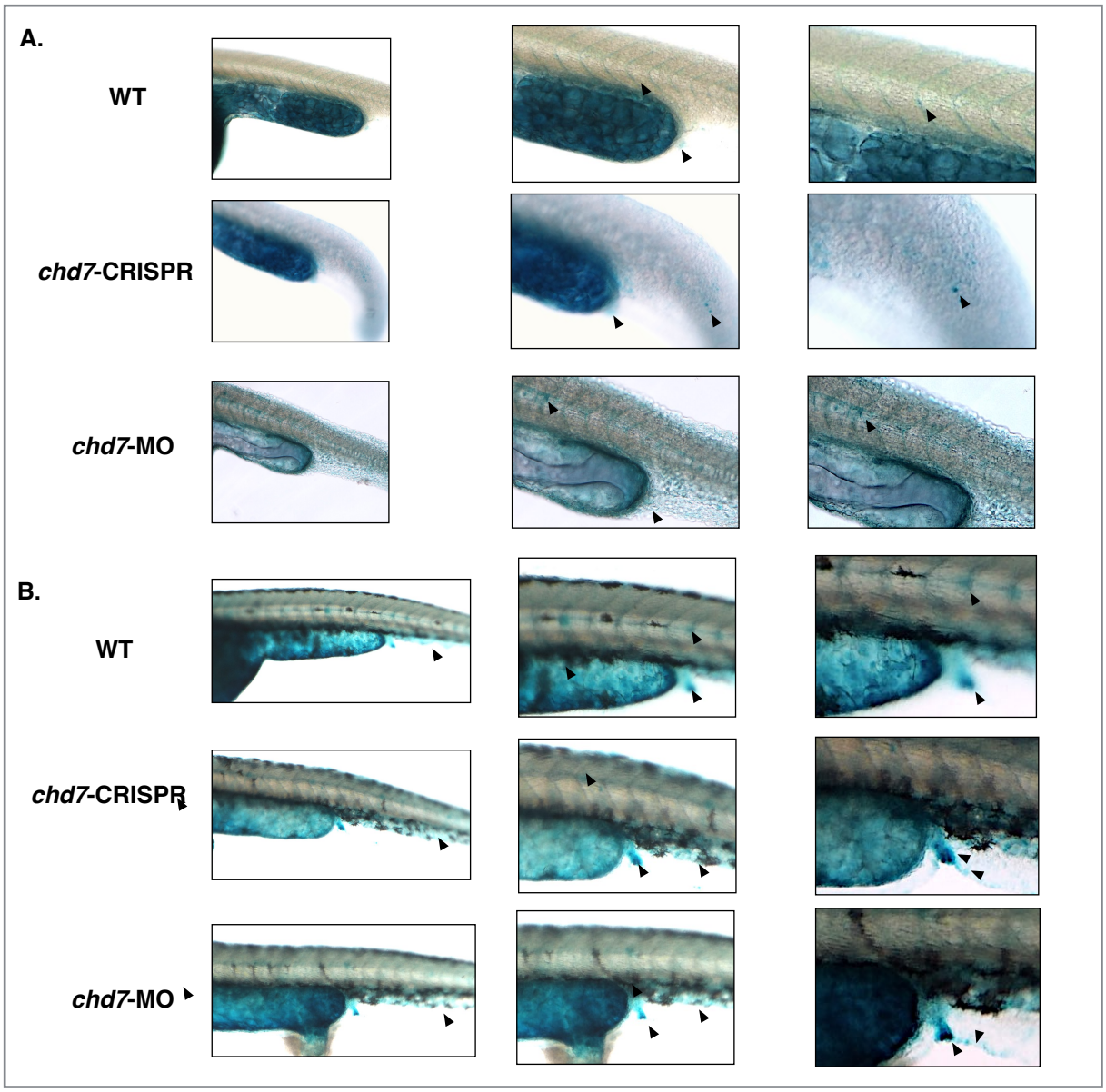


Figura 47. A. Colas de los embriones WT *chd7*-CRISPR mutantes materno-cigóticos *chd7*-CRISPR y morfantes para *chd7*-MO 25 hpf. B. Colas de los embriones WT *chd7*-CRISPR mutantes materno-cigóticos y morfantes para *chd7*-MO 48 hpf. Aunque no se ha percibido senescencia en las aletas pectorales de los embriones por la dificultad de observación del órgano, sí se ha percibido una elevada actividad SA-β-Gal a las 48 hpf, en el límite de formación entre la aleta anal y la aleta ventral, dando a entender que el programa de la senescencia durante el desarrollo embrionario también actúa en la definición de las extremidades igual que en mamíferos. Mientras en el resto de la aleta no se observa actividad SA-β-Gal, en los organismos deficientes *chd7*-CRISPR a las 48 hpf, parece haber un aumento de esta actividad extendiéndose a más lugares del tejido.

4.2.1. La Activación del Programa de Senescencia Embrionaria Está Marcado por un Momento en Desarrollo Embrionario

La actividad SA-β-Gal en los tejidos en los que ocurre la senescencia embrionaria ocurre independientemente del genotipo, siempre y cuando se haya formado el tejido. Hasta el embrión con los defectos más graves, activa el programa de senescencia embrionaria en los mismos tejidos y en los mismos momentos del desarrollo que los embriones WT (Fig. 48). Por lo que la activación o no del programa es independiente de la deficiencia en *chd7*. El embrión entra en ese

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

programa cuando llega a un estadio, aunque sea con malformaciones en el desarrollo del órgano en el que se va a activar la senescencia embrionaria.

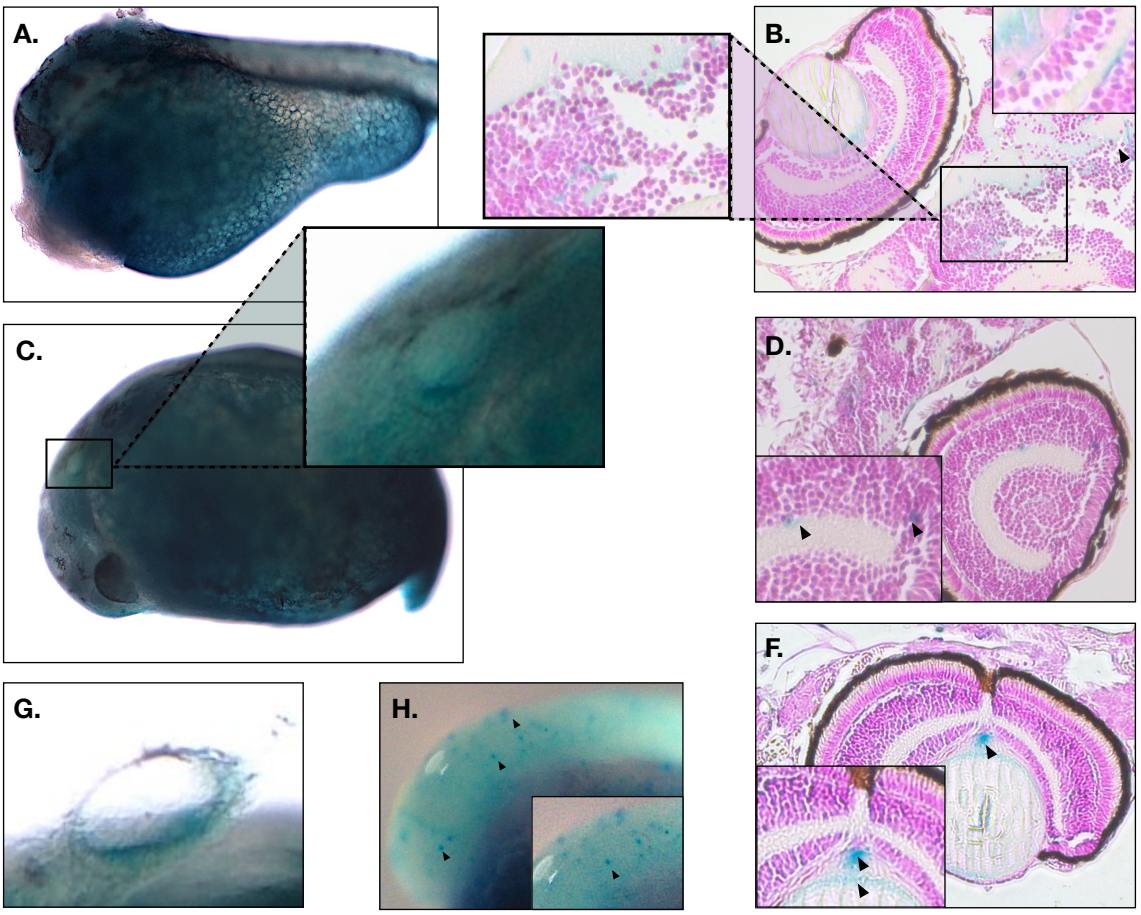


Figura 48. Caracterización embriones *chd7*-CRISPR (*outcross* e *incross*) A-D. Malformaciones y alteraciones de la actividad SA-β-Gal en algunos embriones completos a las 96 hpf y tejidos concretos a las 144 hpf. **G.** Extracción de la vesícula ótica con actividad SA-β-Gal. **H.** Ampliación embrión Figura **45E**.

Estos problemas más graves como la ausencia de ojos (Fig. 48A), como hemos dicho salvo contadas excepciones en los embriones *outcross chd7*-CRISPR, ocurre solo en los morfantes y cruzamientos *incross*, dando evidencia del efecto materno. La presencia de actividad SA-β-Gal tan intensa en el nervio óptico en el ojo de un mutante cigótico *chd7*-CRISPR (Fig. 48B, y 48D), con apariencia de presentar coloboma en algunos casos (Fig. 48F), nos hace pensar que la alteración de la senescencia en ese mismo órgano podría estar causando el arresto del ciclo celular impidiendo la maduración del órgano.

Sin embargo, como hemos dicho, la presencia de senescencia embrionaria se produce siempre y cuando se genere el órgano que la presenta. En este sentido, hemos encontrado individuos del cruzamiento incross (materno-cigóticos) que presentaban serios defectos del desarrollo y retrasos muy graves en algunos tejidos, pero la maduración de otros y la presencia de senescencia embrionaria en forma de actividad SA-β-Gal se mantenía (Fig. 48C). En un intento de extraer la vesícula ótica, pudimos comprobar que estas células con actividad SA-β-Gal formaban parte de las células del borde de la vesícula ótica, pero nunca conseguimos una extracción más limpia que la que se muestra (Fig. 48G).

4.2.2. Las Alteraciones en la Senescencia Embrionaria Producen Malformaciones en las Estructuras que la Presentan.

Aunque no hemos detectado actividad SA-β-Gal en el tejido pericárdico de los mutantes, hemos encontrado claras evidencias de células con actividad SA-β-Gal en el tejido pericárdico a las 96 hpf en embriones WT (Fig. 49A). Al tratar los embriones WT a las 48 hpf con ABT-263 y retratados a las 72, estas células desaparecen o disminuye su número o intensidad de actividad SA-β-Gal. El tejido pericardio de los embriones presentan malformaciones que van desde una estructura más reducida hasta la presencia de un edema.

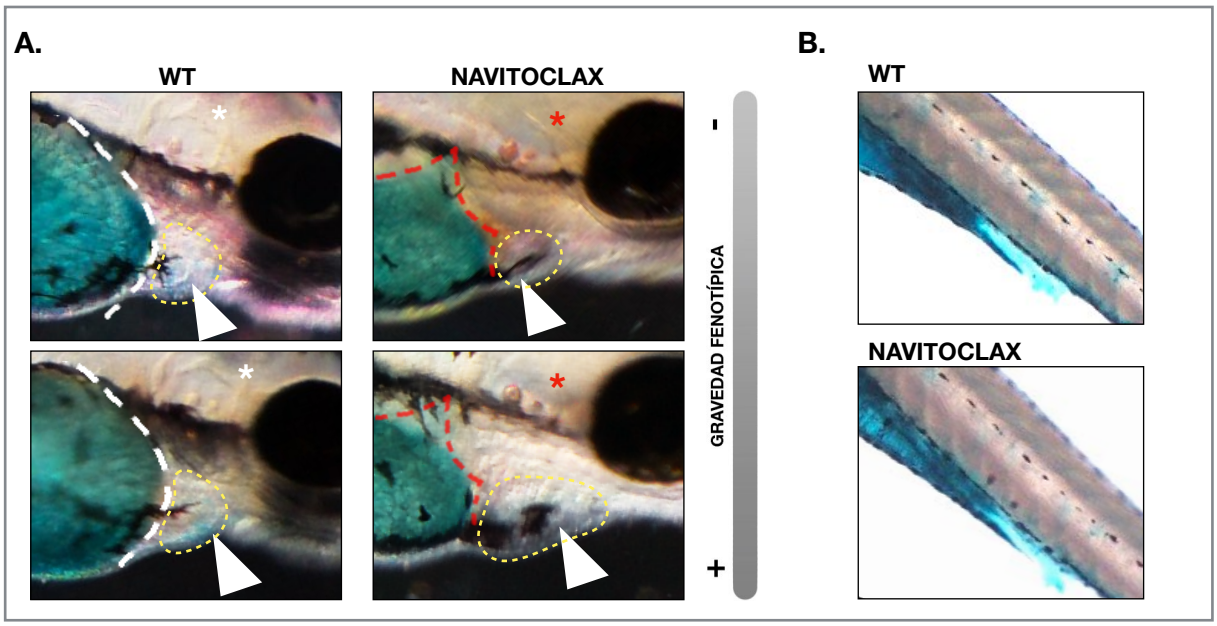


Figura 49. Embriones WT a las 96 hpf y embriones tratados con Navitoclax (ABT-263) a las 48 y retratados a las 72 hpf y teñidos con tinción SA-β-Gal a las 96 hpf. 49A. Variabilidad fenotípica en la actividad SA-β-Gal y en el tamaño del pericardio del embrión (flecha blanca), reducción y deformación del vitelo (líneas blancas rojas), mayor variabilidad en el tamaño del pericardio (línea amarilla) y menor diferenciación de estructuras como la vesícula ótica (asterisco blanco y rojo) en los embriones. 49B. Reducción de la actividad SA-β-Gal en las colas, entre los somitas de los embriones tratados con Navitoclax en comparación con WT. Estos fenotipos son semejantes a algunos de los de los embriones *chd7*-CHARGE y morfantes para *chd7* que presentan alteraciones en la senescencia embrionaria y celular.

Al tratar los embriones también se reduce la actividad SA-β-Gal en las colas de los embriones, entre los somitas, al igual que en nuestros embriones mutantes. En estos embriones de 96 hpf no se observa un efecto de malformación en el eje corporal, y la actividad SA-β-Gal no se ve tan reducida (Fig. 49B). Sin embargo, las alteraciones de la senescencia embrionaria entre las 22-48 hpf en los embriones *chd7*-CRISPR, podría ser la causa de la presencia de curvaturas en el eje del cuerpo.

Al tratar los embriones con ABT-263, el límite entre los tejidos parece hacerse más difuso. Si nos fijamos en el límite entre el vitelo y el pericardio o el límite de la vesícula ótica, estos tejidos parecen no tener una diferenciación tan grande en los individuos tratados en comparación con los WT (Fig. 49A). Si estas células senescentes se encargan de definir un límite en la diferenciación, proliferación y apoptosis celulares de los tejidos embrionarios, una disminución de la senescencia en estas células, provocaría una infiltración y mezcla entre células de los tejidos. El aumento de la senescencia debería tener un efecto de retención de la

proliferación, diferenciación y apoptosis, lo que provocaría unos tejidos menos desarrollados. La ausencia total de senescencia podría causar el no desarrollo del tejido. Esto demuestra que los fenotipos relacionados con la senescencia presentan una alta variabilidad y heterogeneidad fenotípica, y probablemente la participación de programas de senescencia celular distintos.

4.2.3. Expresión de los marcadores de senescencia.

La actividad SA-β-Gal, aunque es la forma más típica de evaluar senescencia, no es la única. Otra característica de las células senescentes, compartida en la senescencia embrionaria, es la expresión de inhibidores de kinasa ciclina dependientes específicas. En el caso de la senescencia embrionaria que se observa en pez cebra, los más típicos son *p21* (*cdkn1a*) y *p15* (*cdkn2a/b*). La función de estos mediadores es inhibir el ciclo celular y, por tanto, promover la senescencia al impedir la proliferación celular.

Los patrones de expresión de los embriones materno-cigóticos (*incross*) se corresponden mucho con las desregulaciones observadas en morfantes, aunque la variabilidad fenotípica es más grande (Fig. 50A). Los embriones seleccionados fenotípicamente, muestran patrones de expresión muy similares a los mutantes maternos y cigóticos de un cruzamiento *outcross*. Esto parece destacar la utilidad de los 3 modelos en conjunto para estudiar correctamente la enfermedad. Los morfolinos y los embriones *incross* pierden la función materna, son mejores para estudiar esa etapa y la materno-cigótica. Los embriones *outcross,* junto con los hermanos WT, son más útiles para estudiar la función cigótica del gen. Los embriones del *incross* que llegan a las 96 horas, parecen recuperar niveles de expresión normales ya de los genes *cdkn1a* y *cdkn2a/b* lo que parece indicar la recuperación de la función cigótica y seguramente el establecimiento correcto del programa de senescencia embrionaria.

Los patrones de expresión de los embriones cigóticos, de un cruzamiento *outcross,* son mucho más homogéneos, con una menor variabilidad intra e intergrupal. Los niveles de expresión de *chd7* entre heterocigotos y hermanos WT son prácticamente iguales en todos los estadios analizados (Fig. 50B). A las 72 hpf, estos individuos presentan unos niveles altos de expresión, que disminuyen progresivamente en el tiempo con ligeras desregulaciones de la expresión en los mutantes (Fig. 50B). Mientras que la expresión de los marcadores de senescencia embrionaria p15 y p21, sufren desregulaciones al alza, más o menos pronunciadas, en momentos concretos del desarrollo. La expresión de *p21* se mantienen constantes los primeros 4 dpf, y sin diferencias, entre los embriones WT y los mutantes. A las 120 hpf se produce un aumento brusco en la expresión de *p21* en los embriones WT. Los embriones mutantes no sufren esa subida tan pronunciada a las 120 hpf y a las 144 hpf , y presentan todavía unos niveles de expresión más altos que los WT (Fig. 50B). Esto podría deberse a un efecto por una mala regulación de la expresión debido a la deficiencia en *chd7,* o un retraso en el desarrollo embrionario.

La expresión de *p15*, durante estos momentos del desarrollo, es muy baja; sin embargo, las diferencias entre embriones WT y mutantes *chd7*-CRISPR heterocigotos son significativas (Fig. 50B). A diferencia de los WT, que presentan una subida gradual de los niveles de expresión a lo largo del tiempo, los mutantes *chd7*-CRISPR presentan un desajustes significativos, con aumentos y disminuciones de los niveles de expresión de *p15* en diferentes momentos del desarrollo. Estas alteraciones en la transcripción sí parecen indicar una mala regulación debida a la haploinsuficiencia en *chd7*.

USC UNIVERSIDADE DE COMPOSTELA

Aunque existen alteraciones en los perfiles de expresión de los marcadores de senescencia *p15* y *p21*, y alteraciones en la actividad SA-β-Gal, los individuos cigóticos del cruzamiento *outcross*, estos son capaces de recuperar el fenotipo, y llegar a la edad adulta con una apariencia notablemente sana. La descompensación de la función cigótica del gen *chd7*, podría estar causando alteraciones en la senescencia embrionaria por la haploinsuficiencia de *chd7*. Sin embargo, el embrión es capaz de compensar la deficiencia y continuar madurando en heterocigosis. Por lo que la pérdida de función cigótica del gen no debería de ser la causante principal de la enfermedad. El comienzo de la expresión de p21 se hace muy notable en la entrada de la transcripción cigótica, sin embargo, los niveles de p15 son muy bajos hasta entradas a las 120 hpf.

Para estudiar la función materno-cigótica de *chd7* en la expresión de estos genes, quisimos comprobar, a través de distintos cruzamientos, cómo la variabilidad materna y cigótica del gen, podría influir genéticamente en los resultados. Además, bajo la hipótesis de que los fenotipos, podrían ser más útiles que los genotipos a la hora de evaluar la expresión., quisimos comprobar si la variabilidad en los perfiles de expresión de los marcadores de senescencia embrionaria, también podían estar afectados por el fenotipo.

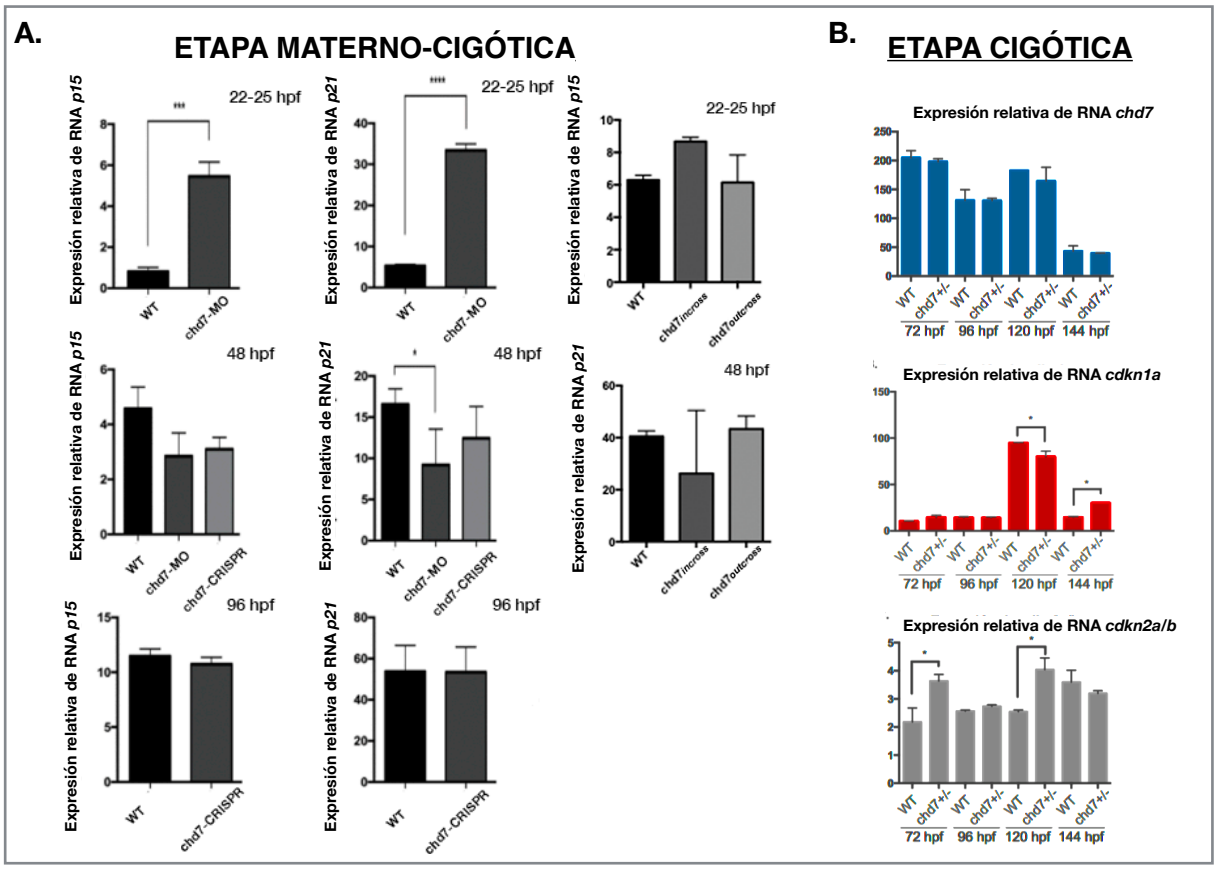


Figura 50A. Expresión de *cdkn2a/b* (*p15*) y *cdkn1a* (*p21*) y desajustes en su expresión provocados en embriones *chd7*-CRISPR mutantes y WT y morfantes para *chd7* en la etapa materno-cigótica (22-96 hpf). 50B. Expresión de *cdkn2a/b* (*p15*) y *cdkn1a* (*p21*) y desajustes en su expresión provocados en embriones *chd7*-CRISPR mutantes y WT y morfantes para *chd7* en la etapa cigótica (72-144 hpf). WT: embriones WT cruzamiento *outcross*. ***chd7*-MO**: morfantes *chd7*-MO. ***chd7incross***: embriones mutantes homocigotos de un cruzamiento *chd7*-CRISPR *incross*. ***chd7outcross***: embriones mutantes heterocigotos de un cruzamiento *chd7*-CRISPR *outcross*. ***chd7*-CRISPR:** embriones seleccionados fenotípicamente con fenotipo CHARGE leve de un cruzamiento incross *chd7*-CRISPR. Se representan las medias y la desviación típica. La significación se realizó mediante un análisis de la varianza ANOVA o un *unpaired t-test* dependiendo del número de muestras. * = $p < 0,05$; *** = $p < 0,001$; **** = $p < 0,0001$.

UPO

Tanto la actividad SA-β-Gal en términos generales, como la expresión de *p15* (*cdkn2a/b*) y *p21* (cdkn1a) se ven alteradas en los individuos morfantes y mutantes materno-cigóticos y cigóticos para *chd7*. Entre las 22-25 hpf observamos un aumento de *p15* y *p21*, lo cual puede indicar el aumento de la senescencia observada en algunos individuos no relacionada con los tejidos que normalmente presentan actividad SA-β-Gal. A las 48 hpf la senescencia parece disminuir en los morfantes y mutantes para *chd7*-CRISPR*incross* y los individuos con esta actividad dispersa desaparecen, pero no para los *chd7*-CRISPR*outcross* y los mutantes con fenotipo correlacionándose con una menor expresión de *p15* y *p21* la recuperación cigótica del gen *chd7* (Fig. 50A). Tanto en los embriones *chd7*-CRISPR seleccionados fenotípicamente con fenotipo CHARGE leve y los embriones *chd7*-CRISPR*outcross* a las 96 hpf no parece haber cambios en la expresión de *p15* y *p21* respecto a los WT, pero si se encuentran alteraciones en las etapas anteriores y posteriores (72 120 y 144 hpf) lo que podría indicar desregulaciones en la transición materno-cigótica y una recuperación cigótica (Fig. 50B)

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

5. KILLIFISH

En esta investigación también hemos querido introducir y comenzar a utilizar como herramienta para el estudio síndrome de CHARGE al *killifish.* El primer éxito fue la puesta a punto de las técnicas para la cría de esta especie, seguido del nacimiento del primer macho de *killifish* de nuestro laboratorio, que sobrevivió hasta la edad adulta. Vivió entre 3-4 meses, a pesar de no haber conseguido hinchar su vejiga natatoria, y nadaba hacia arriba con movimientos bruscos y luego caía rampante. El tejido completo del adulto ha sido conservado para su posterior análisis histológico.

Este macho vivió y murió solo, por lo que no pudo dejar descendencia. Más tarde nacieron 5 hembras, por lo que tampoco pudimos cruzarlas, pero esta vez sí consiguieron inflar la vejiga natatoria. Vivieron en torno a los 4 meses, y sin compañía masculina.

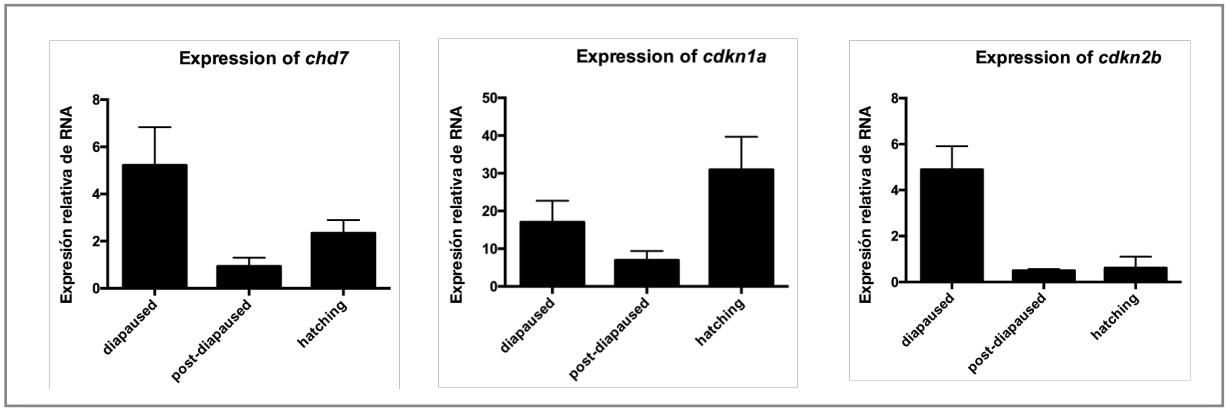


Figura 51. Expresión de *chd7*, *cdkn2b* (*p15*) y *cdkn1a* (*p21*) en embriones de *killifish* en los estadios de diapausa III (*diapaused*), pre eclosión (*post-diapaused*) y después de la eclosión (*hatching*).

Comparamos la expresión de los marcadores de senescencia *cdkn1a* y *cdkn2b* en embriones en diapausa pre-eclosión, en desarrollo y después de la eclosión, con el objetivo de comprobar si este proceso de inactividad está relacionado con la senescencia. Además, también analizamos la expresión de chd7 como posible candidato para regular la expresión de estos marcadores. Los embriones en estado de diapausa, en desarrollo y después de la eclosión, se agruparon en grupos de 7 individuos y tres réplicas biológicas por grupo. El RNA se extrajo con trizol y fenol cloroformo, y se realizó q-PCR para cuantificar la expresión siguiendo el método delta delta ct.

Los embriones de *killifish* en diapausa muestran una mayor expresión de los genes relacionados con la senescencia embrionaria *cdkn1a* y *cdkn2b* que los embriones que se desarrollan después de este proceso. Sin embargo, esto solo ocurre con *cdkn2b* en embriones recién nacidos. En este momento, después de la eclosión, *cdkn1a* muestra un gran aumento, superior al de los embriones en diapausa (Fig. 51). La expresión de *chd7* es más alta en la etapa de diapausa y disminuye después de que se reanuda el desarrollo y aumenta después de la eclosión. Sin embargo, este incremento no es superior al estado de diapausa, a diferencia del caso de *cdkn1a* (Fig. 51).

Existe una mayor expresión de inhibidores de proliferación en embriones en diapausa que en embriones en desarrollo, por lo que este proceso podría estar controlado por los marcadores de senescencia *cdkn1a* y *cdkn2b*. Aunque no hemos encontrado una relación entre

USC DE COMPOSTELA

la expresión de estos genes y la variabilidad entre muestras todavía es muy grande, la presencia y los cambios en la expresión de *p15* y *p21* y de *chd7* durante esos períodos del desarrollo embrionario, nos hacen plantear que podría estar jugando algún papel en su regulación.

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

DISCUSIÓN

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

DISCUSIÓN

1. ANÁLISIS COMPARATIVO DE LAS DIFERENTES APROXIMACIONES PARA EL ESTUDIO DE LA FUNCIÓN GÉNICA.

El presente análisis de técnicas *knockout* y *knockdown* comenzó en 2017 con perspectivas de revisión. Los últimos datos revisados son de 2020, a excepción de un artículo de 2021.

Los organismos mutantes, o *knockout,* llevan décadas utilizándose en investigación para testar la función de los genes involucrados en diferentes procesos biológicos. La mutagénesis aleatoria basada en mutágenos como ENU, ha sido el método preferido para generar mutaciones en el pez cebra hasta la aparición de la edición genética. El ZMP, finalizado en 2016, nos ha dejado más de 40.000 alelos mutantes, que cubren el 60 % de los genes codificadores de proteínas del pez cebra. Desde la irrupción de las técnicas de edición dirigida del genoma: TALEN, ZFN y especialmente CRISPR/Cas9, la generación de mutantes ha experimentado una revolución sin precedentes (Doyon *et al.*, 2008; Meng *et al.*, 2008; Hwang *et al.*, 2013). Por otro lado, las técnicas de *knockdown*, siendo los morfolinos los más utilizados en el pez cebra, han sido cuestionadas en numerosas ocasiones por sus efectos *off-target* y su baja correlación fenotípica con mutantes (Ekker y Larson, 2001; Amoyel *et al.*, 2005; Pickart *et al.*, 2006; Robu *et al.*, 2007; Summerton, 2007; Gerety y Wilkinson, 2011; Kok *et al.*, 2015).

1.1. Los genes son más o menos susceptibles a la pérdida de homogeneidad fenotípica

Las tres ideas más importantes que obtuvimos de este estudio son:

1. Los mutantes para un gen, siempre que tiene un fenotipo mutante asociado, e sino que se debe al efecto de los distintosste, fenocopia el morfante, independientemente de la técnica de mutagénesis utilizada (Tabla 5 y 6).
2. Si un gen tiene fenotipo mutante, casi todos los mutantes presentan un fenotipo asociado al menos parcialmente (Tabla 5).
3. Los morfantes para todos los genes de este análisis presentan siempre un fenotipo asociado (Tabla 6).

La primera observación que se puede extraer, es que la pérdida de la homogeneidad fenotípica no depende del tipo de técnica de mutagénesis qué utilicemos. En nuestro estudio, los mutantes generados por mutagénesis aleatoria, presentan casi exclusivamente mutaciones puntuales, y los generados por mutagénesis dirigida, presentan mutaciones más complejas, y ninguno de estos mutantes presenta mutaciones puntuales (Tabla 7). Esto no fue un sesgo en el análisis al escoger los artículos, sino que se debe al efecto de los distintos procedimientos

USC UNIVERSIDADE DE COMPOSTELA

de las técnicas de mutagénesis, que producen lesiones distintas en el DNA. La segunda, pero no menos importante, es que los morfantes siempre muestran fenotipo, y es aquí donde puede haber una clave importante. La pérdida de homogeneidad en los mutantes se debe a cuestiones relacionadas con las técnicas, que son independientes a la supresión génica (*knockdown* o *knockout*). Cuestiones cómo la compensación por contribución materna o activación de las vías de la GCR, ocurren en los mutantes, pero no en los morfantes, para compensar las deficiencias (Rossi *et al.*, 2015; Kok *et al.*, 2015; El-Brolosy y Stainier, 2017; Ma *et al.,* 2019). Por otro lado, el uso sin control y prematuro de los morfolinos llevo a cometer errores de caracterización fenotipado debido a los efectos *off-target.*

1.2. Los morfolinos son responsables del descenso en la homogeneidad fenotípica.

La ausencia de fenotipo en los mutantes no es rara si tenemos en cuenta que el *knockout* y el *knockdown* son aproximaciones distintas, y que, aunque el objetivo de ambas técnicas es la supresión de la expresión génica, los procesos moleculares que están ocurriendo en la célula para conseguir ese mismo resultado, son extremadamente distintos (Rossi *et al.*, 2015; Kok *et al.*, 2015; El-Brolosy y Stainier, 2017; Ma *et al.*, 2019). La presencia siempre de fenotipo en los morfantes, se explica por dos razones:

1. Una cuestión temporal. Los morfolinos comenzaron a usarse antes para testar la función de los genes mediante el silenciamiento de la expresión (*knockdown*) que las técnicas de modificación genética (*knockout*). Los artículos que se publican son aquellos en los que se observa un fenotipo asociado. Pocos son los artículos que se publicaban manifestando no haber observado efectos del morfolino. En estos artículos hay muchos fenotipos que ahora ya no se deben a la disfunción del gen, o se ha encontrado una causa en la compensación (Kok et al., 2015; Rossi *et al.*, 2015).
2. Los efectos *off-target* de los morfolinos. Antes no se tomaban las medidas de control necesarias para evitar estos efectos, lo que implica la confusión de fenotipos, y una pérdida de homogeneidad fenotípica (Stainier *et al.*, 2015; Kok *et al*., 2015; Morcos *et al.*, 2015; Zimmer *et al.*, 2019; Robu *et al.*, 2007; Elabd *et al*., 2019; Lai *et al.*, 2019). Estos artículos tomarían cómo fenotipos debidos a la deficiencia en el gen, efectos inespecíficos asociados a la inyección de los morfolinos, que contribuirían a aumentar el número de mutantes que no recapitulan el fenotipo.

Mientras que los *knockdown* mediados por morfolinos actúan a nivel de RNA, el efecto es transitorio, el producto materno se elimina parcialmente (no elimina las proteínas parentales), y no activa la GCR, los *knockout* mediados por las técnicas de mutagénesis, actúan a nivel del DNA, el efecto es permanente, puede verse eliminado o no el producto materno y pueden activar la GCR (Abrams y Mullins, 2009; Nair *et al.*, 2013; Giacomotto *et al.*, 2015; Moravec *et al.*, 2021). En cualquier caso, la técnica de edición genética CRISPR ha demostrado ser la técnica con mejores resultados en la generación de mutantes con fenotipo similar al morfante (Fig. 14), debido a la precisión con la que se ha llevado y el interés científico por obtener buenos resultados. Sin embargo, el número de mutantes en el momento del análisis era

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

todavía muy bajo, por lo que incrementar su número beneficiaría las futuras investigaciones en el campo de la genética.

1.2.1 el Uso Indiscriminado y sin Controles de los Morfolinos, Altera los Resultados de la Homogeneidad Fenotípica.

Otra pérdida de homogeneidad fenotípica que afecta a los mutantes producidos por ENU, TALEN y ZFN, que apenas afectaría a los mutantes CRISPR es la falta de *guidelines* para los controles a llevar a cabo en los estudios del silenciamiento de la expresión génica con morfolinos (Stainier *et al.*, 2017). La falta de fenotipos mutantes, y la gran cantidad de morfantes con fenotipo, también se podría explicar por el uso de morfolinos sin utilizar los controles adecuados. El uso de estos controles apareció poco antes de la llegada de las técnicas de edición genética en el pez cebra, y alerto de que muchos de los fenotipos observados, eran debidos a efectos *off-target* de la propia técnica.

A través de estas *guidelines* para el uso de los morfolinos, muchos morfantes que presentaban un fenotipo claro, ya no lo presentan, pero en otros casos siguen presentando fenotipos más graves que los mutantes (Eisen y Smith, 2008, Kok *et al.*, 2015). Esto apoya la idea que reflejan nuestros datos de que muchos de los estudios con morfolinos realizados hasta la fecha del análisis (2017), no realizaban, o no reflejaban, haber realizado esos controles necesarios para el estudio de los fenotipos morfantes (Tabla 8), repercutiendo así en una pérdida de homogeneidad fenotípica observable de los mutantes.

También demuestra que para muchos genes, sigue habiendo cierta susceptibilidad fenotípica a la hora de recapitular el fenotipo, mientras otros parecen inmunes, y el morfante presenta defectos del desarrollo asociados a la enfermedad (Tabla 5 y 6). La razón de esto podría ser una cuestión genética a través de los mecanismos de la contribución materna y la GCR, otorgando robustez genética al pez cebra. Gracias a los CRISPant, muchos de los fenotipos morfantes ya se están confirmando, y se ha descubierto que muchos de estos genes son de efecto materno así como paterno (Zhang *et al.*, 2019; Moravec *et al.*, 2021; Zhang *et al.*, 2021; Shi, 2022).

1.2.2. El Uso de los Controles Disminuye el Número de Falsos Positivos en los Morfantes y Aumenta la Homogeneidad Fenotípica.

Debido a esta falta de rigurosidad en los controles, se estarían tomando por fenotipos muchos de los efectos *off-target*, que a día de hoy se conocen, y que no se verían en los mutantes ENU y CRISPR. Cada día son más los autores que están siguiendo las guidelines necesarias o algunos de los controles necesarios para la correcta ejecución del examen de la disfunción genética mediada por morfolinos. Por ello y cómo la tecnología CRISPR va en aumento, la confusión de fenotipos cada vez afecta menos al sistema CRISPR en la pérdida de homogeneidad fenotípica.

La elección de los individuos control a utilizar es un tema muy importante. Como hemos comentado en los resultados, los hermanos WT de los cruces también estarían condicionados por los efectos de la contribución materna y puede que incluso la GCR por parte del mRNA materno. Por lo que el uso de estos como control estaría recomendado, para descartar estos efectos, pero siempre se deben utilizar también individuos WT descendiente de un cruce WT como control real del experimento.

USC UNIVERSIDADE DE COMPOSTELA

1.3. Las técnicas de edición genética producen mutaciones distintas que implican resultados distintos en la homogeneidad fenotípica.

Como no parecía haber diferencias entre las técnicas de mutagénesis aleatorias y dirigidas, a la hora recapitular el fenotipo morfante, en nuestro estudio quisimos observar si las causas de esta discrepancia se debían al tipo de mutación Los mutantes ENU son muy numerosos, pero las mutaciones que se producen con esta técnica suelen ser mutaciones puntuales, lo que provoca que la mayoría de las veces la mutación solo produzca un cambio de un solo aminoácido, y no altere mucho la secuencia de las proteínas.

Las técnicas de mutagénesis dirigida como CRISPR produce mutaciones mucho más graves como son los *indels* y las mutaciones *frameshift*, que en la mayoría de los casos conducen al truncamiento de la proteína o a una proteína aberrante. Esta relevancia en el tipo de técnica es la que pretendíamos buscar en nuestro estudio, y que ahora se ha demostrado. Aunque vimos que la tecnología CRISPR era la que mejor resultados mostraba en cuanto a mutantes que recapitulaban los fenotipos, el número de artículos en ese momento era muy bajo. Aunque las técnicas de CRISPR/Cas9 aparecieran en 2013, estas no se empezaron a introducir totalmente en la investigación con peces cebra hasta 2015 aproximadamente, y comenzaron a mostrar resultados válidos en torno a 2016-17, cuando comenzamos el análisis (Jao *et al.*, 2013; Alexander Hruscha y Bettina Schmid 2015).

Si se comparan las técnicas de mutagénesis dirigidas, no se observan diferencias en cuanto a si recapitulan o no el fenotipo, en comparación con las técnicas de mutagénesis aleatoria. Aunque las mutaciones producidas por CRISPR son más graves, la compensación genética por GCR explica la ausencia de fenocopia del morfante (Rossi *et al.*, 2015; Kok *et al.*, 2015) y por qué esto no se había observado con las técnicas de mutagénesis aleatoria.

1.3.1. El Tipo de Mutación Influye Negativa y Positivamente en la Recapitulación de Fenotipos de pez Cebra.

En las técnicas de mutagénesis aleatoria se producen mutaciones puntuales debido a agentes mutágenos o procesos físicos, mientras que en las técnicas de mutagénesis dirigida, se genera DSB en el DNA, y su reparación produce lesiones más grandes como los *indels*. Los resultados contenidos en las tablas y figuras del análisis de técnica (apartado 1 de Resultados), muestran una mayor relación entre la presencia o ausencia de fenotipo entre los genes de estudio que diferencias entre la presencia o ausencia de fenotipo y la técnica empleada. Sin embargo, esto no implica que las técnicas de mutagénesis aleatoria como el ENU sean mejores. Las técnicas de edición genética son como un arma y depende de cómo se utilicen. Las técnicas de mutagénesis dirigida son mucho más precisas, y con enfoques distintos se podrían recrear las mutaciones puntuales de los mutantes ENU, o incluso recrear las mutaciones humanas. Desde luego son estas últimas, siendo el CRISPR la más versátil de todas en la creación de mutaciones de precisión, mucho más útiles y fáciles de ejecutar que la generación de mutantes generados por ENU. Tal y como predecíamos en nuestro análisis, la cuestión de la discrepancia fenotípica entre *knockout* y *knockdown* es una cuestión genética y del tipo mutaciones generadas con la técnica, pero no por la técnica *per se*. En nuestro análisis

USC UNIVERSIDADE DE COMPOSTELA

vimos que, algunos genes eran más propensos que otros a desarrollar un fenotipo mutante y que recapitule el fenotipo morfante.

La pérdida de homogeneidad fenotípica podría explicarse por la compensación genética y la contribución materna. Muchos genes podrían estar produciendo una respuesta compensatoria y así evadir el desarrollo de los fenotipos, debido a la redundancia genética del pez cebra, y muchos otros podrían tener un efecto materno o materno-cigótico importante que no permite la correcta observación del modelo. Aunque las mutaciones leves también explicarían una menor homogeneidad fenotípica en los ENU (Tabla 7; Fig. 13A) que no recapitulan el fenotipo, y las graves esa mayor homogeneidad en los CRISPR que presentan fenotipo, este efecto también podría jugar a la inversa (Bhuiyan *et al.*, 2008; Gong *et al.*, 2007; Zarraga *et al.*, 2011; Gong, Stump y Zhou, 2014; Gong y Zhou, 2018). Las mutaciones graves y más deletéreas, son más propensas a la formación de PTCs que activan los mecanismos de compensación, por lo que se vería una menor homogeneidad fenotípica en los mutantes generados por mutagénesis dirigida.

En humanos, más del 30 % de las mutaciones en el síndrome de QT largo tipo 2 son mutaciones sin sentido o de desplazamiento del marco de lectura que introducen codones de terminación prematura (PTC) en el mRNA del gen hERG (*KCNH2*) (Gong, Stump y Zhou, 2014). Se ha observado que estos PTCs activan las vías de degradación por la NMD, y eliminan los transcritos anormales selectivamente de mRNA que albergan PTCs (Kuzmiak y Maquat, 2006) y previenen la producción de proteínas truncadas que a menudo tienen efectos negativos dominantes. Por lo tanto, la NMD debería proteger contra los fenotipos de enfermedades graves al convertir los efectos negativos dominantes en haploinsuficiencia (Khajavi *et al.*, 2006). Este efecto de compensación genética, debido a las mutaciones que provocan PTCs, se observó con mayor intensidad con la llegada de los mutantes generados por TALEN y ZFN que en los ENU, pero con los mutantes CRISPR ya se empezó a tener en cuenta. Por ello no se observa una pérdida de homogeneidad fenotípica tan grande. Esto se debe, como hemos propuesto, a qué estos sistemas son más nuevos y precisos y a que cada día se toman más controles en el uso de los morfolinos (Stainier *et al.*, 2017; Amorim *et al.*, 2020; Uribe-Salazar *et al.*, 2022). La pérdida de homogeneidad fenotípica de los CRISPR, por lo tanto, parece continuar siendo el componente materno (Moravec *et al.*, 2021).

1.4. La pérdida de la homogeneidad fenotípica es una cuestión genética.

En los mutantes ENU y TALEN se observa una mayor pérdida de homogeneidad fenotípica entre mutante y morfante, en comparación con los mutantes CRISPR, donde apenas existe pérdida. Siendo la tres técnicas de mutagénesis, deberían tener una pérdida similar. Las causas de esta mayor pérdida de homogeneidad fenotípica por parte de los mutantes podrían ser varias. Entre las técnicas aleatorias y dirigidas agrupadas, vemos que la pérdida de homogeneidad fenotípica es la misma. Estas discrepancias entre técnicas, que deberían tener la misma pérdida de homogeneidad fenotípica, son las que nos llevaron a pensar en que el problema, no está en la técnica de por sí y a analizar los tipos de mutaciones provocadas por los las técnicas. De esta forma vemos que los tipos de mutaciones son realmente la causa de la pérdida de homogeneidad fenotípica. En este sentido habría dos tipos de genes (Tabla 5 y 6 en el apartado de Resultados):

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

— Genes susceptibles: aquellos genes en los que todos los mutantes estudiados presentan un fenotipo y este está asociado al morfante y ningún mutante sin fenotipo.

— Genes inmunes: aquellos genes en los que, para todos los mutantes analizado el fenotipo morfante no se expresa y ningún mutante ha conseguido recapitular el fenotipo morfante.

1.4.1. Modelo de Genes Susceptibles y Genes Inmunes a la Recapitulación Fenotípica

Si es una cuestión genética y los genes son los culpables de la discrepancia, la diferencia en los efectos entre estos dos tipos de genes se debería a la compensación materna a través de la contribución materna y cigótica a través de la GCR.

1. Los genes susceptibles o menos inmunes, aquellos en los que siempre aparece un mutante asociado al fenotipo morfante, no les afectarían los "problemas" de compensación materna y cigótica asociados al modelo de pez cebra, y casi cualquier tipo de mutación, que implicara la pérdida de la expresión normal del gen o formación de proteínas aberrantes, afectaría al fenotipo del pez. Estos casi siempre mostrarían fenotipo. En los casos que no, seguramente se deba a mutaciones poco agresivas, y no se verían reflejados en una publicación.

2. Los genes inmunes o menos susceptibles, aquellos en los que no habría ningún o casi ningún mutante con fenotipo asociado, estarían muy compensados por la contribución materna y la compensación genética. En estos, las mutaciones puntuales, "menos agresivas", podrían no estar provocando graves daños a la secuencia aminoacídica, mientras que las mutaciones como los *indels* "más agresivas" con la secuencia, producirían estas mutaciones *nonsense,* que formarían PTCs, por lo que son más propensas a activar los procesos de GCR y NMD y de esta forma compensar la deficiencia del gen mutante. Estos mostrarían todo tipo de controversias fenotípicas también descritas en nuestro modelo mutante *chd7*-CRISPR y *chd7*-ENU con los morfantes para *chd7*, como la ausencia de fenotipo, la variabilidad fenotípica, la aparición de fenotipos tardíos o fenotipos en el WT.

Esto podría verse como una ventaja en el uso de los mutantes ENU, en los que la baja gravedad de la mutación no activaría estos mecanismos de compensación por la GCR, y explicaría por qué con los mutantes ENU, no se alertó de la discrepancia fenotípica, cuando ya se conocía la gran importancia del efecto de la contribución materna en el pez cebra. A pesar la alta disponibilidad de las líneas ENU, la mayoría de ellas no están caracterizadas, ni fenotípica ni molecularmente, y las que lo están muestran una baja correlación fenotípica con los morfante. En estos organismos, era muy normal pensar que la pérdida de la homogeneidad fenotípica se debiese a que la mutación no alteraba apenas la proteína, o que algunos de los fenotipos observados fueran producidos por mutaciones no encontradas en otras regiones del genoma debidas a la aleatoriedad de la técnica para producirlas (Wienholds *et al.*, 2003; Sood *et al.*, 2006; Pan *et al.*, 2015).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

1.4.2. Las Discrepancias Fenotípicas Entre Técnicas Están Causadas por la Contribución Materna.

El efecto materno en los morfantes, es eliminado debido a la supresión también del producto materno. Esto, si no se tiene en cuenta, sería un factor de pérdida de homogeneidad fenotípica. La mayoría de las veces se evalúan heterocigotos, los cuales presentan contribución materna, y muchos autores, tanto en mutantes ENU como CRISPR, no habrían tenido en cuenta los efectos maternos-cigóticos, a la hora de evaluar los fenotipos (Zhang *et al.*, 2019; Moravec *et al.*, 2021; Zhang *et al.*, 2021; Shi, 2022). Esto produce una pérdida de la homogeneidad fenotípica para todos los mutantes de estos genes. Este efecto en la contribución materna ya fue alertado, como hemos dicho hace mucho tiempo, debido a la importancia de las implicaciones que tiene la misma en la generación del modelo de pez cebra para el estudio de la función génica (Selman *et al*., 1993; Ciruna *et al.*, 2002; Pelegri, 2003).

1.4.3. Las Discrepancias Fenotípicas Entre Técnicas Están Causadas por la Activación de la GCR.

La GCR, está desencadenada por mutaciones deletéreas, pero no por la supresión de genes, lo que explica muchas discrepancias fenotípicas entre los modelos *knockout* y *knockdown*. En los modelos *knockdown,* aunque se suprime la expresión del gen, no se activa la GCR. Y algunos mutantes para el mismo gen, no desencadenan la GCR. Como se ha demostrado, no es la generación de mutaciones lo que produce la activación de la GCR (El-Brolosy *et al.*, 2019; Ma *et al.*, 2019), por lo que independientemente de la técnica de mutagénesis se deberían obtener los mismos resultados. En diferentes estudios se ha demostrado que los mRNA portadores de PTC activan la respuesta de compensación genética (GCR) incluso con la eliminación materna en organismos CRISPant (Cárdenas-Rodríguez *et al.*, 2021). Las PTC se forman sobre todo por mutaciones *nonsense* y *frameshift* (Wang *et al.*, 2002) algo que predecíamos en el estudio, ocurriría más en los TALEN ZFN y CRISPR que en los ENU, y que sería relevante en cuanto a copiar el fenotipo entre mutantes y morfantes.

El tipo de mutación, por otro lado, sí que influiría en la activación de estos mecanismos compensatorios, a través de la formación o no de PTCs. Cómo demuestran nuestros resultados del análisis realizado, las técnicas de mutagénesis aleatoria producen mutaciones puntuales, mientras que las técnicas de mutagénesis dirigida producen *indels*. Los *indels* son más propensos que las mutaciones puntuales a producir estas mutaciones *frameshift* o *nonsense* que causan PTCs y el truncamiento de la proteína (Fig. 18; Wang *et al.*, 2002; Janssen *et al.*, 2012, Butcher *et al.*, 2017; Zentner *et al.*, 2010; Frischmeyer y Dietz, 1999, Popp y Mquat, 2016). Aunque esto no siempre es así. Los PTCs se pueden formar a través de las mutaciones puntuales generadas por los ENU, y a su vez podrían mantener una función o actividad de la proteína. Estas mutaciones podrían además activar la GCR y producir un desequilibrio en la expresión génica.

Todas las técnicas de mutagénesis tienen capacidad de producir mutantes que fenocopian el fenotipo morfante, en más de un 50 %. Sin embargo, parece haber genes más susceptibles que otros o genes que son inmunes, a la recapitulación fenotípica, independientemente de la técnica que se utilice. Si la implicación de la contribución materna y la GCR son tan importantes, los resultados de este estudio nos conducen a entender que la pérdida de

USC UNIVERSIDADE DE COMPOSTELA

homogeneidad fenotípica observada, no es una cuestión de la técnica de mutagénesis, o de los morfolinos, sino que hay algunos genes más susceptibles que otros de recapitular el fenotipo morfante, y que en muchos casos se están confundiendo fenotipos reales observados en los morfantes con posibles efectos *off-target* de los morfolinos (Moravec *et al.*, 2021).

1.4.4 los Genes Susceptibles e Inmunes a la Recapitulación Fenotípica: un Caso Real

La aparición de las técnicas de edición genética, llevo la generación de mutaciones de alta precisión, en genes que se pensaba que eran esenciales para el desarrollo de los vertebrados. Los peces cebra, sin embargo, parecían no necesitar esos genes para desarrollarse normal y completamente (Kok *et al.*, 2015), algo que además de curioso, contradecía los resultados con morfolinos que durante muchos años se habían considerado válidos para el estudio de la función génica en el tanto. Las técnicas de mutagénesis dirigida son mucho más efectivas que las aleatorias, como las ENU para la generación de mutaciones que afectan gravemente a la secuencia como son los *indels*, produciendo un aumento de la recapitulación del fenotipo de los morfantes, como se observa para la técnica CRISPR (Fig. 14).

Los *indels* a su vez son más propensas a producir la formación de estas mutaciones *nonsense*, que forman PTCs prematuros en la secuencia de mRNA (Wang *et al.*, 2002) y activan los mecanismos de la GCR descritos en pez cebra (El-Brolosy *et al.*, 2019; Ma *et al.*, 2019). Se podría decir que, los investigadores, de una forma intencionada, pero a la vez accidental, hicieron aparecer los PTCs totalmente inofensivos en aquel momento, y el genoma del pez cebra respondió. La precisión de las técnicas de edición genética y la hipótesis correcta de qué grandes delaciones del gen producirían mayores daños a la proteína, provocó esta reacción desconocida, a través de la GCR, en el robusto genoma del pez cebra debido a su alta redundancia genética.

Un claro ejemplo de esto lo tenemos en este mismo estudio, pero que confirma esta teoría casi 5 años más tarde. De los 49 genes del estudio, solo *pdgfrb* presentaba discrepancia entre mutantes. Un mutante ENU con una mutación puntual y un mutante TALEN con una deleción de 4 bases. En un artículo publicado en 2021 por K. Ando y colaboradores, entre los que se encontraban N.D. Lawson y D.Y.R. Statainier, utilizaron las dos líneas mutantes que aparecen en nuestro estudio para este gen. La línea mutante TALEN, *pdgfrb*-UM148, con una deleción de 4 bases se trata de una línea transgénica diseñada por F.O. Kok, en el laboratorio de N.D. Lawson (Kok *et al.*, 2015), específicamente para producir una mutación *nonsense,* que se sabe, activa la GCR (Kok *et al.*, 2015). La línea mutante ENU, *pdgfrb*-sa16389, se sabía que mostraba fenotipo, aunque hasta los 5 dpf eran morfológicamente normales (Ando *et al.*, 2016; Kok *et al.*, 2015), dando la idea de una posible contribución materno-cigótica, en el caso de que el rescate fuera materno, o únicamente cigótica para este gen y que la proteína desencadene la GCR. Esta vez sí encontraron algunos de los fenotipos anteriormente descritos en el mutante ENU, y otros que todavía no habían sido descritos, sin embargo, la mayoría de fenotipos eran leves o estaban completamente ausentes. La ausencia de algunos fenotipos se asoció a la compensación genética por parte de *pdgfra* parálogo de *pdgfrb.* Sin embargo, la pérdida de pericitos cerebrales en los mutantes UM148 era completamente penetrante y altamente expresiva, por lo que no se descarta la posibilidad de que haya una compensación específica de tejido (Ando *et al.*, 2021).

USC UNIVERSIDADE DE COMPOSTELA

El efecto finalmente ha resultado ser únicamente cigótico y sin contribución materna. La expresión que se muestra en el atlas de expresión de pez cebra del EMBL-EBI (White et al., 2017; Papatheodorou *et al.*, 2020) para *pdgfrb* comienza después de la transición cigótica. Estos resultados confirmarían dos de las hipótesis sugeridas en este apartado:

1. Las mutaciones producidas por ENU son más leves que las mutaciones producidas por las técnicas de mutagénesis dirigidas como TALEN y menos propensas a activar la GCR.
2. La discrepancia observada es genética y no entre el tipo de técnica de supresión de la expresión génica, siendo los genes susceptibles o inmunes a la recapitulación fenotípica.

El único mutante con discrepancia, ahora ya no tiene discrepancia, y se ha encontrado una respuesta en la GCR. La mutación en *chd7* de los mutantes generados por ENU, produce una proteína que aunque defectuosa, no activa la GCR. Este gen, sería uno de estos genes menos susceptibles, si no fuera por la mutación leve generada por el ENU. Gracias a la introducción de las técnicas de edición genética en el pez cebra, ahora podemos estudiar cuestiones genéticas y evolutivas que habían sido pasadas por alto en todo el reino animal, pero sobre todo en los vertebrados.

1.5. Inmunes y susceptibles. Los genes de Schrödinger.

La baja correlación fenotípica entre morfantes y mutantes revelada en artículos anteriormente publicados se cuestiona a la luz de los resultados presentados en el presente análisis. El único mutante con discrepancias en el análisis fue el que además salvó la cuestión. El mutante reveló un fenotipo, pero a la vez no. Como un fenotipo de "Schrödinger", está y no está. Pero esta vez, estaba. Estos genes serían genes que tienen un efecto materno y/o cigótico importante, pero susceptibles también de activar la GCR, al menos de una forma espacial.

La aparición cuántica del fenotipo de *pdgfrb* generado por TALEN, confirma nuestras dos hipótesis: existen genes más susceptibles que otros a recapitular el fenotipo mutante independientemente de la técnica, y las técnicas de edición genética son más propensas que las aleatorias a producir mutaciones que activan la GCR. La otra técnica de edición genética que fue la más prometedora con su llegada, los TALEN, ha sido capaz de demostrar una subida de la homogeneidad fenotípica, para un gen en el que no la mostraba y en ese mismo mutante. Lo que confirma una primera mala observación del modelo de mutagénesis.

El gen *pdgfrb* es un gen que realmente es susceptible. La mutación generada por ENU no activa la GCR, pero si afecta a la proteína y, por lo tanto, es capaz de mostrar fenotipo. Sin embargo, la mutación generada por TALEN activa los mecanismos de GCR al portar un PTC. Una alta GCR explicó la discrepancia fenotípica entre mutantes. Los peces *pdgfrb* mutantes ENU son aparentemente normales hasta los 5 dpf, a partir de ahí, comienzan a mostrar fenotipo. Esto es completamente normal si tenemos en cuenta los efectos únicamente cigóticos que tiene este gen en el desarrollo del embrión, y la susceptibilidad genética del mismo debido a la no contribución materna.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

1.5.1 *CHD7*, ¿Un Gen De Schrödinger?

Los resultados de Ando *et al.* (2021) junto con los del resto del análisis de técnicas y las controversias en los resultados fenotípicos del mutante *chd7*-CRISPR, demuestran por qué el gen *chd7* todavía cuenta con un solo modelo mutante validado fenotípicamente (Sun *et al.*, 2022), además del presente trabajo, y solo existen unos pocos más con ninguna o muy baja recapitulación fenotípica con morfantes (Liu y Liu, 2020; Prykhozhij *et al.*, 2017; Cloney *et al.*, 2018; Jamadagni *et al.*, 2021). Nuestro mutante *chd7*-ENU en heterocigosis también presentaba un fenotipo más leve, debido seguramente a estos efectos de compensación. Mientras que los morfantes presentaban fenotipos muy graves y detención del desarrollo en estadios muy tempranos.

Es probable que tanto la contribución materna como la GCR podrían estar actuando en nuestro modelo mutante *chd7*-CRISPR, camuflando fenotipos, incluso de una forma específica en el tiempo y en el espacio durante el desarrollo del embrión. Quisimos comprobar, por tanto, si nuestras primeras observaciones realizadas eran correctas, y si realmente nuestro mutante podía mostrar fenotipo, y por tanto podía seguir siendo útil para el estudio de la función génica de *chd7* así como de sus posibles efectos maternos y/o cigóticos. Se ha informado que la compensación genética desencadenada por la NMD en mutantes CRISPR de pez cebra, podría dar como resultado fenotipos débiles o nulos (El-Brolosy *et al.*, 2019).

Resultados similares en mutantes para la recapitulación fenotípica del morfante para el gen *chd7,* fueron observados en otros mutantes heterocigotos de *chd7* publicados anteriormente que causan mutaciones *frameshift* (Liu y Liu, 2020). La compensación genética podría activarse en mutantes *chd7*-CHARGE, y esto podría dar como resultado los fenotipos CHARGE graves que observamos y fenotipos en el WT. En este trabajo, proponemos una posible causa para estos fenotipos, debido a la contribución materna y la GCR, que también podría estar ocurriendo en el síndrome de CHARGE.

La posibilidad de un efecto materno-cigótico para el gen *chd7* ya ha sido descrito hace unos días, desde el momento en el que se redactó el presente trabajo (Sun *et al.*, 2022). En nuestras hipótesis iniciales en 2016, no contábamos con este posible efecto, sin embargo, ahora tenemos resultados de su función y mecanismo. En este trabajado, otorgamos pruebas sólidas no solo de una función materno-cigótica, sino también materna, cigótica, y una probable función en el adulto. Todas ellas a través de la senescencia celular y la capacidad de *chd7* de regular la expresión génica de p53.

1.6. Todas las técnicas de *knockdown* y *knockout* son correctas y válidas para el estudio de la función génica

Con los controles adecuados y el uso apropiado de las técnicas analizadas en nuestro estudio son aproximaciones útiles para el estudio de la función génica en el desarrollo embrionario y las enfermedades genéticas. Una conclusión positiva que extraemos del estudio es la buena intención con la que los autores tanto de morfolinos como de las técnicas de mutagénesis no falsearon sus datos. Los culpables son los morfolinos y la falta de *guidelines*, pero no las personas que los usaban. Los investigadores no mentían acerca de sus observaciones.

La llegada de las técnicas de edición genética de precisión generó un ansia por provocar mutaciones que produjeron esos PTCs, al ser capaces de generar grandes deleciones,

USC UNIVERSIDADE DE COMPOSTELA

condujeron a la contradicción de los datos, y con moralidad se echaron la culpa a las técnicas de *knockout.* En ese momento se observó la gran importancia de la contribución materna y los efectos *off-target*, inducidos por los morfolinos que condujeron a la creación de las *guidelines* para el estudio cooperativo y comparativos de ambas técnicas, *knockout* y *knockdown*. Los investigadores las acataron y, aun así, se observó que la discrepancia fenotípica entre las técnicas no disminuía, o lo que es lo mismo, la homogeneidad fenotípica no subía.

Al observarse que esa recapitulación del fenotipo con los morfantes no se conseguía, se descubrieron los mecanismos de compensación genética y la responsabilidad de las mutaciones para compensar estos mecanismos. Y es aquí donde entra la responsabilidad genética a la hora de generar fenotipos y nuestro modelo de genes susceptibles e inmunes ampliado.

1.6.1. Modelo de Genes Susceptibles e Inmunes Ampliado

Se podría concluir, por tanto, que todos los genes son sensibles a recapitular el fenotipo independientemente de la técnica de mutagénesis dada la importancia de los mismos y las observaciones previas con morfolinos y otros organismos. El concepto de inmunidad, por tanto, depende de:

1. Daño en la proteína.
2. Actividad de la GCR.

    - Mutación producida.

    - Parálogos para ese gen.

3. Contribución materna para ese gen

Este modelo (Tabla 9), aunque teórico y artificial, ayuda mucho a comprender estas discrepancias fenotípicas entre las técnicas y como estas afectan a los distintos tipos de genes maternos y cigóticos, encajando los genes en cada grupo y estudiándolos a través sus funciones y compensaciones a medida que se presencie un gen de “Schrödinger”.

1. Los genes susceptibles, probablemente cigóticos en su mayoría, sin efecto materno, a penas, tienen efectos de rescate fenotípico por la contribución materna y una homología muy baja con otros genes para el rescate por la GCR. Cualquier mutación que altere gravemente a la proteína provocaría que un gen así produjera un mutante que se desarrolle correctamente, pero cuando entra en juego su función, la proteína defectuosa muestra el fenotipo.

En este grupo también habría genes maternos y materno-cigóticos importantes, pero con una compensación materna y GCR muy bajas que harían que incluso en heterocigosis no se produjera una repuesta compensatoria correcta.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

GEN:		SUSCEPTIBLES	INMUNES	SCHRODINGER
EFECTO:	Materno	BAJO o NINGUNO	ALTO o ÚNICO	ALTO
	Materno-cigótico	BAJO o MEDIO	ALTO o MEDIO	ALTO o MEDIO
	Cigótico	ALTO o ÚNICO	BAJO o NINGUNO	ALTO
RECAPITULACIÓN FENOTÍPICA con MORFANTE:		ALTA	NINGUNA	BAJA o NINGUNA
COMPENSACIÓN:	Materna	BAJA o NULA	ALTA	ALTA
	Cigótica (GCR o otro)	MEDIA-BAJA	ALTA	MEDIA-ALTA
LETALIDAD:	Heterocigoto	MEDIA	BAJA	BAJA o NULA
	Homocigoto	MEDIA-ALTA	MEDIA-BAJA	ALTA
	Morfante	MEDIA-ALTA	MEDIA-ALTA	ALTA
TÉCNICA:	*Knockout*	SIEMPRE	BAJA	CONDICIONAL
	Knockdown	SIEMPRE	SIEMPRE	SIEMPRE

Tabla 9. Modelo de Genes inmunes y susceptibles a la recapitulación fenotípica

2. Los genes inmunes, probablemente maternos y sin efecto cigótico, siempre se verían efectos de rescate fenotípico por la contribución materna y pueden o no tener una alta homología con otros genes para el rescate por la GCR. Cualquier mutación haría que un gen así produjera un mutante que se desarrolle correctamente, por la contribución materna del pez cebra, y si tuviera una función cigótica, pudiera ser o no rescatada por la GCR, mostrando así un fenotipo parcial o leve y dependiente de tejido a penas observable en comparación con morfantes.

En el caso de homocigosis para estos genes en la F3 se podrían observar un fenotipo parcial, debido a la contribución materna gradual, y una GCR baja. Pero sin una compensación genética de rescate fenotípico, ya sea materna o por la GCR, el *incross* de estos individuos F3 no sería posible, dejando así sin pruebas sobre el efecto real de la disfunción genética y una homogeneidad fenotípica muy baja con respecto al morfante.

3. Los genes de "Schrödinger", deberían ser los genes realmente inmunes por su efecto materno y cigótico importante y su contribución genética materna muy grande y una GCR media alta. Estas altas respuestas compensatorias, además de revelar la importancia genética de los mismos en el desarrollo, harían que no mostraran fenotipos, pero sí condicionalmente. La pérdida parcial de contribución materna y cigótica de un heterocigoto, haría que el efecto se compensase solo parcialmente en las etapas materno-cigótica, y que los descendientes de un *incross* de este genotipo, mostraran siempre fenotipo si la GCR es baja o un fenotipo parcial si es alta debido al desequilibrio materno-cigótico.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

El desequilibrio materno-cigótico podría afectar más al desarrollo, ya que podría estar descompensándose en cualquiera de las 3 etapas o incluso en las 3 dependiendo del genotipo, la descompensación entre cargas materna y la actividad de la GCR. Por tanto, en el pez cebra la ausencia de fenotipo para los genes de "Schrödinger", dependería principalmente de que la carga materna sea suficiente para el completo desarrollo embrionario, materno y cigótico, que también afectaría a los WT, como podría ser el caso de nuestros heterocigotos mutantes CRISPR, o que la GCR compense el efecto como es el caso de los mutantes *pdgfrb* TALEN. En humanos la descompensación genética sería casi únicamente cigótica, por la poca contribución materna, lo que aumenta la aparición de defectos más graves en el desarrollo embrionario de los heterocigotos con solo pérdida cigótica.

La ambigüedad del efecto genético de la función de un gen y el desconocimiento todavía de algunos de los mecanismos que de las propias técnicas que nosotros hemos desarrollado, es la que provoca que surjan estas apariciones "cuánticas", y que aparezcan mutantes únicamente cigóticos debido a un mutante para el que no se les ha encontrado fenotipo, o mutantes únicamente maternos debido a la mala caracterización del efecto materno en los morfantes.

1.7. Recapitulación fenotípica

En este estudio, se ha evaluado la homogeneidad fenotípica de cada mutante con los morfantes asociados para ese mismo gen, pero no entre mutantes para un mismo gen. En este caso los mutantes se parecían al morfante, pero no comparamos el parecido con el resto de mutantes para el mismo gen. Muchos mutantes *chd7*-CRISPR no se parecían entre ellos, aunque hay mucho solapamiento fenotípico, muchos recapitulaban parte de los fenotipos, pero en distintos tejidos, dando pie a la teoría de la compensación espacio-temporal observada por (Ando *et al.*, 2021), y que podría explicar los efectos no autónomos de *CHD7*.

Por tanto, la capacidad, o no, de recapitulación fenotípica de un modelo mutante a uno morfante para un mismo gen se explicaría como: la capacidad de producir mutaciones en un gen, que se traduzcan en un fenotipo visible y asociado al fenotipo del morfante para ese mismo gen; y se vería influenciada por 4 componentes principales (Tabla 10), y sus implicaciones:

La razón de los genes de "Schrödinger" quedaría descrita como una necesidad genética por parte de los mecanismos de compensación de mantener el equilibrio materno-cigótico. Sin embargo, serían genes inmunes, y estos también son capaces de recapitular el fenotipo morfante al menos parcialmente dependiendo de la GCR y disminuyendo al máximo la contribución materna en la F3. Los genes de "Schrödinger" serían un cajón de sastre, donde se irían incluyendo los genes inmunes hasta que no se encuentre una causa del efecto, materno o cigótico, a la no recapitulación fenotípica.

La baja homogeneidad fenotípica en la F2 y la aparición de homocigotos adultos en la F3 por parte de la compensación materna y genética es tan grande, que a penas se le puede dar una explicación adecuada a lo que está ocurriendo en la F3. Aunque es muy fácil generar una línea mutante en pez cebra y el tiempo del desarrollo embrionario, adulto y entre generaciones es muy corto, obtener una F3 homocigota, y semirreproductible contribuye a pensar en la prescindibilidad de ese gen en el genoma del pez cebra. Sin embargo, los parálogos no

USC DE COMPOSTELA

siempre cumplen la función completa del gen y son muy específicos de tejido, lo que afectaría solo parcialmente al rescate del fenotipo y a la aparición de fenotipos tardíos. de los embriones y adultos.

La llegada de los mutantes CRISPant ha contribuido mucho a la explicación de este modelo de genes susceptibles e inmunes. Gracias a ellos queda demostrado que las técnicas de mutagénesis dirigida como el CRISPR, los genes maternos e incluso paternos, también pueden ser capaces de recapitular el fenotipo en embriones de la F0, e incluso de la F1. Esto hace que el modelo del pez cebra en algunos casos pueda llegar a ser transitorio, y no establecer un modelo estable. El desentrañamiento de los mecanismos de la GCR activada a través de las PTCs, el estudio de cómo pueden afectar de manera diferente distintas PTCs a la activación de la GCR, como afecta la distinta homología de los genes parálogos y como las mutaciones *missense* también pueden afectar gravemente al fenotipo sin apenas afectar a la secuencia, son cuestiones todavía por resolver que podrían ayudarnos a generar mutaciones leves más precisas y a no desencadenar estas respuestas compensatorias.

1.8. El gen *CHD7* es inmune a la recapitulación fenotípica

A raíz de los resultados de nuestro análisis, podemos afirmar que los peces cebra con mutaciones deletéreas grandes en los genes inmunes que afectan prematuramente a la parada de la traducción de la proteína, mantienen la estabilidad genética gracias a la contribución materna y de los mecanismos de la GCR, gracias a la redundancia genética producida por un evento de duplicación en el pasado de los peces. Sin embargo, estos eventos de duplicación han ocurrido muchas veces a lo largo de la evolución de las especies.

Es probable que la única razón de no observarse tan frecuentemente estos eventos de la GCR en otros organismos modelo, y se haya encontrado ahora en el pez cebra y con tanta frecuencia, resida más en el evento, no compartido con el resto de vertebrados, que en los tipos de mutación. El aumento se debería tanto al aumento en el número de parálogos, como a la proximidad del evento, relativamente reciente en términos evolutivos, y que se traduce en un menor tiempo de divergencia paras las secuencias a diferenciarse y a adaptarse a funciones más específicas.

A diferencia de nuestro modelo mutante *chd7*-CRISPR, e igual que ocurre con otros modelos de enfermedades genéticas raras, la variante mutante contiene una mutación agresiva que genera un PTC muy próximo al inicio de la traducción. Puede que estos mecanismos de GCR estén actuando en favor de la variante sana, pero el rescate del homocigoto a través de genes parálogos no se observa o este evento es muy bajo. La contribución materna parece estar afectando al fenotipo mutante y WT.

Las personas con mutaciones en *CHD7* y síndrome de CHARGE no diagnosticado, tienen mutaciones pequeñas o deleciones/duplicaciones que no afectan a todo el gen (Janssen, 2012). Puede que estas deleciones creen marcos de lectura que generan PTCs, que no activasen esta ruta compensatoria a través de *CHD8*, podrían estar sanas o mostrar un fenotipo leve y, por tanto, pasar desapercibidas entre la población sana. Pudiendo también ocurrir mecanismos compensatorios y de contribución materna de manera sinérgica que afecten al fenotipo. En algunos caso de duplicaciones para otros genes materno-cigóticos, el fenotipo se ve aliviado cuando la enfermedad estaría causada por una haploinsuficiencia, al proporcionar una copia

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

WT adicional de un gen, lo que da como resultado un nivel normal de expresión génica (Carelle-Calmels *et al.*, 2009).

1.9. El sistema "autoinmune" genético del pez cebra.

La alta reactividad de la GCR debido a la redundancia genética en pez cebra y la contribución materna gradual de la madre producen un sistema "autoinmune" para las mutaciones producidas en su genoma. El mecanismo de la GCR, activado a través de las PTCs de la contribución materna, ayuda al pez cebra a mantener un equilibrio genético, para los genes maternos y materno-cigóticos, y un desarrollo notablemente sano, por lo menos hasta las F3, donde esos individuos, podrían cruzarse con individuos WT y mantener viva a la descendencia, o cruzarse consigo mismo y probablemente morir si no hay homología o más concretamente, paralogía suficiente para compensar el desarrollo de los embriones.

El parecido de este sistema "autoinmune" con los sistemas CRISPR/Cas de inmunidad viral, ayudaría a entender como una variante o un gen de un virus se introduce en el genoma y evolutivamente se fija en un tejido concreto, o adquiere una función en la evolución de los organismos eucariotas. Sencillamente, el organismo con esa variante sobrevive, y puede que gracias a ese nuevo fragmento introducido se adapte mejor al ambiente y desarrolle nuevas funciones. Anecdóticamente, en el pez cebra ha habido casos de mutantes que han dejado de serlo en varios laboratorios. Si esto fuese cierto, podría deberse a esta alta reactividad de la GCR por la redundancia genética y la relación de estos sistemas con los sistemas CRISPR/Cas de bacterias y los sistemas de reparación de mutaciones en el DNA.

Una intoxicación por PTCs debido a una carga materna gradual negativa, durante el desarrollo embrionario, podría explicar la aparición de fenotipos relacionados, en individuos WT, por una respuesta inapropiada de la GCR y una sobreactivación de los genes homólogos. Se ha estimado que alrededor del 30 % de las enfermedades humanas hereditarias se deben a la presencia de PTC o mutaciones *frameshift* o *nonsense* que inducen codones sin sentido en los mRNA (Frischmeyer y Dietz, 1999, Popp y Mquat, 2016), y la NMD también parece estar involucrada en muchos de los cánceres humanos (Lindeboom *et al.*, 2016, Popp, y Maquat, 2018). Paradójicamente, estas mutaciones deberían de ser menos lesivas en la población, al degradarse por la vía NMD o producir el rescate del fenotipo por la compensación genética.

La razón de la diferencia entre el efecto de las mutaciones para los genes maternos (inmunes) y materno-cigóticos ("Scrhodinguer"), viene marcada por la importancia de la carga (contribución) negativa y positiva en un contexto temporal. La ausencia de carga o una contribución negativa, a un mutante materno, solo le va a afectar durante la etapa materna. Una mutación leve, sin o con PTCs que activen poco la GCR, y los morfolinos ajustando las dosis y siguiendo los controles, pueden ofrecer buenos resultados.

Para los genes cigóticos, la contribución materna a penas tendrá efecto si la madre no aporta el gen, por lo que toda la compensación dependerá de sus parálogos en la etapa cigótica. Mientras que para un gen materno-cigótico, la contribución materna puede afectar negativamente, y esa explicación solo la tiene el aumento de los PTCs. Este aumento de los PTCs explicaría la gravedad y a la vez variabilidad del fenotipo heterocigoto debido al efecto de una descompensación materno-cigótica.

A raíz de esta explicación todavía por demostrar, se podría decir que la pérdida de homogeneidad fenotípica en el pez cebra se debe a un sistema de "autoinmunidad" genética, a

USC UNIVERSIDADE DE COMPOSTELA

través de ese evento de duplicación genética y el aumento de la actividad de la GCR mediada por lo PTCs, que crean un organismo casi inmune a las mutaciones heterocigotas y poder seguir procreando incluso en homocigosis para algunos genes cigóticos.

1.9.1. La GCR Podría Explicar Muchos de los Mecanismos de Reparación y Duplicación Genética Celulares.

El sistema de la GCR se encarga de alertar a la célula cuando presencia un PTC, pero solo si es mucho más corto que el original (El-Brolosy *et al.*, 2019; Ma *et al.*, 2019). Por lo tanto, podría estar detectando un RNA más pequeño, e incluso puede que circular. El reconocimiento de los PTCs específicamente por el tamaño lleva a pensar a que este reconocimiento se produce a través de la posición del PTC con un punto fijo de la cromatina. Aunque se sabe que los mRNA con PTCs se reconocen en el núcleo, y se retienen, mientras que el mRNA sano sale al citoplasma rápidamente, esta detención también depende del marco de lectura en el que se encuentre el PTC con respecto al mRNA sano, y en muchas células no los mecanismos de degradación no son efectivos, por lo que se mantienen en el citoplasma (Shi *et al.*, 2015; Sato y Singer, 2021), lo que podría explicar, parte de la gran variabilidad fenotípica y molecular entre individuos.

Los PTCs podrían estar unido a proteínas que establezcan la unión con la cápside del RNA y de esta forma se cree un bucle de RNA pequeño, que el organismo podría detectar como extraño y activar el mecanismo de compensación de los genes homólogos. Casi como un sistema CRISPR/Cas de reconocimiento de RNA viral y activación de los genes espaciadores. Ambos mecanismos, en términos generales, comparten las mismas etapas a través de los mismos componentes: proteínas, RNA y genes.

Tabla 9.

1. Morfolinos
1.1. Efecto materno
1.2. Efectos off-target
1.3. Uso indiscriminado en el pasado
2. Efectos materno-cigóticos
2.1. Efecto materno
2.2. Efecto cigótico
2.3. Efecto materno-cigótico
3. Mutación y gen
3.1. Tipo de lesión producida
3.2. Tipo de gen (inmune o susceptible)
4. Efectos de la GCR.
4.1. Redundancia genética
4.2. Homología de los parálogos
4.3. Contribución materna

- GCR: Detección del “anillo” de PTC de RNA patogénico a través de proteínas que producen la activación de genes parálogos duplicados.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

- CRISPR/Cas9: Detección de protoespaciadores de RNA vírico a través de proteínas que producen la activación de genes espaciadores adquiridos.

La explicación del sistema de la GCR entendido como la reacción a la aparición de un RNA patogénico endógeno podría estar muy relacionado genética y funcionalmente con los sistemas CRISPR/Cas. Esta relación contribuiría al entendimiento de cómo estos últimos podrían haber evolucionado hacia un sistema de "inmunidad" a las enfermedades genéticas en un organismo diploide y a un mecanismo evolutivo de los eucariotas, mediante la adquisición de genes de otros organismos, o incluso la duplicación genética propia de varios genes relacionados para la compensación y el mantenimiento de la proteostasis en el desarrollo.

1.10. VARIABILIDAD FENOTÍPICA DE *CHD7* EXPLICADA A TRAVÉS DE LAS PTCS

Las mutaciones habituales en el síndrome de CHARGE, igual que muchas de las mutaciones presentes en el estudio de mutantes, son variantes patogénicas producidas por *indels* que causan *frameshift* (*fs-indels*) (Zentner *et al.*, 2010). Los *fs-indels* están asociadas a una mayor patogenicidad debida a la evasión de los mecanismos de maduración y detección de mutaciones celulares. Se ha visto que estos *fs-indels* pueden evitar la expresión del exón mutado (Lalonde *et al.*, 2017) e incluso evadir la degradación a través de los mecanismos de NMD (Litchfield *et al.*, 2019), lo cual podría estar relacionado. El proceso NMD es solo parcialmente eficiente. El modelo canónico de NMD dicta que una mutación que desencadena un PTC escapará a la degradación si se encuentra aguas abajo, del último complejo de unión del exón (Lindeboom *et al.*, 2016). Por lo tanto, la eficiencia de NMD está íntimamente relacionada con la posición de la secuencia, y se encuentra una eficiencia reducida en: i) el último exón del gen, ii) el penúltimo exón dentro de los 50 nucleótidos de la unión del exón 3', y iii) el primer exón dentro de los primeros 200 nucleótidos de la codificación. secuencia (CDS). Sin embargo, estas reglas solo explican parcialmente la variación en la eficiencia de NMD, y se estima que el 27 % permanece sin explicación en todos los genes, aumentando al 71 % para los genes con compensación de dosis (es decir, genes en los que la eliminación del número de copias se compensa con la regulación al alza del alelo restante) (Lindeboom *et al.*, 2016). Según estas reglas, se predice que únicamente el ~30 % de los *fs-indels* en todos los tipos de cáncer escaparán a la NMD (Hu *et al.*, 2017); sin embargo, no existen datos de lo que ocurre en líneas embrionarias.

La mayoría de *knockouts* para genes maternos o materno-cigóticos resultan letales incluso en heterocigosis, lo que conduce al fracaso de la transmisión de la línea germinal de los alelos nulos. Por ejemplo, la inducción de mutagénesis de *chd* (*chordin*), un gen esencial para la formación del escudo durante la gastrulación (Hammerschmidt *et al.*, 1996), utilizando la tecnología CRISPR/Cas9 convencional, provoca una ventralización severa y letalidad embrionaria (Zhang *et al.*, 2016), lo que impide que la obtención de mutantes adultos para una mayor detección de la línea germinal. Nuestros resultados, y los del resto de mutantes para *chd7,* parecen indicar que la contribución materna está contribuyendo con la enfermedad, y provocando la incapacidad de mantener el gen en heterocigosis.

Sin nos fijamos en los resultados obtenidos, de 3 mutantes distintos para *chd7,* las mutaciones aunque diferentes, todas son susceptibles de producir PTCs prematuras debidas a *indels* que provocan *frameshift*, entre los que nos encontramos nosotros. Además parece que

USC UNIVERSIDADE DE COMPOSTELA

la mutación afecta más a la contribución materna y a la variabilidad fenotípica a medida que el PTC se aproxima al codón de iniciación (Sun *et al.*, 2022, Jamadagni *et al.*, 2021).

Comparando tanto los análisis del fenotipo como en los niveles de expresión del gen *chd7* para distintos mutantes en *chd7,* una PTC más prematura, parece contribuir a una mayor variación genética del fenotipo. Nuestros mutantes *chd7*-CRISPR tienen un PTC que produce un truncamiento en el aminoácido 28. La expresión de *chd7* aumenta según va perdiendo genes sanos de *chd7*, expresando niveles altos en heterocigosis y más en homocigosis, sin embargo, la variabilidad entre los grupos es muy grande. En el estudio de Sun *et al.* (2022), la mutación produce un PTC que produce el truncamiento de la proteína en el aminoácido 850 aproximadamente. Sus mutantes presentan un comportamiento similar, pero fenotípicamente se ven menos afectados entre grupos.

Nuestros mutantes heterocigotos *chd7*-CRISPR, no muestran una homogeneidad fenotípica entre mutantes y presentan una variabilidad muy baja entre hermanos heterocigotos y WT. Sin embargo, en el estudio de Jamadagni *et al.* (2021), la terminación de la proteína Chd7 la sitúan aproximadamente en el aminoácido 1485. La variabilidad fenotípica y de expresión es muy alta entre los heterocigotos y los hermanos WT de un *outcross*, y los efectos en los descendientes de un *incross*, no son tan graves como en nuestros mutantes *chd7*-CRISPR.

Estos resultados parecen indicar que cuanto más prematura es la PTC, más afecta a la GCR y al rescate a través de la contribución materna, produciendo fenotipos más graves a los WT y causando una mayor variabilidad fenotípica independiente al genotipo. Mientras, un PTC más tardío en la traducción, afectaría más gravemente al mutante únicamente cigótico y produciría una menor compensación cigótica de los heterocigotos de un *outcross* para *chd7*, pero una mejor compensación materna o materno-cigótica para los descendientes de un *incross*. Es decir, parece que la contribución materna puede afectar a la compensación a través de la GCR por los PTCs de las variantes *nonsense* de los padres.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

2. EL FENOTIPO CHARGE DE LOS MUTANTES *CHD7*-CRISPR

En los resultados de los estudios previos realizados (Arana, 2016) queda reflejada la falta de homogeneidad fenotípica de la que hablábamos en el apartado anterior. En una de las conclusiones se dice: "Los resultados tanto de la caracterización fenotípica como del análisis de la senescencia embrionaria, muestran un claro efecto de la contribución materna de *chd7* en el desarrollo de pez cebra." Pero gracias a ese claro efecto de la contribución materna, el efecto materno de *chd7* parece brillar en forma de senescencia embrionaria.

A falta de un fenotipo evidente para el modelo *chd7*-CRISPR, expuesto en los resultados de ese trabajo, nos propusimos estudiar cuestiones más profundas, como es la contribución materna, para comprender este y otros mecanismos que puedan estar actuando tanto por parte del pez cebra como del gen *chd7*. Pero sin un homocigoto mutante, la búsqueda de la contribución del efecto materno en *chd7,* igual que la proteína Chd7 de nuestros mutantes, parecía estar más truncada que nunca.

Como solo han llegado a adultos dos homocigotos para el gen en nuestro laboratorio, pero también hay casos documentados de peces cebra mutantes homocigotos para *chd7* en otros laboratorios, nos hace pensar que en el caso del pez cebra puede estar ocurriendo algún tipo de mecanismo de compensación mediado por la GCR o la contribución materna. Decidimos cambiar el rumbo de los experimentos y realizar cruzamientos *incross,* además de los *outcross*, y estudiar qué estaba afectando a nuestro modelo mutante *chd7*-CRISPR.

2.1 El Fenotipo CHARGE en Humanos

Estudiar a los individuos con fenotipo y no por genotipo fue un gran avance para nuestra investigación. El síndrome de CHARGE en humanos, es una enfermedad que se confirma muy bien fenotípicamente, pero no siempre se encuentra el gen causal, o se encuentra un gen distinto a *CHD7* (Lalani *et al.* 2004; Sanlaville y Verloes, 2007; Pampal, 2010; Zentner *et al.*, 2010; Butcher *et al.*, 2017). Existe también una amplia variabilidad fenotípica, incluso entre familiares y no familiares con la misma mutación. En un estudio se reportaron 5 familias no emparentadas con síndrome CHARGE. Dos familias, con la misma mutación, mostraron una clara transmisión de padres a hijos, y el padre se vio menos gravemente afectado que los hijos. Una tercera familia, con el padre asintomático pero con mosaicismo somático por una mutación, ya que la misma mutación estaba presente en ambos niños afectados. En las últimas 2 familias, dos hermanos se vieron afectados, pero no se identificaron mutaciones en los padres, lo que sugiere mosaicismo de la línea germinal (Jongmans *et al.*, 2008).

Se han demostrado factores epigenéticos que podrían ser en última instancia la verdadera causa de la enfermedad (Kouzarides, 2007; Lalani *et al.*, 2006; Miraoui *et al.*, 2014; Verhagen *et al.*, 2014; Latcheva *et al.*, 2016; Priest *et al.*, 2016; Butcher *et al.*, 2017; Su *et al.*, 2018; Sánchez-Fernández *et al*., 2020). La contribución materna podría estar afectando incluso a nivel epigenético durante la enfermedad en humanos. Estas variabilidades entre pacientes con síndrome de CHARGE recuerdan mucho a las discrepancias fenotípicas encontradas en mutantes y hermanos WT de los cruzamientos *outcross* (Arana, 2016). Además, las afecciones del WT (mutantes maternos) y la variabilidad fenotípica de los mutantes, parecen estar muy relacionadas con la contribución materna, y no mediadas a través de los mecanismos de GCR (Selman *et al*., 1993; Ciruna *et al.*, 2002; Pelegri, 2003; Moravec *et al.*, 2021; Shi, 2022).

USC UNIVERSIDADE DE COMPOSTELA

2.2. Establecimiento del Fenotipo CHARGE en Pez Cebra

Aunque los embriones mutantes para *chd7* no recapitulan todas las anomalías descritas en las observaciones realizadas en embriones morfantes de pez cebra para *chd7,* el establecimiento del fenotipo CHARGE durante el desarrollo embrionario en embriones heterocigotos, la presencia de adultos heterocigotos *chd7*-CRISPR con fenotipo y los resultados de los distintos análisis genéticos y moleculares, nos llevaron a continuar con la validación del modelo *chd7*-CRISPR a pesar de no encontrar un fenotipo evidente en los embriones heterocigotos. Así que nos propusimos comprender para evitar en un futuro los posibles efectos compensatorios.

De esta forma comenzamos a hacer el otro y único cruzamiento posible y que nos permitía obtener homocigotos maternos-cigóticos, el cruzamiento *incross* entre mutantes heterocigotos para *chd7*. Es por eso que el primer gran logro, fue establecer el modelo mutante *chd7*-CRISPR como el grupo de individuos descendientes del *incross* de heterocigotos para la mutación *chd7*-CRISPR. Aunque es más sencillo trabajar así, porque se evitan todos los pasos del genotipado de los embriones, dificulta el trabajo a la larga, pues todavía faltaba comprender las diferencias entre los mutantes de cada grupo. Pero siendo optimistas, el establecimiento del fenotipo mutante estaba más cerca.

2.2.1. El Cruzamiento Incross de Mutantes Heterocigotos *chd7*-CRISPR Muestra un Fenotipo en la Expresión de Genes, Independiente del Genotipo

En humanos, varios estudios han demostrado que el análisis de expresión génica muestra un patrón característico de diferencias en la expresión génica que distingue a las personas con síndrome CHARGE con mutación *CHD7* de los controles (Lalani *et al.*, 2006) y se han encontrado perfiles de expresión idénticos en pacientes con síndrome de CHARGE y mutaciones en *CHD7* y marcas epigenéticas de metilación del DNA similares a las de otras enfermedades raras (Priest *et al.*, 2016; Miraoui *et al.*, 2014; Butcher *et al.*, 2017; Verhagen *et al.*, 2014). Los peces cebra embriones *chd7*-CRISPR *incross* con fenotipo CHARGE leve a las 96 hpf presentan unos perfiles de expresión similares independientemente del genotipo, para algunos genes marcadores de senescencia embrionaria (Fig, 50). Sin embargo, en los mutantes homocigotos con fenotipo grave de esos cruzamientos, algunos marcadores del desarrollo se observan desregulados significativamente en los patrones de expresión, mayores a los que se observan cuando no son seleccionados, y con una menor variación entre fenotipos que entre genotipos. Por lo tanto, al igual que lo observado en morfantes, la deficiencia en *chd7* producida por la mutación *chd7*-CRISPR, produce alteraciones en los niveles de expresión de estos genes y de sí mismo (Fig. 33 y 34).

En los cruzamientos *incross* la expresión de *chd7* es mayor en los embriones mutantes heterocigotos y homocigotos, que en los hermanos WT, lo que podría indicar una activación de la GCR, sin embargo, las desviaciones dentro de los grupos son bastante grandes. En los embriones mutantes heterocigotos *chd7*-CRISPR del cruzamiento *outcross*. no se observan elevaciones de los niveles de expresión de *chd7* ni mucha variabilidad entre los embriones mutantes heterocigotos y sus hermanos WT. Al comparar los embriones seleccionados con fenotipo grave, con embriones WT de un cruzamiento *incross* WT, vemos que si existe un aumento significativo de *chd7*, en algunos momentos, y que implica la desregulación de otros genes del desarrollo, pero no en los marcadores de senescencia embrionaria para los fenotipos

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

menos graves (Fig. 35 y 50). La subida de los niveles de expresión *chd7* podría deberse a una activación de la GCR, para intentar compensar la haploinsuficiencia.

2.2.2. Los Mutantes Chd7-CRISPR Presentan Alteraciones del Comportamiento Relacionadas con un Programa de Senescencia Embrionaria Mal Establecido

Todos los resultados de los análisis fenotípicos y moleculares podrían relacionarse con los defectos en las alteraciones del comportamiento de los mutantes *chd7*-CRISPR. Tanto las anomalías ópticas y óticas, las malformaciones en la columna, aletas y cartílagos como las alteraciones en los patrones actividad SA-β-Gal en el cerebro, son a causa de un programa de senescencia embrionaria mal establecido temporalmente.

Otros estudios han observado una natación anormal y circular en morfantes para *chd7* como la que presentan nuestros embriones mutantes, relacionada con una expresión reducida de *chd7* que provoca una organización anormal de neuronas motoras, así como la curvatura del eje del corporal, defectos en los segmentos vertebrales y somitas, hipodesarrollo de la cresta neural, microftalmia, falta de fotorreceptores en el ojo y otras anomalías oftálmicas, hipoplasia de las aletas pectorales (Patten *et al.,* 2012, Balow *et al.,* 2013; Asad *et al.,* 2016). En todos estos tejidos, en condiciones normales, se activa el programa de senescencia embrionaria en los momentos en los que se observan esos defectos (apartado 4 de Resultados), en los embriones *chd7*-CRISPR se observan alteraciones de la actividad SA-β-Gal en esos tejidos (Fig. 41-48) y alteraciones en los marcadores *p15*, *p21* y *p53* (Fig. 50). Estas anomalías, por tanto, estarían causadas por la alteración de la expresión de *chd7* y el establecimiento correcto de los programas en los que interviene, a través de la inhibición de la expresión de *p53*.

A pesar de que pueda deberse a un programa de senescencia embrionaria mal establecido, muchas de estas alteraciones están causados durante la función, materna o materno-cigótica de *chd7*. Revelando la importancia de este gen como un gen materno y materno-cigótico, pudiendo ser mejor observados, en los morfantes, algunos efectos de la haploinsuficiencia en *CHD7* de la enfermedad humana.

Aunque aún no se consideran parte del diagnóstico fenotípico del síndrome de CHARGE, muchas personas con este síndrome muestran déficits neurológicos que van desde moderados hasta graves, incluyendo comportamientos similares al autismo, trastornos obsesivo-compulsivos, TDAH, ansiedad, agresividad y convulsiones (Hartshorne et al., 2005; Souriau et al., 2005; Johansson et al., 2006; Bergman et al., 2011; Hartshorne et al., 2017). Se han descubierto casos de trastornos del espectro autista (TEA) asociados con mutaciones en el gen *CHD7* (O'Roak et al., 2012; Takata et al., 2018), lo que sugiere una fuerte relación entre la deficiencia en *CHD7* y el desarrollo y funcionamiento del sistema nervioso central. Se ha descrito un comportamiento anormal y alterado en peces cebra adultos mutantes para *chd7*, similar al observado en los adultos heterocigotos para *chd7* de nuestro estudio (Liu y Liu, 2020).

Además de su papel en la activación y migración de las células de la cresta neural (Bajpai et al., 2010; Okuno et al., 2017), *CHD7* también es crucial para el mantenimiento y la proliferación de las células madre neurales en el cerebro durante el desarrollo (Ohta et al., 2016) y su inactividad en el cerebro adulto (Jones et al., 2015). Se ha identificado una relación entre comportamientos ansiosos y agresivos y una mayor expresión de transportadores de glicina (Liu y Liu, 2020). Además, se ha demostrado que *CHD7* es capaz de activar y inhibir la expresión de genes en células madre embrionarias (Schnetz et al., 2010).

USC UNIVERSIDADE DE COMPOSTELA

Además de para la activación y migración de las células de la cresta neural (Bajpai *et al.,* 2010; Okuno *et al.,* 2017), CHD7 facilita el mantenimiento y la proliferación de células madre neurales en el cerebro en desarrollo (Ohta *et al.,* 2016) y la inactividad en el adulto (Jones *et al.,* 2015). Han identificado comportamientos ansiosos y agresivos relacionados con una mayor expresión de transportadores de glicina (Liu y Liu, 2020). Además, se ha demostrado que CHD7 es capaz tanto de activar como de inhibir la expresión de genes de células madre embrionarias (Schnetz *et al.*, 2010).

En este sentido, el comportamiento del gen se estaría correspondiendo al de un gen cigótico. Los trastornos en el adulto se observarían en el caso de que la deficiencia en el gen no fuese suficiente y provoque un trastorno degenerativo. Sin embargo, la contribución negativa de la madre, también podría afectar a un gen materno-cigótico si tuviera función adulta (Leader *et al.*, 2002; Payer *et al.*, 2003; Wagner *et al.*, 2004; Lindeman y Pelegri, 2010). En ese caso estaríamos hablando de la deficiencia en *CHD7* también podría causar trastornos en la senescencia celular en el adulto.

Que los mutantes heterocigotos adultos para *chd7* empiecen a mostrar fenotipos en diferentes laboratorios todos a la vez, además de demostrar un mal análisis preliminar del modelo, y la relevancia de la función de los genes durante todo el desarrollo embrionario, parece que nos refleja una cuestión temporal. Cuanto más tiempo pasa, los fenotipos que se veían de vez en cuando, aparecen más a menudo. Esto, como todo lo relacionado con *CHD7*, parece una cuestión de carga, pero en este caso no solo de déficit, sino también una acumulación negativa, que provoca el agravamiento del fenotipo independientemente del genotipo, y la aparición de fenotipos tardíos.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

3. LA CONTRIBUCIÓN MATERNA DE CHD7

A diferencia de lo observado en los patrones de actividad SA-β-Gal con embriones *chd7*-CRISPR *in toto* (Fig. 45) que se observa actividad SA-β-Gal en el ojo a las 33 hpf, en cortes histológicos, solo encontramos senescencia en el ojo a partir de las 96-120 hpf (Fig. 41; Arana, 2016). En comparación con el mutante, no hemos observado diferencia en la tinción SA-β-Gal en este tejido, ni tampoco hemos encontrado diferencias morfológicas. En experimentos con morfolinos, se observó, que la disminución de la expresión de *chd7* causaba un desorden celular, en las capas del ojo. Este desorden no es comparable al de nuestros mutantes heterocigotos *chd7-CRISPR* de los cruzamientos *outcross* (Figura 41). Sin embargo, el desarrollo del ojo en los embriones *chd7*-CRISPR de cruzamientos *outcross*, es defectuoso independientemente del genotipo (Fig. 41 y 43). Lo mismo pasa en otros órganos como el oído, o la presencia de defectos como edemas, que ocurren en baja frecuencia en los embriones *chd7*-CRISPR *outcross* independientemente del genotipo (Arana, 2016) y sin apenas asociación con las alteraciones en los patrones de expresión de los marcadores de senescencia embrionaria.

En todos los cruzamientos, únicamente se han observado retrasos en la aparición de actividad SA-β-Gal (Fig. 41-48; Arana, 2016), asociados sobre todo al retraso en el desarrollo embrionario, y patrones en los niveles de expresión de los marcadores *p15*, *p21* y *p53* (Fig. 50) asociados al fenotipo CHARGE de pez cebra. La activación de la senescencia, por lo tanto, no depende del genotipo. Los homocigotos maternos y materno-cigóticos posibles o no están, por qué murieron antes del efecto materno o materno-cigótico, o presentan actividad SA-β-Gal, indicativo de la activación de la senescencia embrionaria. La aparición de fenotipos en los WT, la pérdida de homogeneidad fenotípica en los mutantes heterocigotos y homocigotos, y la aparición de los fenotipos tardíos, tanto en embriones mutantes como en adultos, se deben a que la contribución materna está afectando al análisis de los resultados. Los huevos tienen una carga gradual de *chd7* materno*,* por lo que el embrión podría verse o no afectado durante esas etapas del desarrollo en las que el producto materno interactúa con el producto cigótico. Esto afectaría tanto a los embriones mutantes como WT del cruzamiento de heterocigotos *chd7*-CRISPR, y explicaría también el efecto cigótica de *chd7* y la recuperación de fenotipos, así como la aparición de fenotipos tardíos, incluso una función para *chd7* en el adulto revelada a través de los fenotipos en los heterocigotos adultos *chd7*-CRISPR.

De una forma maternal, el gen *chd7*, decide que células van a activar los procesos de senescencia programada a través de su expresión. Puede que de una forma epigenética, o a través del mRNA, marque en que células se va a llevar a cabo el programa para el desarrollo la senescencia embrionaria. De esta forma solo activan la senescencia las células que expresan *chd7*.

3.1. La Contribución Materna de *chd7* Activa el Programa de Senescencia Embrionaria

La expresión de *chd7* es ubicua desde el estadio de 2-4 células hasta los de esfera y 10 somitas (Asad *et al.*, 2016). Esta expresión se correlaciona temporal y espacialmente con la observación hecha de la presencia de actividad SA-β-Gal en los estadios de entre 32-64 células-domo y 8-13 somitas (Arana, 2016; Asad *et al.*, 2016; Villiard *et al.*, 2017). La

USC UNIVERSIDADE DE COMPOSTELA

senescencia celular en el embrión, por tanto, comienza antes de que el embrión comience a expresar el *chd7* endógeno. Si la madre es WT o aporta una contribución materna positiva, la contribución realizada por esta ayudaría al embrión a establecer un programa correcto de senescencia embrionaria.

Por otro lado, los embriones WTm hijos de una hembra mutante heterocigota para *chd7*, tendrían problemas con el programa de senescencia celular, en esos primeros momentos del desarrollo embrionario, en los que no hay transcripción activa. Esto estaría causando un pequeño sesgo a la hora de analizar las imágenes y considerar a los hijos WT de un individuo mutante heterocigoto, como completamente WT, cuando podrían estar ocurriendo defectos en el desarrollo causados por la contribución materna.

En los peces mutantes para *chd7*-CRISPR se produce un fenotipo similar a los morfantes para *chd7*-MOtb, pero no en los coinyectados con *p53* ni *chd7*-MOsb. La coinyección con *p53*-MO crea un leve rescate en el fenotipo, lo que coincide con las observaciones hechas en ratones homocigotos para C*hd7* y heretocigotos para *p53* (Van Nostrand *et al.* 2014), confirmando un papel aguas abajo de *chd7* para p53. La ausencia total de carga en *chd7* en el homocigoto provoca un fenotipo más grave en los ratones para terminar siendo letal, igual que en humanos. Pero como en pez cebra, gracias a la inhibición de la expresión de *p53* estos ratones, rescatan el fenotipo por lo menos 1 día más de desarrollo (Van Nostrand *et al.* 2014).

3.1.1. El Gen *chd7* Bloquea las Rutas de Activación de la Senescencia Celular en las Células Programados Para Activar la Senescencia Embrionaria

El gen *chd7* se coexpresa espacial y temporalmente en los mismos órganos con actividad SA-β-Gal. Esta actividad solo aparece en algunas de las células que expresan *chd7* en ese tejido. Cabría esperar que la bajada en la expresión del gen *chd7* como inhibidor de las rutas de la senescencia embrionaria, provocaría que en esas mismas células del órgano en las que se encuentra *chd7*, se activara el proceso de senescencia.

En este sentido, no se observa una mayor actividad SA-β-Gal, ni un adelanto en el programa de senescencia, debida a la deficiencia en *chd7* ni en esas ni en otras regiones del tejido en los mutantes *chd7*-CRISPR. Por lo tanto, *chd7* no está activando el programa de senescencia embrionaria debido a su deficiencia como cabria esperar. Puede que su trabajo sea inhibirlo, pero la expresión de *chd7*, aunque se mantiene, cae durante la instauración del programa. Aunque la expresión de *chd7* disminuye, las células del tejido siguen expresando *chd7* (Fig. 50).

3.1.2. La Pérdida de la Función Cigótica en *chd7* No Aumenta la Expresión de *p53*

El efecto de *chd7* en los morfantes, podría no ser tan inespecífico, produciéndose a través de la eliminación de la función materna, inhibidora de la apoptosis y de la activación de *p53*, que inducen los propios morfolinos. Llegados a este punto, vale la pena señalar que CHD7 regula la biosíntesis de rRNA a través de la proteína Treacle mutada en el síndrome de Treacher Collins (Zentner *et al.*, 2010) y que los mutantes Tcof1 pueden rescatarse de manera similar al cruzarse con ratones heterocigotos LoF para *p53* (Jones *et al.,* 2008). La variabilidad fenotípica observada en los mutantes y WT, la presencia de homocigotos con compensación fenotípica, incluso adultos homocigotos sin fenotipo en nuestro modelo de pez cebra mutante *chd7*-CRISPR, son efectos atribuibles a la contribución materna y no un efecto

USC UNIVERSIDADE DE COMPOSTELA

debido a una compensación momentánea. El rescate con *p53*-MO produce un fenotipo similar al de algunos embriones mutantes y WT encontrados en nuestro modelo *chd7*-CRISPR en momentos previos a la transición a la ZGA.

La dependencia de la carga en *chd7* y la contribución materna del pez cebra en este gen, revelan una cuestión sobre la homocigosis. Los humanos y ratones en homocigosis no pueden vivir, pero los peces cebra sí. La haploinsuficiencia debida a las mutaciones, desata un fenotipo concreto, tanto en humanos como en ratones. En mamíferos, la contribución materna no es una cuestión tan relevante, como ya se ha comentado anteriormente, pero el leve rescate fenotípico solo en un momento determinado, para acabar siendo letal, en todos los modelos de vertebrados para *CHD7*, está mas relacionado temporalmente con la transición a la ZGA (Fig. Sup. 2).

3.1.3. Muchos de los Defectos del Desarrollo de los Peces Cebra c*hd7*-CRISPR Se Deben a las Alteraciones del Programa de Senescencia Embrionaria

Todos los resultados de la caracterización fenotípica y el estudio molecular de la senescencia embrionaria en los embriones mutantes *chd7*-CRISPR y morfantes para *chd7* confirman y amplían las observaciones realizadas por Rhinn *et al.* en junio de este mismo año, para todos los tejidos en los que se encuentra senescencia embrionaria, donde demuestran que una senescencia mal regulada en las células del neuroepitelio puede contribuir a defectos del desarrollo (Rhinn *et al.*, 2022).

El gen *Chd7* se expresa en las células basales olfativas, que son la población de células madre neurales del epitelio olfativo. Se observó que los ratones heterocigotos para *Chd7*, tenían defectos en la proliferación de las células madre neurales que conducía a una reducción en la producción y regeneración de neuronas sensoriales olfativas (Zentner *et al.*, 2010). Estos resultados sugieren que se requiere *CHD7* para el desarrollo y mantenimiento del epitelio olfativo.

Además de los defectos del oído interno en la línea de ratones Chd7Gt/+, se informaron defectos en el sistema olfativo, incluida la disfunción olfativa y la hipoplasia del bulbo olfativo (Layman *et al.*, 2009). Chd7 se expresa en las células basales olfativas, que son la población de células madre neurales del epitelio olfativo.

La presencia de más estructuras como: el tejido olfativo, zonas del sistema nervioso central, la vesícula ótica, la mácula media del oído, los aros faríngeos o los el borde de los somitas, con actividad SA-β-Gal positiva en los mutantes *chd7*-CRISPR (Fig. 41-48), que expresan *chd7* (Jacobs-McDaniels y Albertson, 2011; Asad *et al.*, 2016; Sanlaville *et al.,* 2006; Bosman *et al.,* 2005; Aramaki *et al.,* 2007; Liu *et al.*, 2018) y que aparecen afectadas en los pacientes con síndrome de CHARGE, no solo confirma que las estructuras que presentan senescencia son las afectadas en el síndrome de CHARGE, sino también, que las deficiencias en la expresión del gen *chd7,* no provocan la inactivación ni activación incorrecta del programa de senescencia embrionaria, para el correcto desarrollo, a pesar de que *chd7* es un inhibidor necesario de este. Sin embargo, sí podría estar causando un desajuste de este programa, en su entrada, mantenimiento y salida.

En contraste con los pacientes CHARGE con solo un alelo mutante de *CHD7*, los peces mutantes heterocigotos para *chd7* no muestran fenotipos obvios, excepto por el comportamiento agresivo y similar a la ansiedad (Liu y Liu, 2020). A diferencia de nuestro

USC UNIVERSIDADE DE COMPOSTELA

fenotipo CHARGE gravemente afectado en los mutantes *chd7*-CRISPR, los peces homocigotos *chd7* de otros laboratorios muestran fenotipos leves similares a CHARGE, como ojos más pequeños, corazón agrandado con edema, incapacidad para inflar la vejiga natatoria (Prykhozhij *et al.*, 2017), cabeza pequeña, malformaciones del cartílago craneal y defectos de los nervios craneales (Jamadagni *et al.*, 2021).

La disminución del tamaño del tracto gastrointestinal (Cloney *et al.*, 2018), las células de la cresta neural craneales positivas para *sox10* dispersas (Liu *et al.*, 2019) y el desarrollo deficiente de las células T y el timo (Liu *et al.*, 2018) también se registraron en mutantes homocigóticos para *chd7*. Nuestros mutantes para *chd7*-CRISPR presentan además de células derivadas de la cresta neural (melanocitos y condrocitos) dispersas y una disminución de los macrófagos (Fig. 32, no asociada con el timo) a las 48 hpf también presentan malformaciones en el intestino en la etapa adulta (no mostrado). El intestino es un órgano con una alta proliferación durante la etapa materno-cigótica y muestra actividad SA-β-Gal positiva tanto en mutantes para *chd7* y WT (Fig. 42).

Hasta este año tampoco se habían descrito, tan detalladamente en los mutante, los fenotipos de los cartílagos craneofaciales, también presenciados en morfantes para *chd7*, y que como observamos en los fenotipos maternos (Fig. 22 y 23) no se deben exclusivamente a las alteraciones materno-cigótas como se supuso anteriormente (Sun *et al.* 2022). En conclusión, observamos que, no solo los tejidos en los que se observan malformaciones o anomalías en nuestros mutantes, están afectados en el síndrome de CHARGE y expresan senescencia embrionaria, sino también que, otras alteraciones observadas, como la infiltración de pigmento o malformaciones en estructuras no relacionadas, y no relacionados con los rasgos característicos del síndrome de CHARGE, también presentan actividad SA-β-Gal. Nuestros datos amplían las observaciones fenotípicas realizadas en los modelos de pez cebra mutantes para *chd7* anteriores, y validan las anomalías descritas en estos (Liu et al., 2018; Prykhozhij et al., 2017; Cloney et al., 2018; Jamadagni et al., 2021; Sun et al., 2022). Añadimos, nuevas características fenotípicas, conductuales y moleculares, en embriones y adultos para *chd7*, y todas ellas relacionadas probablemente con las alteraciones en el establecimiento y la regulación de los programas de senescencia embrionaria y celular en los tejidos embrionarios.

3.2. El Efecto Materno del Gen *chd7*

Como se comentó en la introducción, los genes con efecto materno implican que los individuos a pesar de su genotipo podrían ser mutantes de algún tipo, maternos, cigóticos o materno-cigóticos (Fig. 12), y que esto repercuta en su fenotipo, según pierdan o no el producto materno y cigótico (Ciruna et al., 2002). De esta forma, la falta de homogeneidad de nuestros mutantes, y la idea de que el gen *chd7* tenga un efecto materno y afecte al fenotipo de nuestros mutantes y WT, se hace posible.

El producto materno en el pez cebra, es el conjunto sobre todo de:

1. mRNA
2. Proteínas

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Estos son donados por la madre, para el correcto desarrollo del embrión en los primeros estadios. La importancia, por tanto, de un mRNA sano o enfermo, es muy grande, porque este implicaría la producción a su vez de varias proteínas. Sin embargo, en humanos la importancia de las proteínas es más grande, sobre todo los factores epigenéticos de la impronta materna y paterna (Yurttas *et al.*, 2008; Tong *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2010; Burns *et al.*, 2003; Yu *et al.*, 2014; Mahadevan *et al.*, 2017; Tashiro *et al.*, 2010; Gao *et al.*, 2018).

3.2.1. Los Mutantes *Chd7*-CRISPR Muestran una Amplia Variabilidad Fenotípica Independientemente del Genotipo

Los embriones *chd7*-CRISPR presentan un gran solapamiento fenotípico, de patrones similares de afecciones y malformaciones con una gravedad variable entre individuos, y de tejidos afectados independientemente del genotipo. Como sería de esperar para un gen materno, en los cruzamientos *incross* de heterocigotos *chd7*-CRISPR, se despliega un amplio abanico de fenotipos. El fenotipo CHARGE de pez cebra, descrito como la presencia de 3 o más de las características asociadas al morfante para *chd7* y al síndrome de CHARGE en humanos, en los cruzamientos *outcross*, solo se presentaba ligeramente en los hermanos WT, y los pocos embriones más graves se descartaron del estudio. Sin embargo, en los cruzamientos *incross* este fenotipo CHARGE se hace más evidente independientemente del genotipo (Fig. 22-24 y 27-29).

Los defectos producidos en los órganos, como la ausencia de estos, son anteriores a la formación de los mismos y la aparición de la senescencia embrionaria, y, por tanto, no pueden atribuirse a defectos en una actuación de la senescencia embrionaria. La variabilidad fenotípica observada, en cuanto a órganos afectados, son dependiente de la dosis de *chd7* materna, y no al efecto cigótico de la formación de órganos y la senescencia embrionaria. El efecto del cigótico, si fuera la causante principal de la enfermedad debida a la haploinsuficiencia de *chd7*, actuaría también en el fenotipo de los heterocigotos *chd7*-CRISPR *outcross*, y se observaría una mayor homogeneidad fenotípica con el morfante. Sin embargo, la discrepancia entre heterocigotos *chd7*-CRISPR y morfantes para *chd7* es muy grande, así como su homología con sus hermanos WT y otros WT, en estos cruzamientos.

3.2.2. La Variante Mutante *Chd7*-CRISPR de Pez Cebra Es Heredable en Heterocigosis Gracias a la Contribución Materna

Los resultados de la caracterización fenotípica aquí recogidos validan a nuestro pez cebra mutante *chd7*-CRISPR como un modelo útil para el estudio tanto del gen chd7 y las implicaciones de su déficit en el síndrome de CHARGE, como también para el estudio de diferentes mecanismos genéticos que ocurren en el pez cebra. El síndrome de CHARGE no es una enfermedad hereditaria, sin embargo, nuestro modelo hereda la mutación sin apenas afectar a su fenotipo.

Los embriones *chd7*-CRISPR descendientes del *incross* presentan defectos como malformaciones y alteraciones en los patrones de expresión génica de algunos genes del desarrollo embrionario como *sox2*, *jag1* o *dfna5* (Fig. 33-34) relacionados con *chd7*. Las variaciones en la expresión de estos genes son muy grandes dentro de cada grupo de mutantes heterocigotos y homocigotos. Estas variaciones disminuyen cuando seleccionamos a los individuos fenotípicamente. En el síndrome de CHARGE existen patrones de expresión y

USC UNIVERSIDADE DE COMPOSTELA

huellas epigenéticas similares entre la población enferma, y distinta entre la población sana (Lalani *et al.*, 2006; Butcher *et al.*, 2017; Priest *et al.*, 2016; Miraoui *et al.*, 2014; Butcher *et al.*, 2017; Verhagen *et al.*, 2014).

La mutación en homocigosis para *chd7*-CRISPR resulta letal, como para muchos otros genes de efecto materno (Zhang *et al.*, 2019; Moravec *et al.*, 2021; Zhang *et al.*, 2021; Shi, 2022), y nuestros datos apuntan a que existe algún evento en el desarrollo en torno a las 144 hpf que los conduce a la muerte (Figuras 21 y Sup. 2). Sin embargo, han existido casos de individuos mutantes chd7-CRISPR que han conseguido evitar esas barrares de la homocigosis y han llegado a adultos sin un fenotipo llamativo observable.

Si *chd7* es un gen materno, la madre heterocigota para *chd7*, podría depositar el producto materno suficiente del gen para el desarrollo completo de un embrión homocigoto. Si no importa la carga, los homocigotos materno-cigóticos, serían homocigotos cigóticos y la contribución materna no podría explicar la aparición de los, homocigotos. Sin embargo, el hecho de que existan homocigotos para *chd7* siendo un gen materno y letal, nos plantea la cuestión de si podrían estar actuando otros mecanismos compensatorios como la GCR que jueguen en nuestra contra (El-Brolosy *et al.*, 2018).

3.2.3. Los Efectos del Gen *chd7* Son Dependientes de la Dosis

La mutación en heterocigosis de *chd7*-CRISPR delata algunos de los defectos propios de la deficiencia en *chd7* y el comportamiento de la enfermedad en humanos. La enfermedad se debe a la deficiencia por la haploinsuficiencia del gen *CHD7*, lo que significa que es una cuestión dependiente de la carga. Una sola copia del gen no es suficiente para desarrollar completamente al embrión, se necesita una dosis más alta para completar todos los eventos celulares que están ocurriendo durante el desarrollo.

La relación cada vez más evidente de *chd7* con la contribución materna, y probablemente con la activación del producto cigótico, nos llev a intentar comprender más el modelo de pez cebra y desarrollar un modelo gradual de la carga de los genes de efecto materno (Fig. 52). Son evidentes las implicaciones de la carga y la distribución del material genético en las divisiones celulares (Kane et al., 1992; Abdelilah et al., 1994; Kane y Kimmel, 1993; Zamir et al., 1997; Chang y Meng, 1995; Webb et al., 1997; Créton et al., 1998). Las deficiencias en la carga del material genético de *CHD7* explicarían mucho la variabilidad fenotípica entre los pacientes con síndrome de CHARGE y en nuestro modelo mutante *chd7*-CRISPR.

La variabilidad fenotípica debida a la dosis del producto genético materno, podría afectar todavía más al pez cebra. Además del extraordinariamente rápido desarrollo embrionario del pez cebra, este, a diferencia del desarrollo de los humanos, es externo. Por ello es muy importante la contribución materna de la madre al embrión, principalmente antes de la transición a la ZGA. El efecto de la contribución materna podría tanto beneficiar como perjudicar el desarrollo de nuestro modelo *chd7*-CRISPR, ya que la madre heterocigota podría aportar a los embriones mutantes una mayor carga de material genético sano, pero también mutado.

Es crucial comprender estos efectos de la contribución materna en pez cebra, para poder hacer un uso apropiado del modelo. Los efectos de la contribución materna del material genético de este gen en humanos, probablemente no estén tan implicados en el desarrollo del normal, pero si podría estar relacionado con el desarrollo del síndrome de CHARGE. Las

USC UNIVERSIDADE DE COMPOSTELA

deficiencias en la carga del producto genético de *CHD7,* materno y cigótico, explicarían en gran medida la variabilidad fenotípica entre los pacientes con síndrome de CHARGE. Aunque la enfermedad se debe a mutaciones *de novo* en la mayoría de los casos, siendo los padres genéticamente sanos, en algunos casos el mosaicismo germinal podría explicar que el mRNA de la madre y una proteína deficiente, pudieran estar contribuyendo a la variabilidad fenotípica, al intervenir con el producto cigótico, además de producir algunos de los casos de síndrome de CHARGE sin mutaciones en *CHD7*.

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

3.3. Teoría de la Contribución Materna Gradual

La mutación *chd7*-CRISPR descrita en este estudio es letal en homocigosis, por lo que no es posible realizar los cruzamientos necesarios para estudiar la contribución del componente materno (Fig. 12), y obtener los mutantes maternos, cigóticos y materno-cigóticos. Sin embargo, teóricamente sí se podrían obtener estos mutantes realizando cruzamientos incross entre mutantes heterocigotos. Es lógico pensar que la concentración del producto materno no es la misma en todos los óvulos durante la gametogénesis. Durante la gametogénesis, la madre mutante heterocigota distribuiría una concentración distinta de mRNA y proteínas mutantes y WT a cada óvulo. Esto implica que existirían óvulos genéticamente mutantes o WT con una concentración gradual de mRNA WT (Fig. 52). En este caso, la contribución materna sería gradual y la obtención de mutantes maternos y cigóticos dependería de esta carga materna, produciendo una gran variabilidad fenotípica y una pérdida de concordancia entre genotipo y fenotipo, como la observada en nuestro modelo *chd7*-CRISPR.

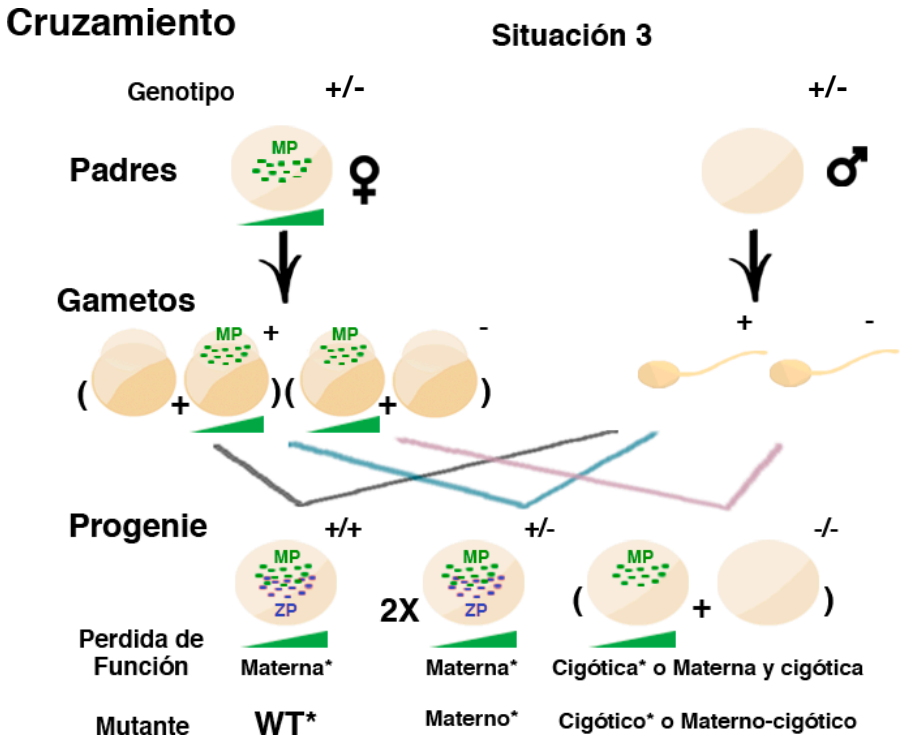


Figura 52. Esquema de la teoría de la contribución materna gradual para la obtención de mutantes meternos cigotos y materno-cigóticos, con individuos mutantes haploinsuficientes.

Como la concentración del producto materno es gradual, provocaría que el efecto, ya en sí dependiente de la dosis en el caso de *chd7*, también fuese gradual, y variase mucho el efecto, explicando la diversidad fenotípica en los mutantes, tanto descendientes de un cruzamiento *incross* como de un *outcross*. En nuestro modelo para *chd7*-CRISPR, sería posible que debido a esta contribución gradual, algunos de los fenotipos resultantes de ambos cruzamientos desaparezcan o se reviertan con el tiempo (Fig. 27E). La proporción esperada de mutantes maternos y cigóticos sería variable según la teoría gradual de la contribución materno-cigótica, incluso más cuando se considera el posible componente epigenético del síndrome de CHARGE. Esto significa que es posible que algunos fenotipos aparezcan en individuos WT de

cruzamientos *outcross* e *incross*, debido a la influencia de la dosis tanto del RNA como de la proteína de *CHD7*. Los estudios en humanos también han mostrado que hermanos con el mismo genotipo *CHD7* positivo para una mutación no presentan necesariamente el mismo fenotipo (Delahaye et al., 2007; Jongmans et al., 2008; Hughes et al., 2014; Hale et al., 2015; Wen *et al.*, 2018). Los fenotipos observados en cruzamientos suelen aparecer en hermanos con genotipo WT, pero no suelen aparecer en hermanos WT cuando son adultos (Fig. 29). Estos hermanos WT probablemente mueran o reviertan el fenotipo dependiendo de su gravedad y capacidad de compensación. El síndrome de CHARGE se produce debido a una haploinsuficiencia en la expresión de *CHD7*, por lo que la gravedad de los fenotipos podría depender de la dosis de la proteína. Los estudios en morfantes para *chd7* en nuestro laboratorio y en otros laboratorios han mostrado que los fenotipos son más graves cuando se utilizan morfantes con una mayor carga de MO (Zentner *et al.*, 2010; Balow *et al.*, 2013; Asad *et al.*, 2016). Los mutantes materno-cigóticos serían letales en homocigosis, y podrían ser los responsables de los fenotipos más graves observados en los cruzamientos *incross*. Además, muchos de los genes de control materno no producen fenotipos visibles hasta la cría de la F3, por lo que es posible que algunos fenotipos solo sean visibles en los adultos (Wagner et al., 2004).

Al criar los peces de la F3 y llegar a la edad adulta, aparecen algunos fenotipos similares y morfológicamente visibles, en los mutantes heterocigotos adultos para *chd7*-CRISPR, pero no en los hermanos WT. Estos fenotipos para *chd7* representan una oportunidad para estudiar el síndrome de CHARGE en estadios embrionarios, infantiles y adultos, así como los posibles efectos derivados de la mutación en *CHD7* en los adultos. La implicación materna del gen *CHD7* se corresponde muy bien con la enfermedad humana debido a la haploinsuficiencia y todo lo explicado sobre los defectos de carga en CHD7. La teoría gradual de la contribución materna (Fig. 52) en los peces cebra, permite explicar muchas de las discrepancias observadas en los estudios de mutantes para *chd7* y otros genes, como la ausencia de fenotipos en los embriones mutantes heterocigotos del *outcross* de *chd7* y la aparición de fenotipos en genotipos WT (Zhang et al., 2019; Moravec et al., 2021; Zhang et al., 2021; Shi, 2022). Asimismo, esta teoría también nos permite explicar la baja capacidad de homocigosis para *chd7* y la ausencia de fenotipos en los hermanos WT adultos (Liu y Liu, 2020; Prykhozhij et al., 2017; Cloney et al., 2018; Jamadagni et al., 2021; Sun et al., 2022)

En general, la teoría de la contribución materna gradual, ofrece una explicación lógica y coherente para la variabilidad fenotípica observada en los estudios de mutantes *chd7* y otros genes relacionados con el síndrome de CHARGE. Los mutantes maternos también serían letales si *chd7* no activase nunca su expresión en las células. La ausencia de mutantes homocigotos maternos para *chd7* podría explicarse por varios factores, incluyendo la importancia de la contribución materna y paterna en el desarrollo del embrión. La teoría gradual también podría aplicarse a la carga genética, donde los individuos con una carga menor de mutaciones podrían tener una mayor capacidad para desarrollarse y sobrevivir.

La pérdida de integridad celular (Fig. 23) y las alteraciones en la capacidad migratoria de los mutantes *chd7*-CRISPR *incross* y *outcross* (Fig. 28 y 31) podrían estar relacionadas con una disminución en la expresión de proteínas relacionadas con la adhesión y la migración (Okuno et al., 2017; Machado *et al.,* 2018; Sheikh *et al*., 2019). Es importante proseguir investigando estos descubrimientos para comprender mejor cómo la contribución parental de *chd7* podría influir en la aparición y gravedad de los fenotipos.

USC UNIVERSIDADE DE COMPOSTELA

3.4. No Es Solo Cuestión Materna: la Función Materno-Cigótica de *chd7*

Existe un efecto materno claro de *chd7* en el desarrollo embrionario y la deficiencia en el producto materno provoca la letalidad del embrión. Sin embargo, las pruebas de que *chd7* tiene una actividad después del período de transición materno-cigótica son muy evidentes. Aunque el posible efecto materno-cigótico de *chd7* en el pez cebra ya ha sido demostrado a través del fenotipo más grave y de la baja supervivencia de los embriones materno-cigóticos para *chd7* (Sun *et al.*, 2022), y contribuyendo a la aportación ahora con nuestro mutante *chd7*-CRISPR, su función y relevancia en la enfermedad y el desarrollo embrionario nunca estuvieron tan claras.

La implicación materno-cigótica de *chd7*, y su relación con la enfermedad humana, es muy relevante durante los efectos de las células de la cresta neural. Los datos que utilizan ratones *knockout* condicionales para *CHD7* sugieren una función celular autónoma de *CHD7* en células de la cresta neural cardíacas (Yan et al., 2020). Sin embargo existen importanes diferencias anatómicas y del desarrollo del corazón entre mamíferos y peces que afectan a la contribución de estas células (Icardo, 2006; Grant *et al*., 2017). Por otro lado, se ha demostrado que las células craneofaciales son también defectuosas tanto en peces morfantes y mutantes para *chd7* y la presencia de edemas pericárdicos es numerosa (Asad *et al*., 2016; Sun *et al*., 2022; la presente tesis). Por lo tanto, *chd7* podría tener diferentes funciones autónomas o no autónomas en las células de la cresta neural craneales y cardíacas (Sun et al., 2022).

3.4.1. Los Embriones *chd7*-CRISPR Muestran o Rescatan un Fenotipo Tardíamente Independientemente del Genotipo

El retraso en el desarrollo y los embriones detenidos observados en nuestro laboratorio, en estadio de midblastula, podrían explicar los fenotipos corregidos, o incluso la presencia de fenotipos tardíos en los embriones mutantes *chd7*-CRISPR de genotipo mutante y WT, en los emrbiones de cruzamiento *incross* y adultos *outcross*. Se han identificado mutantes maternos con defectos morfológicos evidentes por primera vez después de la MBT en moscas, peces y anfibios (Gans *et al.* 1975, Raftery *et al.* 1995, Schupbach y Wieschaus, 1989, Sekelsky *et al.* 1995, Steward *et al.* 1984, Terracol y Lengyel 1994, Zalokar *et al.* 1975).

La expresión de *chd7* presente en el zigoto y aportada por la madre, es estable hasta el estadio de la MBT, donde aumenta casi el doble de su expresión (Fig. Sup. 2). Dando cuenta de su actividad como inhibidor, se activarían en este sentido rutas como la de *sox2* y se expresarían genes como *sox10*, *sox9b* o *jag1* (Doi *et al.*, 2017; Engelen *et al.*, 2011). Los niveles de expresión se mantienen hasta las 5-6 hpf, donde empieza a subir para caer aproximadamente ligeramente antes de las 22 hpf, y luego continúa disminuyendo hasta las 144 hpf con pequeñas subidas y bajadas (Fig. 50 y Fig. Sup. 2).

Estos resultados sugieren que *chd7* como gen materno tiene una importancia primordial en las primeras etapas del desarrollo, y que luego entra en acción el gen cigótico tras la MBT y la activación de la ZGA. Durante esta transición, las alteraciones de la contribución materna podrían afectar a los cambios normales en el paisaje de la expresión génica, es decir, alterar el epitranscriptoma, lo que podría tener una gran incidencia tanto en los embriones WT como en los embriones mutantes maternos y cigóticos, provocando paradas en estos procesos de transición, y afectar de manera positiva o negativa en el desarrollo embrionario, según el genotipo.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

3.4.2. El Gen *chd7* Tiene una Función Materno-Cigótica

Para muchos genes, el inicio de la transcripción cigótica es el primer requisito para el producto del gen materno, lo que refleja una persistencia de la influencia materna en el período "cigótico" posterior de la embriogénesis. Sin embargo, es probable que el gen *chd7* tenga un papel mucho antes del inicio de la transcripción cigótica y, por tanto, exhiba un fenotipo morfológico molecular anterior a la MBT que aún no hemos descrito.

La influencia materna en la embriogénesis también persiste más allá del inicio de la transcripción cigótica en la transición a midblastula (MBT; del inglés *midblastule transition*). Aunque algunos factores maternos funcionan antes de la MBT, y sus consecuencias fenotípicas no son visibles morfológicamente hasta después de ella. Otros factores maternos persisten más allá de la MBT, cuando se requieren para procesos específicos posteriores a la MBT y funcionan junto con productos de genes cigóticos (Steward y otros 1984, Terracol y Lengyel 1994, Raftery *et al*., 1995, Sekelsky y otros 1995, Gritsman *et al.* 1999, Miller-Bertoglio *et al.* 1999, Mintzer *et al*. 2001).

Si el gen *chd7* fuera materno-cigótico, la pérdida de cualquiera de las dos funciones, implicaría la muerte del individuo. a aparición de homocigotos a través de la compensación materna gradual podría explicar la existencia de heterocigotos sin fenotipos, sin una acción únicamente cigótica de *chd7*. Sin embargo, la presencia de fenotipos tardíos en los mutantes heterocigotos, sugiere que en nuestro modelo *chd7*-CRISPR puede estar ocurriendo algo más, y que, el gen *chd7* puede tener una influencia más allá del estadio embrionario estudiado.

3.4.3. Muchos de los Defectos del Desarrollo No Se Pueden Relacionar con Defectos en el Programa de Senescencia Embrionario Observable

Los defectos más graves en la formación de los órganos, tales como los ojos, el oído o la aparición de edemas, ocurren antes de que comience el programa de senescencia embrionaria en esos tejidos. Por lo tanto, aunque el gen *chd7* esté implicado en la expresión y el control del programa de senescencia embrionaria, no se podría explicar que los defectos encontrados en esos órganos se deban a alteraciones en el programa de senescencia embrionaria. Aunque parezca una obviedad, es importante destacar que no puede ocurrir la senescencia en un tejido que no existe. Los embriones que carecen de esos tejidos presentarían unos niveles de senescencia embrionaria más bajos, por lo que la senescencia embrionaria no puede explicar los defectos en esos órganos, que ocurren antes de las 22 hpf. Estos y otros defectos, probablemente se deban a errores en la migración y destino de las células precursoras, o de los efectos no autónomos de *CHD7* en esos tejidos, debidos a señales erróneas de las células de la cresta neural (Corsten-Janssen y Scambler, 2017; Sun *et al*., 2022).

La ausencia de tejidos concretos es bastante común en los embriones *chd7*-CRISPR, independientemente del genotipo. Al igual que ocurre con nuestros mutantes para *chd7*-CRISPR, el ser humano presenta una gran superposición fenotípica independientemente de la presencia o ausencia de mutación, aunque también, existe una amplia variabilidad fenotípica dentro del síndrome de CHARGE en pacientes con las mismas mutaciones en *CHD7*, así como, en otras patologías asociadas a mutaciones en *CHD7* (Jongmans *et al*., 2008; Lalani *et al*., 2006; Salem-Hartshorne y Jacob 2005; Gao *et al*., 2007; Pleasance *et al*., 2010; Kim *et al*., 2008).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

3.4.4. El Gen *chd7* Podría Jugar un Papel en la Proliferación Celular Antes o Durante el Programa de Senescencia Embrionaria

Las deformaciones en estos los tejidos cartilaginosos, y la evidencia de actividad SA-β-Gal en la mácula de los embriones WT y mutantes a las 120 hpf (Fig. 41), podría explicar las deformaciones y deficiencias auditivas observadas en los pacientes con síndrome de CHARGE. También se ha observado actividad SA-β-Gal a las 22 hpf y 48 hpf en otras zonas de la vesícula ótica (Fig. 44-46), que ser va reduciendo desde la parte posterior a la anterior a medida que transcurre el desarrollo.

Estas células se correlacionan de manera espacio-temporal, pero en la zona contraria al tejido que expresa senescencia, con las células que expresan *pax2.1* en el mismo momento del desarrollo (Figura 5C de Whitfield *et al.*, 2002). *PAX2* un marcador de proliferación celular y la inhibición de la apoptosis, de celular progenitoras óticas (Nie *et al.*, 2022, Durruthy-Durruthy *et al.*, 2014), como también de células de neuroblastos que se desprenden de las vesículas óticas y las neuronas del rombencéfalo. Las mutaciones en *PAX2* igual que *CHD7*, *SOX2* o *OTX2* también se correlacionan con un mayor riesgo de coloboma (Sanyanusin *et al*., 1995; Ragge *et al*., 2005; Wyatt *et al*., 2008; Okumura *et al.*, 2015; Islam *et al.*, 2020). La expresión de *PAX2* se limita al tejido más proximal que da origen al tallo óptico y la futura cabeza del nervio óptico dentro de la copa óptica, lugar donde observamos senescencia embrionaria en los peces cebra *chd7*-CRISPR a las 144 hpf (Fig. 48) y el coloboma próximo al nervio óptico. El desarrollo del cristalino requiere *CHD7* en el ectodermo superficial, mientras que la copa óptica y la morfogénesis del tallo requieren *CHD7* en el ectodermo neural. (Gage, 2015).

Los mutantes de pez cebra homocigotos para *pax2.1* exhiben defectos de cierre de la fisura óptica y crecen del mesencéfalo, el límite entre el mesencéfalo y el rombencéfalo y el cerebelo. No se alimentan y mueren entre las 2 semanas (Lun y Brand, 1998). Este defecto de cierre de la fisura óptica se ha atribuido en parte a la inhibición de las caspasas efectoras aguas abajo y a deficiencias en el control de la proliferación celular, lo que implica un papel para pax2a en el ajuste fino de la muerte celular apoptótica. No se requiere la función autónoma celular de *CHD7* para especificar subdivisiones importantes dentro del ectodermo neural durante el desarrollo temprano del ojo. Teniendo en cuenta que *chd7* se expresaría en todo el tejido, los cambios en la expresión de *chd7* en los tejidos senescentes, como la cresta neural o el tejido del cristalino, podrían estar promoviendo la inhibición de la proliferación en unas zonas del tejido mediante la activación de la senescencia, y promoviendo la proliferación celular, en otras, inhibiendo la senescencia de forma no autónoma.

Aunque se ha informado una alta prevalencia de anomalías olfatorias en el síndrome de CHARGE en autopsias y estudios funcionales, dichas anomalías, se habían subestimado en gran medida entre los criterios diagnósticos y no se había evaluado su prevalencia, debido a que el olfato, es difícil de evaluar en recién nacidos y niños pequeños (Pagon *et al.*, 1981; Lin *et al.*, 1990, Harvey *et al.*, 1991; Sanlaville *et al.* 2005). Algunos pacientes presentan anósmia o una función residual olfatoria (hipósmia). En un estudio con 10 pacientes, todos presentaban anomalías de los tractos y bulbos olfatorios que iban desde hipoplasia moderada hasta aplasia completa (Blustajn *et al.*, 2008). En los embriones mutantes heterocigotos *chd7*-CRISPR como WT hemos encontrado activado SA-β-Gal en células de la placoda olfatoria, estas células se diferencian en células migratorias y presentan una gran diferenciación y capacidad

USC UNIVERSIDADE DE COMPOSTELA

migratoria (Whitlock *et al.*, 2000). Se han reportado anomalías congénitas de las estructuras olfatorias en pacientes con síndrome CHARGE (Pagon et a., 1981; Lin *et al.*, 1990, Harvey *et al.*, 1991), y actualmente se cree que el dismorfismo y la disfunción olfatoria son una parte crucial de este síndrome (Lin *et al.*, 1990, Sanlaville *et al.*, 2005).

A pesar de que la evidencia de estas células senescentes se hizo, en mutantes heterocigotos *chd7*-CRISPR se ha comprobado más tarde en WT. Esto prueba una vez más que la senescencia embrionaria se activa a pesar de la deficiencia en *chd7* y que siempre que se encuentra un órgano o tejido con actividad SA-β-Gal en los mutantes *chd7*-CRISPR, esta misma actividad está presente en los WT y es un órgano afectado en el síndrome de CHARGE. Pero también prueba que, en los mutantes para *chd7*, en esos mismos órganos ocurren alteraciones en las etapas anteriores de migración y proliferación celular.

3.4.5. El Gen *sox9b* Cofactor del Programa de Senescencia Embrionaria

La presencia de *sox9b* en los arcos faríngeos y su alteración de la expresión en los morfantes para *chd7*, podrían deberse a retrasos en el desarrollo de los tejidos debidos a la deficiencia en *chd7*, a una disminución de la proliferación, o un aumento de la apoptosis descrito para *chd7*-MO (Balow *et al.*, 2013). Pero también podría ser una disminución de la expresión, lo que implicaría el control de la expresión por parte de *chd7*, como ya se dijo (Bajpai *et al.*, 2010). En los mutantes para *chd7* se han observado células senescentes próximas a los arcos branquiales, y anomalías en la senescencia en el cerebro, ojos y oídos, lugares donde se coexpresan *chd7* y *sox9b* a las 48 hpf (Fig. 35 y Asad *et al.*, 2016).

Como se mencionó anteriormente, la deficiencia de *chd7* produce una reducción en la expresión de los genes *sox9b* (Fig. 35) tanto en zonas del cerebro, en los arcos faríngeos, los ojos y en las estructuras cartilaginosas. Igual que en nuestros mutantes cigóticos *chd7*-CRISPR (Fig. 30), las dosis bajas de morfolino para *chd7* causan varias anomalías en el cartílago craneofacial, incluyendo retrognatia del arco faríngeo que comprende el cartílago de Meckel, ausencia de los cartílagos ceratobranquiales o malformación del ceratohial (menor forma de V), en comparación con los controles (Balow *et al.*, 2013). Sin embargo, los morfantes para *chd7* con fenotipo severo, la única estructura de cartílago craneofacial observada fue un neurocráneo gravemente subdesarrollado, con cartílagos paracordales y *trabeculacranii* malformados. Estas malformaciones son incluso más leves que algunos de nuestros mutantes materno-cigóticos con fenotipos más graves (Fig. 30). La presencia de senescencia embrionaria en estos tejidos afectados y coexpresión de chd7 y *sox9b*, confirma nuestra hipótesis de que las deficiencias en *chd7* producen alteraciones en los mismos tejidos en los que se presenta la senescencia embrionaria y confirma que las deficiencias en *chd7* producen alteraciones de la expresión de *sox9a y sox9b* en etapas tempranas del desarrollo (Asad *et al.*, 2016).

Todavía no hemos podido comprobar si la deficiencia en *chd7* o la ausencia de *chd7* produce una bajada o una subida de los niveles de *sox9b*, entre las 72-120 hpf, indicativo de su regulación materno-cigótica. Pero si hay pruebas de su colocalización y de que ambas proteínas cooperan juntas para unirse a los promotores distales y activar la expresión de genes (Bajpai *et al.*, 2010; Mondal *et al.*, 2018; Lettieri *et al.*, 2021). Aunque la expresión de *sox9a* y *sox9b* es muy solapada y también se solapa con la de *Sox9* de ratón (Chiang *et al.*, 2001; Cresko *et al.*, 2003; Yan *et al.*, 2005), existen distinciones y se les ha otorgado una función

USC DE COMPOSTELA

tejido específica (Force *et al.*, 1999; Postlethwait *et al.*, 2004). Sabemos que la deficiencia en la expresión de *chd7* no produce la desactivación de la expresión de *sox9b*. El gen *FOXO* en humanos, inductor del programa de senescencia embrionaria en vertebrados (Muñoz-Espín *et al.*, 2013), también se une al promotor *SOX9* aumenta su expresión, e inicia la condrogénesis, además de actuar como un regulador del metabolismo celular al suprimir la oxidación de los ácidos grasos y, adaptar a las células a una vida avascular. (Van Gastel *et al.*, 2020).

En cualquier caso, lo que sí que se evidencia es la coexpresión y colocalización de *sox9b, chd7* y actividad SA-β-Gal en los tejidos y órganos en los que se encuentran malformaciones durante el síndrome de CHARGE, indicio de que seguramente cooperen *sox9b* y *chd7* durante el programa de senescencia embrionaria. La activación de la senescencia embrionaria y de *sox9b* por parte de *foxo,* podría ocurrir aguas arriba de chd7 en el inicio de la senescencia embrionaria. Si la proteína Chd7 se encarga de regular la expresión de *sox9b* tras esta activación de *foxo*, podría explicar los fenotipos asociados a malformaciones cartilaginosas de los arcos faríngeos y del oído tanto en pez cebra como en mamíferos.

La actividad SA-β-Gal en lo que parecen células próximas o propias de los arcos faríngeos, en los mutantes deficientes de *chd7*, no implica que esta no exista en los WT. Como hemos dicho en el caso del sistema olfativo, siempre se evidencia expresión de senescencia en ambos genotipos. La senescencia en los arcos faríngeos también ha sido vista en especies como ratón y pollo (Muñoz-Espin *et al.*, 2013; Chuprin *et al.*, 2013; Storer *et al.*, 2013). Como vimos, los mutantes heterocigotos *chd7*-CRISPR heterocigotos presentan malformaciones cartilaginosas en los arcos faríngeos y cartílagos mandibulares, y muchos, ausencia de ese tejido, igual que los morfantes para *chd7*.

Peces cebra mutantes y morfantes chd7, de otros laboratorios, presentan malformaciones en los cartílagos idénticas a las de nuestros mutantes *chd7*-CRISPR, como el apilamiento de los condrocitos, malformaciones de los cartílagos craneofaciales y cartílagos acortados o extra. Por lo que nuestro mutante *chd7*-CRISPR proporciona un modelo útil para similar los fenotipos craneofaciales que se encuentran en pacientes CHARGE y usarse para determinar los mecanismos moleculares en los que está implicado de *CHD7*.

3.4.6. El Gen *Chd7* Materno Cofactor del Programa de Senescencia Embrionaria.

La robustez genética no es la única ventaja que también jugó en nuestra contra. El rápido y sincronizado desarrollo embrionario, y el pequeño tamaño de los embriones, también son dos grandes ventajas que en este caso nos suponen un problema a la hora de analizar los embriones de *chd7*-CRISPR en los que se observa un retrasado y desincronizado desarrollo embrionario (Fig. 22-24). A la hora de medir la expresión génica en los embriones, se requiere hacer *pools* de individuos en el mismo momentos del desarrollo, por lo que se suelen utilizar los miembros de una misma puesta, para que no haya diferencias temporales de expresión ni de fondo genético, entre los individuos del *pool*. El bajo número de individuos en las puestas y el desarrollo desincronizado de los peces *chd7*-CRISPR dificulta conseguir los embriones en un estadio concreto para el análisis. Esto podría deberse a la enfermedad en sí o al efecto materno y la parada de la MBT. Pero la diferencias en la expresión o no del gen, las variaciones en el mRNA, la proteína y la activación de la senescencia embrionaria entre los embriones mutantes, de los cruzamientos *outcross* e *incross* para *chd7*-CRISPR, y los

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

morfantes para *chd7,* podrían ayudarnos a comprender como la carga materna y cigótica de *chd7* actúa en la activación del programa de senescencia durante el desarrollo embrionario.

En definitiva, existen muchas evidencias en la literatura, en las que encuentran nuestras mismas observaciones con la contribución materna: ausencia de fenotipo, fenotipos tardíos, mutación letal en homocigosis, mutantes adultos con fenotipos tardíos…(Cardenas-Rodrigue *et al.*, 2021; El-Brolosy *et al.*, 2019; Ma *et al.*, 2019; Moravec *et al.*, 2021; Zhang *et al.*, 2019; Wagner *et al.*, 2004). Los efectos de la contribución materna también fueron vistos en los mutantes *chd7*-ENU de nuestro estudio. Aun así, la evidencia de un PTC muy próximo al codón de iniciación, en nuestro modelo de pez cebra mutante *chd7*-CRISPR, nos hace no poder descartar la activación de la GCR.

3.5. La variante gen chd7 es susceptible a GCR

Uno de los grandes problemas a los que nos enfrentamos fue el confiar en todas las ventajas que nos aportaba el modelo. La robustez genética del pez cebra puede ser una ventaja, y precisamente en este caso lo fue. Al igual que con otros muchos genes, gracias a la robustez genética, todavía no existe otro organismo modelo de *chd7* homocigoto mutante que pueda dejar descendencia en pez cebra. Sin embargo, esa gran ventaja también nos plantea varias nuevas, pero inquietantes hipótesis. ¿La mutación en realidad no es tan deletérea, o puede estar ocurriendo algún mecanismo compensatorio?

La robustez genética viene explicada por dos factores principalmente:

1. La compensación materna por la contribución materna.

2. La compensación de Dosis por la GCR.

En nuestro modelo *chd7*-CRISPR, aunque podría estar implicado algún mecanismo de GCR, la respuesta de los mutantes *chd7*-CRISPR en cuanto a la mortalidad y variabilidad fenotípica, nos dejó claro que existe un efecto materno. Sin embargo, los eventos de homocigosis se explicarían en parte por la contribución materna, pero la parte cigótica de *chd7* entonces no sería tan importante, pudiendo la contribución materna rescatar completamente el fenotipo. La presencia de un PTC en la secuencia, y genes parálogos con suficiente homología para desencadenar una respuesta compensatoria, nos hacen contemplar un mecanismo de respuesta al NMD, generado por los PTC, también para CHD7, aunque seguramente más antiguo y menos propenso a activación.

3.5.1. La Línea de pez Cebra Mutante *chd7*-CRISPR Produce una Variante de la Proteína Disfuncional

Aunque los análisis proteómicos podrían proporcionar información valiosa para el estudio del gen *CHD7* y la enfermedad, los datos genéticos, fenotípicos y moleculares recolectados, así como la revisión bibliográfica realizada, indican que nuestro modelo de pez cebra mutante *chd7*-CRISPR produce una variante disfuncional de la proteína Chd7. Si en el pez cebra, las mutaciones en *chd7* fueran tan deletéreas como en los mamíferos, los

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

individuos heterocigotos, además de no reproducirse, no alcanzarían la edad adulta sin las anomalías asociadas a los defectos fenotípicos observados durante el desarrollo embrionario. Estos resultados coinciden con los alcanzados en investigaciones anteriores en pez cebra (Jamadagni *et al*., 2021; Sun *et al*., 2022), donde se han hallado tanto individuos heterocigotos adultos sin fenotipo asociado como embriones homocigotos. En algunos casos, también se han logrado homocigotos adultos, pero no se explica si estos son capaces de procrear (Liu y Liu, 2020; Prykhozhij *et al*., 2017; Cloney *et al*., 2018; Jamadagni *et al*., 2021; Sun et al., 2022). El presente estudio en el modelo de pez cebra mutante *chd7*-CRISPR demuestra que la proteína Chd7 producida por este gen es esencial para el desarrollo normal. Estos resultados concuerdan con las hipótesis en investigaciones en humanos y otros modelos animales, que sugieren que el síndrome de CHARGE en humanos y la haploinsuficiencia se deben a la deficiencia en la expresión de *CHD7* y la pérdida de función de la proteína (Bouazoune y Kingston, 2012; Janssen *et al*., 2012).

3.5.2 la Variante de la Proteína Chd7-CRISPR Produce un PTC Susceptible a Activar la GCR

Cuando comenzamos esta investigación, con la generación del modelo chd7-CRISPR (Arana, 2016), fue también el comienzo de la discusión científica sobre las controversias entre fenotipos, y sobre la validez de los morfolinos y las técnicas mutagénicas. Todavía no se conocía el mecanismo de GCR en pez cebra (Ma *et al.*, 2019). Por eso, cuando comenzamos los cruzamientos, buscamos aproximarnos lo más posible a la enfermedad, por lo que decidimos centrarnos en individuos heterocigotos, realizando cruces *outcross* de heterocigotos *chd7*-CRISPR con WT (Fig. 19; Arana, 2016).

Estas primeras observaciones resultaron ser cruciales, ya que llevaron a considerar la posibilidad de que el gen podría activar algún mecanismo de compensación debido al efecto materno. El mRNA del gen *chd7,* aparece en gran concentración en el huevo a 0 hpf en el pez cebra, y comienza su transcripción en la primera división, manteniéndose casi constante hasta la MBT (Fig. Sup. 2; Asad *et al.*, 2016). Por ello, se consideró que debía tener una gran importancia su carga y distribución durante los primeros momentos del desarrollo en la transición a la ZGA.

Sin embargo, si el gen es tan importante, la aparición de mutaciones en homocigosis es todavía más complicada. El mecanismo de GCR, mediada por la NMD se activa por PTCs. Tanto en los mutantes *chd7*-CRISPR como en los mutantes *chd7*-ENU, las mutaciones provocan PTCs, sin embargo, las mutaciones de los *chd7*-CRISPR son aún más cercanas al codón de iniciación y provocan una proteína más corta. El comportamiento genético y fenotípico de ambas líneas fue similar, aunque la línea ENU presentaba una mayor mortalidad embrionaria y de adultos, y una menor variabilidad fenotípica en los embriones.

3.5.2.1. El gen *chd8* podría compensar la deficiencia cigótica de *chd7* a pesar de la no activación de la GCR

Como hemos dicho, el gen *chd7* no presenta parálogos por el evento de duplicación génica de pez cebra comentado anteriormente, sin embargo, podrían intervenir sus hermanos *chd6* y *chd8*, con bastante homología en comparación con otros genes que se activan por la GCR (datos en estudio; Manning *et al.*, 2017; Dooley *et al.*, 2019; Buglo *et al.*, 2020). Se

USC UNIVERSIDADE DE COMPOSTELA

requieren los PTCs para desencadenar la GCR. Pero los productos de degradación del mRNA son suficientes y el mRNA que contiene PTCs puede servir solo como sustrato de la vía NMD para degradar los productos. En los individuos heterocigotos, la GCR, también podrían producir un aumento en la expresión de *chd7* en su variante sana, como se ha visto en otros estudios (E1-Brolosy; Ma *et al.*, 2018).

Sabemos por los datos del Atlas de expresión de pez cebra (Fig. Sup. 2; White *et* al., 2017; Papatheodorou *et al.*, 2020) que *chd8*, comienza su expresión también en el cigoto, pero esta cae justo en el momento de la subida de *chd7*, en el estado de MBT. Si en esa transición la subida en *chd7* no puede cumplir su función, puede que *chd8* actúe compensando en caso de detectarse una bajada de la expresión de *chd7*. Los efectos del fenotipo CHARGE podrían deberse al aumento en la formación de dineros de Chd7-Chd8 que no pueden cumplir el efecto regulador de la expresión correctamente en esas transiciones en las que actúa *chd7*, por la distancia evolutiva de ambas proteínas y las funciones específicas y espacio-temporales de cada una (Subtil-Rodríguez *et al*., 2014; Hoffmann & Spengler, 2021). Incluso de esta forma, si *chd7* es el regulador de la expresión de *chd8* no haría falta explicar una subida por un efecto compensatorio, como se ha sugerido (Batsukh *et al.*, 2010; Marie *et al.*, 2018; Zhao *et al.*, 2018b; Dooley *et al.*, 2019; Hoffmann & Spengler, 2021). La deficiencia en los niveles de *chd7* podrían explicar un aumento de la expresión de *chd8*, si Chd7 se encargase de regular la expresión de *chd8*. En los mutantes para *chd7*-CRISPR del cruzamiento *incross,* sí observamos una subida de la expresión de *chd7* en heterocigosis y más en homocigosis en comparación con sus hermanos WT a las 96 hpf. Esto prueba una activación de las vías de GCR, pero no de la NMD, lo que podría implicar una compensación ineficiente por parte de *chd8*.

3.5.2.2. La presencia de PTCs no prueban la GCR para *chd7*

Los *primers* utilizados para analizar la expresión de *chd7* (Tabla 4) no discriminan entre las variantes del gen *chd7*, por tanto, no estamos evaluando si la expresión observada procede del alelo WT o el alelo mutante. La variante mutante generada genera un PTC en el primer exón codificante (Fig. 17 y 18), lo que produciría una proteína truncada, pero no un mRNA más corto. Sin embargo, el hecho de que se vea una expresión por lo menos similar entre los mutantes y sus hermanos WT, aunque sea de ambas variantes del gen, nos da bastantes ideas para entender lo que puede estar pasando.

La variante enferma dentro de los embriones sanos, heterocigotos u homocigotos mutantes, por parte de la madre, podría desencadenar los mecanismos de GCR, a través de la PTC antes de la ZGA, y compensar los efectos cigóticos de *chd7*. Sin embargo, ese efecto compensatorio solo se activaría muy pocas veces y no explica los efectos fenotípicos atemporales, pudiendo ser esos mutantes los mutantes cigóticos, con componente materno. El efecto materno sumado a un efecto en la activación de la GCR explica la aparición de individuos homocigotos *chd7*-CRISPR adultos para un gen materno-cigótico.

Otra desventaja del pez cebra es que es muy difícil observar la expresión de un gen con un solo individuo, por lo que se suelen hacer *pools* de individuos en el mismo estadio del desarrollo y con las mismas condiciones. El escaso número de individuos debido a la variabilidad fenotípica, y la desincronización del desarrollo, también dificulta mucho la obtención de muestras homogéneas y realizar *pools* para el estudio de algo tan puntual como

USC UNIVERSIDADE DE COMPOSTELA

es la expresión génica, dando validez a la utilidad del fenotipo CRISPR en este estudio, y de que para algunos genes, vale más el fenotipo que el genotipo.

3.5.2.3. La presencia de PTCs prueban el efecto materno de *chd7*

Si bien el gen *chd7,* actualmente, puede considerase un gen materno-cigótico, es altamente probable que la pérdida de función materna afecte a la reproducción de individuos homocigotos, a menos que se produzca una compensación génica. Sin embargo, los cruzamientos entre individuos WT e heterocigotos podrían restaurar la función materna y/o cigótica a través de la contribución materna. Los pequeños aumentos en los niveles de expresión de *chd7* en los mutantes descendientes de un *outcross* en comparación con sus hermanos WT y las mayores variabilidades fenotípicas (Arana, 2016), podrían ayudarnos a entender los mecanismos de compensación génica y contribución materna que están afectando.

En los primeros apareamientos llevados a cabo en nuestro estudio (cruzamientos *outcross*), la hembra heterocigota produciría una población de un 50% de mutantes heterocigotos y un 50% de individuos WT, pero que presentan una amplia variación fenotípica (Fig. 19; Arana, 2016), pero sin fenotipos notablemente graves. Teniendo en cuenta que los individuos WT y los heterocigotos no pierden la función cigótica, pero podrían perder el efecto materno, es probable que la función materna de *chd7* también tenga un efecto durante la MBT y en la ZGA, y, por consiguiente, el efecto podría aparecer después o durante esas etapas.

3.5.3. Los Cruzamientos *Outcross* Nos Pueden Ayudar a Crear una Teoría de la Contribución Materno-Cigótica Gradual

Los genes materno-cigóticos producen la letalidad del homocigoto (Wagner *et al*., 2004). El gen *chd7* en el pez cebra es un gen materno-cigótico, pero produce adultos homocigotos viables y sin fenotipo destacable (esta tesis; Liu *et al.*, 2018). El efecto únicamente materno y únicamente cigótico del gen no esta claro.

1. Los embriones mutantes maternos, únicamente con componente cigótico, del cruzamiento *outcross,* sobreviven, y presentan un fenotipo igual que él de sus hermanos, sin apreciarse apenas defectos graves. Lo que podría indicar una compensación materna por la contribución materna o una compensación cigótica por la GCR
2. Los embriones mutantes *chd7*-CRISPR de los cruzamientos *incross*, con una carga del componente materno gradual, y pérdida de una o las dos copias de la función cigótica, los defectos son muy notables en la mayoría de embriones, independientemente del genotipo. Lo que niega la compensación por la GCR y se atribuye al efecto materno.

Los casos de heterocigotos y homocigotos con fenotipo WT, y WT con algún fenotipo mutante nos parece indicar una respuesta compensatoria únicamente materna, para los heterocigotos adultos. Por otro lado, el escaso número de homocigotos adultos, y el grave fenotipo observado, letal durante la embriogénesis igual que en mamíferos, contradice la GCR, y da la razón a la propia contribución materna, debido a lo que puede ser una contribución únicamente cigótica importante también para *chd7.* Ahora, el efecto cigótico

USC UNIVERSIDADE DE COMPOSTELA

incluso si podría ser recompensado por una GCR, explicando así el bajo número de homocigotos y rescate atemporal de fenotipos.

La pérdida de la función cigótica, en los mutantes *incross* para chd7-CRISPR, aunque letal en la mayoría de casos, resulta compensada, seguramente, por un componente de efecto materno. La idea de que *chd7* es un gen materno-cigótico, podría explicarnos muchas cosas sobre la etiología de la enfermedad

Las discrepancias fenotípicas observadas, por lo tanto, entre los embriones mutantes y WT de un cruzamiento *outcross,* serían por una mala distribución del producto materno. En el caso de los embriones heterocigotos, podrían recibir una carga suficiente que ayudaría en el desarrollo normal de estos embriones, y podrían contar con una copia sana que compense la etapa cigótica del gen. Los WT, al contrario, podrían no estar recibiendo la copia sana necesaria para la etapa materna, y presentar así un fenotipo materno tardío.

Que el homocigoto sea letal y los heterocigotos no presenten un fenotipo, mientras que en humanos y otros modelos es letal y los heterocigotos presentan diversidad fenotípica, refuerza las ideas de la dosis y el efecto materno-cigótico. Por un lado, los embriones heterocigotos para *chd7* con pérdida de función materna compensarían el defecto con la función cigótica, o presentarían fenotipos asociados al efecto materno, como retraso en el desarrollo embrionario y fenotipos debidos a la contribución materna después de la MBT. Por otro lado, los homocigotos en *chd7* perderían la función cigótica, y la materna nunca sería capaz de compensar el efecto, salvo excepciones.

3.5.3.1. Los retrasos en el desarrollo observados en mutantes *chd7*-CRISPR, pueden deberse a activaciones de la GCR en la ZGA

Los niveles de expresión de *chd7* aumentan significativamente en la transición a la ZGA en el pez cebra, mientras que los de *chd8* caen (Fig. Sup. 2, White *et al*., 2017). Los retrasos en el desarrollo observados en algunos mutantes heterocigotos y en unos pocos WT podrían deberse a mecanismos de compensación en esos momentos de vigilancia, mediante el ajuste de las cargas de ambos genes.

— Si no hubiera producto materno:

1. Al no haber una dosis de *chd7* suficiente para el efecto materno, en esa transición ambos genotipos podría verse comprometidos en la MBT, al no presentar los embriones un desarrollo correcto, debido a esta pérdida del efecto materno.
2. En el caso de los embriones WT sin producto materno, se detendrán en la ZGA para controlar ese déficit, y producir más *chd7*, puede que desencadenada por la misma PTC que active la GCR.
3. En los mutantes heterocigotos sin producto materno, una copia podría no ser suficiente para llevar a cabo todos esos procesos, y se expresa un fenotipo leve. Estos embriones serían mutantes maternos, pero como la mutación en *chd7* es muy deletérea, podría tener también un efecto cigótico. Estos mutantes podrían también desencadenar la GCR y activar genes compensatorios como *chd8*.

— Si hubiera producto materno:

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

1. Los embriones de ambos grupos se desarrollarían completamente, casi sin paradas en la ZGA.

2. Los mutantes heterocigotos reciben el material de la madre suficiente para la transición a la ZGA correctamente, pero tienen una pérdida de producto cigótico. Esta pérdida no afectaría a los primeros momentos del desarrollo, donde la madre compensaría esa deficiencia en *chd7* cigótico, y se produciría una variabilidad fenotípica debido a la gradualidad de la carga.

3. Los mutantes heterocigotos, con efecto cigótico, podrían sufrir con el tiempo la necesidad de producir más *chd7*, y que no sea suficiente un alelo. Produciendo la aparición de fenotipos tardíos, y la activación de la GCR.

3.5.3.3. Los embriones cigóticos contribuyen a explicar la teoría de la contribución materno-cigótica gradual.

Esto nos lleva a pensar que a las 25 hpf el decaimiento de *chd7* conlleva un aumento de la senescencia en los mismos tejidos en los que se expresa. Sin embargo, a las 48 hpf la expresión de *chd7* induciría la senescencia en los mismos tejidos en los que se expresa, y por tanto, su eliminación conllevaría a una reducción o un retraso del programa de senescencia embrionaria.

Como ya dijimos, igual que para otros genes con contribución materna, muchos de los adultos heterocigotos *chd7-CRISPR* desarrollaron un fenotipo claro pasado el año de edad. No obstante, esto también le aporta mucha importancia al gen *chd7* en el desarrollo del adulto, que aunque tengamos indicios todavía no hemos llegado a probar.

Si las GCR las provocan los PTCs, probablemente los sistemas se activen a pesar del gen, y la efectividad del mecanismo de reconocimiento dependa más de la contribución materna, la homología de la secuencia o del tipo de PTC, que de la susceptibilidad por la función del gen. La GCR se activaría en los embriones mutantes de un descendiente heterocigoto en cualquier tipo de cruzamiento, siempre que esta le aporte algo de producto materno mutante.

Los mecanismos de PTC se podrían establecer en los mutantes homocigotos para *chd7*-CRISPR con y sin producto materno sano. La copia sana de la madre podría evitar el efecto materno del gen, pero la copia enferma podría desencadenar la GCR tras la activación de la ZGA y así compensar la deficiencia en chd7. Los homocigotos sin copia sana también podrían heredar la respuesta de la GCR de la madre y tener activado ya genes compensatorios para el correcto desarrollo embrionario.

En estos dos casos, debería haber un gen parálogo, con suficiente homología y capacidad de mimetizar el efecto de chd7 para el correcto desarrollo embrionario de los homocigotos mutantes. El gen parálogo también explicaría la aparición de los homocigotos adultos chd7-CRISPR, para un gen únicamente cigótico, que no presentan fenotipo y que no mueran sin causa justificada.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

4. *CHD7* EL "INTERRUPTOR" DE LA SENESCENCIA

Aunque más que un "interruptor" es un guardián o un "Snorlax", parece que la función del gen *chd7* en la senescencia es la de activar a través de la preinhibición. Cuando está presente, bloquea las puertas de entrada, pero tras un golpe, se va y deja paso a la senescencia, y esta, como la caja de Pandora, cuando se abre desata el caos. Aunque parece tener lazos con la senescencia embrionaria, esa relación parece estar provocada por una aumento de la senescencia celular, a través de las vías mediadas por p53, y su capacidad antiapoptótica.

Si *chd7* se expresara en los tejidos para bloquear o activar la senescencia embrionaria, como en la paradoja de Fermi ¿Dónde está?, ¿Por qué no hay más senescencia embrionaria en los organismos deficientes? La respuesta parece ser que la proteína Chd7 no está ahí para eso. El papel de chd7 como interruptor de la senescencia se diluye entonces a un simple inhibidor de la apoptosis, y la activación de esta, en el síndrome de CHARGE, es un defecto al activarse otras vías de la senescencia celular. Pero podría ser más que eso y tener la misión de controlar que p53, no se vuelva "loco", y provoque el caos como suele hacer, pero entonces, ¿por qué no se observa un aumento de la apoptosis en heterocigosis debido a la haploinsuficiencia?.

En cualquier caso, la expresión del gen *chd7,* está correlacionada espacial y temporalmente con la senescencia embrionaria y los defectos producidos en los tejidos y órganos, tanto en mamíferos como en pez cebra, son en su mayoría los mismos que desarrollan este programa. La solución está en ese papel como inhibidor apoptótico y su papel como guardián de la senescencia celular. La senescencia embrionaria se activa igualmente sin la necesidad de chd7, pero parece estar controlando este proceso. Cuando está lo inhibe, reprimiendo a p53 y p21, pero cuando se va los activa.

La senescencia embrionaria es un programa genética y epigenéticamente bien establecido en las células y regulado espacial y temporalmente por muchos genes, proteínas y moléculas señalizadoras, para ejecutar una tarea específica durante el desarrollo embrionario (Muñoz-Espín *et al.*, 2013; Storer *et al.*, 2013; Rhinn *et al.,* 2019 Da Silva-Álvarez *et al.*, 2019; Da Silva-Álvarez *et al.*, 2020). La finalidad de esa tarea es algo muy importante para el correcto desarrollo del tejido en el que ocurre ese proceso. El proceso de la senescencia celular es muy definido y agresivo, por lo que la activación espacio-temporal de este durante el desarrollo embrionario tiene que estar muy bien controlada. Es lógico entonces, que este reloj suizo, tenga un engranaje muy sofisticado, y que si falta alguna pieza importante, este se desajuste.

4.1 El Pez Cebra Mutante *chd7*-CRISPR Es un Modelo Válido para el Estudio Funcional de la Senescencia Embrionaria durante el Síndrome de CHARGE

Por todos los defectos aquí descritos en los embriones entre las 22 hpf y las 144 hpf, u muchos otros no reflejados en este estudio, por su relación encontrada con el fenotipo morfante y con otros organismos modelo, y las similitudes con la enfermedad humana, queda validado el mutante *chd7*-CRISPR no solo como un modelo válido para el estudio del gen *chd7* y del síndrome de CHARGE, sino también para cuestiones biológicas como la contribución materna y cigótica y el mecanismo de GCR activado por NMD.

Por estas y muchas otras razones, hemos decidido emplear el modelo de pez cebra mutante *chd7*-CRISPR como herramienta para el estudio de la senescencia y su implicación en el síndrome de CHARGE.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

En cuanto a si existen diferencias en la senescencia embrionarias entre nuestro modelo y los WT, parece que sí, pero con discrepancias. Los individuos *chd7*-CRISPR heterocigotos presentan una relativamente intensidad menor de la actividad SA-β-Gal en la mayoría de tejidos, a excepción de algunos casos individuales o momentos del desarrollo, donde la intensidad parece mayor en los mutantes. Además, entre los hermanos WT la actividad SA-β-Gal es más homogénea, aunque existe algún caso de WT donde la senescencia parece más baja en comparación de sus compañeros.

Aunque no observamos apenas diferencias entre los embriones WT y los embriones mutantes *chd7*-CRISPR, sí se ha observado un retraso en la aparición de la actividad SA-β-Gal, y un incremento de la expresión de genes relacionados con la senescencia tales como *p53*, *p15* y *p21*. La senescencia embrionaria comienza en momentos distintos en algunos tejidos y órganos, mientras que en otros, como es el caso del pronefros y el intestino (entre las 72-120 hpf) y el oído interno y el ojo (sobre las 24 hpf), parece ser más sincrónica entre estadios, con ligeros retrasos en los mutantes *chd7*-CRISPR.

La senescencia embrionaria en el mesonefros, está conservada evolutivamente en aves y mamíferos (Nacher *et al.*, 2006; Muñoz-Espin *et al.*, 2013). El pronefros, en mamíferos, deriva en el mesonefros y este a su vez en el metanefros, que finalmente acabará formando el riñón. En el pez cebra el desarrollo del mesonefros comienza a los 10-11 dpf, dando lugar directamente al riñón del adulto, por lo que es probable que la senescencia en este tejido se mantenga hasta la renovación completa del mismo, o ocurra otro evento más adelante.

La presencia de senescencia embrionaria en estas estructuras, demuestra una conservación de los programas de senescencia embrionaria específicos de tejido, desde peces, hasta mamíferos, apoyando la idea de que la senescencia celular evolucionó de manera temprana en los vertebrados, para jugar un papel clave en el desarrollo embrionario (Da Silva-Álvarez *et al.*, 2020). Además, podría otorgársele un rol, además de en la inhibición de la proliferación, en la renovación de tejidos transitorios.

4.1.1. La Deficiencia en *chd7* Produce Retrasos en la Activación del Programa de Senescencia Embrionaria.

Aunque parece que los procesos de senescencia embrionaria están alterados, también habría que tener en cuenta el efecto de la temporalidad en el desarrollo embrionario del pez cebra, y el desarrollo asincrónico de los embriones mutantes *chd7*-CRISPR y morfantes. En el caso de lo observado en morfantes por (Balow *et al.*, 2013), y como ya alertamos en estudios previos (Arana, 2016), el aumento en los niveles de p21 en morfantes podría deberse a un proceso de senescencia embrionaria que ya ocurrió antes en los controles, pero esta ocurriendo en los morfantes en el momento de la toma de muestras, debido a un retraso en el desarrollo por la pérdida del producto materno.

En el presente trabajo, los experimentos de SA-β-Gal y los análisis de expresión génica, los hemos llevado a cabo siguiendo el fenotipo de los embriones y el momento del desarrollo, y no el tiempo real del desarrollo desde la puesta. Por eso puede que encontremos tantas semejanzas entre mutantes, morfantes y controles en cuanta a la presencia de senescencia embrionaria en un tejido determinado. Sin embargo, el retraso en la recogida de muestras podía llegar a las 24 hpf en algunos casos.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

4.1.2. La Mutación *chd7*-CRISPR Inhibe la Proliferación Celular en los Tejidos Senescentes.

A partir de las 72-120 hpf comienza a detectarse actividad SA-β-Gal sostenida en el tiempo, en el esófago e intestino (Arana, 2016; Da Silva-Álvarez *et al.*, 2020). Entre las 24 y 76 hpf, todo el endodermo intestinal es un órgano altamente proliferativo (Ng, *et al.*, 2005), y por tanto, es normal que no se observe senescencia en esos momentos del desarrollo. Los estudios de Da Silva-Álvarez *et al*. indican que la actividad SA-β-gal comienza a las 48-72 hpf y aumenta a partir de las 144 hpf, siendo particularmente intensa en el extremo caudal (cloacal) del intestino (Arana, 2016; Fig. 42).

En el intestino, aunque no está claro, parece que la tinción aparece en el borde de las células de las crestas intestinales, lo que podría suponer una restricción en la localización exclusivamente en las células más internas, o puede que se trate de la flora intestinal ya presente en los embriones y que es sensible a la tinción SA-β-Gal. Mientras que, en los análisis de la senescencia embrionaria de Da Silva-Álvarez *et al*. (2020), la senescencia en este tejido era muy clara en el interior celular y de todo el órgano, en nuestro estudio la intensidad de la tinción en el esófago y el intestino era más débil en los embriones *chd7*-CRISPR de 96 hpf, y ausente en los de 72 hpf, y aumentó con la edad (Fig. 42).

A diferencia de lo observado por Da Silva-Álvarez *et al*. (2020) que detectaron actividad SA-β-Gal en el hígado a partir de las 72 hpf y sostenida hasta el día 10, nosotros solo la observamos una leve actividad SA-β-Gal a las 120 hpf (Fig. 42) que aumenta a las 144 hpf. Entre las 24 y 50 hpf, el hígado en desarrollo aumenta de tamaño, y por tanto está en estado de proliferación celular (Field *et al.*, 2003).

En todos los tejidos observados con alta capacidad proliferativa que expresan *chd7* no hemos observado signos de una mayor proliferación celular. Es obvio que la mutación en *chd7*-CRISPR inhibe la proliferación de las células, pero su papel como inhibidor de la proliferación celular, se vería comprometido en aquellos tejidos que expresasen *chd7*. En este sentido, parece que su papel como inhibidor de la proliferación no está comprometido durante el síndrome de CHARGE, pudiendo mantener bloqueadas esas vías ante una deficiencia.

4.1.3. La Mutación *chd7*-CRISPR

En los embriones *chd7*-CRISPR *outcross*, no han sido observadas alteraciones fenotípicas graves significativas antes de las 144 hpf, ni en los patrones de expresión de la actividad SA-β-Gal en la mayoría de tejidos (Fig. 19, 41-47 y Arana, 2016). En experimentos con morfolinos, se observó, que la disminución en *chd7* causaba un desorden celular, en las capas del ojo. Sin embargo, ese desorden no es comparable en nuestro mutante *chd7*-CRISPR (Fig. 43). Las células senescentes activan rutas antiapoptóticas (Wang, 1995; Mooi y Peeper, 2006; Childs *et al.*, 2017; Kirkland y Tchkonia, 2017; Niedernhofer y Robbins, 2018). Ese mayor desorden celular observado en morfantes, podría deberse a la intensificación del programa de senescencia, debido a la alteración de la actividad de *chd7* sobre p53, que podría volver a estas células más resistentes a la proliferación y apoptosis. La ausencia de ese fenotipo en los embriones heterocigotos *chd7*-CRISPR (mutantes cigóticos) podría ser debido a una función únicamente cigótica del propio gen en plenas condiciones o la presencia de mayor carga materna en los mutantes. Lo que haría que desarrollasen un programa de senescencia embrionaria normal, con algunas alteraciones del desarrollo.

USC UNIVERSIDADE DE COMPOSTELA

Esto explicaría los pequeños retrasos en la aparición y desaparición de la actividad SA-β-Gal y de los marcadores de senescencia embrionaria *p15* y *p21* que atribuimos a los retrasos debido a paradas en el desarrollo. Siguiendo la idea de Da Silva-Álvarez *et al.* (2019), las diferencias y alteraciones temporales en la intensidad de la tinción SA-β-Gal a lo largo del desarrollo entre los embriones *chd7*-CRISPR, así como el aumento y la disminución graduales en algunas estructuras, refuerza la idea de que el proceso de la senescencia embrionaria es transitorio y se activa en momentos del desarrollo precisos, para luego desaparecer después de culminar su función (Da Silva-Álvarez *et al.,* 2019).

4.1.5. La Expresión de *Chd7* Se Correlaciona Espacial y Temporalmente con la Presencia de Actividad SA-B-Gal Embrionaria Observada en Diferentes Tejidos en Embriones WT y Mutantes *Chd7*-CRISPR.

La expresión de *chd7*, varía en el desarrollo embrionario, como y se correlaciona con la presencia de actividad SA-β-Gal, espacial y temporalmente, como es en el caso del pronefros y el intestino, donde se observan elevados niveles de *chd7* entre las 72-120 hpf y también actividad SA-β-Gal, o en el caso del ojo y el oído, donde la actividad SA-β-Gal aparece muy pronto, y la expresión de *chd7* está presente desde las 24 hpf en toda la región cefálica, recluyéndose finalmente al ojo (Asad *et al.*, 2016). No obstante, no hemos observado diferencias en los patrones de actividad SA-β-Gal, entre embriones mutantes heterocigotos y embriones WT.

El problema de la tinción SA-β-Gal, que, aunque es muy específica para detectar senescencia celular, es muy difícil de cuantificar, y su uso se limita casi exclusivamente a la presencia y ausencia de senescencia en un tejido determinado y en un momento determinado. Las diferencias en la intensidad no son un resultado fiable, ya que podrían deberse al momento del desarrollo que recordemos, que en pez cebra es muy rápido. Por lo tanto, las diferencias observables de la senescencia a través de la SA-β-Gal, tanto temporales como cuantitativos, pueden deberse a problemas técnicos de la tinción y el retraso en el desarrollo de los embriones.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

5. MATAR AL MENSAJERO

Antes de la invención del *WhatsApp,* los mensajes eran normalmente transmitidos a través de un mensajero humano, como en la guerra, donde un emisario portador de malas noticias se enviaba desde un campamento enemigo. La ira de los soldados era muchas veces compensada sobre los mensajeros en lugar de sobre la persona responsable de esas malas noticias. Esta falacia *ad hominem*, aunque metafórica en la vida cotidiana, también ocurre en genética durante el acto de matar al mensajero portador de malas noticias (mRNA) a través de la NMD, en lugar del autor de las mismas (el gen) que podría ser recompensado a través de la GCR. Durante el el desarrollo embrionario en el síndrome de CHARGE, esta situación podría ser la verdadera responsable de muchos síntomas de la enfermedad.

5.1. Chd7 y *chd7* se Contradicen

Si está ausente el gen *chd7* (homocigotos *incross*) se observa lo mismo que cuando su mensajero se expresa activamente (WT y heterocigotos *outcross*). La presencia del mensajero a niveles altos de expresión, implica la inhibición de la senescencia celular (Fig. 50), y la ausencia del gen *CHD7,* la incapacidad de activación de la senescencia celular (Su *et al.*, 2018). Sin embargo, la expresión de *chd7* también implica la activación de los programas de senescencia mediados por p53, pero la función de *chd7* es la de inhibir los marcadores de senescencia (Balow *et al.*, 2013; Su *et al.*, 2018). Durante el desarrollo, *chd7* se expresa previamente para inhibir la expresión de *p53* (Balow *et al*., 2013; Van Nostrand, *et al*., 2014), pero cuando disminuye su expresión, lo activa (Fig. 34).

La ausencia del gen *chd7,* produce una inactivación de la senescencia celular, al no producirse mensajero de *chd7* previamente. Las rutas de p53, no se puedan activar, y las células se vuelven inmunes a la senescencia, y puede que a la apoptosis. Es, por tanto, que la ausencia de expresión del mensajero de *chd7*, implica tanto la inhibición como la activación. La deficiencia en el mensajero de *chd7* produce una inhibición suficiente de los programas de senescencia y apoptosis, pero la activación de estos se ve descontrolada. Dando evidencia a la importancia de la dosis en *chd7*. La ausencia total de *chd7* implicaría la no activación de los programas de senescencia celular, pero sí embrionaria. Los programas se activan por rutas distintas, es probable que aguas arriba de *chd7*, pero este parece intervenir en ambas.

Cuando está *chd7*, se produce una inhibición de la senescencia celular en las células que lo expresan, y cuando se va, una sobre estimulación de la senescencia en las que se activa la senescencia celular, debida a la activación transcripcional de *p53*, anteriormente inhibido por *chd7*. La proteína Chd7 como activadora de la senescencia, en las células que no se expresa, no puede activar estas vías. Pero en las que sí se expresó y estaba controlando que todo fuera correctamente inhibiendo la apoptosis mediada por p53, cuando se va de golpe, p53 toma el control de la célula, y comienza a realizar un efecto sinérgico sobre la senescencia embrionaria. Probablemente, el gen *chd7*, como capataz y controlador del proceso de senescencia celular, se requiera ahí para inhibir la expresión de p53, y evitar la activación del programa de senescencia celular. Tras cada evento de activación de la senescencia embrionaria, se observa un leve descenso de la expresión de *chd7*, tanto a las 22-25 hpf, como a las 120-144 hpf (Fig. 50A), momentos clave del establecimiento de la actividad SA-β-Gal observada en varios tejidos (Fig. Sup. 2) y una desregulación en esos momentos en los heterocigotos *chd7*-CRISPR en los

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

marcadores de senescencia celular p15 y p21 (Fig. 50) además de alteraciones en la actividad SA-β-Gal (Fig. 41-48; Arana, 2016). Sin embargo, tanto los mutantes como los WT parecen tener retrasos en el desarrollo y activación de esos programas en comparación con lo observado por Da Silva-Álvarez *et al.*, (2020) lo que sugiere un control materno también para la activación de esos programas (Da Silva-Álvarez *et al.*, 2020).

5.2. "Snorlax" sube y baja el interruptor a través de *p53*.

Si nos atenemos al comportamiento del gen *chd7*, observamos que los niveles de expresión aumentan y disminuyen, comportándose como si fueran un interruptor o un grifo, que abre la llave de la senescencia celular a través de la actividad SA-β-Gal y de la expresión de los marcadores *p15* y *p21* (Fig. 53). El patrón de expresión del mRNA de *chd7* durante el desarrollo normal de pez cebra (Fig. Sup. 2) varía, presentando "subidas" y "bajadas" en sus niveles. Esta variación es la que debe controlar la entrada de la senescencia celular y regular su expresión y la expresión de los marcadores de senescencia embrionaria *p15* (*cdkn2a*/*b*) y *p21* (*cdkn1a*), así como también la inhibición de la expresión de *p53* (Fig. 50, Balow *et al*., 2013; Van Nostrand *et al.*, 2014; Su *et al*., 2018; Marie *et al*., 2018).

Llegados a este punto, es importante destacar que el aumento o la disminución de la expresión de *chd7* no provocan que el programa se inicie, sino que debe haber algún otro factor que lo estimule. La ausencia o deficiencia de *chd7* no necesariamente implica la activación o no activación del programa, sino más bien su alteración. Por lo tanto, la activación y regulación del programa de senescencia celular dependen, aunque no únicamente, de la expresión de *chd7*. En nuestros estudios con los embriones mutantes *chd7*-CRISPR *incross*, no observamos adelantos en los patrones espaciales y temporales de la actividad SA-β-Gal en función del genotipo, ni en la expresión de los marcadores *cdkn1a* y *cdkn2a*/*b*, lo que sugiere que la activación de los marcadores asociados a la senescencia embrionaria no ocurre antes en los mutantes que en los WT. Sin embargo, sí se han observado ciertos retrasos en los *chd7*-CRISPR *outcross*, lo que podría estar relacionado con un retraso en el desarrollo embrionario.

La presencia de expresión de *chd7* indica la capacidad de activar y, al mismo tiempo, inhibir el programa de senescencia celular, a través de los aumentos y disminuciones en los niveles de expresión. Por lo tanto, es importante tener en cuenta que el gen *chd7* y su mensajero no son lo mismo, y es necesario examinar tanto la presencia como la ausencia de ambos para comprender completamente el mecanismo de regulación del programa de senescencia embrionaria en pez cebra. y controlando sus niveles de expresión durante el programa de senescencia embrionaria, y su capacidad inhibidora de p53 (Su, *et al.,* 2018, Marie *et al.*, 2018). La presencia de expresión indica la capacidad de activar y, al mismo tiempo, inhibir el programa de senescencia celular, a través de los aumentos y disminuciones en los niveles de expresión, como si fuera un interruptor (Fig. Sup. 2). En consecuencia, la presencia y ausencia del gen *chd7* y de su mensajero deberían examinarse de esta manera:

1. El gen *chd7*, es el guardián, el "Snorlax". Su presencia, es decir, si se expresa *chd7* en las células, abre las puertas y permite la activación del programa, pero necesita de un estímulo adicional para iniciarlo. En ausencia del gen, la activación del programa resulta imposible.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

2. El mRNA *chd7*, es el interruptor, o la persiana, el regulador de la actividad de la senescencia embrionaria. El aumento de su expresión disminuye los niveles de senescencia, mientras que una disminución los aumenta.

Esta situación podría provocar una menor activación de la senescencia celular en los mutantes homocigotos materno-cigóticos, y probablemente un incremento en la apoptosis, al no controlar los niveles de expresión de *p53*. Aunque también podría suponer un arresto permanente del ciclo celular. Aun así, en algún momento podría presentarse un efecto compensatorio que supondría una estimulación de la senescencia embrionaria e inhibición de la apoptosis, lo que podría prolongar el desarrollo correcto del embrión.

Esta amplia variabilidad fenotípica en la expresividad y la penetrancia para una misma mutación en el gen *chd7*, ilustra la complejidad del modelo al tratar de encontrar un fenotipo específico y evidente. Las variaciones en el modelo *chd7*-CRISPR, son muy grandes en cuanto a la relación entre genotipo y fenotipo. No obstante, esto también pone de relieve la importancia de la validación de algunos modelos a través del fenotipo, y no solo del genotipo, teniendo en cuenta las singularidades de cada gen.

5.2.1. La Expresión del Gen *chd7* Convierte a las Células en Células Sensibles a la Senescencia.

Las células de los tejidos en los que se expresa *chd7*, son sensibles a estímulos que activan las vías de senescencia. Si *chd7* se expresa en todas las células del tejido, estas serían susceptibles a activar la senescencia celular, a través de la disminución de la expresión de *chd7*. La senescencia embrionaria es un programa establecido durante el desarrollo, pero igual que el resto de senescencias, para que se active en unas células y no en otras, necesitaría de un estímulo. Ese estímulo reduciría la expresión de *chd7*, y estimularía la activación de *cdkn1a* y *cdkn2a*/*b* en condiciones normales. Sin embargo los organismos deficientes en *chd7* aumentarían o activarían estos procesos antes debido a la deficiencia. Por lo que parece que la activación del programa de senescencia se debe a un estímulo, en el que *chd7* no es tan importante, pero sin él, probablemente sea más difícil de regular el proceso, y por eso observamos un retraso en la activación del programa. El aumento en la inhibición de la proliferación observada, y el aumento de inhibidores del ciclo celular en esos momentos del desarrollo debido a la pérdida de *chd7* parecen mostrar que había un aumento de la senescencia embrionaria (Fig. 50). La presencia de defectos observados en los mismos órganos y tejido en los que ocurre el proceso de senescencia embrionaria, y las alteraciones observadas en la actividad SA-β-Gal, parecen apoyar estar teoría. Sin embargo, ambas cosas no parecen más que una alteración debida al retraso en el desarrollo embrionario.

5.2.2. Los Mutantes *chd7*-CRISPR Activan los Programas de Senescencia Celular Durante la Senescencia Embrionaria

La activación de la senescencia embrionaria es un proceso complejo que involucra diferentes mecanismos celulares y moleculares. Uno de los principales mecanismos implicados es la activación de los programas de senescencia celular, que están regulados por una serie de genes y proteínas específicas (Fuchs y Steller, 2011; Muñoz-Espín *et al*., 2013; Storer *et al.*, 2013; Lorda-Diez *et al.*, 2015; Gibaja et al., 2019). Estos programas están

USC UNIVERSIDADE DE COMPOSTELA

controlados por diferentes señales intracelulares y extracelulares, como el estrés celular, la acumulación de daño en el ADN, la pérdida de integridad celular y la presencia de factores de crecimiento y citocinas. Es posible que la expresión de ciertos genes implicados en la senescencia embrionaria esté regulada por mecanismos epigenéticos, como la metilación del DNA o la modificación de histonas (Sanchez-Fernandez et al., 2020). También es posible que la contribución materna juegue un papel importante en la activación de estos programas, ya que los desequilibrios heredados por la contribución materna podrían afectar la expresión de los genes implicados en la senescencia. Por lo tanto, la activación del programa de senescencia podría estar más relacionada con la impronta genética y la contribución materna, al ocurrir aguas arriba del aumento en la expresión del gen *chd7*. De esta forma, la deficiencia en la contribución materna no necesariamente implicaría la no activación de los programas de senescencia celular para los homocigotos mutantes en *chd7*.

En los homocigotos *chd7*-CRISPR, la activación de la expresión de los genes que activan la senescencia embrionaria, podría ser similar a lo que ocurre en las líneas celulares tumorales (Su *et al*., 2018), donde la deficiencia absoluta en *CHD7* produce la incapacidad de activar la senescencia celular. El gen *chd7* podría ser solo la llave para regular el programa en las células programadas para activarlo. La activación de los programas no dependería directamente de la expresión del gen *chd7*, sino de la contribución materna en los mutantes homocigotos. Los embriones de *chd7*-CRISPR incross y outcross presentan una alta mortalidad durante la fase materna (Fig. 21). Estos individuos no se han reflejado en el estudio fenotípico debido a esta muerte prematura, ya que muchos embriones no llegaron a desarrollarse hasta la MBT. Los efectos de la contribución materna gradual podrían explicar que esto solo ocurra localmente.

5.2.3. La Deficiencia del Gen *chd7* Confiere Inmunidad Apoptótica, Pero su Ausencia Produce la Muerte.

Durante el desarrollo embrionario, como hemos explicado, también ocurre el proceso de apoptosis (Bromleigh y Freedman, 2000; Campisi y d'Adda di Fagagna, 2007; Collado *et al.*, 2010; Moskalev *et al.*, 2014; Wanner *et al.* 2021; Conradt, 2009, Fuchs y Steller, 2011, Kourtis y Tavernarakis, 2007). La presencia de senescencia en poblaciones celulares dispersas (Fig. 41-48), podría deberse a un fallo en el mecanismo de apoptosis. Pero, CHD7 es necesario para activar la senescencia en líneas celulares (Su *et al.*, 2018). Por tanto, la ausencia total de CHD7 no es capaz de activar la ruta de la senescencia celular mediada por p53, y las células que deberían entrar en senescencia morirían por apoptosis. Las células deberían entrar en un estado de senescencia replicativa debido al aumento de la proliferación inducido por la subida de *p53*, sin embargo, al no haber *chd7* suficiente o estar totalmente ausente, la inhibición de *p53* no se puede producir.

Lo mismo podría pasar en los tejidos en los que observamos senescencia embrionaria, y donde también podría ocurrir el proceso de apoptosis en algún momento del desarrollo. Las células deficientes en *chd7*, con la ruta de la senescencia embrionaria activada, no podrían inhibir la senescencia celular mediada por p53 y, por tanto, serían inmunes a la apoptosis. En estos tejidos en homocigosis y sin carga materna, podría ocurrir la muerte celular. Las células que deberían entrar en senescencia morirían por apoptosis. En los embriones mutantes *chd7*-CRISPR existen indicios de que esto podría estar ocurriendo. La falta de pigmentación

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

observada en la retina, igual que en el tegumento, falta de estructuras y malformaciones en los tejidos (Fig. 22-24) así como la aparición de zonas reactivas a la tinción SA-β-Gal en los heterocigotos *chd7*-CRISPR (Fig. 41-48), confirma estos dos eventos. Estas observaciones podrían explicar la formación de tabiques y otras estructuras observadas en mamíferos (Lalani *et al*., 1993; Kim & Layman, 2011; Muñoz-Espín *et al*., 2013; Bosman *et al*., 2005).

5.2.4. El Gen *chd7* Inhibidor/Activador de p53.

El requerimiento esencial de *CHD7* para la activación de la senescencia celular en líneas tumorales (Su *et al*., 2018) podría deberse a que es necesario previamente para la propia expresión de *CHD7*, ya que esto permite la activación de estas vías y la inhibición de a expresión de p53. Si no se activan estas vías, y aumenta la expresión de *p53*, las células entrarían en apoptosis o en un arresto del ciclo celular. Sin la expresión de *CHD7*, no se podría desenrollar el DNA para activar o inhibir la transcripción de los genes que implican esta vía. Sin embargo, algo debe controlar la entrada en escena de *CHD7* y en la senescencia embrionaria, la contribución materna podría desempeñar ese papel.

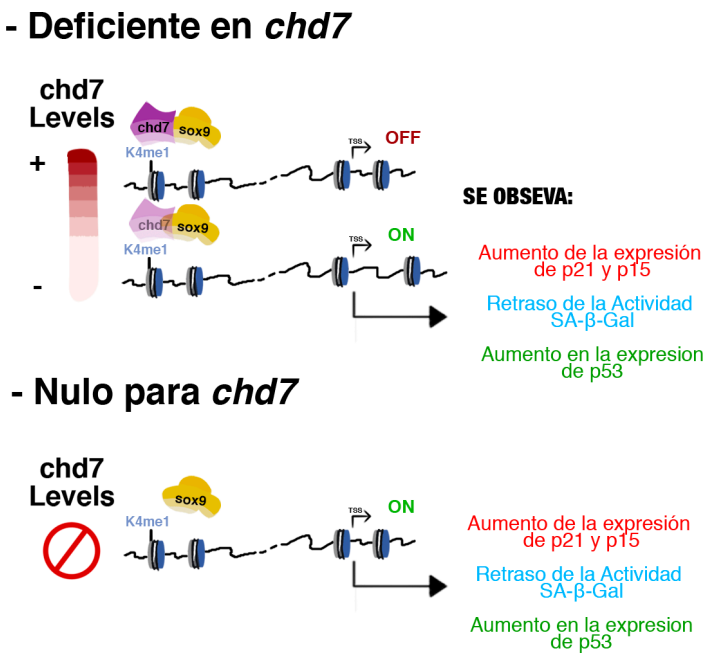


Figura 53. Observaciones de los mutantes *chd7*-CRISPR *incross* nulos y deficientes para la expresión de *chd7* cigótica (heterocigotos y homocigotos). Los morfantes para *chd7* podrían comportarse como ambos, dependiendo de la dosis de morfolino y la duración del efecto. Los mutantes completamente materno-cigóticos deberían comportarse como los nulos, pero sin activación de la senescencia celular.

5.2.4.1. La deficiencia en *chd7* activa la expresión de p53

Se observó un aumento en los niveles de expresión de los marcadores de senescencia embrionaria *p15* y *p21* en los embriones mutantes *chd7*-CRISPR, de los cruzamientos *outcross* e *incross* (Fig. 50), así como unos patrones de actividad SA-β-Gal similares espacio-temporalmente a los de los hermanos WT (Fig. 41-48). Esto indica que la senescencia embrionaria se establece en los tejidos, aunque con ciertas alteraciones. Sin embargo, cuando hay deficiencia en *chd7* aumentan *p21* y *p53* (Fig. 50; Balow *et al*., 2013). La elevación de la expresión de *p21* y la activación de la senescencia embrionaria podrían no estar

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO

correlacionadas. Como se ha explicado, *chd7* no sería necesario para la activación de la senescencia embrionaria, pero sí para la regulación de la senescencia que se manifiesta a través de la expresión de *p21*. El gen *CHD7* regula la inhibición de la apoptosis y la activación de la senescencia celular mediada por la proteína p53. El incremento en la expresión de *p53* debido a la deficiencia en *chd7*, ocasionaría un aumento en la expresión de *p21*. Este aumento solo ocurriría en las células en las que se exprese *chd7* para controlar la expresión de *p53* y la senescencia celular. Esto demuestra la importancia de estudiar tanto la presencia (WT y heterocigotos para *chd7*) como la ausencia de la expresión del gen *chd7* (homocigotos) para comprender el mecanismo de regulación del programa de senescencia embrionaria en pez cebra.

5.2.4.2. La deficiencia en *chd7*-CRISPR inhibe la apoptosis y la proliferación celular y activa la senescencia embrionaria.

Puede que la senescencia embrionaria sea un proceso que su activación también requiera de factores, en los que la importancia de *chd7* no sea tan grande, pero si para el control de la inhibición de la senescencia y la apoptosis de las células que lo expresan. Es lógico pensar que p53 tiene más mecanismos de activación e inhibición aparte de *chd7* por su importancia como guardián del genoma. Pero se requiere a *chd7* para que esto ocurra.

En los órganos y tejidos senescentes habría algunas células que recibirían el estímulo de la senescencia embrionaria, y reducirían los niveles de *chd7*, y otras que no, y los mantienen, para controlar el programa en el tejido, o puede que activar rutas apoptóticas en otras zonas del tejido. Las células senescentes se vuelven resistentes a los estímulos apoptóticos (Wang, 1995; Mooi y Peeper, 2006; Childs *et al.*, 2017; Kirkland y Tchkonia, 2017; Niedernhofer y Robbins, 2018). El mayor desorden y menor recuento celular observado en los morfantes para *chd7* (Balow *et al.*, 2013), también podría deberse a un efecto dependiente de la expresión (carga) de *chd7* y *p53*, interviniendo en los programas en los que actúa p53, inhibiendo la apoptosis y la proliferación celular y favoreciendo la senescencia.

En este caso estamos viendo un funcionamiento distinto entre aproximaciones. Tanto los morfolinos como los mutantes *chd7*-CRISPR, exhibirían pérdida del componente materno (carga materna) y pérdida de las funciones de control de la inhibición de la expresión de *p53* por parte de Chd7. Mientras que los mutantes heterocigotos con carga materna, cumplirían todos los programas en los que actúan estos genes con algunas desincronizaciones en el encendido y apagado.

5.3. La activación del programa de senescencia embrionaria pone fin a la senescencia celular.

Es decir, *chd7* inhibe la expresión de *p53*, pero solo a niveles altos de expresión de *chd7*. Cuando bajan los niveles de *chd7*, aumentan los niveles de *p53*. Sin embargo, se observa una subida de los niveles de *p53*, anterior a la activación de la expresión de *chd7*, lo que podría indicar que los niveles de expresión de *chd7* se eleven debido al aumento de la expresión de *p53* (Fig. 34). El aumento de la expresión de *chd7*, haría que bajase la expresión de *p53*, y así se desactive el proceso de senescencia celular en las células mediante su propia inhibición de la transcripción y de *p53*. En los tejidos donde la expresión *chd7* no fuera suficiente podrían

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

morir por apoptosis, o retrasar la entrada y salida del programa de senescencia embrionaria, y la diferenciación de tejidos.

Puede que la senescencia celular observada en las células embrionarias senescentes, solo sea una respuesta observable transitoria debido a la subida de expresión de *p53*, y la estimulación de la proliferación y apoptosis celular, para que esos procesos en las células terminen y se revierta a un estado normal y se estabilice la función y la especificación del tejido. La entrada en senescencia celular por parte de las células en desarrollo, sería una respuesta transitoria de *chd7* para controlar la sobreestimulación de las actividades de p53. Este mecanismo de control de *p53* por parte de *chd7* coincidiría con las hipótesis de que la senescencia embrionaria es momentánea y las células revierten a un estado normal de diferenciación celular, ayudando a la remodelación de tejidos transitorios (Muñoz-Espín *et al.*, 2013; van Deursen, 2014; Li *et al.*, 2018; Da Silva-Álvarez *et al.*, 2020). Además, esta hipótesis ayudaría mucho a entender cómo intervienen *p53* y *chd7* en la patología de la enfermedad, tanto en el síndrome de CHARGE como en el cáncer y puede que incluso en la regeneración de tejidos.

Si el gen *chd7* actúa de una manera tan importante en los programas de senescencia celular a través del control de p53 en células cancerígenas y tumorales, por qué no va a actuar en los procesos de regeneración de tejidos. En este sentido, los mutantes heterocigotos, con pérdida de las funciones cigóticas, verían comprometidas las actividades de *chd7*, y sería un modelo más útil y aproximado para comprobar las funciones cigóticas del gen, y las implicaciones de su deficiencia en el desarrollo de la enfermedad.

Las deficiencias en *Chd7* en ratones heterocigotos, produce defectos en la proliferación de células madre neurales que conducen a una reducción en la producción y regeneración de neuronas sensoriales olfativas (Zentner *et al.*, 2010). Estos resultados sugieren que se requiere CHD7 para el desarrollo y mantenimiento del epitelio olfativo. En el síndrome de CHARGE parece que las únicas patologías que se desarrollan en el adulto son las que derivan de las malformaciones y defectos producidos durante el desarrollo embrionario. El gen *CHD7* no parece tener una implicación o función en el adulto y el desarrollo de la enfermedad durante la maduración. En nuestros mutantes cigóticos *chd7*-CRISPR (*outcross*), observamos la presencia de actividad SA-β-Gal en muchos de nuestros embriones entre las 96-144 hpf, en órganos como el cerebro, el aparato auditivo, el ojo y los arcos faríngeos, en las mismas zonas en las que se observan malformaciones o penetración de células derivadas de la cresta neural en otros tejidos (Fig. 28, 30 y 31). Esto le da a la senescencia celular una implicación en la regeneración embrionaria de los tejidos en desarrollo, e implica la recuperación de la función cigótica en los mutantes heterocigotos.

La relación entre el gen *chd7* y la activación y control de la senescencia celular es tan estrecha, que seguramente también está muy implicado en el mecanismo de control de la senescencia en la regeneración de tejidos de los adultos. La implicación tan grande que tiene *chd7* con la senescencia celular, la senescencia embrionaria y ahora la regeneración tisular, nos hace abrir las puertas al estudio de este mecanismo y la función que *chd7* podría desempeñar en los períodos de diapausa y el envejecimiento del *killifish.*

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

6. LA PROTEÍNA CHD7, EL "DESTORNILLADOR" DE LA SENESCENCIA EMBRIONARIA

"Por un lado, aprieta y por el otro afloja". La proteína Chd7, con su actividad helicasa, aprieta y afloja el DNA activando e inhibiendo la transcripción génica (Creyghton *et al*., 2010; Schulz *et al.*, 2014b; Chai *et al.*, 2018; Mondal *et al.*, 2018; Reddy *et al.*, 2021). Aunque principalmente inhibidora, es decir crea regiones de cromatina cerrada, heterocromatina, dificultando la activación de los promotores dislates de la transcripción, también se le ha dado un papel activador durante el desarrollo, se sabe que es un inhibidor y activador de la transcripción, o sea un regulador (Schulz *et al.*, 2014b). Aunque, la presencia de *chd7* parece indicar siempre la de inhibir la expresión del DNA, su función es la de cerrar la cromatina, pero luego alguien tiene que abrirla, y ajustarla, y esos son.

1. La proteína Chd7, el destornillador o el fontanero, que aprieta y afloja las tuercas del grifo que abre la senescencia.
2. La expresión de *chd7* y la importancia de su carga, como mensajero, le indica a la proteína si se activa o se inhibe la senescencia y a qué intensidad.

Si la proteína Chd7 se encarga de inhibir la senescencia embrionaria durante el desarrollo, sería lógico pensar que en las células en las que debería activarse el proceso de senescencia embrionaria, *chd7* no esté activo transcripcionalmente. Sin embargo, la presencia de *chd7*, podría estar implicada en activar y regular la expresión de esos genes cuando el programa establezca que se inicia o se termine el proceso de senescencia embrionaria. Por tanto, la deficiencia en *chd7* podría producir errores en la entrada y salida de la senescencia, y un proceso de senescencia descontrolado y mantenido durante más tiempo.

Como demostraron los resultados de Balow *et al.* (2013) con morfantes, y apoyados por nuestros resultados de mutantes y morfantes para *chd7*, la deficiencia en *chd7* produce un aumento en la inhibición de la proliferación debido al aumento de p15 y p21. Sin embargo, CHD7 es necesario para activar la senescencia celular en células cancerígenas (Su *et al.*, 2018). El aumento de la senescencia en embriones deficientes de *chd7*, estaría causado por dos razones. Una activación descontrolada de la senescencia en condiciones patológicas, y una deficiencia del proceso de inactivación de los genes de senescencia, resultado del déficit en *chd7*.

6.1. "DESATORNILLANDO" LA SENESCENCIA EMBRIONARIA

En cualquiera de los dos casos, parece que los genes inhibidores del ciclo celular relacionados con la senescencia, están listos para la transcripción en condiciones de deficiencia de *chd7*. Sería lógico pensar que si *chd7* es un inhibidor de la senescencia, no vamos a encontrar expresión de *chd7* en los sitios que haya senescencia de forma programada, por lo menos hasta el momento de pararla o antes de su activación. Por lo tanto, su deficiencia no produciría un aumento de la senescencia celular en estos lugares, hasta que el programa no requiera pararse, donde ese control si podría tenerlo *chd7*.

El programa de senescencia embrionaria se activa a pesar de la deficiencia o ausencia cigótica de *chd7* (Fig. 41-48 y 50). Como cabría esperar, la deficiencia en *chd7* no produce

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

una no activación del programa senescencia embrionaria. Sin importar el genotipo del embrión, y sin tener en cuenta si es o no mutante materno, cigótico, o materno-cigótico, siempre que aparece un tejido, es decir, el embrión no presenta ausencia de ese tejido por defectos del desarrollo, encontramos actividad SA-β-Gal en el tejido mutante en el mismo momento que los WT o retrasada en el tiempo (Fig. 41-48). Por lo que la carga cigótica del embrión es suficiente para activar los programas de senescencia embrionaria.

6.1.1. La Deficiencia en la Dosis Materna de *chd7* Retrasa la Aparición de la Senescencia Embrionaria

Otra forma de ver esto, es que el gen *chd7* no es un factor indispensable para la activación del programa de senescencia embrionaria en el pez cebra. Tanto en embriones morfantes como mutantes para *chd7*-CRISPR, la deficiencia de este gen por la mutación en *chd7*, no causa la desaparición de la actividad SA-β-Gal en ninguno de los tejidos en los que se observa senescencia embrionaria en los embriones WT (Fig. 41-48; Da Silva-Álvarez *et al.*, 2020), pero sí un retraso. Al principio, relacionamos este retraso en la aparición del programa de senescencia embrionaria con un retraso en el desarrollo de los embriones, pero podría deberse también a la deficiencia en *chd7.* De la misma forma que las en las observaciones de Su et al. (2018) donde *CHD7* ha resultado ser es un activador esencial de la senescencia en algunas líneas tumorales (Su *et al.*, 2018), el gen *chd7* también podría ser necesario pero no imprescindible para la activación del programa. La cantidad de la dosis en *chd7* no es suficiente, y el programa de senescencia no se enciende a tiempo. La incapacidad de *chd7* de inhibir la expresión de *p53*, *p15* y *p21* podría provocar la alteración de este programa, y causar malformaciones en los tejidos asociados. Recordemos que *chd7* es un inhibidor de la senescencia, pero inhibe a dosis bajas. Se requieren bajos niveles de *chd7* para activar el programa, no la ausencia.

6.1.2. La Deficiencia en *chd7* Activa la Apoptosis

El papel de *chd7* en la senescencia parece estar en la función antiapoptótica como inhibidor de la expresión de *p53* (Patten *et al.*, 2012; Liu *et al.*, 2018; Marie *et al.*, 2018; Cheng *et al*., 2022). Puede que, en los lugares en los que se expresa *chd7*, se inhibe epigenéticamente la expresión de los genes relacionados con la senescencia, y se activan las rutas antiapoptóticas, para después desencadenar la senescencia celular. Pero en todo momento en las células y tejidos observados en los mutantes cigóticos, al reducirse los niveles de *chd7*, no observamos indirectamente una mayor apoptosis (no se han realizado análisis de apoptosis). Lo que parece indicar, que los niveles de la proteína se mantienen en esos tejidos en todo momento para inhibir la apoptosis. Por lo que la haploinsuficiencia no explica la enfermedad

Los embriones mutantes *chd7*-CRISPR presentan zonas con actividad SA-β-Gal donde no debería expresarse, o no hemos encontrado en los WT en los lugares de expresión de *chd7*. En estos lugares en los que se expresa *chd7*, en caso de un estímulo que activase las vías de senescencia celular mediadas a través de *p53*, se activan las vías de senescencia celular. Sin embargo, no hay presencia de tejidos completamente senescentes en los mutantes, lo que indica que las la vía da de estimulación de la senescencia embrionaria está aguas arriba de *chd7* y los estímulos que controlan la senescencia celular y los niveles de *chd7*.

USC SANTIAGO DE COMPOSTELA

La proteína p53 funciona como activadora de la apoptosis a dosis altas. En nuestros mutantes *chd7*-CRISPR vemos unos niveles mayores de p53. Al reducirse los niveles de expresión de *chd7*, las células se vuelven senescentes, y a su vez resistentes a los estímulos apoptóticos. Sin embargo, la estimulación por parte de la senescencia embrionaria, haría que los niveles de la proteína Chd7 sana se vieran comprometidos, y como se produce un retraso en la entrada en senescencia, se produce una menor inhibición de la apoptosis.

6.2. La Proteína CHD7 Inhibidora/Activadora de la Senescencia Embrionaria

Los cambios en la expresión de *chd7* en los mutantes no están claros todavía. En los primeros experimentos, se analizaron *pools* de mutantes heterocigotos para *chd7-CRISPR* y WT hermanos de los mismos cruzamientos *outcross* (Fig. 50; Arana, 2016). Las subidas y bajadas en la expresión de *chd7* a lo largo del desarrollo son semejantes en ambos grupos, con patrones de expresión casi idénticos, y la variación entre ambos grupos es muy pequeña. Sin embargo, los niveles de expresión de *chd7* en los mutantes materno-cigóticos (*incross*) aumentan (Fig. 33).

Los procesos en los que actúa la senescencia son muchos por lo tanto es normal que existan multitud de mecanismos y vías para activarla. La implicación de chd7 en la senescencia embrionaria, a pesar de las múltiples causas que la relacionan con la misma, no es clara. La relación con la senescencia celular parece ser más directa (Su, *et al.*, 2018). El gen *chd7* podría actuar en el proceso inhibitorio y regulador de la senescencia celular. Esta idea daría explicación a muchas de las cosas aquí descritas como por qué no observamos una relación tan directa con la enfermedad y la senescencia embrionaria, a pesar de los efectos compensatorios que pudieran estar ocurriendo en los mutantes (Fig. 33-34). Como en las observaciones de Balow *et al.* (2013), la deficiencia en *chd7* causa un aumento de los niveles de expresión de *p15* y *p21* en algunos de los momentos analizados (Fig. 50; Arana, 2016), sin embargo, la subida en la expresión de *p15* y *p21* podría deberse a un retraso en el desarrollo embrionario como hemos explicado, detectando senescencia en momentos que ya han pasado (efecto materno), pero también a que la expresión de *chd7* materna no es capaz de controlar este programa de senescencia embrionaria, y la expresión de estos genes se desregula (efecto materno-cigótico).

Postulamos un mecanismo inhibidor de la senescencia embrionaria para *chd7*, pero no se descarta también un posible mecanismo activador de la misma. En algunos lugares *chd7* actuaría inhibiendo la senescencia para que no se descontrole, pero en otros podría actuar activándola, y ser necesaria su expresión también después para el proceso de apagado. Tanto en los embriones WT como en los mutantes para *chd7*-CRISPR, la expresión es muy alta a las 72 hpf. Esta expresión baja a las 96 hpf y a las 120 hpf sube un poco, para luego caer a las 144 hpf bruscamente (Fig. 50). La disminución en la expresión en el mismo momento en el que los tejidos presentan una mayor cantidad de SA-β-Gal refuerza la idea de la contribución de chd7 como inhibidor de la senescencia a dosis bajas. Sin embargo, la actividad SA-β-Gal aparece muchos antes de la bajada de los niveles de expresión de *chd7.*

6.2.1 la Proteína Chd7 Coactiva la Senescencia

La idea de que sea un coactivador necesario para el encendido del programa de senescencia embrionaria continúa siendo válida. Los niveles de expresión de *chd7* disminuyen

USC UNIVERSIDADE DE COMPOSTELA

gradualmente a medida que se instaura la senescencia embrionaria en los tejidos (Fig. 50B; Fig. Sup. 2; Fig. 41-48). En algunas de las zonas descritas como la vesícula ótica del embrión, el ojo o el borde de los somitas, la senescencia aparece entre las 25-48 hpf, que es cuando los niveles de expresión de *chd7* están más altos y comienzan a bajar (Fig. Sup 2; White *et* al., 2017). Las alteraciones en la actividad SA-β-Gal en estos momentos anteriores, y la subida de la expresión de *chd7* podría explicarse por una incapacidad de los embriones deficientes en *chd7* de inhibir el programa de senescencia embrionaria (Fig. 45-47). La proteína Chd7 sería necesaria en algunos sitios inhibiendo la senescencia, y en otros ayudando a activarla. El gen *chd7* se expresa para inhibir la activación de la senescencia, hasta que llega un estímulo, que promueve el inicio de la senescencia, la desactivación de *chd7*, pero *chd7* sigue siendo necesario para regular ese proceso.

6.2.2. La Proteína Chd7 Tiene una Función Tejido-Específica

Los embriones mutantes *chd7*-CRISPR muestran fenotipos muy variables, pero semejantes y con igual penetrancia a los vistos en morfantes para *chd7*, mientras que los individuos heterocigotos y WT *chd7*-CRISPR de un *outcross*, presentan una penetrancia muy baja y fenotipos más homogéneos. Si una mala actividad del programa de la senescencia embrionaria se produjese a niveles bajos de *chd7*, por una mala inhibición por parte de *chd7* a *p53*, los individuos heterocigotos tendrían los mismos fenotipos que los homocigotos.

Si la senescencia embrionaria se produce también en los homocigotos, puede que la colocalización de la expresión de *chd7* y la actividad SA-β-Gal en un mismo órgano se deba a que *chd7* solo se está expresando en las células de ese tejido en las que no se produce senescencia embrionaria. Mientras que en las otras células *chd7* no está presente o está a niveles muy bajos. De esta *chd7* estaría reprimiendo la senescencia en el resto de tejido, mientras que en los otros por la ausencia de *chd7* se activa por la activación de p53. Pero entonces en los homocigotos, la senescencia embrionaria se activaría en los tejidos en los que no hay *chd7* para reprimirla.

Debido a cuestión espacio-temporal, coexisten estos dos procesos en las mismas células, y existe una diferenciación celular en la expresión *chd7*. En unas activa el proceso de senescencia mediante la inhibición de p53 y en otras activa los programas de proliferación y apoptosis reduciendo su capacidad inhibidora de la expresión de *p53*. Sin embargo, no es descartable que *chd7* de una forma paracrina, no autónoma del tejido que no expresa *chd7*, las células senescentes que producen *chd7* induzcan las actividades mediadas por p53 al resto de tejidos desde las células senescente.

La caída en la dosis de las células que expresan *chd7* estaría inhibiendo la senescencia en todo momento, ya que parece necesario a dosis bajas para inducir la senescencia. En el caso de heterocigosis, la senescencia se activaría descontroladamente en todas las células que expresan *chd7*. En las células en las que actuaría activando la senescencia, el programa de senescencia embrionario no se activaría, o tardaría en activarse. Mientras, en las células en las que actúa inhibiendo la senescencia, la caída en la expresión de *chd7* haría aumentar la expresión *p53,* la proliferación y migración celular descontrolada, apoptosis, o incluso una senescencia celular permanente. Las subidas y bajadas en la expresión de *chd7* durante el desarrollo embrionario parecen concordar más con la hipótesis de que *chd7* está en las células de los tejidos reprimiendo la senescencia pero dotándolas de sensibilidad a desencadenar este

USC
UNIVERSIDADE DE COMPOSTELA

proceso. En el momento en el que llega un estímulo senescente, nocivo o programado, la función de *chd7* de represor cambia, y se encienden las rutas de senescencia.

6.2.3 el Gen *chd7* Se Expresa en las Células Embrionarias Para Activar e Inhibir el Proceso de Senescencia Embrionaria

Estos estímulos hacen disminuir los niveles de expresión de *chd7* para el mantenimiento o aparición de la senescencia celular en los embriones en desarrollo. En los organismos deficientes para *chd7*, en los tejidos en los que se expresa *chd7* no se observa más senescencia embrionaria. A pesar de ser un coactivador esencial en cáncer, el programa senescencia embrionaria parece desencadenarse igualmente sin necesidad de *chd7*. La deficiencia en *chd7* por el *knockout* estable, aumenta y disminuye los niveles de expresión de los marcadores de senescencia *p15*, *p16* (Fig. 50). La senescencia celular comienza cuando los niveles de *chd7* aún son altos, y disminuye gradualmente a medida que el programa se instaura (Fig. Sup. 2; White *et* al., 2017).

Todas estas ideas conducen a pensar que *chd7* es un inhibidor de las kinasas inhibidoras del ciclo celular dependiente de ciclina *p15*, *p16*, *p21* y *p27*, como ya se ha observado en otras células (Ohta *et al.*, 2016; Su *et al.*, 2018). No obstante, en este caso, podría ser a partir de la inhibición de *FOXO* y estos inhibidores del ciclo celular, aumenten su expresión, al ser *FOXO* un activador de estos (Takano *et al.*, 2007; Ward *et al.*, 2008). Sin embargo, esto no explicaría del todo la subida de *p21*, ya que *p21* parece ser un inhibidor de *FOXO y FOXO* regulador de p21 (Diep *et al.*, 2013). El gen *chd7* podría ser un inhibidor necesario de *p21*. El programa de senescencia se activaría a pesar de las deficiencias en *chd7*, por lo que *chd7* no es un activador esencial de estar rutas:

- Si *chd7* se expresase solo en las células que no hay senescencia para inhibir la senescencia, en los mutantes *chd7*-CRISPR y morfantes para *chd7* abría más senescencia en esas células, o aparecería antes. Sin embargo, solo observamos retrasos en la aparición del programa y aumentos de los niveles de expresión de los inhibidores *p15* y *p21* y de *p53*.
- Si *chd7* se expresase en las células solo para activar la senescencia, en los mutantes *chd7*-CRISPR y morfantes para *chd7* no se produciría senescencia embrionaria. Sin embargo, en los mutantes vemos senescencia, y no vemos más tejidos o otras zonas del tejido con senescencia donde no debería ocurrir.

En las células en las que se expresa *chd7* se produce senescencia. El estímulo que activa la vías de la senescencia embrionaria, seguramente produzca también el aumento de la expresión de *chd7*, y la activación, por parte de *chd7*, de los promotores de los inhibidores del ciclo celular *p15, p21* y *p27*. Sin embargo, donde no hay expresión de *chd7,* esas vías también permanecen inactivas. Por lo que *chd7* no parece tampoco un inhibidor imprescindible del programa de senescencia embrionaria. El programa se tiene que desencadenar por algún estímulo, no se desata porque sí. Es por eso que la deficiencia no produce un aumento de la senescencia embrionaria o celular en todo momento del desarrollo. Debe estimularse esa activación, para que la deficiencia en *chd7* produzca efecto. Y solo las células que expresasen *chd7* previamente tendrían errores en esos programas.

USC UNIVERSIDADE DE COMPOSTELA

Igualmente, pasaría en las células de los tejidos que expresen *chd7* y no activen el programa de senescencia embrionaria. Las deficiencias en *chd7* no implican la activación o inhibición total del programa de senescencia, por lo tanto, las células que lo expresan y no activan el programa no aumenta o disminuyen la senescencia, debido a que no se ha activado el programa aguas arriba de *chd7* en esas células.

6.2.4. La Proteína Chd7 No Activa el Programa El de Senescencia Embrionaria

El efecto de la deficiencia en *chd7* podría venir, por lo tanto, al final del programa de senescencia y al tratar de inhibir o bloquear esas rutas. El programa de senescencia tendría una forma alternativa para mantenerse inactivo sin *chd7*. Los defectos en la alteración del programa en tiempo e intensidad, no son suficientes para explicar los defectos observados en el desarrollo de la enfermedad, y la asociación entre la expresión de *chd7* en los tejidos que presentan senescencia y los defectos fenotípicos asociados a la senescencia ene esos mismos tejidos es muy evidente.

El gen *chd7* parece ser clave en la inhibición del proceso de senescencia antes de que ocurra el programa. En esas células disminuiría su expresión. Pero sigue siendo necesario en las células vecinas para mantenerlo apagado. Sin embargo, no se produce un aumento de la SA-β-Gal en los embriones deficientes de *chd7* en las células de esos tejidos. La dosis cigótica en los heterocigotos, parece ser suficiente para mantener los patrones de senescencia embrionaria normales, se activaría antes.

Lo que parece que las rutas del programa de senescencia embrionaria en los embriones deficientes en *chd7*, se mantienen apagadas por otro complejo inhibidor. Esto daría solidez a la teoría del retraso en la activación del programa y de que *chd7* es un activador del mismo, aunque no imprescindible. En ausencia de *chd7* o en presencia de este nuevo complejo inhibidor se tardaría más en llevar a cabo la activación de genes relacionados con la senescencia.

Puede que la causa de la subida de estos inhibidores del ciclo celular, sea una activación descontrolada en otras zonas en las que no hay senescencia. Sin embargo, *chd7* se expresa en unos tejidos muy definidos en unos momentos determinados, por lo que va en contra de la colocalización de *chd7* y la senescencia embrionaria en los mismos tejidos

6.2.5. La Proteína Chd7 Tiene una Función Indirectamente Proporcional a la Dosis de *Chd7* en la Activación de la Senescencia Embrionaria.

En los datos de expresión del atlas de expresión de pez cebra (White *et* al., 2017; Papatheodorou *et al.*, 2020), se apreció algo similar. La expresión de *chd7* es más alta en los primeros momentos del desarrollo, y se duplica casi en el periodo de gástrula, lo que explicaría su contribución materna y el paso a ZGA. Los embriones mutantes y morfantes parecen detenerse en algún momento de ese paso, dando relevancia a estos hechos y explicando muchos de los fenotipos observados.

El gen *chd8* podría realizar un papel compensatorio. Este gen, en la transición a la ZGA, disminuye mucho su expresión, por lo que podría realizar un papel compensatorio, y tomar el relevo de las funciones de *chd7,* aumentando su expresión en la transición a ZGA en caso de que *chd7* no funcionase correctamente.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

A las 72 hpf y a las 120 hpf es el momento en el que se activa la senescencia embrionaria en muchos tejidos. En esos momentos observamos pequeñas subidas y bajadas de *chd7* tanto en embriones mutantes chd7-CRISPR como en WT. Las subidas de expresión de *p15* en los mutantes en esos momentos podrían explicarse entonces por una deficiencia en *chd7* y una activación descontrolada del programa de senescencia embrionaria, pero seguimos sin observar más actividad SA-β-Gal en esos tejidos en. El gen *chd7* a dosis altas, inhibe la senescencia celular, pero tiene que bajar para que esta se active. De esta forma el papel se cumpliría un papel de activador y represor de *chd7.*

Las subidas de expresión de *p15* y *21*, se deben a que *chd7* actúa inhibiendo a dosis bajas, pero la entrada del programa de senescencia embrionaria hace aumentar los niveles de p53, que a su vez harían aumentar *p15*, *p21* y *chd7*. La bajada en la dosis de *chd7*, produce que estos niveles se disparen, pero el control del producto cigótico los aplaca. De esta forma se producen aumentos de los niveles de los inhibidores, y consecuentemente un aumento de *chd7* que tarda en aparecer, pero reduce los niveles de p53 y provoca la entrada en senescencia. Por eso se observan entradas en senescencia celular tardías, pero niveles altos de los inhibidores del ciclo celular p15 y p21 relacionados con senescencia embrionaria.

De la misma forma, las células que expresan *chd7*, pero no activan la SA-β-Gal, podrían verse comprometidas al no ser capaces de reducir los niveles de los inhibidores del ciclo celular. El aumento en estos inhibidores estaría relacionada con la aparición de zonas con una alta actividad SA-β-Gal en el cerebro de los mutantes, o con la aparición de los parches de células senescentes en algunos embriones mutantes y morfantes. En este caso, la senescencia tendría una relación con *chd7* por su localización en el cerebro de los embriones, por lo menos hasta las 48 hpf. La senescencia embrionaria no se debería activar en esos individuos, pero los bajos niveles de *chd7*, hacen que entren en senescencia en lugar de inhibirla.

6.3. La proteína Chd7 inhibe las rutas de p53 y activa así la senescencia

Atendiendo a todos estos datos, la asociación de *chd7* con la senescencia embrionaria parece ser muy estrecha, particularmente en la inhibición y activación de la senescencia celular durante el desarrollo embrionario. En los órganos, tanto que expresan *chd7*, se ha observado senescencia celular en algunos de sus tejidos (Fig. 41-47; Da Silva-Álvarez, 2020). Sin embargo, la relación que guarda *CHD7* con la senescencia celular como activador esencial (Su *et al*., 2018), no necesariamente implicaría que la deficiencia afecte también al programa de senescencia embrionaria. Los tipos de senescencia son muy diversos, y los estímulos y rutas que los desencadenan pueden ser distintos (Campisi, 2013).

Es posible que la deficiencia en *chd7* produzca el aumento de la expresión de los marcadores de senescencia, únicamente a través del aumento de la expresión de *p53*, por una inhibición ineficiente (Balow *et al*., 2013; Van Nostrand *et al*., 2014; Su *et al*., 2018) y no por la no regulación del programa de senescencia embrionaria y sus intermediarios. En este caso *chd7* se encargaría de reprimir el aumento de la expresión de *p53* (Fig. Sup. 2), y en los casos de deficiencia o ausencia total, se activaría su expresión, desencadenando lo que observamos como una respuesta alterada de la senescencia embrionaria a través de estos marcadores, por el aumento de la senescencia celular. Eso seguramente implicaría que *chd7* se expresa solo en las células de los tejidos que activan el programa de senescencia embrionaria, No obstante esta hipótesis resulta poco probable.

USC DE COMPOSTELA

6.3.1. La Proteína Chd7 Funciona Como un Interruptor Genético de la Senescencia

En las células del tejido que expresan *chd7* y no expresan senescencia no se observa más senescencia. El proceso debe activarse por otra vía y *chd7* es un mecanismo de control de esta. A medida que avanza el programa, la expresión de *chd7* disminuye, y a dosis bajas se activa la senescencia y la expresión de *p53* (Fig. Sup. 2). Luego volvería a subir para bloquearla en el caso de que *chd7* se volviera a expresar. No hay datos de expresión más allá de las 144 hpf. Esto coincidiría con la idea de que es un activador y un inhibidor al mismo tiempo, y que su función podría cambiar durante el desarrollo (Reddy *et al.*, 2021).

La leve bajada en expresión *chd7* a las 72-96 hpf y el incremento de la senescencia podría deberse entonces una bajada en los niveles de expresión de *chd7* en aquellas células que si activan la senescencia embrionaria, mientras que *chd7* se mantiene en las otras células para controlar que no se active la senescencia. En esos momentos a las 96 hpf se observa un aumento de la expresión de los marcadores de senescencia *p15* y *p21* tanto en embriones WT como mutantes para *chd7*-CRISPR, significativamente mayor en los heterocigotos.

Antes de las 144 hpf, al final de lo que podría ser la instauración del programa de senescencia embrionaria, la expresión de *chd7* cae vertiginosamente, pero no se observa una mayor actividad SA-β-Gal en los embriones *chd7*-CRISPR ni *chd7*-MO. Lo que indica que una sola copia del gen *chd7* es suficiente para inhibir la subida de expresión de *p53,* y establecer correctamente el programa de senescencia embrionario. Sin embargo, los mutantes homocigotos *chd7* CRISPR mueren y desaparecen de nuestros registros.

6.3.2. Las Funciones Cigóticas de Chd7

La función cigótica de *chd7* es la diferenciación a través de la entrada o no de La senescencia embrionaria para esos tejidos en los que se observa senescencia durante el desarrollo embrionario. Esa función no se pierde en el heterocigoto, por eso es capaz de establecer los programas correctamente y llevar a cabo la entrada de la senescencia celular. La pérdida del efecto materno sumada al desajuste materno-cigótico es la causa real de la enfermedad en el síndrome de CHARGE. El heterocigoto y la función cigótica del gen chd7 no se vería apenas afectado, al compensarse los efectos a favor de la expresión de sus homólogos o la expresión de su propia variante sana e inhibición de la enferma, si la mutación es lo suficientemente capaz de activar la GCR a través, de su PTC. Puede que la entrada en senescencia descontrolada en algunos tejidos, sea la forma de controlar los errores en la maduración y desarrollo de los tejidos en la etapa materna y cigótica. Los defectos observados en los ojos y en los oídos en los embriones (Fig. 27) y la detección de actividad SA-β-Gal en zonas en las que se observan defectos del desarrollo relacionados con el síndrome de CHARGE (Fig. 26 y 28), podrían indicar que la senescencia se activa como una forma de interrumpir el mal desarrollo del tejido, llevando a la no maduración del mismo pero un individuo parcialmente saludable.

Esa función cigótica se podría mantener en las células si continúa la expresión de la *chd7*, y el mantenimiento o sensibilidad de la senescencia embrionaria, función materno-cigótico. En heterocigotos también podría ocurrir si la función de la GCR compensa el alelo mutante con su variante sana. En este sentido, seguramente se pueda activar *CHD7* mediante algún estímulo en esas células senescentes con capacidades regenerativas a través de la senescencia

USC UNIVERSIDADE DE COMPOSTELA

celular activada por p53. Si la mutación no pudiera compensar el alelo sano, por falta de PTC, pero afecta gravemente a la proteína, entonces podría haber complicaciones en esa función cigótica y materno-cigótica, activada antes de la ZGA, de sensibilidad y entrada a la senescencia embrionaria. Esto concuerda con las observaciones de que las variantes *missense* no producen apenas el síndrome de CHARGE (Yan *et al*., 2020), pero producen otras alteraciones en el desarrollo que probablemente sean posteriores a la función materna de *CHD7*.

Estas funciones se podrían mantener en el adulto en caso de que estas células se mantuvieran vivas en ese estado de senescencia embrionaria. Otra cuestión es si de esta función materna de activación de la senescencia embrionaria pudiera ocurrir durante la maduración en estado adulto, y hubiera células capaces de inducir la producción de *CHD7* para la activación de la senescencia "embrionaria". En ese sentido, los adultos heterocigotos si se podrían ver afectados al perder parte de la función cigótica y no tener una GCR por falta de PTCs. Todo esto hipotéticamente existiendo una función adulta de *CHD7* para los vertebrados.

La etapa cigótica es la que menos patologías causa en el desarrollo de la enfermedad, y puede que la menos importante para descubrir el origen de los problemas asociados. Esta etapa, únicamente cigótica, marca el inicio de la senescencia embrionaria y es la más importante para la resolución de la enfermedad genética y el rescate fenotípico para los pacientes con mutaciones o no en *CHD7* con un fenotipo CHARGE asociados.

6.4. La Pérdida del Efecto Materno-Cigótico de *chd7* Juega un Papel Clave en el Desarrollo de la Enfermedad.

Sabemos que en las células con pérdida de función de *chd7*, no se activa el programa antes de tiempo, por lo tanto, la concentración de *chd7* en el cigoto es suficiente para mantener el programa apagado. Sin embargo, tras un estímulo este se desajusta, habiendo retrasos en el encendido y apagado del mismo. Por lo tanto, parece que esta pérdida de función, ocurre después de la pérdida del efecto materno.

Durante el efecto materno, el embrión se desarrolla correctamente, pero tras el estímulo, los niveles se desajustan en dos momentos distintos del desarrollo. Sabemos que:

1. El gen *chd7,* de forma indirectamente proporcional a la expresión de su mensajero, controla la expresión de los genes relacionados con la senescencia celular, y regula la senescencia embrionaria (Balow *et al*., 2013; la presente tesis).
2. Los efectos de la deficiencia en Chd7 podrían estar implicados en el control de la senescencia celular para controlar el correcto funcionamiento del programa de senescencia embrionaria.
3. Pero ni el mensajero ni la proteína es el activador principal de la senescencia embrionaria.

Es decir, que probablemente la senescencia embrionaria, activada aguas arriba de *chd7*, aprovechase, durante la evolución de los mamíferos, las rutas mediadas por *chd7* para inhibir y activar la senescencia celular, y crear así un programa tan preciso y controlado.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

De esta forma quedaría claro como *chd7* contribuye durante todo el proceso del desarrollo embrionario, y que la pérdida de la función materna y materno-cigótica son las verdaderas causas de la enfermedad en humanos. La pérdida de la función materno-cigótica en humanos podría ser más fácil debido a la poca contribución materna, pero los individuos heterocigotos adultos no parecen desarrollar problemas relacionados con la senescencia celular más allá de la embriogénesis, igual que nuestros mutantes *chd7*-CRISPR adultos. Por lo que parece que la función únicamente cigótica no se ve tan comprometida en heterocigosis

La letalidad de los homocigotos de pez cebra como de ratón para *chd7* en los momentos de inhibición de la senescencia (Fig. Sus 2.; White *et* al., 2017.) sugiere que el componente cigótico y los problemas asociados al síndrome de CHARGE estarían mejor explicados por una recuperación de la función cigótica a través de la senescencia. El rescate del fenotipo con p53 ocurre en ambos modelos en ese momento, cuando se da paso a la función cigótica del gen.

6.5. El Gen *chd7* Implicado en la Senescencia en la Regeneración de Tejidos.

.Si el efecto materno es activar la senescencia embrionaria, el materno-cigótico controlarla durante el proceso de embriogénesis, y el cigótico mantenerla o apagarla, la función en el adulto podría ser el control de la senescencia celular a través de p53. De esta forma tendría sentido un papel también en el adulto para *chd7* en el control de la regeneración de tejidos.

La senescencia durante el desarrollo del embrión se había sido observada en el contexto de la regresión de órganos, el equilibrio de la población celular y la promoción del crecimiento de tejidos (Storeret al., 2013; Muñoz-Espín et al., 2013). Sin embargo, las observaciones recientes indican que la senescencia también opera en el contexto de la remodelación tisular y estructuras escultóricas en el embrión, lo que le proporciona probablemente un papel fisiológico en la senescencia del organismo adulto durante la reparación tisular y los procesos de regeneración (Demaria *et al.*, 2014; Yun *et al.*, 2015; Da Silva-Álvarez *et al.*, 2020a). Las implicaciones de *chd7* durante el programa de senescencia embrionaria, le da un papel importante para la programación de estas células con capacidades regenerativas

En este sentido, se decidió poner a prueba la teoría del efecto cigótico de *chd7* y si juega algún papel también en la senescencia durante la regeneración de tejidos. Si *CHD7* es importante para activar la senescencia en líneas celulares tumorales (Su *et al.*, 2018), a través del control de la expresión de *p53*, las células senescentes en los eventos de regeneración tisular también podrían precisar del gen *chd7* para esta regulación,

Las implicaciones de *chd7* en la regeneración celular, por tanto, serían las mismas. La deficiencia en *chd7* producirían alteraciones solo en el encendido y apagado del programa de senescencia celular y su regulación. Esto implicaría un retraso en la aparición del programa, y una respuesta exagerada en su apagado, que probablemente se traduciría en una regeneración más lenta y alteraciones morfológicas en los tejidos, coincidiendo con nuestros datos del estudio de regeneración de aletas en adultos (Fig. 39).

Mientras tanto, en los embriones mutantes homocigotos *chd7*-CRISPR, la ausencia de componente cigótico y disminución del componente materno, haría que esas células no pudieran controlar la inhibición de *p53* y activar la senescencia celular en el proceso de reparación de tejidos. A su vez, la ausencia total de *chd7* en los mutantes *chd7*-CRISPR

USC UNIVERSIDADE DE COMPOSTELA

adultos homocigotos podría provocar, como se ha observado en líneas tumorales, que estas células no pudieran entrar en senescencia celular necesaria para la reparación de los tejidos, y, por tanto, llevando a la incapacidad de regenerar o incluso puede que inhibir la proliferación y apoptosis del mismo.

6.5.1. La Deficiencia en *Chd7* Produce Alteraciones en la Regeneración Tisular.

A pesar de la lenta regeneración tisular y las malformaciones observadas, La senescencia se activa en las células del borde de la aleta en los mutantes heterocigotos para *chd7*-CRISPR, igual que en los WT. No hemos observado diferencias en la intensidad del marcaje ni en el número de las células con actividad SA-β-Gal de la aleta, en comparación con individuos WT. Sin embargo, la presencia de actividad SA-β-Gal positiva en los embriones mutantes *chd7*-CRISPR indica que las deficiencias en el gen no implican una desactivación de las células senescentes encargadas de la regeneración tisular.

No obstante, las aletas regeneran completamente (Fig. 39), lo que podría indicar, que estas células también estarían activando y desactivando la senescencia y los programas de proliferación celular y apoptosis mediados por *p53*, aunque puede que con ligeras alteraciones, a pesar de las deficiencias en *chd7*. Las alteraciones en el ritmo de regeneración de la aleta en los adultos heterocigotos *chd7*-CRISPR se podrían relacionar con alteraciones en un programa de senescencia celular alterado. Sin embargo, la deficiencia no produce una pérdida de las capacidades senescentes de la célula a programarse, volverse senescente y regenerar.

Esto implica que la proteína presente en las células es suficiente para activar los mecanismos de senescencia observables a través de la actividad SA-β-Gal. Por lo que la haploinsuficiencia de *chd7* en pez cebra, no produce la inactivación de los programas en los que está implicado *p53*. Sin embargo en un modelo nulo para el gen, es decir, homocigoto, con pérdida total de la función, la ausencia de este podría desencadenar en la alteración de los programas de apoptosis y senescencia celular en los que esta implicado *p53*.

6.5.2. La Proteína Chd7-CRISPR No Permite la Regeneración Tisular.

Los experimentos de regeneración de la aleta, como hemos comentado, no fueron posibles de realizar con los individuos adultos homocigotos para *chd7*. No obstante, ambos individuos murieron pocos días después del corte y genotipado de la misma, lo que nos deja sin información real de cómo esta mutación podría afectar con pérdida total de función, pero nos da ideas de que la ausencia total de la función de la proteína y los mismos mecanismos que le ayudan a controlar la activación de la senescencia celular mediante la inhibición de p53, fueran los mismos que los llevaron a su propia muerte. Uno de ellos, aguantó más tiempo sin indicios de regeneración en la aleta caudal y con un hematoma en la parte posterior.

Las proteínas que actúan remodelando el paisaje durante el desarrollo y que tienen un importante control materno, también están relacionadas en la reprogramación celular durante la edad adulta, en los procesos de diferenciación celular y reparación tisular (Przybilla *et al*., 2012; Xiao *et al*., 2016; Ye *et al.*, 2020). La asociación de CHD7 con la regeneración de tejidos no se ha confirmado todavía, y los pacientes con síndrome de CHARGE no presentan ningún síntoma relacionado con los defectos en este programa. Pero como vimos, los vínculos

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

entre el cáncer y el desarrollo embrionario, también se relacionan con la regeneración de tejidos.

La senescencia celular, en el contexto de la regeneración de tejidos, es un proceso que se activa también durante el desarrollo embrionario (Da Silva-Álvarez *et al.*, 2020). La implicación de *CHD7* en la senescencia celular podría explicar los síntomas en tejidos no asociados con la senescencia embrionaria, ni la presencia de expresión de *CHD7,* en tejidos afectados pero no asociados con el fenotipo CHARGE. Esto también explicaría la presencia de parches, o acumulación de células senescentes o con actividad SA-β-Gal positiva como los macrófagos, en lugares donde no se observa senescencia embrionaria en los individuos WT (Fig. 41, 47 y 48). Estos defectos estarían asociados a la contribución materna y cigótica.

Esto no solo podría estar añadiendo una nueva afección en la lista de patologías del síndrome, sino también la relación entre el gen *chd7* y la regeneración tisular a través de la inhibición de *p53* y la entrada en senescencia celular. La observación de la senescencia en los embriones operando de una manera regenerativa podría contribuir a la hipótesis del papel fisiológico de *chd7* en los adultos durante la reparación tisular y en los procesos de regeneración (Demaria *et al.*, 2014, Yun *et al.*, 2015; Da Silva-Álvarez *et al.*, 2020a). También nos ofrece nuevas vías al considerar la contribución de la dosis de *chd7* en la senescencia celular y su posible implicación en la señalización y reparación de tejidos aberrantes como uno de los pilares del cáncer.

Las células senescentes embrionarias se mantienen así como las capacidades regenerativas de los peces mutantes heterocigotos *chd7*-CRISPR (Fig. 39). Si las células senescentes son las únicas que mantuvieran los niveles de *chd7* para su expresión, el resto del tejido debería de ser activado de alguna forma para entrar en senescencia mediante estas células, a través de la activación de *chd7*. Ese estímulo podría ser la activación de la senescencia celular por parte de *p53*.

La activación materna parece importante para la capacidad senescente embrionaria, la carga determina la expresión de *chd7* en las células y la capacidad de producir senescencia. El efecto materno-cigótico del desarrollo en el mantenimiento de esa capacidad, se puede ver afectado en los mutantes por los efectos de la proteína defectuosa activando pero no inhibiendo, y los efectos de la GCR.

La etapa cigótica, sin embargo, determina la diferenciación, apoptosis o proliferación de la célula, pero también el mantenimiento de la senescencia a través de la diploidía y la haploidia. En humanos parece que esto también es así, ya que no se han reportado casos de pacientes con síndrome de CHARGE y problemas en la regeneración de tejidos, manteniendo la función cigótica en haploidía, aunque con posibles alteraciones debido a las mutaciones *nonsense* y *frameshift*. Tampoco hay ningún estudio que relacione a estos pacientes con problemas relacionados con el cáncer y la senescencia celular, siendo este un activador necesario en líneas tumorales.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

7. EL GEN *CHD7* EN LA IMPRONTA DE LOS VERTEBRADOS

Al contrario que en pez cebra, en humanos se han descrito muchos mecanismos de impronta genética, y sobre su relevancia en la evolución y desarrollo. La relación de *chd7* con la contribución materna, y su más que evidente papel epigenético, nos llevan a pensar a que en humanos, el papel de CHD7, en humanos, podría ser el de improntar en el genoma las instrucciones para el correcto desarrollo del programa de senescencia embrionaria de forma materna. Las proteínas de los padres, podrían estar marcando las células que deben desenvolver correctamente esas instituciones, y controlar todo ese proceso durante su ejecución, como un capataz en una obra, o un abuelo en una valla.

Si *chd7* es necesario para la activación de p53 en líneas tumorales, puede que también sea necesario para activar la senescencia embrionaria. Los embriones mutantes homocigotos para *chd7*-CRISPR presentan actividad SA-β-Gal en los mismos tejidos que los embriones WT. Aunque la presencia de senescencia en embriones homocigotos, con deficiencia total de CHD7, podría estar explicado por los efectos de la contribución materna, o compensatorios del pez cebra, que no hubiera tantas evidencias de órganos sin senescencia embrionaria, nos hacía cuestionarnos mucho que *chd7* fuera un activador imprescindible de la senescencia embrionaria y celular. Esto nos lleva a revisar la hipótesis, y realizar una mejor comprensión de la relación entre *chd7* y senescencia.

1. Por un lado, se ha vinculado mucho con la senescencia embrionaria por la relación que tiene con p21, y la multitud de correlaciones que hay entre las afecciones y el programa de senescencia embrionaria.
2. Por otro lado, *chd7* se relaciona con la senescencia celular por su estrecha relación que tiene con p53. Sin embargo, en la deficiencia, aumenta los niveles, pero si esta ausente, no se puede activar el programa de senescencia celular.

Estas relaciones en principio pueden ser contradictorias, pero estas vías están todavía por explorar, y la relación entre senescencia patológica y fisiológica aún no es tan clara. En este sentido, el déficit *chd7* puede estar actuando como una patología dentro de la senescencia fisiológica, o como una respuesta de senescencia patológica que afecta a la fisiología y desarrollo embrionario. El efecto materno se refiere al fenómeno genético en el que un fenotipo en la progenie esta causado por una mutación genética en el genoma materno en lugar de una mutación propia. Los genes de efecto materno generalmente están involucrados en la transición materno-cigótica durante el desarrollo embrionario antes de que se activen los genes cigóticos (Bachvarova y Moy, 1985; Christians *et al*., 2000; Tong *et al*., 2000; Wu *et al*., 2003). La impronta genómica es un fenómeno epigenético exclusivo de los mamíferos euterios, marsupiales y plantas (Feil y Berger, 2007; Jullien y Berger, 2009; Renfree *et al.*, 2009; Law y Jacobsen, 2010). Una característica de la impronta es la expresión específica del origen parental de los genes improntados (Graham, 1974; Surani y Barton, 1983). El gen *Zfp57* de ratón, es el primer ejemplo de un gen de efecto materno-cigótico de mamíferos (Li *et al*., 2008) y exhibe letalidad embrionaria materno-cigótica alrededor de la mitad de la gestación cuando las funciones, maternas y cigóticas, de *Zfp57* están ausentes. La pérdida de *Zfp57* da como resultado la pérdida de múltiples regiones improntadas en el DNA (Li *et al*., 2008).

USC UNIVERSIDADE DE COMPOSTELA

7.1. El síndrome de CHARGE es una enfermedad epigenética compleja

El estudio de las enfermedades genéticas se ha dividido en formas:

1. Enfermedades monogénicas - Raras
2. Trastornos complejos poligénicos - Más comunes

.

La evidencia actual sugiere que estos grupos se superponenf más de lo que se pensaba anteriormente, ya que la variación genética presente en el genoma resalta la complejidad que subyace a la presentación fenotípica (Claussnitzer *et al.*, 2020). Existen variantes raras en genes individuales que provocan formas monogénicas de enfermedades complejas (Vuckovic *et al.*, 2020; Muse *et al.*, 2021) así como variantes comunes que provocan la gravedad de la enfermedad monogénica (Niemi *et al.*, 2018; Goodrich *et al.* al., 2021). Esta gran complejidad hace que la investigación de las relaciones genotipo-fenotipo sea más complicada, lo que se ve exacerbado por asociación de variantes erróneas debido a problemas en el diseño del estudio (Wright *et al.*, 2019). Las variantes deletéreas no debería ser más frecuentes en la población que la enfermedad que causan (Minikel *et al.*, 2016).

Al igual que en el síndrome de CHARGE y las mutaciones en *CHD7*, en otras enfermedades raras, una misma variante genética puede afectar de formas muy distintas a la enfermedad en diferentes personas, desde ser asintomáticas hasta presentarse gravemente afectada, incluso entre miembros de la misma familia (Mahat *et al.*, 2021). La penetrancia de un gen se define como la proporción de individuos que poseen un genotipo particular y exhiben los síntomas clínicos esperados (Cooper *et al.*, 2013; Shawky, 2014), cuando todas las personas con el genotipo presentan síntomas a una edad determinada, se dice que la penetrancia es completa, si esta proporción es menor, se dice que la penetrancia es incompleta. Los genotipos también pueden mostrar una expresividad variable, donde la severidad del fenotipo causado por el genotipo puede variar entre los individuos afectados (Shawky, 2014). Esto difiere de la pleiotropía, donde diferentes variantes en el mismo gen pueden causar diferentes fenotipos potencialmente no relacionados que incluso pueden clasificarse como enfermedades diferentes (Ittisoponpisan *et al.*, 2017).

La realidad biológica de estos tres conceptos distintos es que sus efectos a menudo se superponen. Múltiples fenotipos distintos, en conjunto, podrían clasificarse como un único fenotipo más grave o diferentes subtipos de enfermedades. Es probable que estos sean causados por mecanismos superpuestos o similares, dependiendo del contexto genético y epigenético individual (Gruber y Bogunovic, 2020).

7.1.1. El Gen *CHD7* Es un Factor Epigenético.

La búsqueda de un fenotipo claro, todavía se complica más si hablamos de cuestiones epigenéticas. Muchos de los fenotipos repetidos observados presentaban distinto genotipo, incluso genotipo WT en algún caso. Sin embargo, estos fenotipos también fueron observados en morfantes en nuestro laboratorio. Las personas con síndrome de CHARGE no se reproducen, por lo que en el caso de nuestro modelo ya no estamos hablando solo de una enfermedad con herencia genética, sino que también podríamos hablar de una herencia epigenética. La misma variante genética de *CHD7* que se encuentra en diferentes individuos

USC UNIVERSIDADE DE COMPOSTELA

puede causar una variedad de fenotipos, desde un fenotipo no discernible o asintomático hasta una enfermedad grave, incluso entre individuos emparentados (Wen *et al.*, 2018). Dichas variantes muestran una penetrancia incompleta, un fenómeno binario en el que el genotipo causa o no el fenotipo clínico esperado. Además, muestran una expresividad variable, en la que el mismo genotipo puede causar una amplia variedad de síntomas a lo largo de un espectro. La penetrancia incompleta como la expresividad variable son causadas por una variedad de factores, que incluyen variantes comunes, variantes en regiones reguladoras, epigenética, factores ambientales y estilo de vida.

Actualmente, se han identificado miles de variantes genéticas causa de trastornos monogénicas, en su mayoría determinados a través de pequeños estudios clínicos y, por lo tanto, la penetrancia y la expresividad de estas variantes se ha sobreestimado en comparación con su efecto en la población general. Gracias a la llegada de los estudios de secuenciación masiva, la penetrancia y la expresividad de tales variantes genéticas se pueden investigar en poblaciones mucho más grandes (Stephanou *et al.*, 2019). Determinar cómo un genotipo causa un fenotipo es un paso fundamental hacia la comprensión de la patología de la enfermedad. La investigación de la penetrancia y la expresividad de tales variantes genéticas es también importante para la clasificación clínica, tanto para determinar los mecanismos causales de la enfermedad en la población afectada como para brindar información precisa sobre el riesgo a través del asesoramiento genético (Schacherer, 2016; Chong *et al.*, 2015; McDermott *et al.*, 2017; Kumar *et al.*, 2019; Crawford *et al.*, 2021).

Actualmente, la penetrancia de *CHD7* cada vez se considera más incompleta. Tanto la expresividad de *CHD7* como la penetrancia son muy variables (Balasubramanian *et al.*, 2014; van Ravenswaaij-Arts *et al.*, 2015; Moccia *et al.*, 2018; Goncalves *et al.*, 2019; Li *et al.*, 2020). Wen et al (2018) informaron de un paciente masculino con síndrome de Kallman con algunos síntomas solapados del síndrome CHARGE y que portaba una mutación en *CHD7*. En el análisis genealógico se encontró que la madre y el hermano menor del paciente tenían la misma mutación sin ningún síntoma clínico (Wen *et al.*, 2018). Como hemos explicado, son los pacientes con síndrome de CHARGE los que presentan unos patrones de expresión iguales, pero distintos a la población sana y marcas epigenéticas iguales y distintas a las de la población sana (Lalani *et al.*, 2006; Butcher *et al.*, 2017; Priest *et al.*, 2016; Miraoui *et al.*, 2014; Butcher *et al.*, 2017; Verhagen *et al.*, 2014), sin influir el gen causal de la enfermedad, ya que este no siempre se debe a las mutaciones en *CHD7*. Pero en nuestro modelo, las marcas epigenéticas podrían ser también transmitidas a la descendencia de nuestros peces cebra heterocigotos, incluso siendo estos de genotipo WT.

7.1.2. El Síndrome de CHARGE Es una Enfermedad Epigenética.

A pesar de que existe poca información sabe poco de la herencia epigenética en el pez cebra y los mecanismos de impronta genética para la regulación epigenética del embrión por parte de los padres, tal y como la conocemos evolutivamente aparecieron en mamíferos (Cooper *et al.*, 1971; Cattanach, 1986; Tilghman, 1999; McGrath y Solter, 1984; Surani *et al.*, 1984; Reik *et al.*, 2001), tanto la proteína CHD7 en humanos, como Chd7 en pez cebra, son enzimas remodeladoras de la cromatina, que actúa cambiando el paisaje epigenético, regulando la activación e inhibición de la expresión de los genes (Zentner *et al.*, 2010; Balow *et al.*, 2010; Patten *et al.*, 2012). Es lógico pensar, por lo tanto, que el déficit en esta proteína

USC UNIVERSIDADE DE COMPOSTELA

en el pez cebra, afectará a la configuración de este paisaje en el embrión en desarrollo. En este caso, las marcas epigenéticas que controlan los programas, tanto en el desarrollo embrionario como en el adulto heterocigoto, serían distintas a las de los WT, igual que ocurre en humanos. Los padres mutantes heterocigotos *chd7*-CRISPR podrían transmitir sus marcas epigenéticas a la descendencia, y en consecuencia la enfermedad sin ser portador de la mutación en ninguno de los alelos, y podría explicar la aparición de fenotipos CHARGE entre los embriones WT.

Los casos de síndrome de CHARGE se deben como hemos dicho a mutaciones *de novo* en su mayoría, y los pacientes que lo presentan, no son reproducibles por diferentes motivos (Layman *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2020; Cheng *et al.*, 2022). Los pocos casos que contradicen estos datos se deben a individuos con mosaicismo y una sintomatología muy leve de la enfermedad (Jongmans *et al.*, 2008; Pauli *et al.*, 2009). Tanto en humanos como en ratón la mutación resulta letal en recesividad. En el caso de los peces *chd7*-CRISPR se reproducen muy bien con peces WT, aunque con deficiencias para mantener el ritmo de la puesta, con baja mortalidad en el desarrollo temprano y pocos defectos. Sin embargo, el cruzamiento *incross* de heterocigotos CRISPR produce lo que se esperaría de un gen con efecto materno. La mortalidad del embrión aumenta independientemente del genotipo (Fig. 21), y hay una gran variabilidad fenotípica y una penetrancia incompleta (Fig. 22-33). Debido a la gran importancia de la contribución materna en el pez cebra, muchos de los fenotipos se rescatan, y el homocigoto muere a pesar de todo. Este rescate fenotípico y muerte del homocigoto, es semejante a la enfermedad humana.

El rescate del fenotipo en los humanos ocurre en dos sentidos:

1. El primero es por parte del cigoto en esa transición al efecto cigótico, que permite al individuo continuar el desarrollo a pesar de los problemas maternos asociados a su mutación. Los individuos con una mutación de *novo* no solo están recibiendo el material defectuoso en de su propia producción cigótica, sino también de la producción materna y paterna en la gónada que formo el gameto y que lo doto de una carga materna negativa en *CHD7* para la etapa materna y materno-cigótica. Los pacientes con fenotipo CHARGE que observamos son en su mayoría personas que han conseguido salvar el desarrollo gracias a tener una variante sana y no a pesar de ella como se pensaba.
2. El otro efecto de rescate se observa en la variabilidad fenotípica de los pacientes con mutaciones en el gen. No todas las mutaciones producen el mismo fenotipo, porque no todas producen la misma activación de la GCR. Esta como se explica más adelante, seguramente se active, pero sea gradual en función del PTC, la carga materna y los genes compensadores y parálogos dependientes de tejido para el gen, además de su copia sana. Esto podría producir un efecto de rescate dependiente de tejido. Es decir, que la compensación cigótica realmente es lo que salva a los pacientes, pero también puede ser la causa la enfermedad.

La expresión diferencial de alelos alternativos, provocada por el gen que contiene variantes causales, podría afectar a la presentación de rasgos fenotípicos en individuos con genotipos idénticos. Este mecanismo ha sido propuesto principalmente para condiciones de herencia

USC UNIVERSIDADE DE COMPOSTELA

dominante donde la haploinsuficiencia es la causa de la enfermedad (Ahluwalia *et al.*, 2009; Jordan *et al.*, 2019; Hesson *et al.*, 2015; Glazier *et al.*, 2019), El desequilibrio alélico podría causar una expresión más alta del alelo WT, compensando así la haploinsuficiencia y dando como resultado una penetrancia reducida, o una expresión más baja del alelo WT, exacerbando así la haploinsuficiencia y dando como resultado mayor penetrancia. Se ha observado un desequilibrio alélico significativo en hasta el 88 % de los genes en los tejidos humanos, posiblemente causado por modificadores genéticos o factores estocásticos (Aguet *et al*., 2017), y se ha identificado como específico de tejido y de todo el genoma en modelos de ratón (Pinter *et al.*, 2015). En este sentido, hay personas con mutaciones en genes para los que se creía una función importante o incluso imprescindibles para la vida humana, en los que se han encontrado lesiones graves, y ligeros mecanismos de compensación genética (Carelle-Calmels *et al.* 2009, Servetti *et al.* al., 2021). Algunas variantes estructurales, como las duplicaciones que están en trans con una variante patógena de LoF, pueden aliviar el fenotipo clínico potencial cuando la enfermedad estaría causada por una haploinsuficiencia, al proporcionar una copia WT adicional de un gen, lo que da como resultado un nivel normal de expresión génica (Carelle-Calmels *et al.*, 2009).

7.1.3. El Síndrome de CHARGE una Enfermedad Susceptible y *CHD7* un Gen Inmune.

La penetrancia del síndrome de CHARGE, sin embargo, hasta la fecha, en pacientes con variantes patogénicas *CHD7* sigue siendo casi del 100 %. Debido a que el 97 % de las mutaciones de *CHD7* son *de novo*, el síndrome de CHARGE generalmente ocurre como una nueva condición autosómica dominante, con expresividad variable y sin antecedentes familiares (Hale et al., 2016). En nuestro estudio de técnicas, además de otras cuestiones no reflejadas, queríamos comprobar como el tipo de técnica, a través del tipo de mutación que generase, graves o leves, afectaría a la recapitulación fenotípica positiva y negativamente.

1. Positiva a través de la lesión, las técnicas como CRISPR generan mutaciones más graves que producen proteínas con lesiones más importantes, mientras que las técnicas como ENU, producirían una menor homogeneidad fenotípica

2. Negativa a través de la GCR y la susceptibilidad del gen debida a la alta redundancia genética en el pez cebra, las lesiones influyen de forma inversa.

Por lo tanto, lo que se observa es un balance entre ambas cosas. Teniendo en cuenta que es el gen, dependiendo de su inmunidad/susceptibilidad a través de la mutación que genera un PTC susceptible a desencadenar una GCR, que depende del efecto materno-cigótico, de la contribución materna de la especie e individuo y de los parálogos del gen y el propio PTC o tipo de lesión, parece que la inmunidad/susceptibilidad del gen y la GCR que producen, ambas dependerían únicamente de los genes compensatorios, o lo que es decir es lo mismo.

En comparación con las variantes sinónimas, las variantes *missense* raras muestran una reducción significativa en la expresión alélica en muchos tejidos en proporción a su patogenicidad predicha, lo que sugiere que las variantes nocivas se reducen de los haplotipos altamente expresados (Castel *et al.*, 2018). Estas variantes probablemente no produzcan PTCs

USC UNIVERSIDADE DE COMPOSTELA

que activen los mecanismos de compensación. Se ha demostrado que algunos genes expresados de forma muy diferencial contienen menos variantes asociadas a enfermedades (Chen *et al.*, 2008), que es menos probable que se acumulen en haplotipos que están muy expresados o en combinaciones de alta penetrancia (Castel *et al.*, 2018). Los trastornos oculares monogénicos genéticamente heterogéneos muestran una penetrancia incompleta y una expresividad variable, además de una variabilidad significativa en los niveles de expresión génica en toda la población (Green *et al.*, 2020).

Tanto nuestros mutantes *chd7*-CRISPR como el resto de mutantes para *chd7* documentados (Liu *et al.*, 2018; Prykhozhij *et al.*, 2017; Cloney *et al.*, 2018; Jamadagni *et al.*, 2021; Sun *et al.*, 2022), presentan fenotipos muy expresivos aunque de penetrancia incompleta, pero el mutante *pdgfrb* del estudio de técnicas presenta una expresividad incompleta y una penetrancia completa (Kok *et al.*, 2015; Ando *et al.*, 2021). Esto probablemente se deba a esta redundancia genética y la especificación de tejido, donde el papel de *pdgfrb* es sustituido por otra proteína (Ando *et al.*, 2021), pero su función no esta tan alejada como lo puede estar *chd7* y *chd8*, de esta forma la compensación en ciertos tejidos no se ve tan afectada como en otros, y explicaría que con *chd7* no se vea un efecto compensatorio. Esto además refleja la importancia de la contribución materna gradual negativa y positiva en cuanto a la recapitulación del fenotipo para los genes maternos. Los mutantes para pdgfrb generados por ENU, no presentaban fenotipo hasta los 5 dpf y los WT no mostraban fenotipo. Nuestros mutantes *chd7*-CRISPR como sus hermanos WT muestran fenotipos causados por la descompensación materna y materno-cigótica.

Estas cuestiones de cómo afectan las mutaciones a la recapitulación fenotípica también tienen una implicación, por tanto, al desarrollo de la patología humana. Nuestras dos hipótesis han sido también descubiertas en modelos de mamíferos y en humanos para muchos genes que producen enfermedades, entre las que se encuentra el síndrome de CHARGE (Bosman *et al.*, 2005; Hwang *et al.*, 2011; Gage *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2020; Abrahams *et al.*, 2021). De esta forma tiene sentido que estos mecanismos de compensación también existan en mamíferos y fueran muy parecidos en humanos a través de las mismas rutas entre las que también podría estar *CHD7* y su importancia en estos puntos de control y entradas y salidas de la senescencia celular para la regulación de la transcripción genética. Se ha observado que CHD7 se une y forma complejos con muchas de las proteínas que actúan en el mecanismo de respuesta al NMD como WDR5 (Yan, 2020), y también la activación de esta vía en células humanas transfectadas con CHD7 mutante (Villate *et al.*, 2018; Nie *et al.*, 2022). Sin embargo, estudios recientes revelan una variación temporal y espacial de la activación de la compensación por PTCs en animales, y sugieren que la lectura completa de los codones de terminación puede ser un mecanismo de rescate potencial para las transcripciones que albergan PTC cuando se inhibe la vía de vigilancia de NMD (Chen *et al.*, 2022).

7.2. El efecto de la contribución materna de *CHD7* en el síndrome de CHARGE

En humanos y ratón, los heterocigotos, con un único alelo sano, no son capaces de producir la carga suficiente de *CHD7* para el desarrollo normal. Los mutantes heterocigotos, sin embargo, tendrían siempre función cigótica. Los homocigotos pierden la función cigótica, y solo podrían tener función materna.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

La contribución materna puede explicar la aparición de los homocigotos en pez cebra, y la alta mortalidad del homocigoto, con o sin necesidad de la GCR, a través de:

1. Los efectos dependientes de la dosis del gen *chd7*

2. El efecto materno-cigótico del gen *chd7*

Es aquí donde *CHD7* y su relación con *p53*, podrían tener un efecto materno también en mamíferos. La pérdida de la función cigótica implica una pérdida total de la carga en *CHD7*. Los embriones homocigotos en *CHD7* podrían ser mutantes maternos y conservar parte de la carga en *CHD7,* lo que se traduciría en una compensación fenotípica en el caso de una función únicamente cigótica, o la muerte en el caso de una función materno-cigótica. En el caso de que no la tuvieran, en los mutantes homocigotos materno-cigóticos, algunos de los defectos observados debido a la ausencia total de expresión de *chd7* se podrían revertir si se produjera algún evento compensatorio que rescate el fenotipo, como la reducción de *p53*.

Pero si la función materna de *CHD7* en humanos no es importante, los embriones homocigotos cigóticos, aparte de letales, y sin sistemas de GCR identificados, al perderse la función cigótica totalmente, sin Chd7 que esté previamente en esas células para "activar-inhibiendo" las vías de la senescencia celular e implicarles su destino, las rutas de senescencia celular durante la senescencia embrionaria no deberían activarse, y la compensación de los embriones mediada por un déficit en *p53* no tendría sentido.

Por lo tanto, la contribución materna de *CHD7* en los vertebrados podría estar en transmitir a la descendencia mediante la impronta genética, ese linaje de células que van a dirigirse a un lugar determinado en el desarrollo y a entrar tanto en senescencia como seguramente en apoptosis, para remodelar y los tejidos.

7.2.1. Los Efectos del síndrome CHARGE Se Deben a la Desregulación del Efecto Materno-Cigótico de *CHD7* y la Activación de la Senescencia a Través de la Impronta.

Este último resultado puede verse como que *chd7* activa la senescencia a través de la inhibición de p53. En ese caso podría estar inhibiendo p53, y aumentar la senescencia embrionaria, al aumentar p53. Entonces estarían activadas las dos rutas que se conocen para la activación de estos genes, y explica la no bajada de los niveles de p27, con el rescate de morfolinos, no asociados a *chd7*. Puede que el estímulo para la activación de la senescencia embrionaria sea p16 después de todo.

La subida de los niveles de *cdkn2a/b* comienza a las 144 hpf en los WT, y en pez cebra p15 y p16 se generan de ese mismo transcrito. Los niveles de este gen, sin embargo, son detectables horas antes, pudiendo haber una activación cigótica del gen marca el inicio de la senescencia embrionaria a través de la producción de p16, pero no de p15. A medida que aumenta la expresión *cdkn2a/b* comenzaría a aumentar la producción de p15 y la entrada en senescencia embrionaria en los tejidos.

De esta forma se explicaría que en todas las células programadas para que expresen *chd7* y activar el programa de senescencia embrionaria se sobreactiven los niveles de expresión de senescencia celular con la deficiencia en *chd7*. Las subidas y bajadas en la expresión de *chd7*

USC UNIVERSIDADE DE COMPOSTELA

marcan los cambios, paradas e inicios de las actividades de *chd7*, sobre la inhibición de la senescencia celular. Si hay suficiente *chd7* sano en la etapa materna, pero la proteína es defectuosa en la cigótica, habría problemas únicamente en aquellos tejidos que expresan *chd7,* por no cumplir su función o por un dejaste de la dosis.

Sabemos que *chd7* se expresa a niveles más altos mucho antes que la aparición de senescencia en los tejidos descritos, y parece que la contribución del producto materno en pez cebra es muy grande. En mamíferos, podría no serlo.

Si la contribución no fuera importante, los embriones heterocigotos se desarrollarían únicamente con el producto cigótico y serían ellos los que marcarían las células con chd7, para activar la senescencia celular. La pérdida de un único alelo, desencadenaría el aumento en la expresión de *p53*, por la pérdida de función de *chd7*. Los efectos observados en el desarrollo del síndrome de CHARGE serían únicamente efectos cigóticos en el desarrollo, ya que la etapa materna se supliría.

Sin embargo, la deficiencia de la expresión cigótica del gen no explica muchos de los efectos observados por un desajuste en la senescencia embrionaria, antes de la activación de la senescencia embrionaria. Esto se explicaría solo si la deficiencia en la carga de la proteína materna en la activación de las células “presenescentes” y la pérdida de función cigótica, que causa desajustes en los niveles de expresión de *chd7* necesarios para llevar a cabo sus programas. En cualquier caso, estos programas del desarrollo en mamíferos parecen estar marcados por la madre a través de la impronta y no de la carga en mRNA, como en pez cebra, por lo que CHD7 como factor epigenético podría ser la contribución materna de la madre.

Sin esa contribución materna previa, *chd7* no se podrían marcar las células para esa activación de la senescencia celular y la apoptosis, y no se observaría senescencia embrionaria en el homocigoto materno-cigótico, ni aumentos de la expresión de *p53*. Pero debido a la importancia del efecto materno, seguramente los embriones con pérdida total de la función materna de *chd7*, no sean viables.

Esto daría mucha importancia a la contribución materna en humanos y el marcaje de esas células para su destino senescente y el desarrollo de la enfermedad. El papel materno-cigótico de CHD7 parece estar muy conservado en los vertebrados para controlar el proceso de la senescencia embrionaria. Pero falta saber si en los humanos con pérdida de función y activación materna de *CHD7*, la senescencia juega a favor o en contra. Pero eso solo nos lo puede decir la actividad de la proteína, la presencia de PTCs, y sus papeles compensatorios.

7.3. CHD7-CHD8 HERMANOS SIAMESES

En humanos no parece que no sería tan posible la pérdida de la función materna, ya que las mutaciones son mutaciones *de novo*, aunque a veces están en la las gónadas y no solo en los gametos (Mohiuddin *et al.*, 2022, Pauli *et al.*, 2012). Por lo que un humano, con el gen *CHD7* mutado, podría compensar parte del desarrollo embrionario gracias a la contribución materna, y cuando el gen es necesario en la etapa cigótica, la falta en este, esté compensada por el efecto cigótico de la GCR.

En los ratones mutantes homocigotos para *Chd7*, aunque mueren, también se agrava el fenotipo, y la mutación en heterocigosis del gen *p53*, los rescata levemente. Si existiera esa respuesta compensatoria para *CHD7* u otro gen, los mutantes maternos humanos se comportarían como los mutantes homocigotos, y la mutación en heterocigosis podría ser

USC UNIVERSIDADE DE COMPOSTELA

también letal y el mutante homocigoto en algunas condiciones sería viable. Si el mutante cigótico consigue compensar la carga materna y la cigótica con otro gen como *CHD8* durante esa transición materno-cigótica, causaría solo un leve retraso y seguramente locales.

Chd8 interactúa con Chd7. En un experimento doble híbrido de levadura, la mutación *missense* inducida en el gen *Chd7,* provocó una interrupción de la interacción Chd7-Chd8. Sin embargo, esto no se observó en otro experimento de coinmunoprecipitación (Batsukh *et al.*, 2010). Esto muestra que esta interacción podría ser tanto directa como indirecta. Estos autores plantearon la hipótesis de que la interrupción de la interacción Chd7-Chd8 podría ser un mecanismo implicado en el síndrome CHARGE. Sin embargo, esta interacción no dejaría de ocurrir en un individuo heterocigoto.

Los ratones que carecen de Chd8 mueren por apoptosis masiva en E7.5 (Nishiyama *et al.*, 2004). La sobreexpresión de Chd8 induce la apoptosis in vitro con regulación positiva de los genes diana p53. Se demostró que Chd8 forma un complejo con p53 y la histona H1 en el promotor de los genes diana de p53 para inhibir su transcripción (Nishiyama *et al.*, 2009). El doble mutante Chd8-/- p53-/- muere en el estadio E10.5, mientras que el homocigoto para Chd8 muere en E7.5, debido a hemorragias graves (Nishiyama *et al.*, 2009), lo que destaca las funciones de Chd8 en el sistema cardiovascular (Shanks *et al.*, 2012).

La relación entre CHD7 y CHD8 parece muy grande como para que estos dos no estuvieran interactuando. En estas condiciones serían posibles los mamíferos mutantes homocigotos para *CHD7*, pero sin fenotipo o fenotipo leve, que pasaran desapercibidos. Podrían ser fértiles o no, debido al fenotipo leve. Si lo fueran, pasarían a su descendencia la mutación en heterocigosis, lo que la haría visible, pero podría pasar su impronta para la activación de *CHD8*, no hay ninguna prueba de esto. Los mutantes homocigotos mueren a edades similares, en lo que podría ser la entrada de la función cigótica del gen *chd7* en pez cebra y la activación de la senescencia embrionaria, sugiriendo que la contribución materna podría ser compensada parcialmente entre ambos, pero no la función cigótica completa.

7.3.1 *l*a Deficiencia en *CHD7* Produce Retrasos en el Encendido y Apagado del Programa de Senescencia

Debido a la divergencia evolutiva entre los eventos de duplicación de los genes *chd8* y *chd7*, en peces cebra y humanos y el de la mayoría de genes parálogos duplicados en el genoma y susceptibles de activar una GCR reportados en otros artículos, probablemente el sistema de la GCR de la familia de genes *chd* en peces y CHD en humanos, al ser más antiguo sea menos propenso a la activación lo que causaría el descenso de la homocigosidad en nuestro modelo y en el ser humano, coincidiendo con los datos observados de nuestro modelo y la alta letalidad humana.

El gen *chd7* es uno de estos genes que se ha sufrido varios eventos de duplicación en el genoma y proceden de procesos moleculares más antiguos, pero los mecanismos de regulación epigenética los ayuda a activarse de forma tejido específica y temporal, y de esa forma han establecido nuevos programas mediante la interacción con otras distintas proteínas y genes en momentos específicos, para el complejo desarrollo de los vertebrados.

La activación de los programas de recompensa podría inducir la producción de homodímeros de la proteína CHD8 o heterodímeros de CHD7-CHD8 en el caso de que hubiese producto materno. Esto podría producir un retraso de las rutas, por una mala

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

activación al no formarse el complejo proteico exacto con el resto de proteínas con las que interactúan en los programas.

Aunque no tenemos pruebas en el pez cebra, estos heterodímeros de CHD7-CHD8 se forman en condiciones normales e influyen en los niveles de expresión, por lo que la deficiencia podría afectar a la cantidad de eventos de formación de estos heterodímeros y los homodímeros CHD7-CHD7 (Batsukh *et al.*, 2010).

Esto podría provocar los retrasos observados entre los mutantes heterocigotos de los cruzamientos *outcross* y sus hermanos WT, donde no se seleccionó por fenotipo y se siguió el tiempo de desarrollo desde la fertilización. Además, también da más influencia a la carga y contribución materna de estos genes, donde podrían tener un papel también clave para la activación de los sistemas de recompensa por GCR. Lo que daría una explicación más, aparte del retraso en desarrollo debido a paradas en la MBT.

7.3.2. La Deficiencia en *CHD7* Produce Alteraciones en la Expresión de *SOX9* Asociadas a Malformaciones del Fenotipo CHARGE en la Etapa Materno-Cigótica y Cigótica del Desarrollo.

La relación entre *CHD7* y *SOX9* es muy íntima durante el desarrollo embrionario. Diferentes miembros de la familia SOX están regulados por CHD7, entre los que se incluye *SOX2* en células madre neurales (Engelen *et al.*, 2011), y *SOX9* y *SOX10* en células de la cresta neural (Bajpai *et al.*, 2010; Asad *et al.*, 2016; Fujita *et al.*, 2016). La inyección de *sox10*-MO en pez cebra rescata levemente el fenotipo en morfantes para *chd7*, indicando una actividad represora del mismo, sin embargo, en algunos momentos del desarrollo podría ser activadora. Estudios de expresión de todo el genoma en sistemas modelo han sugerido que CHD7 puede funcionar como activador o represor de la transcripción génica (Schulz *et al.*, 2014b). En las células de la cresta neural humanas, CHD7 se asocia con PBAF y ambos remodeladores ocupan un potenciador de SOX9. En los embriones de *Xenopus*, el *knockdown* de *Chd7* o la sobreexpresión de una forma catalíticamente inactiva recapitula todas las características principales del síndrome de CHARGE. El gen *Chd7* es esencial para la activación del circuito transcripcional de las células de la cresta neural, incluidos *Sox9*, *Twist* y *Slug*. La inducción de cresta neural precisa de la activación de una red reguladora de genes que incluye los genes especificadores *SOX9* y *SOX10* (Asad *et al.*, 2016; Fujita *et al.*, 2016). Las células de la cresta neural son una población de células migratorias pluripotentes que surgen del borde de la placa neural durante la embriogénesis temprana, y dan lugar a estructuras neurales, esqueléticas, dérmicas, nervios cardíacos, nervio craneal, y células pigmentosas. En pez cebra *sox9a* y *sox9b* regulan la condrogénesis en la cabeza (Yan *et al.*, 2005). Estos genes regulan procesos como la migración y la diferenciación de las células de la cresta neural (Pauli *et al.*, 2017, Okuno *et al.*, 2017). Entre las patologías del síndrome de CHARGE se han incluido recientemente los defectos asociados a una migración defectuosa de las células de la cresta neural (Okuno *et al.*, 2017), incluyendo al síndrome CHARGE en el grupo de enfermedades neurocristopáticas. Estas observaciones confirman nuestras hipótesis acerca de los mutantes *chd7*-CRISPR. Muchos de los defectos, asociados al fenotipo CHARGE, se deben a anomalías en la migración de las células antes de ocurrir el proceso de migración y proliferación celular y, por tanto, de senescencia embrionaria.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

La migración de estas células comienza a las 13 hpf en el pez cebra (8.5 en ratones), anteriores al período únicamente cigótico del gen *chd7* y al rescate fenotípico con la disminución de p53 en ratón y pez cebra (Fig. Sup. 2) de la etapa materna. Los defectos en otros tejidos podrían estar asociados también a una mala señalización por parte de la cresta neural, de forma no autónoma de *chd7*, como ha sido observado previamente (Corsten-Janssen, y Scambler, 2017). La asociación de *SOX9* con la diferenciación y especificación de tejidos, también puede estar indicando errores en esos procesos del desarrollo, que conducirían a malformaciones en los tejidos en los que se coexpresa con *CHD7* por fallos en el establecimiento de la senescencia embrionaria.

7.3.3. El Tipo de Mutación También Afecta al Síndrome de CHARGE

En 2020 se realizó un estudio sobre la interacción proteína-proteína al incubar CHD7 recombinante humano en una array de proteínas, y se encontró que CHD7 interactúa directamente con varias proteínas mutadas que causan trastornos del desarrollo, incluida WDR5, componente central de los complejos de metiltransferasa H3K4 (Yan, 2020). Esta interacción sugiere que CHD7 puede reclutar enzimas modificadoras de histonas independientemente de sus funciones de remodelación. Además, se generó un modelo de ratón heterocigoto, deficiente en ATPasa, y se demostró que el mutante *CHD7* conserva la capacidad de reclutar actividad de metiltransferasa H3K4 (Yan, 2020).

Sin embargo, los autores aclaraban que: “Es importante destacar que nuestros datos sugieren que los pacientes que portan mutaciones *nonsense* versus mutaciones *missense* probablemente mostrarán diferentes alteraciones moleculares; por lo tanto, estos pacientes podrían requerir intervenciones terapéuticas personalizadas” (Yan, 2020).

Este estudio demuestra la importancia de las mutaciones y cómo, en algunas condiciones, la variante mutante de la proteína también podría unirse a regiones de la cromatina y actuar de una manera u otra, causando diversidad fenotípica entre los pacientes con mutaciones en *CHD7*, así como también la interacción de la proteína con muchas otras, lo cual podría producir una recapitulación fenotípica para el síndrome de CHARGE.

En este estudio se encontró que una mutación puntual en el gen *CHD7* en heterocigosis es suficiente para provocar defectos graves del desarrollo y letalidad en mamíferos (Yan, 2020). Sin embargo, en el pez cebra, esta misma mutación no tiene el mismo efecto debido al efecto materno de la activación cigótica y a la contribución materna importante que el pez cebra aporta al embrión durante su desarrollo.

En mamíferos, una mutación leve en una copia del gen CHD7 es suficiente para causar la muerte o afectar gravemente el desarrollo. Como se señaló en el estudio de recapitulación fenotípica presentado en esta tesis, hay algunos genes que son más propensos a recapitular el fenotipo que otros, y el gen *CHD7* es particularmente susceptible a esto. Sin embargo, el pez cebra, debido a la carga materna, es inmune en heterocigosis, pero se ve afectado en homocigosis. En mamíferos, probablemente la carga materna no es capaz de compensar la deficiencia de un alelo susceptible y siempre se observa homogeneidad fenotípica. Sin embargo, los datos de penetrancia de *CHD7* cada vez son más bajos (Balasubramanian et al., 2014; Gonçalves et al., 2019) y el aumento de la variabilidad en la expresividad hace cuestionar la inexistencia de compensación materna también en humanos.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

7.3.4. La Redundancia Genética y Funcional Afectan al Síndrome de CHARGE

La letalidad de la homocigosis para *CHD7* se adelanta en los mamíferos en comparación con el pez cebra, pero para ambos coincide que empieza el fin de la fase proliferativa y el establecimiento de la senescencia embrionaria en esos tejidos (Fig. Sup. 2). Igual que los resultados para *chd7* presentados en esta tesis, otros modelos morfantes y mutantes para *chd7* (Bajpai *et al*., 2010; Schulz *et al*., 2014b; Asad *et al*., 2016; Liu *et al*., 2019; Liu *et al*., 2018; Prykhozhij *et al*., 2017; Cloney *et al*., 2018; Jamadagni *et al*., 2021; Sun *et al*., 2022), sugieren que la contribución materna podría proporcionar un rescate genético en el pez cebra para los heterocigotos. Sin embargo, debido a su función materno-cigótica, esto implica la muerte del homocigoto (Wagner *et al*., 2004). A pesar de esto, y como se ha propuesto en esta tesis, la activación de la GCR o la mayor capacidad de rescate por la contribución materna gradual podrían explicar la supervivencia de algunos individuos homocigotos. En humanos, también podría ocurrir eventos de activación de la GCR, especialmente en mutaciones que produzcan PTC (Rouf *et al*., 2022). En un estudio publicado por Wagner *et al*., en 2004, se analizaron más de 300 genomas mutagenizados y se encontró que no se identificaron mutantes materno-cigóticos en homocigosis para ningún gen. En cambio, se encontraron 47 mutantes con efecto materno y cinco con efecto paterno que manifestaban sus fenotipos en el momento o después de la activación del genoma cigótico (Wagner, *et al*., 2004). Esto sugiere que la función cigótica es esencial para la mayoría de los genes expresados de forma materna y cigótica, lo que impide la supervivencia de individuos mutantes homocigóticos hasta la edad adulta.

En el genoma humano, existe un cierto nivel de redundancia genética, similar al observado en el pez cebra, y mecanismos de compensación genética como el NMD y la GCR. Como hemos mencionado, CHD7 interactúa con CHD8 para construir un componente central de un complejo con función similar a kismet (Batsukh et al., 2010). Se ha demostrado la cooperación necesaria de este complejo para la supervivencia y diferenciación de los oligodendrocitos (Marie et al., 2018). Los demás miembros de la familia CHD también podrían ser candidatos a la compensación. La única proteína kismet en Drosophila cumple la función de 4 proteínas humanas CHD6-CHD9 (Batsukh *et al*., 2010). También se han observado combinaciones similares de dos miembros del mismo subgrupo de CHD para formar un complejo entre CHD3 y CHD4 (Hall y Georgel, 2007). Por lo tanto, no podemos descartar la posibilidad de que otros miembros de la familia CHD del subgrupo III (CHD6, CHD8 y CHD9) puedan unirse entre sí y compensar parcialmente la función de CHD7.

El gen *ZEB2* mutado en los síndromes de Mowat-Wilson (Birkhoff *et al.*, 2021), podría compensar la deficiencia en *CHD7* (Sun *et al.*, 2022). Como CHD7, ZEB2 también regula la formación de las células de la cresta neural y puede unirse a proteínas SMAD (Birkhoff *et al.*, 2021; Lettieri *et al*., 2021). En pez cebra, el gen *zeb2* es uno de los genes diana aguas abajo de *chd7* (He *et al*., 2016). Lo que ha llevado a sugier a *zeb2* como gen candidato a participar en la compensación por la deficiencia de *chd7* (Sun *et al*., 2022). El gen *SOX2*, mutado en los síndromes de Alagille, Pallister-Hall y Feingold, regula regiones solapadas en las células madre neurales, lo que resulta en una expresión incorrecta de estos genes en ratones *knockout* para *Chd7*. A pesar de que SOX2 presenta un menor número de sitios de unión genómica que CHD7, este se ha propuesto también como candidato terapéutico para compensar parcialmente los defectos causados por la deficiencia en *CHD7* (Lettieri *et al*., 2021).

USC UNIVERSIDADE DE COMPOSTELA

En esta tesis, se plantea la posibilidad de que el gen *SOX9* también juegue un papel importante en la compensación parcial y recuperación del fenotipo de algunos mutantes para *CHD7*. Esta compensación sería específica de tejido, como ocurre con otros genes cigóticos. Los tejidos que expresan *sox9b* en el pez cebra son la mayoría de los tejidos afectados y muchos derivan de las células de la cresta neural, por lo que no se pueden descartar efectos no autónomos adicionales. La importancia del gen *CHD7* en la contribución materna del síndrome de CHARGE podría extenderse más allá de su función específica como gen materno, si este también es un gen cigótico, y teniendo una interacción tan amplia con otros factores epigenéticos y de transcripción. Muchos factores maternos del óvulo persisten en el embrión y son necesarios para iniciar la transcripción cigótica, pero también tienen un papel más allá de esta etapa, en la que también se pueden transcribir e interactuar con los productos de la expresión cigótica durante el desarrollo embrionario (Wagner *et al.*, 2004).

También se ha demostrado que el síndrome de CHARGE comparte algunos fenotipos que se superponen con otras enfermedades congénitas como los síndromes de Kabuki, DiGeorge, Alagille, Pallister-Hall, Feingold (Lettieri *et al.*, 2021). Se ha sugerido que *KMT2D*, el gen mutado en el síndrome de Kabuki, funciona en la misma maquinaria de modificación de la cromatina (Schulz *et al.*, 2014a). Además, se informó que las firmas de metilación del DNA *CHD7* LoF y *KMT2D* LoF comparten objetivos CpG comunes, específicamente dentro de *HOXA5* y *SLITRK5* (Butcher *et al.*, 2017), lo que hace más evidente las funciones superpuestas entre *CHD7* y *KMT2D* y que estos pueden compensarse entre sí o provocar fenotipos similares. En células sanguíneas humanas se han encontrado firmas de metilación en el DNA, para la regulación específica de la transcripción de genes, por parte de *CHD7* y *KMT2D*. Los síndromes de CHARGE y Kabuki son el resultado de la desregulación de genes involucrados en el desarrollo embrionario, y muchos se expresan de una manera específica de tejido. Estos resultados demuestran que las características fenotípicas del síndrome CHARGE se superponen con muchos otros síndromes raros de un solo gen. Además, implican una patología molecular compartida que interrumpe la regulación epigenética del desarrollo de múltiples órganos (Moccia *et al.*, 2018).

La superposición fenotípica es un hallazgo común en las enfermedades que resultan de tales defectos, y se postula que la superposición mecánica podría ser la base de tal similitud fenotípica (Schulz *et al.*, 2014a; Butcher *et al.*, 2017; Buphamalai *et al*., 2021; Kolobkov *et al.*, 2022). Esto se reconoce además al señalar que todas las proteínas asociadas con estas condiciones regulan el epigenoma a través de interacciones complejas entre sí, y muchas veces estas interacciones son específicas de tejidos concretos. Los estudios futuros en sistemas modelo de desarrollo, además de las células madre pluripotentes inducidas de humano, ayudarán a mejorar nuestra comprensión de la regulación epigenética en diversos tipos de células, incluidas las células neuronales. La identificación de una multitud de objetivos específicos de genes en todo el genoma brinda oportunidades tangibles para explorar nuevas terapias para revertir los déficits del desarrollo causados por la desregulación epigenética. Las mutaciones específicas en las proteínas epigenéticas son candidatos firmes a producir enfermedades en el desarrollo embrionario (Sánchez-Fernández *et al.*, 2020). Estos lectores, escritores, borradores y remodeladores de la cromatina están vinculadas a la variabilidad en el fenotipo clínico observado en sus trastornos asociados. Se sabe que las modificaciones de las histonas se superponen e interactúan con la metilación del DNA genómico para afectar la remodelación de

USC UNIVERSIDADE DE COMPOSTELA

la cromatina (Geiman y Robertson, 2002; Jongmans *et al.*, 2009; Miller; 2013; Moccia *et al.*, 2018). Es de esperar que las mutaciones en los genes que están involucrados en las modificaciones de las histonas como *CHD7* tengan un impacto dentro del metiloma del *DNA*.

El solapamiento fenotípico del síndrome de CHARE (Fig. 54) con otros síndromes como el síndrome de Kabuki, Alagille o el síndrome de Kalkmann probablemente no se deba a la mutación en el gen asociado al síndrome, sino a la desregulación de las rutas génicas (y por tanto, de los genes de esas rutas) en las que interviene el gen causal (Schulz *et al.*, 2014a; 2014b; Butcher *et al.*, 2017; Buphamalai *et al.*, 2021; Kolobkov *et al.*, 2022). Aproximadamente el 72 % de todas las enfermedades raras son de origen genético (Nguengang Wakap *et al.*, 2020), y se cree que la mayoría de ellas son de naturaleza monogénica (Haendel *et al.*, 2020), pero estas enfermedades llamadas monogénicas no son monogénicas, y cada vez se descubren más genes involucrados en pacientes, susceptibles de provocar el síndrome o fenotipos asociados (Singleton *et al.*, 2003; Lupski, 2007; Martin *et al.*, 2001, Lalani *et al.* 2004, Suspitsin *et al.*, 2020). Se sabe que estas variantes raras y dañinas causan miles de trastornos genéticos diferentes en humanos (Boycott *et al.*, 2017; Rahit y Tarailo-Graovac, 2020), y se ha descubierto la base molecular de más de 6000 enfermedades monogénicas (OMIM, 2022). Aunque individualmente son raras, juntas, las enfermedades monogénicas son comunes y afectan a 10 de cada 1000 nacimientos. Estas enfermedades se denominan monogénicas porque las lesiones de un gen específico son esenciales para la manifestación de la enfermedad. Sin embargo, las consecuencias fenotípicas de una mutación dada dependerán en diversos grados de otras variantes genéticas en el mismo u otros genes, cambios epigenéticos y factores ambientales. Así, las consecuencias fenotípicas de diferentes mutaciones en un gen dado pueden dar lugar a trastornos con características marcadamente diferentes (heterogeneidad alélica)

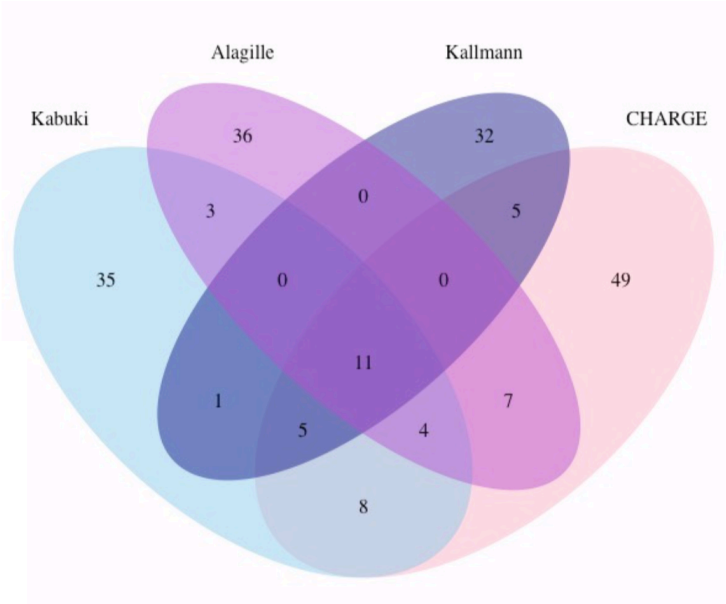


Figura 54. Superposición fenotípica entre el síndrome de CHARGE y otros síndromes genéticamente relacionados. (Síndrome de Kabuki: mutaciones en el gen *KMT2D*; Síndrome de Alagille: mutaciones en el gen *JAG1*; Síndrome de Kallmann: mutaciones en el gen *HH5*). Entre las 4 comparten 11 fenotipos. El síndrome de CHARGE es la que más fenotipos comparte individualmente con el resto y en agrupaciones de 3 en 3. Esto podría indicar un papel aguas arriba para el gen *CHD7* espacial y temporalmente en la regulación de estos factores y en las rutas transcriptómicas. Para buscar una relación entre fenotipos y genes afectados empezamos generando un gran conjunto de genes de enfermedades a partir de dos bases de datos de genes y fenotipos (OMIM, ORPHANET).

Los genes asociados con trastornos similares muestran una mayor probabilidad de interacciones físicas entre sus productos y una mayor similitud en el perfil de expresión de sus transcritos, lo que respalda la existencia de distintos módulos funcionales específicos de la enfermedad. Al igual que *CHD7,* es probable que los genes humanos esenciales codifiquen proteínas centrales y se expresen ampliamente en la mayoría de los tejidos. Esto sugiere que los genes que producen enfermedades también jugarían un papel central en el interactoma humano. Sin embargo, la gran mayoría de los genes de las enfermedades complejas no son esenciales y no muestran tendencia a codificar proteínas centrales, y su patrón de expresión indica que están localizados en la periferia funcional de la red (Goh *et al.*, 2007).

Los trastornos genéticos humanos y los genes de enfermedades correspondientes podrían estar relacionados entre sí en un nivel más alto de organización celular y orgánica. Los ejemplos de trastornos genéticos que surgen de mutaciones en más de un solo gen (heterogeneidad de locus) proporcionan apoyo para la validez de este enfoque. Por ejemplo, el síndrome de Zellweger está causado por mutaciones en cualquiera de al menos 11 genes, todos asociados con la biogénesis de peroxisomas (Weller, Gould y Valle, 2003). Del mismo modo, hay muchos ejemplos de diferentes mutaciones en un mismo gen (heterogeneidad alélica) que dan lugar a fenotipos actualmente clasificados como diferentes trastornos. Por ejemplo, las mutaciones en TP53 se han relacionado con 11 trastornos relacionados con el cáncer clínicamente distinguibles (Vogelstein *et al*.,, 2000).

Dado que la organización interna de las células es una red altamente interrelacionada, debemos mejorar nuestra compresión de "un solo gen, un solo trastorno" (Barabási y Oltvai, 2004; Vidal, 2005; Albert, 2005). El desarrollo de un marco conceptual que relaciona todos los trastornos genéticos con la lista completa de genes que producen enfermedades en humanos, ha dado como resultado una visión global del "*diseasoma*" (Goh *et al*., 2007), una combinación de todas las asociaciones conocidas entre genes de trastornos y enfermedades. Los genes pueden estar involucrados en muchas rutas celulares y no todas tienen por qué estar alteradas en pacientes incluso con la misma mutación, lo que puede producir distintos fenotipos, debido al fondo genético de cada individual. Por lo tanto, en este trabajo se propone utilizar los perfiles de expresión génica y las marcas epigenéticas en embriones mutantes y no mutantes, para el estudio de estas redes moleculares y epigenéticas desreguladas.

Actualmente, existen métodos innovadores de integración de datos en red como el NBS (del inglés *Network Based Stratification*), que emplea una metodología de análisis comparativo de perfiles de mutación a través de la propagación en redes génicas (Vanunu *et al*., 2010). El método de NBS ha resultado muy útil para el reconocimiento de redes génicas dentro de subtipos tumorales de un mismo cáncer en diferentes pacientes (Hofree *et al.*, 2013). Lo que podría dar nuevas perspectivas a la investigación del tratamiento de los fenotipos solapados en distintos síndromes (Hofree *et al.*, 2013; Cowen *et al.*, 2017). Estudios similares ya han demostrado que los genes de enfermedades complejas son menos centrales que los genes de enfermedades esenciales y monogénicas en las redes de interacción molecular (Barrenas *et al.*, 2009). Nuestros resultados respaldan la hipótesis de qué nuevos genes candidatos, podrían identificarse entre los vecinos de las redes génicas que producen las enfermedades monogénicas y que afectan al fenotipo. Se persigue con esto una comprensión más profunda de la relación entre las redes génicas y las enfermedades genéticas, para una identificación precisa de los fenotipos y el desarrollo de terapias específicas.

USC UNIVERSIDADE DE COMPOSTELA

7.3.5. La Homología Podría Afectar al Síndrome de CHARGE.

El modelo descrito en la introducción es una descripción general de la vía NMD en células de vertebrados (Fig. 11), sin embargo, se han revelado vías alternativas a la NMD en levaduras e invertebrados que contribuyen a la eficacia del sistema de recompensa (Alexandrov *et al.* 2011, Amrani *et al.*, 2004). En algunos se ha visto la importancia de proteínas como PBAF con la que CHD7 se une y actúa en la regulación epigenética durante el desarrollo embrionario (Ivanov *et al.*, 2016). En mamíferos, hay constancia de algunos ejemplos de NMD independientes para transcritos de inmunoglobulina (Ig) que adquieren PTCs a altas frecuencias durante el desarrollo de los linfocitos B (Bühler *et al.*, 2006, Metze *et al.*, 2013).

El gen *sox9b* en pez cebra sufrió este evento de duplicación génica tan mencionado y existen dos parálogos: *sox9a* y *sox9b* (Amores *et al.*, 1998; Postlethwait *et al.*, 1998; Taylor *et al.*, 2003; Jaillon *et al.*, 2004). Sin embargo, se sabe que el gen *sox10* se ve recompensado por *sox9b* a través de la GCR que se detecta en la mayoría de casos en pez cebra (Dooley *et al.*, 2019). En humanos *SOX9* no está duplicado, al igual que *CHD7*, pero la compensación de *SOX9* y *SOX10* también ocurre y ambos sentidos (McKeown et al., 2005; Passeron et al., 2007; Shakhova et al., 2015). Puede que cuando los genes de *CHD* se duplicaron, la divergencia entre estos provocara que las funciones o su expresión no sean capaces de recuperar completamente el fenotipo.

Según los datos de Ensembl (Cunningham *et al.*, 2022), el gen SOX9 de humanos presenta un 57,5 % de homología en el 53 % de la secuencia de cDNA de SOX10. el gen *sox9a* en pez cebra presenta un 61 % de homología con *sox9b* en más de un 81 % de la cobertura del cDNA, mientras que con *sox10*, presenta un 45 % de homología en el 54 % de cobertura. En humanos, el gen *CHD7* presenta un 52 % de homología en el 91 % de la cobertura de cDNA de CHD8, mientras que *chd7,* en pez cebra, presenta un 47 % de homología en el 85 % de la cobertura de *chd8*. Si la GCR estuviera afectada por la homología, el ser humano podría verse más recompensado que el pez cebra a para rescatar el genotipo a través de la GCR.

En términos de función de las proteínas, la homología de las secuencias aminoacídicas sería: Sox9b un 61 en el 81 % de la cobertura de Sox9a*;* Sox9b *un* 54 % en el 89 % de la cobertura de Sox10: SOX9 un 53 % en el 81 % de la cobertura de SOX10; Chd7 un 43 % en el 85 % de la cobertura Chd8; CHD7 un 50 en el 90 % de CHD8. Si la función de la proteína dependiese de la homóloga de la secuencia aminoacídica, la proteína CHD8 sería capaz de cumplir mejores funciones de compensación en el ser humano, que *chd8* en el pez cebra y similares a las de SOX9 y SOX10.

La duplicación del genoma del pez cebra podría estar más relacionada con la especificación de tejido que con la GCR. Mientras *sox9b* en pez cebra es un gen materno, *sox10* parece ser un gen cigótico, donde la alteración la transcripción, únicamente afectaría a los tejidos específicos en los que su transcripción se lleve a cabo. Según los datos de transcripción para *sox9b* mientras que *sox9a* comienza justo en la activación materna, en el momento en el que *chd7* y *p53* activan la transcripción anterior a la MBT (Fig. Sup. 2; White *et al.*, 2017*),* el solapamiento en la expresión de estos genes, pero las actividades distintas observadas en *sox9a* y *sox9b* podrían deberse a un intercambio en la función cigótica. En el momento de activación de la transcripción de *sox10*, los niveles de expresión de *sox9b*

USC UNIVERSIDADE DE COMPOSTELA

disminuyen, mientras que los de *sox9a* aumentan. Sin embargo, después de la MBT, los tres genes se activan, pero *sox9a*, parece tomar el control de la expresión. La compensación por parte de la GCR para el gen *chd7* es muy probable, por tanto, podría estar afectando positiva y negativamente dependiendo de la carga materna en PTCs o en producto materno defectuoso y el genotipo del embrión.

Sin embargo, la falta de pigmentación y los defectos en los condrocitos, se debe a una deficiencia materna de *chd7* que causa la alteración materno-cigótica al establecerse la función cigótica. Los melanocitos se recuperan cuando se recupera la función cigótica, pero el establecimiento de la senescencia no es capaz de compensar y eliminar todos los defectos producidos en las etapas anteriores y el embrión muere

Las implicaciones de la carga materna en *sox9b* y los defectos fenotípicos del desarrollo observados anteriores a la transición cigótica podrían darle una explicación a la función de este gen como factor materno de diferenciación celular.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

8. SENESCENCIA CELULAR Vs. SNORLAX

A pesar de que la función principal de CHD7 sobre p53, probablemente sea prevenir la apoptosis, no la senescencia celular, los niveles de expresión de *CHD7* son bajos en las células diferenciadas y durante la senescencia embrionaria (Fig. 50), lo que podría hacer pensar que es innecesario en estos eventos. Sin embargo, su papel recientemente descubierto como activador de la senescencia celular (Su *et al.*, 2018), además de ser un inhibidor de los marcadores de senescencia embrionaria como *ckdn1a* y *cdkn2a*/*b* en pez cebra, demuestra es necesario en ambos procesos, a través de su capacidad de regular la expresión de *p53*. La capacidad de *CHD7* de regular la expresión de *p53* es crucial para mantener la célula en un estado funcional, para que entre en senescencia o se diferencie. Si esta regulación de la expresión de *p53* falla, puede tener consecuencias negativas.

Regula su propia expresión al alza, aunque puede que a través de otros factores de transcripción. Tras la llegada de un estímulo senescente como la senescencia programada, las células que expresan *chd7*, comienzan a reprimir su expresión. Sin embargo el gen *chd7* intenta mantenerla, continuando así con su inhibición controlada del programa de senescencia celular. Esta lucha, entre el estímulo represor, y "Snorlax", es la que falla en la enfermedad del síndrome de CHARGE. En los mutantes *chd7*-CRISPR, se han observado retrasos en la aparición de los patrones de actividad β-Gal asociados a senescencia embrionaria, y apariciones espontáneas de células o poblaciones de células con actividad SA-β-Gal, en los momentos clave de la aparición de SA-β-Gal en los tejidos senescentes.

Estas contradicciones en la aparición de los factores observables asociados a la senescencia embrionaria, pueden ser indicativos de esta lucha entre *chd7* y el estímulo activador del programa de senescencia embrionaria, aguas arriba de *chd7*. Lo que implicaría un aumento de los niveles de expresión de *p27* dependiente de *chd7* en la fase cigótica, por una mala inhibición de la expresión de *p53* materna.

8.1. *CHD7* EL REPETIDOR DE SEÑALES

Se requiere la expresión de *CHD7* a niveles subumbrales para la transcripción de *p53* (Fig. 55). Pero si su carga baja más de esos niveles, se inhibe su expresión, y *p53* aumenta, llevando a la muerte celular. La deficiencia de la carga no explica la entrada en senescencia celular. Sin embargo, la pérdida total de la carga explica muchos de los síntomas de la enfermedad, como la ausencia y la aparición de estructuras, la apoptosis, la desregulación y los retrasos en la entrada de la senescencia embrionaria.

Si nos fijamos en la Figura 55, vemos que los niveles de expresión de *chd7* se comportan prácticamente como un repetidor de señal, con respecto a la expresión de *p53*. Sin embargo, aunque la repita, el gen *chd7* está ahí para inhibir la expresión de *p53*. Por eso, cuando aumenta la expresión de *p53*, aumenta también la de *chd7*, y a la vez inhibe ambas transcripciones. Esta competición entre cargas, parece ser lo que marca el destino de los tejidos y órganos en la senescencia embrionaria. Si se produce un desequilibrio, *chd7* aumenta o disminuye la expresión, controlado los niveles de expresión de ambos, y el organismo se podría desarrollar casi correcta completamente. Sin embargo, si no consigue regularlo, se producirían alteraciones o deficiencias en la activación del programa de senescencia embrionaria, y, en consecuencia, en el desarrollo.

USC UNIVERSIDADE DE COMPOSTELA

8.2. El agotamiento del producto materno y cigótico

Las células están sentenciadas a la muerte sin la dosis suficiente de *CHD7*. La contribución materna en humanos es escasa, pero sí su efecto. Ella decide que células van a marcar la proliferación celular y luego entrar en senescencia embrionaria. Esas células sin la dosis suficiente de *CHD7*, no podrán controlar el aumento de los niveles de expresión de *p53*. Probablemente en esos aumentos de los niveles de expresión de *chd7* (Fig. 55) ocurra ese cambio entre producto materno y cigótico, que causa que al agotarse el producto en los embriones, deje de producirse *chd7*, y de esa manera no se regulen adecuadamente los niveles de transcripción. Momentos previos a el aumento de expresión de *chd7* en la MBT, se produce un aumento pronunciado de los niveles de expresión de *p53* (Fig. 55). Esta señal podría ser la señal que estimulase la transcripción de *chd7* para la entrada en senescencia e inhibir la transcripción de *p53*. Este aumento de los niveles de p53, es lo que provoca el aumento de la expresión de *chd7*, lo que provoca la inhibición de la transcripción de p53, pero no para inhibir la senescencia embrionaria. Los niveles altos de expresión de *chd7* producen la inhibición de la transcripción de *p53*, pero probablemente, también produzca la autoinhibición de la transcripción de *chd7* (Fig. 55). Esto liberaría tensiones entre la inhibición de la expresión de *p53* y el aumento de la expresión de *chd7*, hasta que las cargas de *chd7* y *p53* se agotan. Pero la carga de *chd7* no marca el fin de la expresión de *p53*. Las células que expresan *chd7* siguen expresando *p53,* porque entran en senescencia, pero a niveles bajos de *chd7*, mayor capacidad inhibitoria. En estas células, no deberían subir los niveles de p53 a no ser que recibieran un estímulo, que produciría también la regulación controlada del mismo por *chd7.*

Sin embargo, la caída de los niveles de expresión de *chd7* por debajo de los niveles umbrales en algunas células, lleva a un aumento en la expresión de p53, al no reprimirlo completamente. Y esto marca la primera entrada en senescencia celular en los estadios de 32-64 células-domo (2-5 hpf) y 8-13 somitas (15 hpf) (Villiard *et al*., 2017; Da Silva-Álvarez *et al*., 2020), y la consiguiente aumento de la expresión de *p53*. Estos niveles de expresión de *p53* serían la segunda señal, que en condiciones sanas, deberían activar la transcripción de *chd7* otra vez para la inhibición y entrada en senescencia embrionaria.

Sin la inhibición correcta de la expresión de *p53*, los inhibidores del ciclo celular *p15* y *p21* aumentan para entrar en senescencia. Si hay poco *chd7* por un déficit cigótico, el propio efecto cigótico haría que se aumentase la transcripción del alelo sano a través de la GCR o su compensación por parte de la proteína. No obstante, si la expresión de *chd7* se agota, no puede llevar a cabo su propia transcripción, y *p53* aumenta, y la célula entraría en apoptosis.

Por alguna razón, la transcripción de *chd7* en los mutantes heterocigotos humanos, y el efecto compensatorio, están comprometidos. Los niveles de *chd7* deberían de ser capaces de controlarse a sí mismos con una única copia sana. En la etapa previa a la MBT y la ZGA (Fig. Sup. 2), es donde la contribución materna juegaría su papel de activador de los programas celulares, A las 2 hpf, las células transcriben el RNA suficiente para desarrollar el programa de senescencia correctamente, pero esa transcripción es anterior a la ZGA y, por lo tanto, no disponen de los mecanismos de control cigóticos. Esa transcripción está controlada por el producto materno. Como podemos ver en ese momento los niveles de expresión de *p53* y *chd7* son prácticamente iguales (Fig. 55). Las mutaciones producirían la descompensación de la dosis y el desequilibrio en ese momento, controlado únicamente por el producto materno, para la activación del programa de senescencia embrionaria.

USC UNIVERSIDADE DE COMPOSTELA

8.2.1. El Agotamiento del Producto Materno y Cigótico

La senescencia embrionaria no está activada por p53 como el resto de senescencias, pero sí la activación de los programas del desarrollo anteriores. La madre almacenaría en los huevos la carga suficiente de producto materno para activar los programas del desarrollo, como un manual para el desarrollo embrionario a través de la aportación y activación de diversos factores, entre los que estaría *p53*. A su vez, aporta proteínas y material genético para activar la transcripción de *chd7*, como si fuese un salvavidas, y activar la senescencia embrionarias, deteniendo así los estímulos proliferativos y apoptóticos que va a provocar p53.

Sin embargo, para que se apague la senescencia embrionaria, además de que se tiene que expresar previamente, también se tiene que agotar *chd7*. La madre dejaría la cantidad justa para la activación, pero la insuficiencia en la dosis de *chd7* anteriores a la transcripción cigótica, provocaría los desajustes en el desarrollo del programa de la senescencia embrionaria.

Esto podría verse de dos formas:

1. Teniendo en cuenta que los humanos no tuvieran contribución materna, los individuos heterocigotos siempre serían deficientes en la dosis, no obstante, la actividad de la proteína Chd7 sana equilibraría los niveles de forma indirectamente proporcional a la expresión de mRNA.

   - Un individuo con una carga baja de RNA de *chd7*, en las transiciones, elevaría los niveles de expresión y a su vez inhibiría la expresión de *p53*, entrando así en senescencia embrionaria y no produciendo a penas fenotipo.

   - Una proteína ineficiente provocaría una menor capacidad inhibitoria de *p53*, provocando una aumento de la expresión de *chd7* por el aumento de *p53* y, por tanto, una inhibición de *p53*, entrando en senescencia y no produciendo a penas fenotipo.

Ambos resultados conducen al mismo resultado, un control de la expresión de *p53* por parte de Chd7.

2. Si los humanos tuvieran contribución materna de *CHD7*, los individuos podrían ser o no deficientes en la dosis materna, y produciría la amplia variabilidad en la expresividad y la penetrancia incompleta observadas recientemente (Balasubramanian *et al*., 2014; Gonçalves *et al*., 2019), además del rescate cigótico a través de la entrada en senescencia embrionaria, que proponemos en esta tesis.

Este agotamiento del producto materno y transcripción cigótica, es la que controlaría que p53 no se sobreexprese. Además, sería lo que controlase la desactivación y entrada en senescencia. Como ya se ha comentado anteriormente, al iniciar la activación de la etapa materna, durante las primeras divisiones celulares, el material materno es el que controla la transcripción. En ese momento, los niveles de chd7 se activan por una subida de los niveles de p53. Este que se

USC UNIVERSIDADE DE COMPOSTELA

presenta a niveles bajos comienza a subir hasta que consigue inhibir la señal de *p53* y se agota su producto. Sin este agotamiento ,el gen *p53* se vería completamente reprimido y no podría volver a aumentar su señalización en la etapa siguiente, por lo tanto, la carga materna es importante en ambas direcciones. La descompensación de la carga materno-cigótica explicaría muy bien las discrepancias fenotípicas en un mismo tejido para pacientes con fenotipo CHARGE.

8.2.2. Los Inhibidores del Ciclo Celular p15 p21 Contribuyen a Estabilizar la Entrada del Programa de Senescencia Embrionaria en los Tejidos.

La entrada o no en senescencia dependerá a su vez de los inhibidores del ciclo celular *cdkn1a* (*p21*) y *cdkn2a*/*b* (*p15*). En los mutantes heterocigotos *outcross*, se observan ligeros aumentos de la expresión de estos inhibidores que podrían ser suficientes para compensar el aumento de la expresión de *p53* y mostrar fenotipos leves. Sin embargo, en los mutantes nulos para *chd7*, el producto materno de *chd7* no sería suficiente, por lo que se produce un aumento de *p53* (Fig. 55). En los mutantes c*hd7*-CRISPR y morfantes para *chd7* a las 22-25 hpf, con pérdida de la contribución materna, la expresión de los marcadores de senescencia *p15* y *p21* aumentan (Fig. 50A), confirmando los resultados con morfantes para *chd7* del grupo de Balow *et al.* (2013). Los mutantes maternos, heterocigotos para *chd7* del *outcross*, apenas muestran diferencias estadísticamente significativas (Fig. 50B), lo que demuestra una transición cigótica sana, gracias a la contribución materna positiva.

Los niveles de expresión de *p15* son casi inobservables en los embriones de pez cebra WT hasta los 5 dpf (Fig. 50), sin embargo, la expresión de *p21* comienzan en la ZGA, y aumenta de manera proporcional a *chd7*, pero más lentamente (White *et* al., 2017; Papatheodorou *et al.*, 2020). A lo largo del desarrollo embrionario su expresión aumenta y disminuye, controlando la inhibición de *p53*, hasta llegar al inicio de la senescencia embrionaria observable alrededor de las 72 hpf (Fig. Sup. 2). En este momento la expresión de p21 se comporta de manera indirectamente proporcional a la expresión de *chd7.* Esta momento se corresponde temporalmente con la aparición de actividad SA-β-Gal positiva en zonas como el ojo, el oído, los somitas, y en algunos embriones mutantes para *chd7*-CRISPR y morfantes, la aparición de parches de células senescentes en la cola, cabeza y ojos (Fig.).

A las 48 hpf (Fig. 46 y 47) aumenta la intensidad de la actividad SA-β-Gal en la cabeza. Entre los somitas, se observan ciertas áreas con actividad, pero la intensidad parece menor en los mutantes. Los datos de expresión para *p15* y *p21* a las 48 hpf (Fig. 50) apoyan esta menor cantidad de senescencia en los mutantes con respecto a los WT. Se observa una tendencia clara en esta caída de la senescencia, sin embargo, no es significativa. No obstante, si lo sería en la expresión de *p21* en los morfantes para *chd7.* En este momento, podría ocurrir una menor inhibición por parte de los homocigotos en esa transición cigótica, al no tener ya proteína sana suficiente, para compensar la carga. Puede que en este momento las células entren en apoptosis al no inhibir la expresión de *chd7*. En los morfantes, sin embargo, la reducción de la carga, podría estar ya produciendo la variante sana y compensando erróneamente, a través de la GCR, como les pasaría a los mutantes heterocigotos. En estos mutantes *chd7*-CRISPR, también hay que tener en cuenta la variabilidad genética. En este experimento, hemos seleccionado embriones genotípicamente distintos basándonos en el genotipo.

USC UNIVERSIDADE DE COMPOSTELA

A las 96 hpf, ya entrada la fase cigótica, podríamos estar viendo mejor este efecto. A priori, no se observa ninguna diferencia en la expresión de *p15* y *p21* en WT y mutantes *chd7*-CRISPR. Las alteraciones observadas, por tanto, a las 96 hpf podrían ser debidas a las alteraciones en la senescencia observadas en esos mismos tejidos en etapas anteriores debidas a la descompensación materno-cigótica. Sin embargo, ambos grupos tienen variaciones muy grandes en la expresión de estos genes, pero no para *chd7*, dentro de cada grupo (Fig. 50). Esto podría, deberse a que ambos grupos están seleccionados fenotípicamente y no genotípicamente, habiendo individuos de los tres genotipos en ambos grupos. Unos podrían estar compensando la variante sana ya entrada la fase cigótica y otros no, provocando una variación fenotípica más grande. La actividad activadora o represora de CHD7 en un elemento regulador particular puede cambiar dependiendo del contexto del DNA local. (Basson y van Ravenswaaij-Arts, 2015; Pauli *et al.*, 2017; Figura 1). CHD7 coopera con SMAD1 para regular positivamente la expresión de *Bmp4* durante la morfogénesis del corazón (Liu *et al.*, 2014). La proteína CHD7 puede funcionar en algunos casos exclusivamente como un potenciador de la expresión génica y el aumento de la expresión génica en células deficientes en *CHD7* puede ser secundario a la expresión disminuida de represores transcripcionales. CHD7 también regula positivamente la expresión de *Fgf10*, *Otx2* y *Ngn1* durante el desarrollo del oído (Hurd *et al.*, 2010), mientras que en el cerebelo, la deficiencia en *CHD7* provoca la regulación positiva y la expansión espacial de *OTX2* (Yu *et al.*, 2013).

8.3. El componente materno ajusta los niveles de *CHD7* antes de la transición cigótica

La presencia de actividad SA-β-Gal registrada en embriones de pez cebra, en estudios anteriores, en los estadios de 32-64 células y domo, y luego comienza otra vez en el estadio de 8-13 somitas (Villiard *et al.*, 2017), nos hacen plantearnos que *chd7* su función materna, juegan mucho antes del proceso de senescencia embrionaria en los tejidos en formación y la ZGA. El estadio de 8-13 somitas corresponde a las 10 hpf del pez, momentos después de la subida global de los niveles de expresión de *chd7*, lo que indica que la senescencia embrionaria empieza en algunos tejidos antes de la bajada notable de *chd7* y p53.

Sin embargo, los estadios de 8-13 células y domo donde se observa actividad SA-β-Gal positiva (Villiard *et al.*, 2017), son antes de esta subida en la transcripción cigótica, por lo tanto, dependiente únicamente de la contribución materna. Este momento también se corresponde a la anterior subida y consecuente parada de los embriones a las 2 hpf.

El gen *chd7* podría estar interviniendo también en algunas células de los tejidos marcados para que expresen *chd7,* para que también entre en arresto del ciclo celular, hasta la siguiente fase de proliferación. En ese punto de control previo, sería donde los niveles de *chd7* materno y cigótico se ajustarían. Si los niveles de expresión consiguen elevarse, la expresión de p53 disminuye. Pero la subida en *chd7,* produce un cambio en la capacidad inhibitoria de chd7, lo que provoca la subida de nuevo de p53 y la activación del programa de senescencia embrionaria, después de la MBT.

Seguramente el control de esta primera transcripción de *chd7* también sería dependiente de p53. El gen p53 también aumenta la señal en ese mismo momento, por lo que podría indicar que la subida en p53 provoca una respuesta en la expresión de *chd7* para inhibirlo y la entrada en senescencia en las células que expresa *chd7*. De esa forma se genera el primer

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO

material cigótico dependiente, pero dependiente del material materno. Si las concentraciones en ese momento no son las adecuadas para el control de p53, la función de las células se vería comprometida igual que en los casos anteriormente mencionados.

El aumento en la expresión de *chd7* produciría una disminución de los niveles de p53. Pero si el cigoto es deficiente por alguna de las dos partes, en ese momento las células podrían no inhibir la función de p53 a tiempo y producir los defectos embrionarios detectados en los embriones mutantes *chd7*-CRISPR, anteriores a la formación de los órganos, afectando al efecto materno-cigótico de *chd7* en los embriones en cuanto a las capacidades de migración, proliferación y apoptosis, y también produciendo retrasos en la aparición de la senescencia celular.

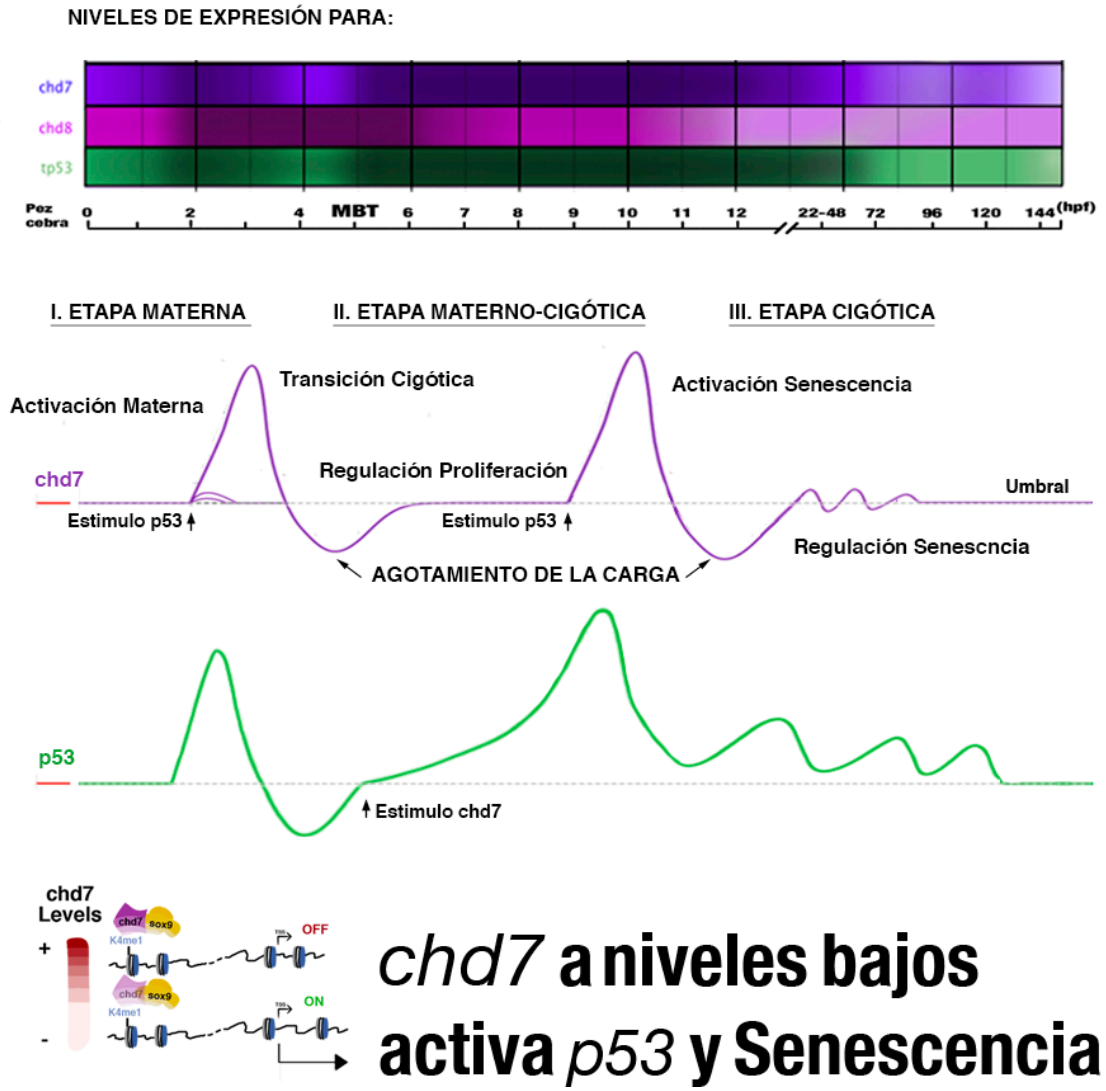


Figura 55. Esquema del mecanismo teórico de la activación, regulación y entrada a la senescencia embrionaria mediante la inhibición de p53 por chd7.

La senescencia embrionaria se activa a niveles bajos de *chd7*. Pero, se necesita su expresión, igual que la de *p53*, para que se active la senescencia celular, y también inhibir la expresión de *p53*, pero no reprimir, y entrar en senescencia embrionaria. Si reprime a p53,

probablemente se reprime a sí mismo y el tejido se diferencia. Si no consigue inhibir la expresión de p53, el tejido muere por apoptosis o puede que entre en senescencia permanente. Es cuando se encuentra el equilibrio entre las dos expresiones cuando entra en senescencia embrionaria.

La pérdida de importancia de la contribución materna en forma de RNA en los mamíferos es lo que explica la enfermedad en humanos y las discrepancias con el pez cebra, no la GCR. El destino de las células dependerá de si la expresión de *chd7,* consigue aplacar la señal de *p53* (Fig. 55) y dejarla a niveles umbrales, cooperando con los inhibidores del ciclo celular *p16*, *p15*, *p21* y *p27*, seguramente activados aguas arriba por *foxo*:

1. Si *chd7* consigue inhibir la señal de p53 y se mantienen ambas expresiones a niveles umbrales, las células se volverán senescentes y resistentes a estímulos apoptóticos.
2. Si no consigue inhibir la señal por el agotamiento de la carga de *chd7*, la expresión de *p53* aumentará y la célula seguirá proliferando o morirá por apoptosis
3. Si consigue inhibir la señal, e inhibir la expresión de *p53*, pero mantener sus niveles de expresión subumbrales, la célula se diferenciaría a un tipo celular, con capacidad de producir *chd7* hasta el agotamiento de la producción de este, y probablemente cumpliendo su función cigótica en el adulto a través de la regeneración de tejidos.

Por lo tanto, la senescencia embrionaria podría verse como una consecuencia a la senescencia replicativa, activada por el aumento de la expresión de *p53*. La importancia de *chd7* en la patología del síndrome de CHARGE está en esa fase final, en la entrada completa de la senescencia embrionaria del embrión y donde mueren los embriones homocigotos. En esa fase se decide el destino celular de los tejidos, si van a morir o si van a vivir y/o mantener la capacidad de senescencia celular.

Las alteraciones se deben a fallos en la inhibición de la señal de *p53*, que implican una alteración de los tejidos que se diferenciarán, morirán por apoptosis, o entrarán en senescencia. La señal que active la senescencia embrionaria podría ser la disminución de la expresión de *chd7* (Fig. 55) a niveles subumbrales que implicarían la subida de la expresión de *p53*, y a su vez la activación de la transcripción de *chd7*. Si la carga de *chd7* se agota antes de la subida de los niveles de expresión de *p53*, la célula no podría inhibir la señal del estímulo de senescencia celular producido por p53. Pero a su vez, una subida de los niveles de expresión de *chd7* más altos por algún mecanismo de compensación genética mal equilibrado, provocaría la no activación de la senescencia embrionaria o un retraso en su aparición, por una represión de de la transcripción de *p53* por parte de *chd7*.

La senescencia en algún momento se apaga, lo que determina el final del programa de senescencia embrionaria. Los niveles de expresión de *chd7* se reducen en todos los tejidos del organismo hasta ser indetectables. Para que haya senescencia celular tiene que haber *CHD7*. Si se agota *chd7* antes que p53 la célula se muere, si entra en senescencia y se acaba *chd7*, probablemente se diferencie a otro tejido. En cualquier caso, parece que para que la senescencia embrionaria y celular tenga lugar, tiene que expresarse *chd7*. Pero de que depende o no la expresión de *chd7* en las células. En el tejido embrionario, esa transcripción

USC UNIVERSIDADE DE COMPOSTELA

está regulada por la madre a través de la contribución materna. ¿Pero en el resto de células del cuerpo, se sigue transcribiendo *chd7* a niveles subumbrales?

Podría ser que la causa de la pérdida de las capacidades regenerativas de los mamíferos y la alta homología entre el fenotipo CHARGE y otras enfermedades estén relacionados. El cambio de la contribución materna en forma de RNA a la impronta genética, y el agotamiento de la carga en *chd7* necesario para el correcto desarrollo, provocan que la concentración de *chd7* en las células senescentes de los mamíferos, se vea comprometida aún más a la diferenciación o apoptosis, produciendo la incapacidad de estas células de producir *chd7* incluso a niveles umbrales.

8.4. La cresta neural tiene algo que decir

La primera evidencia de la multipotencia de células de la cresta neural *in vivo* se presentó al rastrear la progenie de células individuales marcadas en el tubo neural dorsal del embrión de pollo después de una microinyección con un colorante fluorescente vital (Bronner-Fraser y Fraser, 1988; 1989). Sin embargo, un tipo similar de experimentos de rastreo de linaje en el pez cebra ha sugerido que las restricciones de destino de las células de la cresta neural pueden tener lugar antes en los teleósteos que en los vertebrados superiores (Raible y Eisen, 1994, Schilling y Kimmel, 1994), por lo que la alta contribución materna de *chd7* en el pez cebra podría estar implicada. La progenie clonal de las células de la cresta neural craneales contiene solo un tipo de células diferenciadas (células ganglionares, condrocitos y células pigmentarias). En muchos casos, estas células están asociadas a células indiferenciadas proliferantes de destino desconocido (Schilling y Kimmel, 1994).

Los melanocitos y los condrocitos se originan en la cresta neural como células precursoras que luego migran y proliferan para llegar a su destino donde se diferencian en células productoras de pigmento o de cartílago (Couly *et al.*, 1993; Yamauchi *et al.*, 1999; Calloni *et al.*, 2007). En 2009 se describió la presencia de células altamente multipotentes que se encuentran predominantemente en células cefálicas de la cresta neural aviar, y son capaces de producir clones que comprenden tipos de células tan diversas como: neuronas, glía, condrocitos, osteoblastos, células del músculo liso y melanocitos (Calloni *et al.*, 2009). El establecimiento del linaje de estas células está regulado por un conjunto definido de factores de transcripción y vías de señalización que dirigen los programas de expresión génica específicos que sustentan la especificación, supervivencia, migración, proliferación y diferenciación de los melanoblastos y condroblastos. Además, los modificadores epigenéticos y las histonas de reemplazo juegan un papel clave en la regulación de la expresión génica y su sincronización durante los diferentes pasos de este proceso (Dilshat *et al.*, 2021). El papel de los reguladores epigenéticos como CHD7 en el desarrollo y la función de estas células de la cresta neural, cómo interactúan con los factores de transcripción, y las vías de señalización para establecer y mantener este linaje celular puede ser muy importante.

La senescencia se agota en los tejidos así como la expresión de *chd7*. En los adultos, los niveles de expresión de *chd7* son nulos y solo se encuentran en el ovario o testículo de los peces cebra (Asad *et al.*, 2016), indicativo de que pueda ocurrir la senescencia en esas células y reprogramarse o de la transmisión materna y paterna del gen o su expresión. No obstante, esta expresión nula en el adulto, podría deberse a este agotamiento del producto de *chd7* en las células diferenciadas. Sin embargo, podría mantenerse una expresión reducida de *chd7* en

USC UNIVERSIDADE DE COMPOSTELA

algunas células de los tejidos con capacidad de reprogramarse y regenerar y no observarse expresión a penas por estar solo en un tipo celular muy concreto y una población muy baja, a un nivel umbral de su expresión para mantener la senescencia y la capacidad antiapoptótica.

En los embriones de pez cebra, la migración de las células de la cresta neural, la elección del destino y la diferenciación se ven afectados en los morfantes para *chd7* (Balow *et al.*, 2013; Patten *et al.*, 2012). Aunque esta observación viene con la advertencia de que estas células parecen particularmente susceptibles a los efectos *off-target* de los morfolinos (Bóer, Jette y Stewart, 2016). Uno de estos efectos es el aumento en la expresión de *p53*. Pero este aumento también ocurre en mutantes para *chd7* y está muy relacionada con la deficiencia en *chd7*. Este aumento de la expresión de *p53* podría estar causada en los embriones, como una advertencia para los genes maternos y entrada en apoptosis para abortar el desarrollo embrionario por la descompensación de carga en *chd7*.

Tanto en los tejidos y órganos embrionarios, como en las células del sistema nervioso central, se observa actividad SA-β-Gal (Fig. 41-48). Si hay senescencia implica la expresión de *chd7*, pero en algún momento la senescencia embrionaria se reduce así como la expresión de *chd7* en las células. La senescencia continúa en el sistema nervioso y en muchos casos solo se observa en las células del borde de los tejidos como en la vesícula ótica (Fig. 41 y 44-46), el ojo en el caso del cristalino (Fig. 43) o el intestino (Fig. 42). Estas células del borde, en algunos casos como el aparato auditivo, podrían ser prolongaciones de la cresta neural y estar reprogramando de forma no autónoma las células del tejido, para morir por apoptosis al no bloquear la señal de p53, inhibir la expresión de *p53* y *chd7* para diferenciarse en un tejido concreto, o mantener unos niveles umbrales de ambos genes, como en la MBT y entrar en senescencia embrionaria al final de la proliferación celular.

Las funciones no autónoma de *chd7*, es decir, su capacidad de influir en el comportamiento de células vecinas que no tienen una mutación o alteración en el gen *chd7*, podría referirse a la regulación de los genes involucrados en la senescencia celular y las vías de señalización. La función no autónoma es especialmente importante en el contexto del desarrollo embrionario, ya que permite la coordinación entre las células para lograr un desarrollo adecuado del organismo. Esta regulación se logra a través de mecanismos de comunicación intercelular, como la liberación de factores de crecimiento o la activación de vías de señalización, entre los que podrían encontrarse los SASP.

8.4.1. CHD7 el Reprogramador de la Cresta Neural.

La proteína Chd7 es importante para el desarrollo de las características neuroepiteliales y para la migración de las células de la cresta neural. Bajpai et al. (2010) observaron que las células de la cresta neural pluripotentes generadas in vitro expresaban altos niveles de Chd7. Al silenciar la expresión del gen mediante siRNA, demostraron que aunque las células no cambiaron su forma, éstas presentaban una capacidad reducida para adherirse a la superficie y carecían de propiedades migratorias (Bajpai *et al*., 2010). En embriones morfantes para *chd7* de Xenopus, también se observa una migración anormal de las células de la cresta neural hacia los arcos faríngeos. Estas células podrían ser las mismas que se observaron en nuestros mutantes *chd7*-CRISPR diferenciadas a condrocitos y melanocitos (Fig. 25, 26, 28, 30 y 31). Aunque la expresión de los genes marcadores de la placa neural (*pax3*, *zic1* y *msx1*) o de la supervivencia de la cresta neural (*mycII*) en los embriones inyectados fue similar a la del tipo

USC UNIVERSIDADE DE COMPOSTELA

WT, la expresión de los marcadores de cresta neural multipotentes migratorios *sox9*, *twist* y *snai2* se redujo significativamente.

La proteína Chd7 interactúa con el complejo multiproteico Pbaf que produce la remodelación de la cromatina. Pbaf contiene las proteínas Brg1, Arid2 y Brd7. Cuando se silencian los genes *brg1* o *brd7* se observa una expresión reducida de *twist* y *snai2* que da como resultado la replicación del fenotipo *chd7*. Sin embargo, la expresión de *chd7* no se ve afectada en estos embriones. La inyección de *chd7* o *brg1* en una concentración baja no tiene casi ningún efecto, mientras que la coinyección simultánea en la misma concentración baja da como resultado una migración fallida de las células de la cresta neural. Por lo tanto, las proteínas Chd7 y Brg1, y probablemente el complejo Pbaf, están involucradas en la regulación de la migración de las células de la cresta neural. Los morfantes para *chd7* tienen una migración alterada de las células de la cresta neural y una desregulación de la expresión de *sox10* desde las primeras etapas (Asad *et al*., 2016). Se reportaron defectos en las células mielinizantes de Schwann, neuronas entéricas y células pigmentarias en un morfantes para *chd7*. La coinyección con *sox10*-MO rescató los defectos en las células de Schwann y el cartílago craneofacial (Asad *et al*., 2016).

El gen *CHD7* también es importante para mantener las características del neuroepitelio durante la bifurcación de la cresta neural (Chai *et al*., 2018). Al anular y sobreexpresar *CHD7*, se demostró que es necesario para mantener la identidad del neuroepitelio. Menos células expresaron los marcadores neurales como SOX1 y DACH1 y no pudieron formar neuronas en cultivo. Estas células habían aumentado la expresión de TWIST, SOX9, SNAI2 y MSX1/2, marcadores de la cresta neural. La proteína CHD7 ocupa potenciadores de genes involucrados en la neurulación y tiene una gran superposición con las marcas de histonas activas p300, H3K27Ac y H3K4me1. Casi todos los llamados "superpotenciadores", definidos en función de la abundancia de H3K27Ac, estaban unidos por CHD7, y muchos de esos genes eran genes de desarrollo neural (Chai *et al*., 2018). De acuerdo con esto, también se demostró que se necesita Chd7 para mantener la multipotencia de los progenitores de la cresta neural (Fujita *et al*., 2014). En ratones Chd7 es importante para regular la expresión de Foxd3, que nuevamente es importante para regular la expresión de Sox10. Se encontró que CHD7 ocupaba un dominio conservado en la región reguladora de Foxd3 (Fujita *et al*., 2016).

8.4.2. Los Efectos Materno-Cigóticos de CHD7 en el Neuroepitelio

Las diferencias entre los estudios Bajpai *et al.*, (2010) y Chai *et al.*, (2018) pueden estar relacionadas con los diferentes modelos utilizados y la eliminación o no de la contribución materna. Sin embargo, a partir de estos estudios, está claro que *Chd7* desempeña un papel importante en el mantenimiento de las características neuroepiteliales y el establecimiento de precursores de la cresta neural (efecto materno), pero también puede desempeñar un papel en su capacidad para migrar y diferenciarse en etapas posteriores (efecto materno-cigótico). El papel de CHD7 más allá de la migración de la cresta neural aún debe estudiarse en entornos específicos de melanocitos.

Lou *et al.* (2015) caracterizaron las funciones de *brg1* y la subunidad mediadora *med14* utilizando mutantes de pez cebra, y demostraron que los fenotipos de los dos mutantes se superponían considerablemente, aunque el mutante doble exhibió un efecto más grave sobre el fenotipo de cada mutante individual. Ambas mutaciones dieron como resultado defectos en

USC UNIVERSIDADE DE COMPOSTELA

el cartílago craneal derivado de la cresta neural y de las células pigmentarias. Las células pigmentarias estaban presentes en números normales en todos los mutantes. En los mutantes simples, las células se veían anormales con una apariencia puntiaguda, mientras que en el mutante doble, las células eran más pequeñas y puntiagudas. A las 14 hpf, los autores no observaron diferencias en los marcadores de la cresta premigratoria (Foxd3, Sox9b y Snai1b) y los diferentes marcadores que usaron para la migración también fueron normales, lo que sugiere que las células de la cresta neural se establecieron correctamente y pueden migrar a su destino (efecto cigótico). Sin embargo, cuando buscaron marcadores de cresta neural posmigratoria, observaron una expresión reducida de *Sox9a* y *Dlx3b*, lo que sugiere que estas células no se diferencian correctamente. Bajpai *et al.* (2010) demostraron que el complejo *Chd7-Brg1* es esencial para la migración de la cresta neural, lo que contrasta con el estudio de Lou *et al*. (2015). La diferencia entre los dos estudios se explica por los diferentes modelos utilizados (pez cebra frente a Xenopus), pero también por la diferencia entre la eliminación cigótica (*knockout*), y la eliminación materna (*knockdown*) y los efectos materno-cigóticos.

En nuestro modelo *chd7*-CRISPR, observamos que en los mutantes cigóticos (*outcross*), no se observan deficiencias en la pigmentación en los primeros estadios del desarrollo (hasta las 72 hpf) entre los mutantes y los hermanos WT. Sin embargo, entre las 96 y las 144 hpf sí se observan errores en la migración de los condrocitos y melanocitos, malformaciones en los tejidos que forman esas células y actividad SA-β-Gal aumentada en torno a esos tejidos entre las 120-144 hpf. En cambio, en los morfantes para *chd7* y mutantes materno-cigóticos *chd7*-CRISPR, observamos deficiencias en la pigmentación en ojos y tegumento hasta las 72-144 hpf y ausencia de estructuras cartilaginosas hasta las 96 hpf. Los fenotipos de ausencia de estructuras o déficits no son rescatados, pero podría ser que sí el aumento de estas células mediante su eliminación a través de la senescencia. Estas diferencias entre embriones mutantes *chd7*-CRISPR se deben únicamente a la pérdida de la contribución materna y las alteraciones de la carga materno-cigótica del gen *chd7.* Estos resultados demuestran la contribución materna y el efecto materno de *chd7* en la programación celular de las células de la cresta neural, los efectos materno-cigóticos en la migración y diferenciación de las células derivadas y la contribución cigótica de *chd7* en la recuperación del fenotipo a través de la senescencia embrionaria

La detección de células que no derivan directamente de la línea de la cresta neural, como son los macrófagos, que también presentan fallos en la migración y diferenciación en los estadios todavía materno-cigóticos y la recuperación cigótica posterior, nos hace pensar que *chd7* está muy implicado en estos mecanismos de proliferación, migración y diferenciación celulares en todos los tejidos. La pérdida de proteostasis es una de las causas de envejecimiento (López-Otín *et al*., 2013; Kaushik y Cuervo, 2015; Klaips *et al.*, 2018; Labbadia y Morimoto, 2015; López-Otín *et al*., 2022). La pérdida de la contribución materna o una contribución materna negativa podría implicar también una pérdida de la proteostasis debido a la deficiencia en *CHD7* y provocar así la no activación materna o el agotamiento posterior de la proteína efectiva (Fig. 55, 56 y 57). La pérdida de contribución materna provoca las deficiencias en la migración y proliferación celular en los tejidos, y los desajustes materno-cigóticos provocan alteraciones en esos mismos procesos horas después. Aunque se observaron pocas alteraciones materno-cigóticas en los mutantes *chd7*-CRISPR *outcross*, seguramente estas sean más observables en los cruzamientos *incross,* algo que no fue posible

USC UNIVERSIDADE DE COMPOSTELA

de realizar. Pero la senescencia embrionaria y la función cigótica del gen *chd7* restablecen un fenotipo casi normal en los mutantes cigóticos, si los embriones han recibido una contribución materna parcialmente positiva.

Los pacientes con síndrome CHARGE experimentan infecciones recurrentes durante la infancia, y se supone que estas infecciones son el resultado de anomalías anatómicas de la región craneofacial y de las vías respiratorias superiores y defectos de los nervios craneales que inervan estas estructuras. La inmunodeficiencia está más involucrada de lo que se pensaba anteriormente a estas infecciones, como ya se ha señalado en algunos informes de casos, pero solo ha recibido una atención limitada (Chopra et al. 2009, Jyonouchi *et al.*, 2009; Gennery *et al.*, 2008; Assing *et al.*, 2013). Wong *et al.* (2015) revisaron la inmunodeficiencia en el síndrome CHARGE y encontraron que el 80 % de los pacientes, tenían linfopenia T. Además, *CHD7* se reconoce como un gen de susceptibilidad a la inmunodeficiencia combinada grave en estudios de cribado de recién nacidos (Yu *et al.*, 2016, Chinn y Shearer, 2015). Se ha informado aplasia o hipoplasia tímica en pacientes con síndrome CHARGE. Sin embargo, el timo no se ha examinado de forma rutinaria en pacientes con CHARGE y la tasa de defectos tímicos varía drásticamente en diferentes informes (Wong *et al.*, 2015; Sanlaville *et al.*, 2006).

La eliminación o eliminación de *chd7* disminuye el número de células madre y progenitoras hematopoyéticas (HSPC) en el timo, pero aumenta ese número en las regiones periféricas no tímicas de los embriones de pez cebra (Liu *et al.*, 2018). El gen *chd7* es fundamental para la organogénesis tímica mediante la regulación de las células epiteliales tímicas y las células de la cresta neural. Además, la deficiencia de células T se puede salvar parcialmente mediante la expresión forzada de *foxn1*. Estos resultados sugirieron la participación de la displasia tímica y la linfopenia T en la inmunodeficiencia en el síndrome CHARGE (Liu *et al.*, 2018).

La muerte celular prevalece durante el desarrollo en organismos multicelulares y es importante para la eliminación de células y tejidos innecesarios, así como para la corrección de errores de desarrollo (Arya y White, 2015). Durante la embriogénesis de los vertebrados, las células moribundas están presentes durante el cierre del tubo neural y el desarrollo de la médula espinal (Schlüter, 1973; Weil *et al.*, 1997; Buss *et al.*, 2006; Massa *et al.*, 2009). Por lo tanto, una respuesta fagocítica rápida y eficiente es crucial para la eliminación de estos desechos. En ratones, pollos y peces cebra, un grupo de macrófagos primitivos derivados del saco vitelino migran hacia el cerebro en desarrollo, se diferencian en microglia y contribuyen a la neurogénesis en curso al eliminar los desechos apoptóticos (Cuadros *et al.*, 1993; Herbomel *et al.*, 1999; Bertrand *et al.*, 2005). Los macrófagos derivados del saco vitelino no se infiltran en el tronco de los embriones en desarrollo hasta la formación del sistema circulatorio en el día embrionario 10.5 (E10.5) en ratones (McGrath *et al.*, 2003; Bertrand *et al.*, 2005; Stremmel *et al.*, 2018) y 35 hpf en pez cebra (Herbomel *et al.*, 1999, 2001). Esta primera partida de macrófagos, procedentes del saco vitelino, parece que es la que está afectada en nuestros mutantes *chd7*-CRISPR observadas a las 48 hpf (Fig. 32). Antes de la colonización de macrófagos en la región del tronco, se completa el cierre del tubo neural y la búsqueda del axón motor que comienzan en E9 y 16 hpf en ratones y peces, respectivamente (Beattie, 2000; Wang *et al.*, 2014). Aunque la muerte celular durante el cierre del tubo neural se ha estudiado ampliamente, se sabe muy poco sobre la eliminación de desechos en el tronco durante las primeras etapas del desarrollo neural.

USC UNIVERSIDADE DE COMPOSTELA

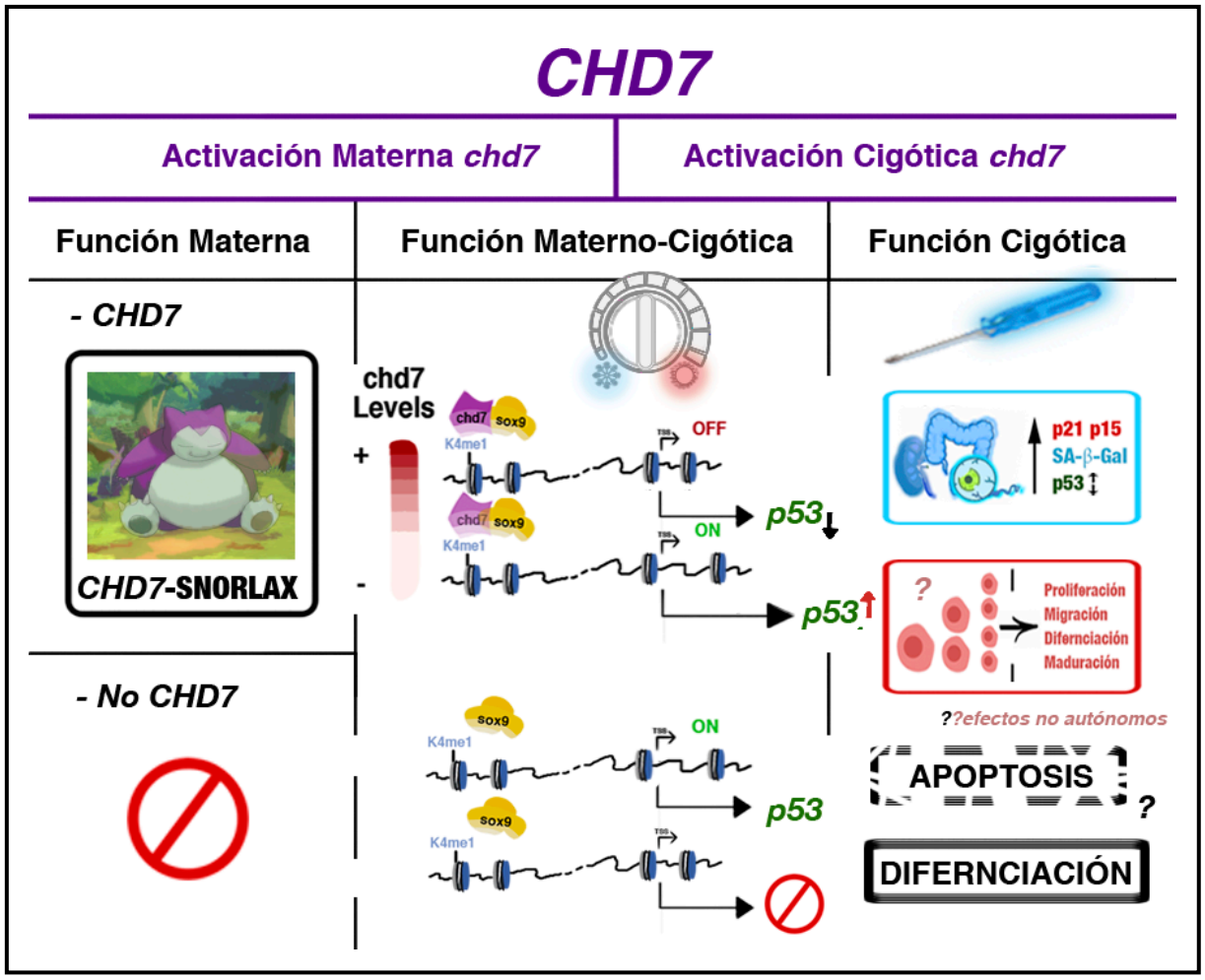


Figura 56. Activaciones, maternas y cigóticas, y funciones de *chd7* en los procesos del desarrollo embrionario mediante la inhibición controlada de la expresión de *p53*. Las líneas abiertas indican el control y el paso de una actividad a otra. En el caso de No *CHD7* puede deberse a una non activación materna, lo que no implicaría la pérdida del gen *chd7* y puede que tampoco la pérdida de la función materna en la activación de la expresión de *CHD7*, pero también el caso de la pérdida total de función para *CHD7* en homocigosis, lo implicaría la pérdida total de la función materna y la capacidad de regular el resto de funciones en el control de los procesos del desarrollo embrionario.

Estudios previos en ratones demuestran una correlación entre la presencia de desechos apoptóticos y las células de la cresta neural migratoria (Massa *et al.*, 2009; Nonomura *et al.*, 2013). Dadas las correlaciones espacio-temporales de la migración de células de la cresta neural, la presencia de células muertas y la ausencia de macrófagos en las primeras etapas de desarrollo, se planteó la hipótesis de que las células migratorias de la cresta neural tienen la capacidad de eliminar los desechos celulares durante las primeras etapas de desarrollo (Zhu *et al.*, 2019). Se propone, pues, que las deficiencias maternas en *CHD7* durante el síndrome de CHARGE, no solo producen la migración incorrecta de las células de la cresta neural, sino también que conducen a la disminución del número de macrófagos descendientes del saco vitelino y errores en su migración, y podrían producir alteraciones posteriores, al no eliminarse de manera correcta las células migratorias aberrantes de la cresta neural, provocando fallos en la maduración tanto de ese tejido como de los tejidos derivados de la misma. Los efectos no autónomos podrían ser también efectos cigóticos en los tejidos, debido

USC DE COMPOSTELA

a esa necesidad de expresarse a niveles bajos para mantener la inhibición de la transcripción de algunos genes y activar otros. De esta forma se transcribirían otros factores de transcripción para regular el crecimiento y la maduración para la identidad de tejido. Las señales que recibirían las células no serían capaces de elevar los niveles de expresión de *chd7*, o provocarían una descompensación de la carga por la GCR.

8.4.3. El desajuste entre cargas materna y cigótica en *CHD7* produce las alteraciones asociadas al síndrome de CHARGE

Si la función cigótica fuera la que provoca la patología del síndrome de CHARGE, los humanos con una mutación, muchos serían fértiles y sanos, incluso entre mutantes, al ser recompensados por la GCR. Esto aumentaría el número de casos de síndrome de CHARGE. En los embriones de ratón heterocigotos para *Chd7* se reduce gravemente la fertilidad, y en humanos se conocen pocos casos de herencia autosómica del gen y asociados a mosaicismos o fenotipos leves en los padres (Jongmans *et al.*, 2008; Pauli *et al.*, 2009; Cheng *et al.*, 2022)

Los individuos homocigotos con carga parcial negativa o sin función de la carga materna, se desarrollarían hasta la función cigótica, como vemos en humanos, ratón y peces, pero luego morirían. Los heterocigotos podrían mantener la mutación en heterocigosis y transmitirla, revelando muchos más casos de heterocigotos para *CHD7* en la población sana, situación que no es observada. La contribución epigenética materna en humanos de *CHD7* es la que provoca que estos embriones heterocigotos no sean fértiles en la mayoría de casos, si no se ven compensados por la GCR, explicando el alto número de mutantes heterocigotos. Probablemente, esto se deba a que las mutaciones *de novo* no ocurren en el gameto, sino en la gónada, y es esta la que descompensa las cargas.

La contribución materna se entendía antes en términos de presencia ausencia, sin embargo, con la teoría gradual planteada en esta tesis, podemos comprenderla como una mayor o menor dosis de material sano para el correcto desarrollo, pero también una mayor o menor carga de material enfermo, tanto proteínas defectuosas, como PTCs donados por el ovocito de la madre mutante al óvulo, independientemente del genotipo de estos. La contribución materna, entendida entonces como una mayor o menor presencia o una intoxicación por PTCs podría contribuir a la comprensión de la aparición de fenotipos sin *chd7* mutado en pez cebra e incluso humanos. La pérdida de la contribución materna en forma de RNA y el establecimiento de la impronta podrían ser dos hechos estrechamente relacionados en la evolución de los mamíferos para un desarrollo embrionario interno y el mantenimiento de la robustez genética. Ambos además son la causa de la aparición de estos casos del síndrome de CHARGE en heterocigosis en humanos.

El papel epigenético de la contribución materna del gen *CHD7* en humanos, podría ser también muy importante. Los pocos casos de humanos con mutaciones en CHD7 sin genotipo se explicarían simplemente a que no se han buscado lo suficiente, pero podrían haber sido compensados por la contribución materna, o por una GCR y genes parálogos como *CHD8*. Los casos registrados de humanos con fenotipo CHARGE y sin mutación encontrada en *CHD7* podrían deberse también a un desajuste de este mecanismo de robustez epigenética a través de la GCR y esa intoxicación por PTCs para genes implicados en la senescencia durante el desarrollo embrionario. Solamente una función únicamente cigótica y una respuesta de la GCR por parte de *CHD7*, o una compensación materna, podría explicar la ausencia de

USC UNIVERSIDADE DE COMPOSTELA

fenotipo en heterocigotos humanos. Los casos de humanos con una compensación completa y mutaciones en *CHD7* podrían ser fértiles, lo cual los haría visibles aumentando el número de casos con mutaciones heterocigotas para *CHD7* con o sin fenotipo. Podría haber incluso casos de homocigosis por la compensación materna y cigótica del gen, que fueran fértiles y todos sus hijos heredasen la mutación con o sin fenotipo asociado. No obstante, la importancia materna de *CHD7* podría hacer que estos individuos no fueran fértiles entre ellos.

El papel ahora más evidente de la contribución materna de *chd7* en el desarrollo embrionario de los vertebrados a través de la activación materna de la senescencia embrionaria y el agotamiento de la carga, además de explicar estos casos, podrían ser la causa de encontrar pacientes con fenotipo CHARGE y ninguna mutación asociada. La pérdida de la función materna y el establecimiento correcto de la carga en la etapa anterior a la ZGA, haría que se pudieran mostrar fenotipos asociados al síndrome de CHARGE y los defectos asociados a la dosis de *chd7.* Tal vez en humanos también exista la compensación de *CHD7* mediada por *CHD8*, pero las mutaciones no son lo suficientemente agresivas para activar la GCR o la homología entre las secuencias no es suficiente, y las que activan esta respuesta, solo rescatan parcialmente el fenotipo.

8.5. Las variantes genéticas de *CHD7* en el síndrome de CHARGE

Aunque el síndrome de CHARGE, está causado casi el 80 % de las veces por mutaciones en el gen *CHD7,* también se han encontrado pacientes con mutaciones en el gen de la semaforina 3E (*SEMA3E*, OMIM 608166) (Martin *et al.*, 2001, Lalani *et al.* 2004, Suspitsin *et al.*, 2020), de la familia de las semaforinas, una clase de moléculas involucradas en procesos patológicos y del desarrollo similares a los controlados por *CHD7*, y reguladas por *CHD7* de una manera específica del contexto genético.

Haciendo una revisión de las mutaciones de *CHD7* en humanas registradas en la CHD7 Database (Janssen *et al.*, 2012; http://www.chd7.org/), vemos la importancia de la mutación también en humanos. De las 801 variantes (581 patogénicas, 115 benignas, resto desconocidas) depositadas, solo 149 (47 patogénicas, 27 benignas, resto desconocido) son mutaciones *missense*, mientras que 174 (174 patogénicas, 0 benignas) son mutaciones *nonsense.*

Las mutaciones se producen a lo largo de toda la secuencia codificante y no codificante a excepción de un exón. Esto desvela la importancia ya comentada de las mutaciones *missense* y *nonsense*, y la susceptibilidad a desencadenar la GCR y producir una enfermedad grave también en humanos con mutaciones en *CHD7*, y como dependiendo de estas, puede verse afectada gravemente o no la patogenicidad de la enfermedad. Las mutaciones *nonsense* aunque más propensas a producir PTCs y activar la GCR, son más propensas a producir daños en el DNA que afecten gravemente a la proteína, mientras que las mutaciones *missense* pueden no afectar a esta ni activar la GCR. Por otro lado, la gran mayoría de mutaciones son del tipo *frameshift* (267 variantes) y otras *spilice site* (73), todas ellas patogénicas, que afectan al marco de lectura del ribosoma, o a los sitios de *splicing*, que pueden producir o no PTCs prematuros, pero generalmente afectan gravemente a la secuencia aminoacídica. Estos resultados parecen indicar, que el origen de la enfermedad podría estar en la formación de estos PTCs y no en el gen o genes relacionados con la misma.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Como se ha observado recientemente en pez cebra, la GCR, además de compensar a favor de las variantes sanas, puede también inhibir las variantes enfermas mediante la expresión específica de alelos (White *et al*., 2022). Este efecto compensatorio a favor de la variante sana podría ocurrir en humanos con variantes enfermas que produzcan una PTC, y por lo tanto, rescatando parte de los efectos materno-cigóticos y cigóticos del gen.

8.5.1. La Patología Fenotípica del Síndrome de CHARGE Podría Estar Relacionada con el Aumento de PTCs en las Gónadas, No en los Gametos.

En *Human Gene Mutation Database professional* 2015.2 (HGMD, http://www.hgmd.org/), se informaron de 615 mutaciones CHD7 para el síndrome CHARGE. La mayoría de estas mutaciones eran mutaciones *nonsense*, de cambio de marco lectura (*frameshift*) o del sitio de empalme, que se previó que eran mutaciones que provocan la pérdida de función de la proteína, y que probablemente conduzca a un RNA mensajero aberrante destinado a la degradación a través de la NMD (Zentner *et al.*, 2010). Por lo tanto, se supuso la haploinsuficiencia para *CHD7* como el mecanismo patogénico más probable que subyace al síndrome CHARGE.

En 2016, antes de conocerse mejor estos mecanismos de respuesta a la compensación genética mediados por la NMD y la GCR, se encontró un paciente de síndrome de CHARGE con una mutación *nonsense* en CHD7, con antecedentes familiares, pero sin mutación ni fenotipo asociado en los padres. Los autores en este artículo sugerían: incluso si los transcritos mutados escapasen al NMD, la proteína CHD7 truncada predicha en este paciente contiene solo los cromodominios en tándem N-terminales, que son incapaces de realizar las funciones de la proteína debido a la pérdida de actividad de remodelación de la cromatina (Kohomoto *et al*., 2016)

La proteína de los mutantes *chd7*-CRISPR no contiene ninguno de los motivos funcionales de la proteína Chd7, y el único fragmento de la secuencia aminoacídica que conserva no codifica productivamente para ningún dominio funcional. Ahora sabemos que los transcritos mutados con PTCs que desencadenan la GCR podrían activar la transcripción de la variante sana y reducir la de la expresión de la variante enferma por la vía de la NMD (El-Brolosy *et al*., 2019; Ma *et al*., 2019), por lo que el fallo de la función del gen podría no estar en la compensación cigótica del mutante.

Al principio se entendía esta haploinsuficiencia como un déficit cigótico, producido por el NMD y el decaimiento de la producción de proteína sana. Sin embargo, la mayor parte de mutaciones producen estos PTCs y, por lo tanto, igual que en pez cebra, estas mutaciones son susceptibles a la compensación por parte de la GCR también en humanos, lo cual podría estar muy relacionado con la expresión específica de alelos, la compensación de dosis y la impronta genética (Shao *et al*., 2019; White *et al*., 2022) mediante lo que se conoce como adaptación transcripcional (Rossi *et al*., 2015; Szatal & Stainier, 2020).

8.6. La contribución materna afecta a la GCR

Igual que la GCR se observó como una respuesta al decaimiento del mRNA de un gen a través del NMD, siendo probablemente una consecuencia, pero no la causa, se descubrió que se debía al aumento de los PTCs de la variante patogénica (Ma *et al.*, 2019), la contribución materna podría ser también ser un mal entendimiento de la misma.

USC UNIVERSIDADE DE COMPOSTELA

El mutante para el gen *pdgfrb* generado por TALEN, se ve recompensado ante la presencia de PTCs debido a su efecto únicamente cigótico y, por lo tanto, susceptible; sin embargo, con una GCR alta por su duplicación en el genoma del pez cebra, el alelo sano también se ve recompensado (Ando *et al*., 2021). Para los genes maternos puede que esto no sea así. El aumento de los PTCs de origen materno para un gen materno, podría producir fallos en el desarrollo normal del embrión en el efecto materno y materno-cigótico del gen, al producirse un desequilibrio entre las cargas, materna y cigótica, necesarias para el correcto desarrollo y la compensación genética, independientemente del genotipo de este. Las variantes *missense* que encontramos en la población sana seguramente no desencadenen estas PTCs a pesar de producir graves fallos en la función de la proteína.

Si las GCR se desencadenan por las PTCs sería lógico pensar que cualquier PTC desencadenaría una GCR aunque solo fuera a favor de su copia sana. En los peces cebra heterocigotos para *chd7,* una única copia es suficiente para compensar la deficiencia en *chd7* y activar la senescencia embrionaria sin apenas defectos observables (Arana, 2016; Sun *et al.*, 2022), lo que revela la importancia de la carga materna. Sin embargo, los mutantes homocigotos también controlan bien esos niveles de senescencia a pesar de su ausencia cigótica, pero en la transición a la etapa completamente cigótica mueren. Los mecanismos de compensación también podrían estar activos y aumentar la expresión de *chd7* debido a las PTCs. Si los hermanos WT también muestran fenotipo antes de la muerte del homocigoto, es por la activación de estas PTCs por parte de la madre. No se explicaría la presencia del fenotipo si no fuera por la contribución materna de la madre.

Como hemos comentado, parece que la GCR y la NMD son vías independientes, incluso puede que temporalmente incompatibles (Ma y Chen, 2020). La NMD protege principalmente a la célula contra los efectos nocivos de los PTCs. Actualmente, existe una creciente evidencia de las diferencias específicas de mutaciones, codones, genes, células y tejidos en la eficiencia de la NMD y como estas pueden alterar la patología de la enfermedad subyacente (Frischmeyer y Dietz, 1999, Khajavi, Inoue y Lupski, 2006; Holbrook *et al.*, 2004; Bashyam, 2009). En ciertos trastornos genéticos, la NMD puede actuar agravando la patología de la enfermedad y empeorar el fenotipo, porque la degradación del mRNA mutado impide la traducción y la acumulación de péptidos truncados que conservan la actividad residual (Muhlemann *et al.*, 2008; Khajavi, Inoue y Lupski, 2006; Holbrook *et al.*, 2004) Además, existe evidencia de que la variabilidad interindividual en la eficiencia de la NMD conduce a diferencias en la presentación de la enfermedad y el resultado terapéutico (Doma y Parker, 2007) La NMD se ha revelado como un poderoso modulador de la gravedad de la enfermedad y el fenotipo clínico, tanto de manera positiva como negativa, debido a su importante función en el reconocimiento y degradación de los transcritos mutados. Por lo tanto, la GCR podría ser también relevante, debido al escape de estas variantes y la sobreestimulación de esta vía.

8.6.1. La Contribución Materna Es Gradualmente Positiva y Negativa

El concepto de la contribución materna es importante tenerlo en cuenta para generar modelos mutantes en el pez cebra. No obstante, esta teoría podría presentar limitaciones y contradicciones que podrían ser respondidas por la teoría de la contribución materno-cigótica gradual. Esta teoría ayudaría a entender mejor el proceso de la GCR activada a través del

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

aumento de las PTCs, y realizar así una mejor comprensión la patología del síndrome de CHARGE:

- Contribución materna gradual positiva: concentración variable de proteínas y mRNA donados por la madre, susceptible de producir proteínas de producción materna sana, óptima y suficiente para el desarrollo correcto del organismo.
- Contribución materna gradual negativa: concentración variable de proteínas y mRNA donados por la madre, susceptible de producir proteínas de producción cigótica defectuosa, subóptima e insuficiente para el desarrollo correcto del organismo, además es susceptible o no a activar GCR. Por lo tanto, esta podría dividirse en dos: una contribución negativa por parte de una proteína defectuosa o una carga insuficiente, lo que produciría efectos maternos; o una contribución negativa tóxica, por el aumento de los PTCs y la sobreactivación de la GCR, lo que podría producir efectos maternos y materno-cigóticos (tóxicos).

Estas tres contribuciones podrían interactuar en el desarrollo del organismo y producir una GCR, pero unas veces podrían jugar a favor y otras en contra, dependiendo de la mutación. Por lo tanto, la GCR también sería gradual en presencia de una mayor o menor concentración de PTCs depositadas por la madre. Y la respuesta a la presencia de estas PTCs sería una mayor o menor respuesta de la GCR a cada tipo de contribución materna, o materno-cigótica gradual. Esta respuesta también sería ampliable a los genes únicamente cigóticos con PTCs.

- GCR gradual: respuesta de los mecanismos compensatorios de la expresión génica, a la presencia de variantes enfermas de un gen con un PTC, en favor de su variante sana y los genes parálogos. rescatando o no el fenotipo de los mutantes.

Por lo tanto, una podría ser la contraria de la otra. La contribución materna gradual negativa producirá una GCR positiva o alta, positiva, producirá una GCR negativa o baja. Sin embargo, no necesariamente sería siempre así, y podría depender del tipo de mutación y del tipo de gen materno o cigótico.

Las distintas respuestas de la GCR a la recapitulación fenotípica para los genes cigóticos y maternos no se explica. La contribución materna positiva y negativa gradual en los genes maternos y materno-cigóticos implica una respuesta a la GCR mayor o menor en la descendencia gracias a la teoría gradual del producto materno, provocando así la mortalidad del embrión o el rescate del mismo para los genes maternos (genes inmunes), y la variabilidad fenotípica observada también en los materno-cigóticos (genes de "Schdrödinger"), independientemente del genotipo.

1. En un gen materno, una mutación *nonsense* qué active una GCR, supondría la intoxicación de los embriones tanto mutantes como WT debido a la descompensación materna y la respuesta exagerada a la presencia de PTCs en la carga materna. Sin embargo, una mutación *missense*, podría conducir al rescate fenotípico, si el daño en la proteína no es muy grave y la contribución materna no activa la GCR.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

2. En un gen materno-cigótico, una mutación *nonsense* que active una GCR, supondría la intoxicación de los embriones tanto mutantes como WT debido a la descompensación materno-cigótica y la respuesta exagerada a la presencia de la contribución negativa materna. Una mutación *missense*, podría conducir al rescate fenotípico en la transición cigótica, si el daño en la proteína no es muy grave igual que en los maternos . Este rescate del fenotipo ocurre siempre en la transición cigótica en los mutantes *chd7*-CRISPR.

3. En un gen cigótico, una mutación *missense* podría afectar más gravemente al fenotipo, al no activarse los mecanismos compensatorios producir un efecto grande. Mientras que una mutación *nonsense*, produciría efectos de rescate en favor de la variante sana o de los genes parálogos, llevando así al rescate fenotípico del embrión.

Los heterocigotos materno-cigóticos deberían morir como los homocigotos, pero no mueren porque compensan en la fase cigótica con la activación de la GCR o porque la mutación no es tan deletérea. Seguramente los humanos con síndrome de CHARGE heterocigotos con variantes *missense* que afectan gravemente a la proteína en heterocigosis mueren por no activar la GCR en la fase cigótica, evidenciando el bajo número de estos casos.

8.6.2. El Tipo de Mutación en la Respuesta al síndrome de CHARGE.

La GCR parece que se comporta de manera diferente en las mutaciones en genes maternos que cigóticos, sin embargo, como hemos explicado, estas discrepancias se deben a la contribución materna y el tipo de mutación. Las mutaciones que producen PTCs son más propensas a activar los mecanismos de GCR. Las que producen graves daños a la secuencia, pero no producen PTCs no afectaría a este rescate genético por parte del cigótico

La causa del síndrome de CHARGE, debido a mutaciones heterocigotas en el gen *CHD7*, se debe a un desequilibrio entre la carga materna y cigótica. Esto no es muy complicado, ya que la mayoría de mutaciones *de novo* son como hemos dicho en las gónadas, y son estas las que ajustan las cargas de los óvulos. Por lo tanto, el tipo de mutación es lo que más influirá en el fenotipo dependiendo de su capacidad de activar o no la GCR.

- Si la madre compensa la parte materna con contribución materna positiva que no active la GCR materna, el embrión seguramente se desarrolle completamente hasta la parte completamente materno-cigótica y estabilizándose en la entrada de la etapa cigótica. El gen se comporta entonces como un gen únicamente cigótico y el rescate del fenotipo completo depende únicamente de la capacidad del tipo de mutación de activar la GCR en la etapa cigótica.

- Si la madre compensa la parte materna con contribución materna negativa que no activa la GCR, el embrión no se desarrollará defectuosamente hasta la función materno-cigótica con múltiples anomalías asociadas a esas etapas. El gen se comporta entonces como un gen materno dependiendo de la capacidad del tipo de mutación de activar o no la GCR.

- Si la madre compensa la parte cigótica con una contribución materna negativa con una respuesta alta a la GCR, se alterarán los embriones independientemente del

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

genotipo debido a la respuesta de la GCR a la intoxicación por PTCs y los ajustes de cargas de ambos genes, produciendo la desestabilización materno-cigótica en todo el proceso, hasta el establecimiento cigótico, donde dependerá también de la capacidad del gen de activar la GCR. El gen se comporta entonces como un gen materno-cigótico, y los efectos de la mutación apenas serán observados en los mutantes por el ajuste entre las cargas materna y cigóticas, pero sí se observarán alteraciones en los WT.

8.6.3 la Inmunidad Está en la Necesidad.

La GCR solo se desencadena por PTCs, no por otras mutaciones que también pueden afectar gravemente la función de la proteína. Para estas mutaciones la contribución materna negativa jugaría al contrario, y la contribución materna positiva a veces podría no ser suficiente y produciría un rescate leve en los mutantes para algunos genes materno-cigóticos, o únicamente cigóticos con activación por la madre. La contribución materna negativa podría producir fenotipo más grave en el WT por activar la GCR.

En el caso de WT con contribución materna gradual positiva, pero con variantes enfermos de la madre con PTCs, podrían verse compensados por una GCR sin necesidad de ella, y producir efectos derivados a la activación sobreexpresión de los genes.

En este sentido, la relación entre la carga en PTCs, en la contribución materna gradual, y la activación de la GCR, parece un mecanismo de inmunidad celular a las mutaciones en ciertos genes que podríamos decir inmunes. Estos genes podrían ser los mismos que vemos en el análisis de datos y que denominamos genes inmunes (genes maternos) y de “Schrödinger”, (genes materno-cigóticos), y aquellos que tienen una función cigótica, pero una GCR muy grande, seguramente también sean necesarios para el desarrollo y la maduración.

Probablemente, no sea tan complicado como lo aquí expuesto, y los únicos genes inmunes sean los propios genes de “Schrödinger”, pero los resultados nos han llevado a entenderlo de una forma más compleja. La forma más simple sería:

1. Los genes susceptibles e inmunes serían una única clase de genes susceptibles donde estarían los genes con una función materna o cigótica alta, baja o nula, pero una contribución materna muy baja por parte del pez cebra para el desarrollo cigótico y una GCR muy baja. Ambas compensaciones muy bajas en mamíferos en comparación por las razones ya descritas del pez cebra.
2. Los genes de “Schrödinger” serían aquellos con una función materna y/o cigótica tan grande que los hace complicados de observar fenotípicamente, pero no imposible. Estos genes también podrían tener un importante efecto en el desarrollo adulto y causar los fenotipos tardíos observados en adultos. Los efectos de la contribución materna y de la GCR, por tanto, serían muy altos y afectarían mucho a la comparación fenotipo-genotipo.

8.7. VARIABILIDAD FENOTÍPICA EN GENES MATERNO-CIGÓTICOS EXPLICADA POR LA PRESENCIA DE PTCS

En los heterocigotos descendientes de *outcross*, el genotipo WT podría recibir material defectuoso de un gen materno, pero de un gen cigótico es más complicado si no hay contribución materna para ese gen. Los descendientes de un *outcross* de heterocigotos de un gen cigótico, no les afectaría la ausencia de contribución materna, y no mostrarían fenotipo

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

gradual, por tanto habría homogeneidad fenotípica dentro de cada genotipos, y no habría diversidad fenotípica, si no hay respuesta a la GCR por parte del gen cigótico.

Por lo tanto, para un gen dado con una mutación que produce PTCs el efecto de la contribución materna gradual para ese gen, es una mayor o menor respuesta de las células a la deposición de PTCs, mediante la activación de los genes parálogos durante la GRC para cualquier gen, materno o cigótico, depositado por la madre.

La respuesta de la GCR en los genes cigóticos, sin contribución materna, solo se observaría si tienen una carga insuficiente de producto sano o mucho producto defectuoso para ese gen o genes relacionados, que la madre, heterocigota u homocigota para ese gen, podría haber depositado en el huevo erróneamente. Lo que provocaría la ausencia de fenotipos en los heterocigotos y homocigotos hasta la activación de los mismos en la etapa cigótica, y por tanto, retrasando el fenotipo por la imprescindibilidad de los mismos hasta ese momento. Este aumento de los PTCs y la respuesta tóxica en los WT, podría tener una relación con los efectos *off-target* de intoxicación observados con los iRNA, pero no con los morfolinos.

Como hemos visto, también se ha observado la capacidad de *chd7* de unirse a otras proteínas que forman parte del sistema de compensación mediado por la GCR. Las mutaciones en estas proteínas, sumado al aumento de PTCs en la población sana, podría ser la causa de la asociación de muchos fenotipos CHARGE en pacientes sin mutación, así como la asociación fenotípica también con otros síndromes genéticos

La causa de la gran variabilidad genética y fenotípica del síndrome de CHARGE podría estar relacionada con este aumento de los PTCs de origen materno, o mutaciones genéticas que implican pérdida de función, pero no la activación de la GCR, situadas en las gónadas, pero no en el ovocito, del gen *CHD7* o de otros genes maternos o paternos relacionados con el programa de senescencia celular u otras rutas específicas de tejido en los que también estaría involucrada la actuación de *CHD7.*

8.7.1. Los PTCs Afectan a Línea Germinal Pero No a la Somática

El 78 % de los pacientes con mutaciones en *CHD7* tienen mutaciones *nonsense* y *frameshift* que provocan la aparición de PTCs, mientras que el 11 % de los pacientes tienen mutaciones *splice site* y un 8 % restante mutaciones *missense* (Janssen *et al.*, 2012, Butcher *et al.*, 2017). Sin embargo, las consecuencias perjudiciales de la sustitución de un solo aminoácido son muy difíciles de determinar, lo que dificulta el asesoramiento genético.

La firma de metilación del DNA se ha propuesto como una herramienta de diagnóstico para trastornos que involucran proteínas que asisten a la maquinaria epigenética como el síndrome de CHARGE (Aref-Eshghi *et al.*, 2018, Bouazoune y Kingstone, 2012). Como hemos comentado, existen registros de un pequeño número de casos de síndrome de CHARGE familiar y transmisión de padres a hijos de mutaciones *CHD7* (Lalani *et al.*, 2006; Delahaye *et al.*, 2007; Jongmans *et al.*, 2008; Vuorela *et al.*, 2008; Wincent *et al.*, 2008; Pauli *et al.*, 2009). En estos casos, los padres suelen mostrar un fenotipo CHARGE leve o son completamente asintomáticos, mientras que sus hijos si presentan defectos graves.

Estos casos podrían ser realmente mutaciones *de novo* en el espermatozoide, y producir un aumento de los PTCs en la etapa materno-cigótica y cigótica. Puede también que la abuela tuviera la mutación, pero no le transmitiera los PTCs al padre, por lo que recibió una

USC UNIVERSIDADE DE COMPOSTELA

compensación materna sana, y un desarrollo correcto en todas las etapas, hasta su propia regulación cigótica de *CHD7*.

El mosaicismo somático para la mutación *CHD7* también se describió en una madre asintomática de dos hermanos afectados (Jongmans *et al.*, 2008). Revelando la importancia de las mutaciones en las gónadas y la contribución materna y positiva. El mosaicismo de células germinales paternas también fue descrito en un padre asintomático de dos niños afectados (Pauli *et al.*, 2009). Por lo tanto, parece que en los casos de transmisión parental de mutaciones *CHD7*, los padres con las mutaciones están levemente afectados o son asintomáticos y solo sus hijos muestran el espectro completo de características de CHARGE. Dando evidencia de que las mutaciones en *CHD7* no produce apenas la deficiencia cigótica, sino una deficiencia materna y materno-cigótica.

8.7.2. La Posición del PTC Podría Influir en la Actividad de la GCR

Investigaciones recientes demostraron que las mutaciones de los pacientes con *CHD7* tienen consecuencias que van desde la inactivación sutil hasta completa de la actividad de remodelación del DNA. Estos estudios también demostraron que es probable que las mutaciones que conducen a truncamientos de proteínas aguas arriba del aminoácido 1899 de *CHD7* provoquen un fenotipo hipomórfico para la remodelación (Janssen *et al.*, 2012; Bouazoune y Kingston, 2012). Por lo que la remodelación del nucleosoma es una función clave de CHD7 durante los procesos de desarrollo, como la senescencia embrionaria y la diferenciación de tejidos. La razón de que estas mutaciones provoque este fenotipo hipomórfico podría no depender de la pérdida de la actividad de la proteína, sino también de la presencia de PTCs. Estas mutaciones seguramente produzcan PTCs al producir, el truncamiento de la proteína. Durante la etapa materna, estos PTCs donados por la gónada parental al gameto, no serían capaces de producir una estimulación tan grande de las vías de la GCR, al no ser tan prematuras con respecto al inicio de transcripción. La proteína, producto de la transcripción de estas, podría conservar algunas funciones incluso, y activar las células para el programa de senescencia celular, pero no ser tan efectivas.

Al no haber una respuesta de compensación cigótica, las proteínas de la madre provocan el agotamiento de la carga en la fase de la MBT y activación de la ZGA, y el único alelo sano, aunque pueda producir un efecto compensatorio a través de la activación de la GCR o la propia ausencia de proteína efectiva, cae a niveles subumbrales y la célula no consigue inhibir los niveles tan altos de expresión de *p53*. En el caso de que si consiguiera una respuesta compensatoria, los niveles se equilibrarían pero seguramente con alteraciones, produciendo el aumento de la expresión de los inhibidores del ciclo celular y retrasos en la entrada en senescencia embrionaria en la fase cigótica, o incluso una sobreexpresión de *CHD7,* que es lo que se observa en individuos heterocigotos cigóticos (Fig. 50B; Arana, 2006). Las alteraciones materno-cigóticas podrían ser solapamientos y perturbaciones de los de los programas maternos y cigóticos de compensación, mediante el escape de los mRNA maternos de las vías de degradación como la NMD, y estimulando la compensación cigótica por GCR de forma innecesaria. Por lo que se propone estudiar en investigaciones futuras estos mecanismos de compensación genética a través de la GCR y la NMD en etapas embrionarias como una posible causa de las alteraciones materno-cigóticas del síndrome de CHARGE,

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

probablemente debida a la presencia de PTCs en los gametos. También se propone analizar cómo podría afectar la posición del PTC y la homología en la activación de la GCR.

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

9. EL PROGRAMA DE SENESCENCIA EMBRIONARÍA EN PEZ CEBRA A TRAVÉS DE *CHD7*

La senescencia embrionaria constaría de 5 fases en los que estaría involucrada la actuación parental y cigótica de *chd7* y *p53*, y la actuación cigótica de los inhibidores del ciclo celular p15 y p21, activados por *foxo*. Las cinco fases se dividirían en 3 etapas de desarrollo y 2 puntos de control en los que actuaría *chd7* como activador/inhibidor del programa de senescencia celular (Fig. 56 y Sup. 2).

1. Etapa materna: Activación materna de los programas del desarrollo.

En esta etapa únicamente materna, podría ocurrir también una entrada y salida de la senescencia programada en aquellas células que tuvieran niveles de expresión suficientes de *chd7* para la entrada en senescencia embrionaria posterior (Fig. Sup. 2; Villiard *et al.*, 2017). A las 2 hpf ocurre un incremento de la expresión de *p53* y el consiguiente aumento de *chd7* en esas células, en las que la carga previa de *chd7* es suficiente para inhibir la transcripción de p53 (Fig. 55). En algunas células puede que produjera represión de ambos, y se diferenciarían en un tejido concreto.

De esta forma se produce un evento de senescencia celular en las células que lo contienen, como las células precursoras de la cresta neural, para activar el desarrollo posterior de unas células y otras, mediante la caída de la expresión de *chd7* a niveles subumbrales y el aumento de nuevo de p53 (Fig. 55). Una proteína de *chd7* materna mutante, que no produjera bien un bloqueo de p53, haría subir los niveles de este más rápidamente. Por lo tanto, el ajuste de la carga entre *p53* y *chd7* en este punto dependería de la eficacia de la proteína materna, y de la proteostasis celular.

En esta fase se podrían producir defectos por la deficiencia de la contribución materna, produciendo la apoptosis o un aumento de la proliferación de algunas células por no detener a tiempo la subida de la expresión de *p53*, prolongando la entrada en senescencia. Bloquear esta primera subida de p53 dependerá de la contribución materna positiva, negativa y en PTCs, pero también del tipo de mutación cigótica.

2. Punto de control: Transición materno-cigótica y activación del desarrollo.

A niveles altos de expresión de *chd7* la actividad de la proteína Chd7 cambia, y deja de inhibir la transcripción de *p53* y la suya propia. Al caer los niveles de *chd7*, el gen de *p53*, se transcribe a niveles más altos, y esa es la señal para la activación de la transcripción de *chd7* Por lo que la expresión de *chd7* aumenta, siempre y cuando continúe habiendo niveles de expresión de *chd7* óptimos para producir de nuevo su transcripción, y volver a inhibir la transcripción de *p53*.

En este punto de control, también se produciría interacción materno-cigótica entre el producto materno y el producto cigótico que podría producir los desajustes en la GCR debidos a las PTC. Podrían estar implicados tanto la disfunción de la proteína como la el PTC, produciendo todavía más desequilibrios entre las cargas.

USC UNIVERSIDADE DE COMPOSTELA

3. Etapa materno-cigótica: Regulación del desarrollo.

Si los niveles de expresión de *chd7* consiguen elevarse lo suficiente, para inhibir la expresión pero no reprimir a p53, ambos niveles bajan de nuevo, pero el cambio en la actividad de *chd7* vuelve a activar los niveles de p53, produciendo la proliferación y migración de células todavía sin diferenciar, y activa el programa de desarrollo embrionario de esas células, mediante la expresión de genes diferenciados como los genes *sox9 y sox10.*

En estas células estaría ocurriendo todavía la interacción materno-cigótica del RNA y, por tanto, de los PTCs, por lo menos en el pez cebra. Pero hay que recordar que esta contribución no solo es en cuanto a la cantidad de RNA sino también de proteína, y se desconocen los tiempos de vida y estabilidad de las proteínas *chd*. El material proteico de los padres podría estar todavía unido al DNA y, por tanto, cumpliendo una función deficiente de *chd7*. En el pez cebra si habría efectos de descompensación por parte de los PTCs paternos y estimulación de la GCR que podrían causar todavía efectos en embriones WT.

4. Punto de control: Transición cigótica y activación de la senescencia embrionaria.

Como los niveles de p53 vuelven a subir, vuelve a aumentar la expresión de *chd7*, y la actividad de la proteína Chd7, que está a niveles bajos, cambia de nuevo, y activa su capacidad inhibidora de la expresión de *p53*. En este momento, el gen, se comienza a comportar como un gen únicamente cigótico, y con una respuesta normal a la compensación por parte de los PTC. Esto no haría a penas daño a los embriones con genotipo WT o heterocigotos *chd7* si han tenido una contribución materna positiva, y se produce el rescate fenotípico. En pez cebra, la contribución materna de los PTCs dejaría de tener importancia, por agotamiento y la activación de la GCR sería casi únicamente cigótica, por lo que ajustaría bien los niveles del gen sano. Sin embargo, una proteína ineficiente, podría provocar alteraciones en este momento, que podrían no haber sido vistas en etapas anteriores por haber tenido una contribución materna sana.

En este momento, como un gen únicamente cigótico en humanos, la compensación dependerá únicamente de la activación de la GCR (tipo de PTC y homología), y del daño a la proteína y el cumplimiento de sus funciones remodeladoras de la cromatina.

5. Etapa cigótica: Regulación de la senescencia embrionaria

La expresión de *chd7* aumenta, pero sabemos que para qué se activa la senescencia tiene que estar a niveles bajos. En las células en las que sube e inhibe la expresión de *p53*, *p53* baja sus niveles de expresión. Pero la capacidad de inhibir a *p53* baja, y sus niveles de expresión también. En ese momento comienza la entrada de la expresión cigótica de *cdkn1a* y *cdkn2a/b* que seguramente aumenten los niveles de expresión de p53, para conseguir un equilibrio entre la expresión de *chd7* y *p53* y que Chd7 no se agote, entrando así en senescencia embrionaria a niveles umbrales de *chd7* y *p53*, sin que haya un desequilibrio de las cargas, volviendo a las células senescentes, e inmunes a estímulos apoptóticos.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

En las células en las que los niveles de *chd7* no fueran suficientes para producir la inhibición de p53, se produciría la proliferación descontrolada y entrada en apoptosis de las células. Sin embargo, en aquellas en las que la carga de *chd7* es capaz de reprimir la expresión de p53, se produciría la diferenciación del tejido. En estos tejidos, los genes *sox9 y sox10*, podrían actuar en la etapa anterior, produciendo un aumento de los niveles de *chd7*, para producir una mayor inhibición de p53. El gen *chd7* activa su expresión en la etapa materno-cigótica, pero en la etapa cigótica los inhibe.

Al entrar estos en la etapa anterior se sobreexpresan, produciendo la diferenciación del tejido ineficiente debido a la contribución materna, por no poder equilibrar los niveles en la etapa materno-cigótica. Esto sería gradual, por lo que causaría un fenotipo gradual en los embriones. Sin embargo, en la etapa cigótica la compensación cigótica equilibraría los niveles de expresión de *chd7* y se conseguiría una inhibición controlada de los genes *sox9* y *sox10*.

Actuando estos genes *sox* como un potenciado de la expresión de *chd7* tendría sentido que en morfantes de *chd7* la bajada de los niveles de estos genes, rescate el fenotipo, ya que a su vez, *chd7* sería un activador e inhibidor de estos, igual que de *p53*. Sin *chd7* suficiente para regular la expresión de estos, los niveles de los genes que son regulados, no activados ni reprimidos, por chd7, estos se sobreexpresan, por qué *chd7* es un necesario para la activación e inhibición controlada.

Se ha demostrado que las proteínas con pérdida total de función en *chd7* se unen a los genes y activan su transcripción. Por tanto, las proteínas de Chd7 defectuosas son suficientes para activar la transcripción, pero no son capaces de inhibir la misma. Estos genes, al igual que p21 y p15, sufren una descompensación materno-cigótica, al solo expresarse en la ZGA, mientras que p53 sufre una descompensación materna y materno-cigótica, causando así desajustes en la etapa materna, la transición materno-cigótica y la etapa cigótica del desarrollo. Esto explica que puedan ser rescatados fenotípicamente los homocigotos de ratón y los morfantes de pez cebra para *chd7*, con la bajada en la dosis de los niveles de *p53*, hasta la entrada completamente cigótica de la función de *chd7*

Una secuencia sin PTCs y una contribución materna positiva, no produciría efectos o produciría efectos leves relacionados con este momento únicamente cigótico. Esto provocaría una descompensación de la carga cigótica a la hora de reparar el fenotipo a través del programa de senescencia embrionaria en los tejidos que expresan *chd7*.

La caída en la dosis, en el momento de entrada de la función únicamente cigótica, de una proteína Chd7 defectuosa, y que su mutación no activase la GCR, en un embrión que haya tenido una contribución materna lo suficientemente positiva para el desarrollo anterior, produciría fenotipos en esta única parte del establecimiento de la diferenciación, apoptosis y senescencia embrionaria.

9.1. Contribución epigenética

Si CHD7 es un factor epigenético (Zentner *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2014; Martin *et al.*, 2015), la contribución materna del fenotipo CHARGE no solo estaría en el producto parental de *CHD7*, proteínas y RNA, sino en todo el material epigenético para la transcripción e inhibición rápida de la proliferación celular, en la que están *p53* y *chd7* implicados, antes de la transcripción cigótica. En algunas células, durante esos dos eventos de aumento y diminución de la expresión de *chd7* y *p53*, es donde se comienzan a observar células con actividad SA-β-

USC UNIVERSIDADE DE COMPOSTELA

Gal en estadio de 32-64 células y domo (Villiard et al., 2017), y que luego darán lugar a las células de la cresta neural y del resto de órganos y tejidos programados para la senescencia celular.

En los eventos de aumento y disminución de la expresión de p53 (Fig. 55) si la contribución parental por parte de la impronta tanto de *CHD7* como del resto de material epigenético, no ha conseguido bajar los niveles de expresión de *p53* anteriores, es donde se verán efectos de la contribución materna de humanos y provocara afecciones relacionadas con el fenotipo CHARGE pero sin mutaciones en *CHD7*. De la misma forma, podría afectar aportando un material aún mayor erróneamente que aplacase la señal de p53 y no entrar en senescencia en algunas células o un arresto celular permanente, y así causar alteraciones como ausencia de tejidos, al no poder proliferar ni migrar esas células. Esto podría ser el efecto de las PTCs.

Esta contribución epigenética del fenotipo CHARGE, estaría afectando todavía más a los pacientes con el gen *CHD7* mutado, causando así el amplio espectro fenotípico observado en humanos, al añadir a todas las proteínas relacionadas con CHD7 en esa primera etapa del efecto materno. Los padres, mediante la impronta, estarían controlando que el resto de células no mueran o se diferencien antes de tiempo, para la siguiente subida de los niveles de expresión de *p53*, en la entrada en senescencia de los tejidos embrionarios programados por ellos.

En 2019, se han identificado 295 genes de maquinaria epigenética responsables de más de 80 enfermedades humanas (Boukas *et al.*, 2019). Estos genes codifican diferentes componentes epigenéticos que presentan dominios de proteínas que ejercen actividades de escritor, borrador, lector y remodelador o una combinación de estas funciones (por ejemplo, una proteína podría incluir tanto un dominio de escritor como de lector) (Fahrner y Bjornsson, 2019). Los pacientes afectados por cromatinopatías muestran características clínicas compartidas, como discapacidad intelectual (DI), crecimiento anormal, y una etiología compartida, que se basa principalmente en la interrupción de genes sensibles a la dosis que conducen a la haploinsuficiencia (Bjornsson, 2015; Fahrner y Bjornsson, 2019). Todas estas características coinciden con *CHD7* y el síndrome de CHARGE

9.2. La descompensación materno-cigótica altera los programas del desarrollo

En este estudio, se pone de manifiesto que existe una importancia de una función parental improntada del gen *CHD7* también en humanos. Los homocigotos maternos y materno-cigóticos posibles se mueren. La pérdida de la función materna, o el desequilibrio de la función materno-cigótica, es la causa de la mayoría de los fenotipos asociados al síndrome de CHARGE. Esta pérdida o desajuste entre las cargas materna y cigóticas del gen *CHD7*, producen alteraciones en el establecimiento y regulación del programa de senescencia embrionaria, en los tejidos activados por la madre, para su futura regulación, por parte también de *CHD7.*

Parece, por lo tanto, que el origen de la enfermedad ocurre por una ineficacia de la compensación materna y cigótica de mantener la inhibición de p53 en esos dos momentos clave, de encendido y apagado de la senescencia embrionaria. La deficiencia en la dosis de *chd7* conlleva al agotamiento o un mal ajuste de la carga de *chd7*. La inyección de dosis altas de *chd7*-MO induce la letalidad dentro de las 24 hpf, y los embriones inyectados en una dosis

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO

más baja mostraron fenotipos como anomalías oculares, anomalías de los otolitos, defectos craneofaciales (Patten *et al.*, 2012; Asad *et al.*, 2016), defectos cardíacos, e hipoplasia de la aleta pectoral (Balasubramanian *et al.*, 2014). Ninguno de estos fenotipos se puede rescatar mediante la inyección conjunta de morfolinos *chd7* y *p53* (Patten *et al.*, 2012; Balow *et al.*, 2013)

Lo que indica que estos fenotipos no están causados por la apoptosis o una mala migración de las células en la etapa materna y materno-cigótica. Pero tampoco estarían causados por los efectos *off-target* de los morfolinos, sino que se produce por una mala regulación de p53 por parte de Chd7 en el final de la etapa materno-cigótica y cigótica. A diferencia de nuestros mutantes, ninguno de los mutantes para *chd7* en pez cebra, ha mostrado una gravedad similar de los síntomas similares a CHARGE comparables a los de los morfantes, seguramente por una buena recuperación de la función cigótica o la contribución materna positiva. Es probable que una bajada en los niveles de p53 rescatase el fenotipo también en esa segunda fase de entrada y salida de la senescencia celular, en la transición cigótica de los heterocigotos para *chd7*, pero seguramente no de los homocigotos.

No es una deficiencia por la haploinsuficiencia en *chd7,* lo que causa la enfermedad, sino un desequilibrio de la carga materno-cigótica, por eso juega en dos sentidos, causando así la gran discrepancia fenotípica pero una gran especificidad de tejido, como la pérdida o aparición de estructuras en los mismos tejidos y órganos. Los resultados de este trabajo confirman y amplían las observaciones realizadas por Rhinn *et al.* (2022) para todos los tejidos en los que se encuentra senescencia embrionaria, donde demuestran que una senescencia mal regulada en las células del neuroepitelio puede contribuir a defectos de desarrollo (Rhinn *et al.* 2022).

La deficiencia de la carga materna y el desequilibrio materno-cigótico, en esas subidas de los niveles de p53, en los momentos de regulación del desarrollo embrionario, aborta el desarrollo de los embriones debido a la inhibición de la expresión de *p53*, por lo que podría que los efectos *off-target* de los morfolinos, que provocan el amento de la expresión de *p53*, podrían estar relacionadas. Resulta muy llamativo como en los vertebrados, observado desde especies tan alejadas evolutivamente, como los humanos y el pez cebra, este control de la senescencia embrionaria esté tan relacionado con la dosis de ambos genes, *chd7* y *p53*, lo que podría imposibilitar la duplicación genética para solo uno de ellos para el mantenimiento de la proteostasis de los programas celulares. En este sentido, puede que los elefantes también tengan 20 copias de *CHD7*.

Como Mera-Rodríguez *et al.* (2021) comprobaron recientemente, existe una fuerte señal de SA-β-Gal que se solapa con la de muerte celular en el tejido interdigital de las extremidades en desarrollo y muchas de las células marcadas pasan a sufrir posteriormente apoptosis. Sin embargo, esto puede ser parte del programa de senescencia embrionaria, regenerando el tejido, madurándolo, diferenciándolo o induciendo la apoptosis y ayudando en la remodelación de los tejidos transitorios. La razón de este solapamiento podría ser la concurrencia de estos eventos en los tejidos en todo momento y la posible regulación por parte de *CHD7*. El parecido de estas células con las células en los tejidos en regeneración también es muy grande, y estos dos eventos también se solapan (Ohta *et al*., 1994; Greenhalgh, 1998; Brown, Kay y Greenhalgh, 1997; Ozaki *et al*., 2001; Coppé *et al.*, 2010; Kuilman y Peeper, 2009; Tatullo *et al.*, 2015; Hernandez-Segura *et al.*, 2018; Da Silva-Álvarez *et al*., 2019).

USC UNIVERSIDADE DE COMPOSTELA

Esto podría apoyar la hipótesis de que *CHD7* es un regulador también de la senescencia en la reparación de tejidos, inhibiendo la proliferación y apoptosis descontrolada por parte de p53 y marcando un límite al tejido mediante esta inhibición y perfilando así su crecimiento y regeneración. Por lo que parece que la senescencia embrionaria podría acabar en una muerte celular o incluso en la diferenciación del tejido a través de la inhibición de p53 (Chakradeo et al., 2016). Al igual que en el pez cebra (Fig. 43), en embriones de pollo los fotorreceptores y las células del epitelio pigmentario también exhibieron actividad SA-β-Gal a lo largo del desarrollo de la retina, y esta actividad se coexpresaba con la inmunorreactividad de p21 (Mera-Rodríguez *et al.* 2021). Según Mera-Rodríguez *et al.*, la actividad SA-β-Gal no puede considerarse un marcador específico de senescencia durante el desarrollo de la retina, y se expresa principalmente en subpoblaciones de neuronas posmitóticas, que son células no proliferativas, incluso en etapas tempranas de diferenciación celular (Mera-Rodríguez *et al.* 2021).

Nuestros resultados, al contrario, apoyan la hipótesis de que la senescencia embrionaria actúa en la remodelación de los tejidos como un estado transitorio junto con el resto de programas de proliferación, migración, diferenciación y apoptosis, y que el control en la entrada y salida de estos programas en los tejidos senescentes lo tiene *CHD7* y su carga. Por eso se observa un solapamiento de actividades que durante el desarrollo adulto son difíciles de presenciar debido a los bajos niveles de expresión de *CHD7*. La razón de este solapamiento también en cuanto a expresión genética probablemente se deba al tamaño del organismo durante el desarrollo y a esta competencia de señales en los tejidos. El análisis de los tejidos embrionarios se complica en el pez cebra, pero los diferentes programas del desarrollo probablemente sean más capaces de colaborar en un organismo pequeño y plástico, que uno grande y diferenciado. En este sentido, los programas de impronta de los mamíferos, podrían ser un mecanismo para evitar este solapamiento de señales en los tejidos ya maduros y diferenciados.

9.3. *CHD7* ES IMPRESCINDIBLE PARA LLEVAR A CABO TODOS LOS PROGRAMAS DE MIGRACIÓN, PROLIFERACIÓN, DIFERENCIACIÓN, APOPTOSIS Y SENESCENCIA NECESARIOS PARA EL CORRECTO DESARROLLO EMBRIONARIO

Se dice que una función genética es estrictamente materna o estrictamente cigótica cuando su correspondiente fenotipo mutante depende únicamente del genotipo de, respectivamente, la línea germinal o el embrión. Cualquier efecto materno-cigótico observado presumiblemente refleja una redundancia funcional entre los productos maternos y cigóticos. Un tipo particular de efecto materno-cigótico ocurre cuando un fenotipo está causado por la heterocigosidad, en un gen recesivo, tanto en contribuciones genéticas maternas como cigóticas. Tal efecto, denominado interacción materno-cigótica dominante, presumiblemente refleja una sensibilidad de la función del gen a las dosis de genes tanto maternos como cigóticos (Gritsman *et al.* al., 1999; Ciruna *et al.*, 2002; Waskiewicz *et al.*, 2002). Incluso en los mamíferos, donde los genomas cigóticos se activan en la etapa de dos células y se cree que los productos maternos son menos importantes, es probable que las señales maternas también dirijan algunos aspectos del desarrollo embrionario (Johnson, 2001). Como dijimos, la activación del genoma cigótico (ZGA) marca un punto en el desarrollo denominado MBT (Fig. 56 y Sup. 2) (Newport y Kirschner, 1982). En los embriones de pez cebra, esta

USC UNIVERSIDADE DE COMPOSTELA

transición ocurre gradualmente a lo largo de una ventana de aproximadamente 2 horas, comenzando en el ciclo celular 10 y finalizando al final del ciclo 13, y también implica la transición de un patrón de divisiones celulares rápidas y sincrónicas a uno de divisiones celulares asincrónicas más largas y, con un retraso de uno a dos ciclos celulares, el inicio de la motilidad celular (Kane *et al.*, 1992; Kane y Kimmel, 1993; Zamir *et al.*, 1997). La mayoría de estos cambios parecen iniciarse al alcanzar una relación nucleocitoplasmática umbral donde la titulación de un hipotético factor citoplasmático suministrado por la madre da como resultado el inicio de la transcripción (Kane y Kimmel, 1993; Zamir *et al.*, 1997). Este hipotético factor podrían ser *chd7*.

Se necesita la expresión de *chd7* para llevar a cabo todos los programas del desarrollo embrionario. A medida que van transcurriendo, la expresión de este aumenta y disminuye, pero el resultado global es la disminución tras la maduración y entrada en senescencia de los tejidos (Fig. 56 y Sup. 2). La expresión aumenta para activar la proliferación celular y la disminución marca la entrada en senescencia embrionaria. La expresión de *chd7* en las células disminuye para la entrada en senescencia o diferenciación de los tejidos. La expresión global de *chd7* en el embrión de pez cebra se reduciría por el aumento de esta diferenciación y maduración de los tejidos, la entrada en senescencia y la apoptosis de células. Una de las hipótesis planteadas en esta investigación y que podría tener más importancia para el transcurso de la misma, es la función materno-cigótica de *chd7*, pero no solo en el pez cebra, sino en el ser humano y la enfermedad del síndrome de CHARGE. Esa hipótesis ha sido también revelada como hemos dicho recientemente (Sun *et al.*, 2022). La razón de haber descubierto esto dos grupos independientes al mismo tiempo, daría solidez a que este evento, no solo es el que está causando la mayoría de problemas en el síndrome de CHARGE, sino que la acumulación de esta carga con PTCs con el transcurso de los años en los mutantes heterocigotos de pez cebra, podría ser la causa de estar ahora descubriendo unos fenotipos más graves.

Tanto los fenotipos en embriones con genotipo WT como la aparición de fenotipos tardíos en nuestros mutantes de pez cebra *chd7*-CRISPR, son pruebas de una contribución negativa por parte de la madre, como de la compensación genética. Creemos que la acumulación de la carga en PTCs en los óvulos maternos, así como una GCR descompensada por la acumulación de mRNA cigótico con PTCs más prematuros, podría tener un efecto tóxico en el desarrollo de los embriones, y puede que también en los adultos mutantes para genes materno-cigóticos como *chd7*. La importancia del tipo de mutaciones y de la contribución materna en el síndrome de CHARGE, reflejada en esta tesis, revela la multitud de aportaciones que el pez cebra puede dar no solo al estudio de la enfermedad, sino también al estudio de la evolución de estos mecanismos de “inmunidad genética" para la herencia en heterocigosis y algunos casos homocigosis, de genes tan necesarios para el desarrollo embrionario.

9.4. Las Implicaciones de la Senescencia Embrionaria en el Síndrome de CHARGE

La expresión de *chd7* aumentan en los mutantes *chd7*-CRISPR, mientras que la expresión del resto de genes analizados (Fig. 33, 34 y 50) relacionados con el desarrollo y la senescencia embrionaria, y probablemente regulados transcripcionalmente por Chd7, aumentan o reducen su expresión, probablemente debido a estos efectos de *chd7* como remodeladora de la

USC UNIVERSIDADE DE COMPOSTELA

cromatina. Sin embargo, no todas las mutaciones provocan los mismos efectos sobre los niveles de expresión, por lo que es difícil saber si esto son efectos positivos o negativos y entenderlos correctamente. Además, recientemente se ha observado que los mecanismos de compensación complementarios a la GCR como la expresión específica de alelos podrían contribuir a la expresión diferencial de genes no relacionados con las rutas de *chd7* al silenciar o sobreexpresar una región cromosómica concreta, pudiendo confundir así genes desregulados con genes compensatorios (White *et al.*, 2022).

En nuestros mutantes *chd7*-CRISPR, algunos genes parecen comportarse de manera distinta en los heterocigotos, que en los homocigotos a las 96 hpf. Esto podría significar una pérdida completa de la función en los homocigotos, y una recuperación de la función cigótica en los heterocigotos, pero algún tipo de desregulación (Fig. 33, 34 y 50), que podría deberse a la sobreexpresión de *chd7* y provocar una sobreinhibición o activación de la expresión de esos genes. La variabilidad de expresión génica dentro de cada genotipo del cruzamiento *incross chd7*-CRISPR es muy grande, pero la variabilidad observada entre fenotipos es muy pequeña, igual que en el caso de los mutantes *chd7*-CRISPR *outcross*. Por lo que esa variabilidad observada en la expresión de genes a partir de las 96 hpf podría deberse únicamente a la contribución materna y los problemas materno-cigóticos anteriores, que contribuye a la gravedad del fenotipo de los mutantes y WT *chd7*-CRISPR.

9.4.1. Los Efectos Materno-Cigóticos de *Chd7* en la Senescencia Embrionaria

En humanos se conocen pocos casos de la contribución materna, pero los efectos son muy similares a los observados en el pez cebra mutante *chd7*-CRISPR y en los humanos con síndrome de CHARGE con y sin mutaciones en *CHD7*. Las mutaciones maternas de efecto materno también afectan a la expresión de las proteínas del complejo materno subcortical (SCMC) del genoma materno y alteran la maduración de los ovocitos y la progresión del embrión temprano (Lu *et al.*, 2017). Además, las variantes genéticas en estos factores también provocan un espectro de trastornos reproductivos (Bebbere *et al.*, 2016; Monk *et al.*, 2017).

Durante la ovogénesis, las proteínas del genoma del ovocito (genoma materno) con funciones importantes en la fertilización y el desarrollo embrionario temprano, incluida la degradación de proteínas, la activación del genoma embrionario, las modificaciones epigenéticas y la transducción de señales celulares, se acumulan en gran medida (Li *et al.*, 2010). El agotamiento o la expresión anormal de las proteínas maternas no solo afecta al desarrollo del embrión, sino que también puede conducir a la muerte embrionaria (Burns *et al.*, 2003; Gao *et al.*, 2018; Mahadevan *et al.*, 2017; Tashiro *et al.*, 2010; Yu *et al.*, 2014; Tong *et al.*, 2000; Yurttas *et al.*, 2008). El gen *chd7* en pez cebra y su homólogo *CHD7* en humanos, se comporta de la misma forma que muchos de estos genes de efecto materno de mamíferos conocidos (Payer *et al.*, 2003, Wu *et al.*, 2003; Tong *et al.*, 2000; Howell *et al.*, 2001, Christians *et al.*, 2000, Gurtu *et al.*, 2002; Burns *et al.*, 2003), afectando al fenotipo durante el desarrollo embrionario de forma independiente al genotipo del embrión, pero dependiente del genotipo materno o paterno. En algunos genes maternos, se observa una anticorrelación, en la que el mRNA se degrada rápidamente después de la fertilización, mientras que las proteínas persisten durante toda la etapa de blastocisto (Israel *et al.*, 2019). Esto podía deberse al tiempo de vida de las proteínas y el escape de los PTCs a los mecanismos de degradación.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

La transición materno-cigótica (MZT) es un paso inicial en el desarrollo temprano de todas las especies animales investigadas; durante la MZT, las transcripciones de los genes maternos se eliminan por degradación y el genoma del cigoto se activa (Sha *et al.*, 2019; Tadros y Lipshitz, 2009). Los estudios genéticos y de secuenciación han indicado que la eliminación de las transcripciones maternas se logra mediante dos vías secuenciales (Walser y Lipshitz, 2011, Bashirullah *et al.*, 1999, Alizadeh *et al.*, 2005) denominadas:

1. Decadencia materna: Completamente mediada por factores maternos acumulados en los ovocitos maduros.
2. Desintegración cigótica Depende de los productos de transcripción cigóticos de novo después de la fertilización.

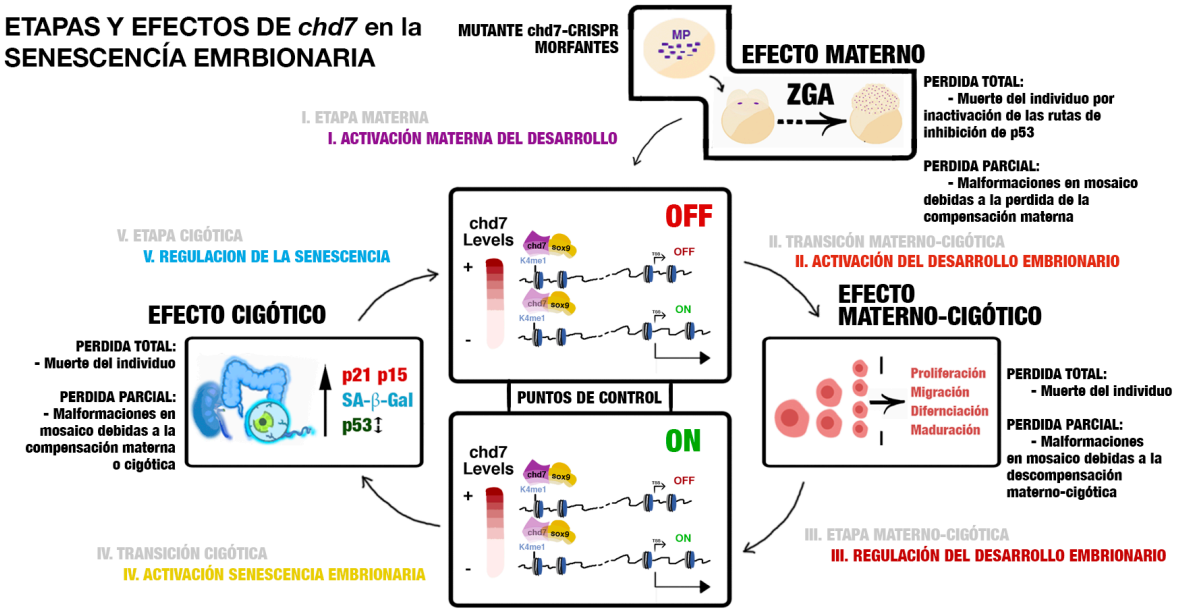


Figura 57. Etapas y efectos de *chd7* en la senescencia embrionaria.

A diferencia de los embriones de ratón, en los que la ZGA se inicia en la etapa de 2 células, los embriones humanos experimentan ZGA en la etapa de 8 células (Chen *et al.*, 2019; Liu *et al.*, 2019). La proporción de transcritos maternos humanos con aclareamiento que depende de la ZGA sigue sin determinarse. La desregulación del proceso de eliminación del mRNA materno está relacionada con diversos trastornos del sistema reproductivo, como el retraso en el crecimiento de los folículos, los defectos en la maduración de los ovocitos, la detención temprana del embrión, el envejecimiento de los ovocitos y, en última instancia, la infertilidad (Sha *et al.*, 2018, Yu *et al.*, 2016, Morgan *et al.*, 2017, Ivanova *et al.*, 2017; Yao *et al.*, 2018). Estas observaciones también han sido realizadas recientemente para las mutaciones en *Chd7* de ratón (Cheng *et al.*, 2022).

La implicación de la deficiencia en *chd7* en la instauración y regulación de la senescencia es muy grande. Pero las células programadas para expresar la senescencia embrionaria parecen tener un importante control materno tanto en peces cebra como humanos. Los fenotipos en el síndrome de CHARGE se deben a un desajuste entre los efectos maternos,

cigóticos y materno-cigóticos, explicado por los efectos dependientes de la dosis del gen *chd7* y solo en las células programadas para desarrollar ese programa a través de la contribución maternaLa función cigótica de *chd7* en la etapa cigótica, es la que menos patologías debería causar en el desarrollo de la enfermedad. Esta función, sobre el control y regulación de la senescencia embrionaria, contribuye a la mejora del individuo siempre que la mutación pueda ser compensada o provoque daños leves a la proteína. Por lo tanto, sería la menos importante para descubrir el origen de los problemas asociados. Sin embargo, esta etapa únicamente cigótica, marcaría el inicio de la senescencia embrionaria y es la más importante para la resolución de la enfermedad genética y el rescate fenotípico en los pacientes con mutaciones o no en *CHD7* y un fenotipo CHARGE asociados. Por lo que las mutaciones que no causaran una compensación genética, tendrían efectos también en esa fase cigótica.

9.5. La Impronta causa de la Expresividad y Penetrancia del Síndrome de CHARGE

La alta variabilidad en la expresividad y la penetrancia de *CHD7* no explica la alta penetrancia y expresividad que existe en la haploinsuficiencia durante el síndrome de CHARGE únicamente en la embriogénesis para un gen materno en pez cebra. La adaptación de los mamíferos al sistema de importación ha vuelto irrelevante el material materno en forma de RNA para el control del desarrollo embrionario. El RNA materno, no obstante, seguramente siga existiendo hasta la etapa de eliminación materna o cigótica, tras la fecundación, pudiendo producirse los escapes de estos PTCs, y provocar la sobreactivación cigótica, o incluso un leve rescate en caso de heterocigosis. La producción insuficiente de proteína materna también podría ser una causa de las deficiencias, sin embargo, parece menos probable y la compensación por otros productos como CHD8 (Batsukh *et al.*, 2010; Marie *et al.*, 2018; Zhao *et al.*, 2018b; Dooley *et al.*, 2019; Hoffmann & Spengler, 2021) o ZEB2 (Sun *et al.*, 2022) es más probable.

La impronta de los mamíferos y la pérdida del componente materno en forma de RNA, probablemente nos haya vuelto más sensibles a las enfermedades en heterocigosis debido a la haploinsuficiencia materna. Esto explicaría la no existencia de homocigotos humanos para estos genes, pero no para los peces cebra, donde la contribución del RNA es más grande, pudiendo contribuir a la herencia y transmisión de estos genes incluso en homocigosis. En este sentido, puede que los mecanismos de impronta, hayan conducido a los mamíferos a mantener una variabilidad genética más grande y mantener la heterocigosidad, y de esta forma reducir la endogamia y la homocigosidad para abarcar multitud de hábitats y adaptarnos mejor a diferentes condiciones.

Los resultados de los análisis de las técnicas, la introducción de los CRISPant y la importancia de los genes materno-cigóticos como el gen chd7, durante todo el desarrollo embrionario, a través de la impronta parental, demuestran que este tipo de genes hay que tratarlos fenotípicamente para conocer mejor que tipo de compensación positiva o negativa podría estar afectando en cada etapa, materna o cigótica.

Nuestro método validación fenotípica del mutante *chd7*-CRISPR ha llevado años, por la aparición y desaparición de fenotipos debidos a la contribución materna, el desconocimiento de la GCR en el pez cebra y las conclusiones a las que ha ido llegando la comunidad a través del estudio y la mejora de las técnicas para la validación de la función de los genes. Al igual

USC
DE COMPOSTELA

que nuestros compañeros investigadores del gen *chd7* y el síndrome de CHARGE en pez cebra, el fenotipo parece tener un componente temporal, y afectar con los años más al desarrollo. En este sentido, proponemos estudiar estos mecanismos de acumulación de PTCs en los gametos, que pudieran explicar estos fenotipos complejos, más graves e independientes del genotipo, además de la importancia de estos PTCs en todas las etapas, maternas y cigóticas dependientes de la función de *CHD7* de controlar la senescencia celular.

9.5.1. La Pérdida de la Proteostasis Aumenta la Penetrancia y Expresividad

Resulta interesante pensar como estas funciones únicamente "maternas" como la proliferación, migración, diferenciación, senescencia y apoptosis de estos genes maternos se mantienen en unas pocas células adultas y son funciones básicas compartidas con los organismos procariotas (Meunier *et al*., 2021; Allison y Hughes, 1991; Kirkwood, 1997; Jarrell y McBride, 2008; Koonin y Aravind, 2002; Matic, 2001; Ackermann et al., 2003; Stewart et al., 2005 Stephens, 2005; Steiner, 2021). Estas funciones primarias en el desarrollo y en la evolución, podrían ser mecanismos descendentes de las funciones celulares haploides, por lo que podrían implicar una homocigosis total, o el silenciamiento de una copia mediante la impronta, en un contexto diploide. Eso explicaría la diferencia de la homocigosidad para los genes maternos y cigóticos en mamíferos y en peces cebra. En los mamíferos con pérdida de la contribución materna, el organismo homocigoto materno no puede desarrollarse, pero sí los cigóticos, ya que las funciones secundarias de estos, solo están implicadas en las células algo más diferenciadas. La compensación materna tan grande del pez cebra en forma de RNA crea un mecanismo de inmunidad para los genes maternos, y el aumento de los parálogos para los genes cigóticos, pudiendo mantener la endogamia y aumentar así la homocigosidad de estos genes.

La haploinsuficiencia o la pérdida de la función de la proteína y en consecuencia de la proteostasis por parte de CHD7, no explicaría una expresividad y una penetrancia tan grande del síndrome de CHARGE, siendo este gen un gen materno y con una expresividad y una penetrancia tan variable para una misma variante, pudiendo ser recompensadas por la GCR o por la función de otras proteínas como CHD8 (Batsukh *et al.*, 2010; Marie *et al.*, 2018; Zhao *et al.*, 2018b; Dooley *et al.*, 2019; Hoffmann & Spengler, 2021). Sin embargo, la pérdida de proteostasis del adulto y la generación de mutaciones que producen PTCs que escapan de los mecanismos de degradación y descompensan las funciones materno-cigóticas, si explicarían el aumento de la expresividad de este síndrome en pacientes con y sin mutaciones en *CHD7*.

La función de muchos de estos genes materno-cigóticos podrían tener implicaciones en el adulto, por lo que las compensaciones genéticas podrían no resultar eficientes en la etapa adulta aunque el homocigoto se desarrollase. Estas funciones de la etapa adulta podrían ser las mismas que confieren la pluripotencia y plasticidad celular. Por lo que el papel de *CHD7* como factor epigenético en la proteostasis celular durante el desarrollo podría ser considerada como causa del síndrome de CHARGE. Proponemos estudiar esta pérdida de proteostasis tanto en los organismos adultos con mutaciones en *CHD7* como en el desarrollo de los gametos y el embrión como una posible causa del síndrome de CHARGE en pacientes con y sin mutación asociada.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

10. LA SENESCENCIA Y LA DIAPAUSA

El agotamiento de la carga materna o la contribución materna negativa, a través de la subida de los PTCs en los períodos de disminución de la expresión de *chd7*, coincidirían con los momentos de encendido y apagado de la proteína, y entrada y salida de la senescencia celular en los dos momentos estudiados, antes de la MBT y la entrada en senescencia embrionaria. Lo que no quiere decir que no pueda haber más eventos a lo largo del desarrollo.

A medida que avanza el desarrollo, estos eventos de senescencia parecen ir ocurriendo a microescala, según aumenta la diferenciación celular. Haciendo que se reduzca la concentración de chd7, los tejidos entran en senescencia, mueren por apoteosis o se diferencian. En cualquier caso implica la bajada de los niveles de chd7 con respecto al organismo, no solo por el aumento del número de células, sino por esta necesidad de inhibir la apoptosis y la proliferación celular por parte de p53. Esto podría deberse al aumento de las células diferenciadas por las senescentes y al agotamiento de los niveles de chd7 y p53 en las células, estabilizando tanto al tejido como a las propias células que lo forman.

Solo unas pocas células del tejido necesitan niveles umbrales de *chd7* para inhibir a *p53*, el resto podrían necesitar niveles subumbrales. La concentración necesaria de estos *chd7* y *p53* para ese juego de inhibición activación, podría variar dependiendo del tejido y los genes que estén interviniendo específicos de tejido, haciendo que se dificulte más la detección de chd7 y de las células senescentes a lo largo del desarrollo.

El *killifish* es el vertebrado con la esperanza de vida más corta conocida que se puede criar en cautiverio. Se ha observado un aumento en los marcadores típicos de senescencia *cdkn1a* y *cdkn2a/b* así como un aumento de la actividad β-Gal y la lipofuscina asociadas a la senescencia, en adultos mayores en comparación con los jóvenes de *N. furzeri* en la línea MZM pero no en la GZR (Genade *et al.*, 2005; Graf *et al.*, 2012). Los datos sugieren que el estudio de la diapausa de N. furzeri puede revelar firmas genéticas y vías comunes asociadas con el envejecimiento (Reichwald *et al.*, 2015).

En *N. furzeri* se ha observado una conexión entre el tiempo de desarrollo embrionario y los rasgos de tiempo de vida posteriores a la eclosión (Polacik *et al.*, 2014). En *C. elegans*, uno de los modelos clásicos de investigación sobre el envejecimiento, existe un estado similar de detención del desarrollo denominado larvas *dauer*. Esta forma detenida puede ser inducida por el hacinamiento y el suministro limitado de alimentos. Con *daf-2* que codifica un receptor de insulina, se ha identificado un gen que regula la formación de larvas de dauer y conduce a una extensión dramática de la esperanza de vida cuando este muta (Kenyon *et al.*, 1993). Además, se han identificado firmas de expresión génica similares en larvas dauer, así como en adultos mutantes *daf-2* (McElwee *et al.*, 2004). Esto sugiere la existencia de genes que están involucrados en la regulación del estado y la esperanza de vida de las larvas *dauer*. Esto ha llevado a examinar si el genoma de *N. furzeri* también tiene firmas genéticas que son similares en diapausa y envejecimiento, y de hecho pueden encontrarse tales firmas comunes. Los genes que se regulan a la baja tanto en embriones detenidos en el desarrollo como en el envejecimiento del cerebro, y están involucrados en la regulación del ciclo celular y la segregación cromosómica (Reichwald *et al.*, 2015). Esto no fue inesperado, ya que en diapausa se detiene la proliferación. También se había demostrado anteriormente que la actividad mitótica disminuye en el cerebro del *killifish* que envejece (Tozzini *et al.*, 2012).

USC UNIVERSIDADE DE COMPOSTELA

Estos momentos parecen clave para el correcto desarrollo del embrión y del adulto, controlando la proliferación para algunos tejidos embrionarios. La senescencia embrionaria y el desarrollo embrionario coexisten espacio-temporalmente Puede que el desarrollo esté controlado desde las células senescentes, como las células de la cresta neural. El *killifish*, entra en este estado de diapausa, sin embargo, algunos tejidos parecen seguir desarrollándose. La relación de estos momentos de inhibición de la proliferación y entrada en senescencia celular, con los procesos de diapausa en el desarrollo embrionario del *killifish* nos han llevado a buscar una relación entre este proceso de inhibición de la proliferación durante el desarrollo embrionario y el gen *chd7*.

10.1. La diapausa en el *killifish* podría ser un estado de senescencia embrionaria prolongado y reversible.

La diapausa es un estado de latencia, una detención reversible del desarrollo de los cambios metabólicos y la tolerancia extrema al estrés (Podrabsky *et al.*, 2010). Se ha revisado la regulación de la diapausa en nemátodos, crustáceos, insectos y peces. Estos datos mostraron que no existe un mecanismo único subyacente a la diapausa, aunque algunas vías parecen compartirse (Hand *et al.*, 2016). Los *killifish* presentan este mecanismo de detención reversible en tres posibles etapas de desarrollo: diapausa I (DI) durante la fase de células dispersas (100 % epibolia), diapausa II (DII) en embriones durante la organogénesis y diapausa III (DIII) en la etapa final etapa previa a la eclosión (Wourms, 1972a; Wourms, 1972b).

La DII es la detención del desarrollo mejor caracterizada en *killifish* (Meller *et al.*, 2012; Romney *et al.*, 2018). Recientemente, un análisis transcriptómico de *N. furzeri* en DII reveló que este estado es mantenido activamente por reguladores específicos de la cromatina e involucra cambios fisiológicos que protegen al organismo del envejecimiento, preservándolo durante períodos prolongados (relacionados con la vida media de los adultos), sin consecuencias para el crecimiento, la fertilidad y la esperanza de vida del organismo (Hu *et al.*, 2020). La entrada en DII es el resultado de una trayectoria alternativa del desarrollo que es fisiológica, morfológica y bioquímicamente única en comparación con los embriones que se desarrollan continuamente hasta la eclosión o entrada en DIII (Chennault y Podrabsky, 2010; Romney y Podrabsky, 2017).

La DIII ocurre en la etapa previa a la eclosión cuando el embrión ha completado su desarrollo. Se caracteriza por una desaceleración del ritmo cardíaco y el cese del desarrollo y crecimiento. El embrión está listo para eclosionar si aparecen las señales de eclosión apropiadas (Wourms, 1972a; Wourms, 1972b). La DIII es la menos conocida de las tres diapausas. Algunos datos indican que el metabolismo embrionario disminuye progresivamente en la DIII de los embriones de *Austrofundulus limnaeus* (Podrabsky y Hand, 1999) en comparación con los embriones en la misma etapa inducidos a eclosionar (Podrabsky y Hand, 1999; Levels *et al.*, 1986).

Un estudio transcriptómico comparativo entre embriones DIII y larvas de vida libre de *Nematolebias whitei* sudamericana mostró 945 genes expresados diferencialmente. Se encontraron patrones transcripcionales similares entre *N. whitei* y otros animales en diapausa en un pequeño conjunto de genes asociados con la resistencia al estrés, el ritmo circadiano y el metabolismo (Thompson y Ortí, 2016).

USC UNIVERSIDADE DE COMPOSTELA

Por lo tanto, la diapausa de los vertebrados es un estado de vida suspendida que se mantiene activamente mediante reguladores específicos de la cromatina, y que tiene implicaciones para la conservación del organismo a largo plazo. Entre estos reguladores transcripciones podrían estar los genes asociados al desarrollo embrionario, el ciclo celular y la senescencia embrionaria como *CHD7*. Se ha demostrado recientemente que los genes más regulados en diapausa incluyen miembros del complejo Polycomb (Hu *et al.*, 2021). La proteína CHD7 se relaciona funcionalmente con el complejo Polycomb (Badodi *et al.*, 2017) y las marcas H3K27me3 (Bajpai *et al.*, 2010; Basson y van Ravenswaaij-Arts, 2015; Schnetz *et al.*, 2010, Williams *et al.*, 2022).

Una característica distintiva entre las diapausas es que, reaccionan de manera diferente a la misma señal ambiental. Por ejemplo, la hipoxia induce y prolonga la DI y DII, pero completa la DIII (Peters, 1963). Los niveles de expresión de *chd7* podrían estar implicados en el mantenimiento y regulación del desarrollo embrionario y la senescencia embrionaria en esos momentos de la DII, la DIII y la eclosión y desarrollo posterior

La senescencia embrionaria puede que se encargue de esas paradas en el desarrollo embrionario en la MBT y otros momentos, y podrían ser puntos clave en la activación de la compensación y reparación genética, que parecen estar muy relacionados con *chd7* y el síndrome de CHARGE. La diapausa, podría ser un efecto prolongado en el tiempo, en algunos tejidos, de la senescencia embrionaria en los *killifish,* a través de la regulación de *chd7* y p53 en conjuntos con los inhibidores del ciclo celular p15 y p21, mientras que en otros se podría estar estimulando el desarrollo.

Se sugieren muchas estrategias transcripcionales para producir respuestas de latencia fisiológicamente similares, (Ragland *et al.*, 2010), ya que hay poca similitud transcripcional entre las latencias entre especies. Sin embargo, se ha demostrado que el factor de transcripción *FOXO* es un candidato principal para activar muchas vías fisiológicas que causan el fenotipo de diapausa en insectos y nemátodos, incluida la regulación del metabolismo y el ciclo celular (Hand *et al.*, 2016).

Los análisis transcriptómicos sugieren una programación materna de los embriones a través de mRNA materno (Romney y Podrabsky, 2017). La comparación de estos resultados con estudios en pez cebra y otros peces revela una abundancia sorprendentemente alta de transcritos involucrados en la respuesta celular al estrés y una expresión relativamente menor de los genes necesarios para una transición rápida a través del ciclo celular. El gen *chd7* como un gen materno-cigótico, demostrado en este estudio, y su función en la biogénesis del RNA ribosómico (Zentner *et al*., 2010), lo convierten en un candidato idóneo para el control de este estado a través de la contribución materna.

Resulta poco probable que la programación materna de la trayectoria del desarrollo de los vertebrados se logre mediante una expresión diferencial de genes específicos de la diapausa. Además, con base en los estudios comparativos con pez cebra, el transcriptoma en la etapa de 1-2 células de *A. limnaeus* es único en formas que son consistentes con su historia de vida única (Romney y Podrabsky, 2017). Estos resultados, aunque afectan a nuestra comprensión de los mecanismos genéticos que regulan la entrada en diapausa, también nos pueden proporcionar cierta información sobre la regulación epigenética de la expresión genética durante el desarrollo y la senescencia embrionaria en diferentes organismos, pudiendo incluso estar relacionado con la esperanza de vida, a través de la contribución materna de *chd7*

USC UNIVERSIDADE DE COMPOSTELA

Las paradas en diapausa, parecen coincidir mucho temporalmente con las etapas de *chd7* de activación y desactivación de la senescencia celular, por eso nos lleva a pensar que puede estar muy implicado. Aunque todavía debemos optimizar algunos de los protocolos para el estudio de *chd7* y su función en el *killifish*, el simple hecho de evidenciar la coexpresión de *chd7* y los inhibidores del ciclo celular, *p15* y *p21* (Fig. 51), así como variaciones en la expresión de estos genes, tanto en momentos de DIII como del desarrollo embrionario anterior y posterior a la eclosión, nos conduce a pensar que nuestras hipótesis no van por el mal camino. Con todos estos datos en la mano, podemos decir que el *killifish* no solo puede ser un organismo útil para el estudio del envejecimiento, la diapausa o la enfermedad del síndrome de CHARGE, sino también para comprender la relación que pueden tener estos con la senescencia embrionaria y la función de *chd7* en el desarrollo embrionario.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

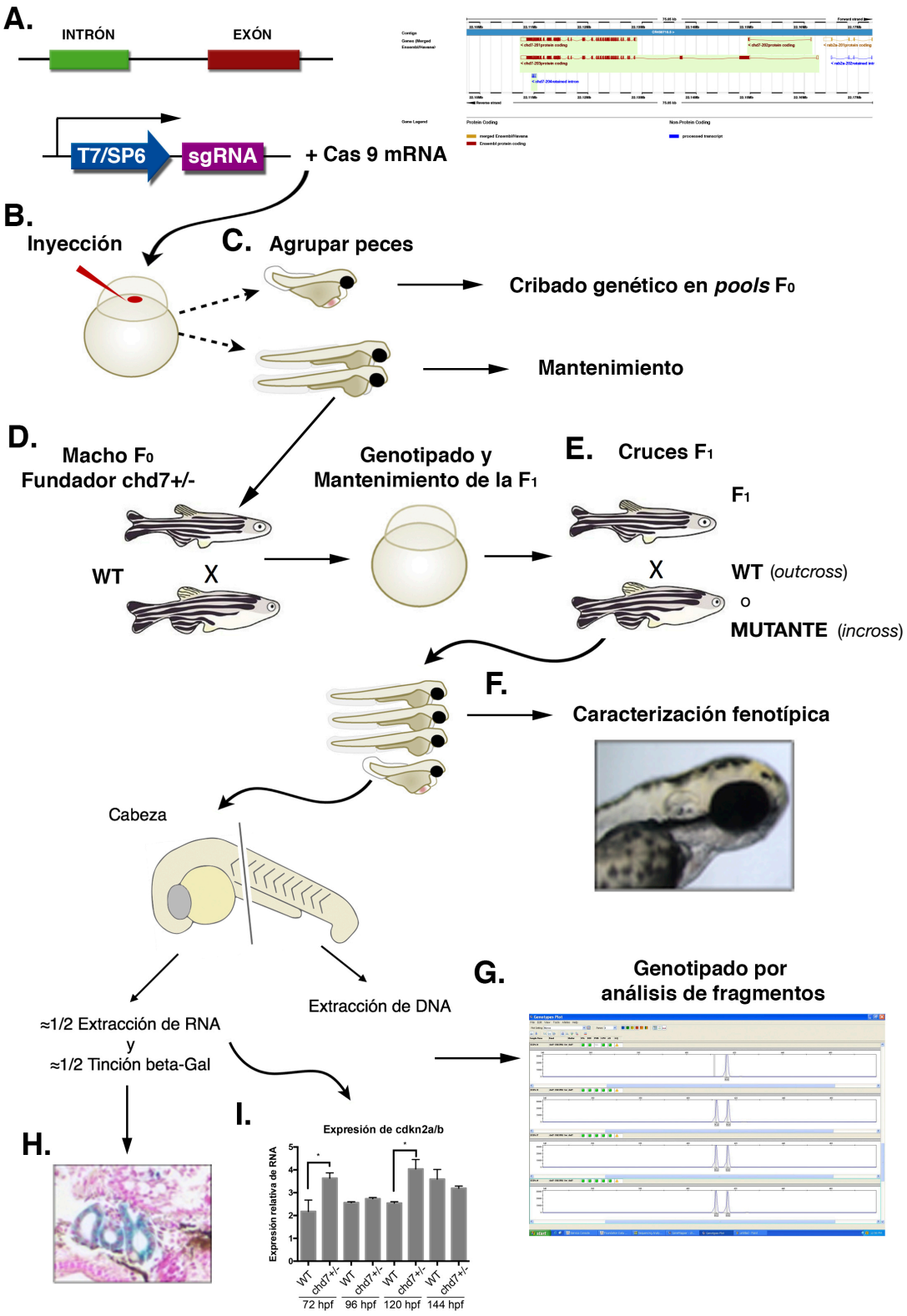
USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

FIGURAS SUPLEMENTARIAS

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

Figura Suplementaria 1. Esquema del modelo experimental



USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

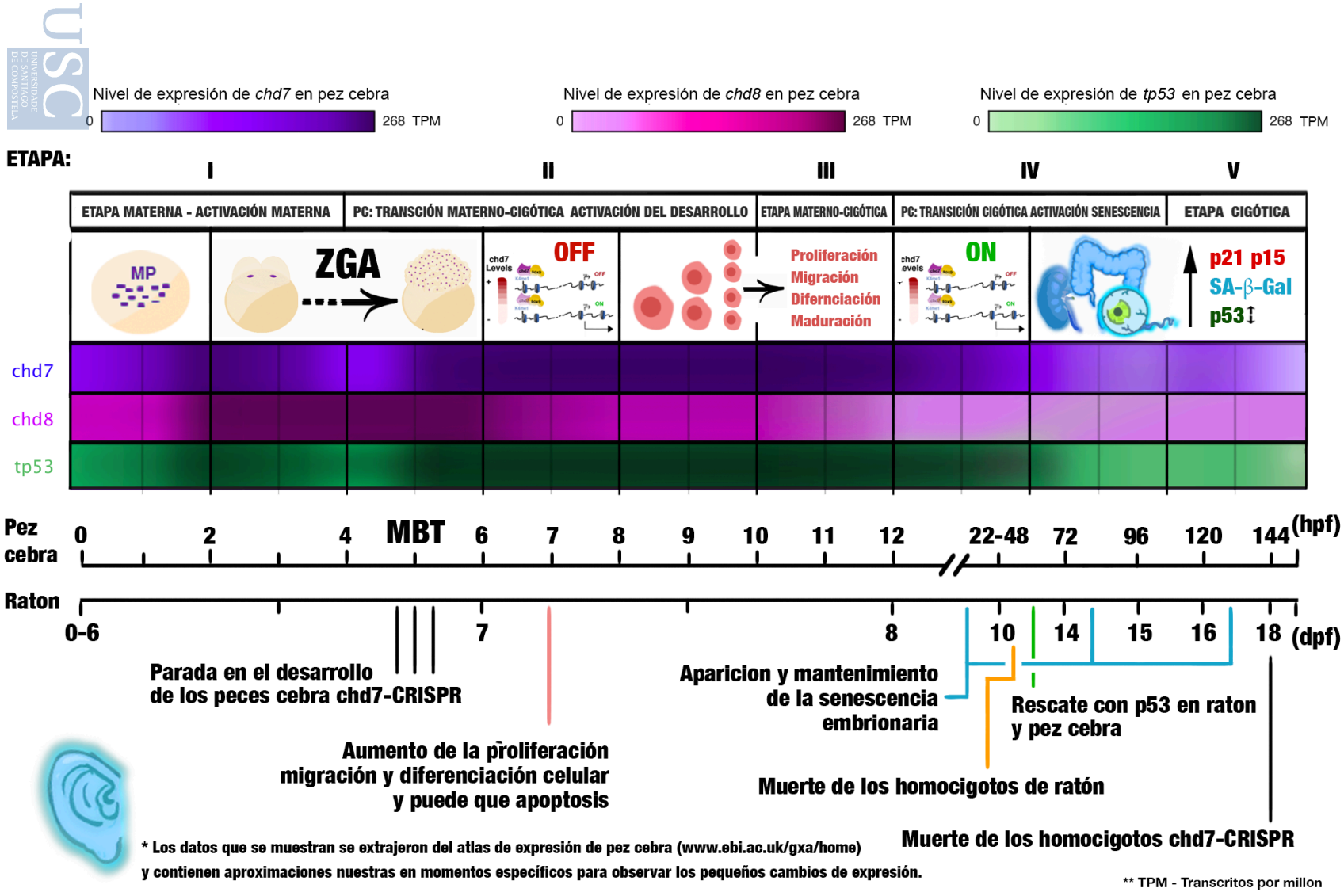


Figura Suplementaria 2. Organigrama de las funciones de *chd7*

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

CONCLUSIONS

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

CONCLUSIONS

1. Different mutations produce opposite effects on phenotypic recapitulation for maternal and zygotic genes.

As has already been demonstrated on other occasions, and something that we already assumed would be demonstrated at the beginning of our study, is that random mutagenesis techniques produce mutations that could be considered milder in terms of damage to the DNA sequence, such as are point mutations, while directed mutagenesis techniques produce more severe lesions such as indels. These indels, are more prone than point mutations to generate nonsense and frameshift variants of the genes, which may produce a rescue effect due to genetic compensation mechanisms such as GCR and NMD observed in zebrafish for the zygotic effect genes. However, these same nonsense and frameshift mutations also produce a more serious condition and haploinsufficiency in the embryos for the maternal effect genes, producing above all maternal-zygotic alterations that are sometimes rescued, but can reappear in the adult. Missense mutations, although the damage to the protein may be milder, would not be rewarded by the GCR as they do not produce PTCs, so the severity of the mutation is based on the damage to the zygotic protein and the possible loss of the proteostasis and transcriptional stability of the parental contribution. The most severe missense mutations would produce damage not only in the zygote, but also in the adults since GCR is not rewarded, which provides even more evidence of this possible function in the adult for the maternal-zygotic genes. The association of these missense mutations in *CHD7* is associated with milder phenotypes or problems in adults with phenotypes not associated with CHARGE syndrome. In zebrafish, these defects are easier due to the importance of the maternal contribution in the form of RNA.

1.1. Zygotic genes are more susceptible than maternal and maternal-zygotic genes to the phenotypic recapitulation, causing greater variability in expressivity and penetrance.

1.2. Nonsense and frameshift mutations are more likely to produce maternal-zygotic alterations that cause gene haploinsufficiency than missense variants.

1.3. Maternal contribution in the form of RNA and gene duplication in zebrafish for many genes important for vertebrate embryonic development provide a system of genetic “autoimmunity” through respectively maternal and zygotic genetic compensation for maternal and zygotic genes.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

2. The maternal, maternal-zygotic, and zygotic functions of the *chd7* gene are to regulate embryonic development programs through controlled inhibition of p53 expression.

2.1. The *chd7* gene has a uniquely maternal effect on imprinting of vertebrate embryonic development.

As in mammals, *chd7* mutations in zebrafish are lethal when homozygous. Maternal-zygotic embryos for *chd7* are probably not possible or die at some point. The Chd7 protein in zebrafish could be an imprinted epigenetic regulator not only in the form of protein but also in the form of RNA. This opens the door to speculation on whether *CHD7*, as an epigenetic regulator, could have a role in vertebrate imprinting. Thus, loss of cellular proteostasis in adult humans, as well as *CHD7* mutations in the gonads, could lead to dysregulation of gamete imprinting and severe CHARGE phenotypes. The key role of the maternal contribution of *CHD7* in vertebrates through the cellular programming of embryonic development gives this gene an essential role in the imprinting of these programs in the embryo.

2.1.1. The presence of phenotypic defects in WT embryos of equal severity to those observed in *chd7* homozygous and morphant mutants reveals the importance of gradual positive and negative maternal contribution.

2.1.2. The absence of phenotype in heterozygous mutants and even some homozygotes, reveals the importance of negative and positive maternal contribution also in humans, recapitulating the increase in variability of expressivity and incomplete penetrance for *CHD7* observed in recent years.

2.2. *chd7* gene has a uniquely maternal-zygotic effect in the maintenance of senescent capacities and in cell proliferation, migration, differentiation and apoptosis during the embryonic development of vertebrates.

The effect observed in CHARGE syndrome is the result of the defects produced in this maternal contribution, and the possible zygotic contribution, since the defects produced by the haploinsufficiency of the gene are mostly corrected in the zygotic transition thanks to the establishment of the embryonic senescence in tissues. The alteration of the embryonic senescence programs can also contribute to the syndrome´s condition, but the most serious defects are produced before its establishment, so that cellular senescence can no longer manage to rescue the phenotype.

2.3. *chd7* gene has a uniquely zygotic effect in the regulation of embryonic senescence.

Homozygotes die because of the inability of the cells to enter cellular senescence. All tissues in which the embryonic senescence program is activated at zygotic transition are damaged in persons with CHARGE syndrome, and in *CHD7*-deficient organisms. The total absence of maternal contribution probably does not exist because of the gradual maternal contribution, or because of the longer duration of the proteins in the oocyte. However these embryos, when the maternal product is totally depleted, cannot maintain the cells in a state of senescence due to the inability to inhibit the expression of p53. The zygotic capacities to enter cell senescence and inhibit proliferation and apoptosis are exhausted when the zygotic function of the *chd7*

USC UNIVERSIDADE DE COMPOSTELA

gene is fully established. In addition, embryos zygotic for *chd7* only present alterations in the regulation of embryonic and cellular senescence, so maternal-zygotic alterations are rewarded in heterozygosity.

3. *chd7* gene plays a role during cell senescence in tissue regeneration in adult zebrafish

There is a space-time correlation between *chd7* expression and embryonic senescence. The phenotypes in adult humans are due to developmental abnormalities, and these rarely have greater complications than those produced by these defects. So the role of *CHD7* in the haploinsufficient adult is unclear. The *CHD7* gene, as a zygotic gene, is compensated in adults with nonsense and frameshift mutations, just as in zebrafish, so the disease in adults goes unnoticed. However, maternal-zygotic alterations in humans are the most visible, due to the influence of the loss of proteostasis during the aging of vertebrates and the toxic load in PTCs that aggravate the phenotype due to transcriptional deregulation. Zebrafish have large litters, and the maternal contribution in the form of RNA is very large, so the maternal-zygotic transition is highly compensated and heterozygous individuals with the CHARGE phenotype are very low. Upon reaching the zygotic transition, the transition to the zygotic function of *chd7* and the establishment of senescence, the phenotype of the majority of the embryos is recovered as they are carriers of nonsense mutations with PTCs. The same would happen in humans. However, these zebrafish, compensated for their own healthy gene, produce phenotypes as they age as adults. This could be due to the loss of proteostasis and accumulation of PTCs that is also observed in the embryo due to nonsense mutations in the *chd7* gene. Space-time alterations imply a maternal contribution to the *chd7* load in cells, leading to local maternal-zygotic alteration, variability in expressivity, and incomplete penetrance of the phenotype. However, the late appearance of the adult phenotype and its high expressivity and penetrance contribute to the explanation of the zygotic and adult function of *chd7*, probably through cellular senescence in the repair, regeneration and differentiation of adult tissues. Cellular senescence has been altered in the regeneration process through increased SA-β-Gal activity in the amputated tissue, which could imply a greater activation of cell senescence or a greater number of cells with SA- β-Gal activity like macrophages in the tissue. This overactivation of senescence could be due to an accumulation of PTC and increased expression of *chd7* by the GCR in older adult *chd7* heterozygous mutants, or it may be a loss of proteostasis as it occurs in humans.

3.1. The deficiencies in CHARGE syndrome are due to alterations in the space-time regulation of embryonic senescence due to maternal-zygotic alterations in *CHD7* charge.

3.2. The activation of the embryonic senescence program is dependent on the *chd7´*s maternal contribution, before ZGA in zebrafish and probably in humans.

3.3. Nonsense mutations in *chd7* produce alterations in cellular senescence and tissue regeneration in adult zebrafish.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

CONCLUSIONES

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

CONCLUSIONES

1. Las distintas mutaciones producen efectos contrarios en la recapitulación fenotípica para los genes maternos y cigóticos.

Como ya se ha demostrado en otras ocasiones, y algo que ya suponíamos que iba a demostrarse al inicio de nuestro estudio, es que las técnicas de mutagénesis aleatoria producen mutaciones, que podrían considerarse más leves en cuanto al daño a la secuencia de DNA, como son las mutaciones puntuales, mientras que las técnicas de mutagénesis dirigida producen lesiones más graves como los *indels*. Estos *indels*, a su vez, son más propensos que las mutaciones puntuales a generar variantes *nonsense* y *frameshift* de los genes, que pueden producir un efecto de rescate por los mecanismos de compensación genética como la GCR y NMD observados en el pez cebra para los genes de efecto cigótico. Sin embargo, estas mismas mutaciones *nonsense* y *frameshift* también producen una afección más grave y la haploinsuficiencia en los embriones para los genes de efecto materno, produciendo sobre todo alteraciones materno-cigóticas que en ocasiones son rescatadas, pero pueden volver a aparecer en el adulto. Las mutaciones *missense*, aunque suelen producir un menor daño a la proteína, estas no se verían compensadas por la GCR al no producir PTCs, por lo que la gravedad de la mutación, se basa en el daño de la proteína cigótica y la posible pérdida de la proteostasis y estabilidad transcripcional de la contribución parental. Las mutaciones *missense* más graves producirían daños no solo en el cigoto, sino también en los adultos al no verse recompensada la GCR, lo que aporta aún más pruebas de esa posible función en el adulto para los genes materno-cigóticos. La asociación de estas mutaciones *missense* en *CHD7* están asociadas a fenotipos más leves o problemas en adultos con fenotipos no asociados al síndrome de CHARGE. En el pez cebra, estos defectos son más fáciles debido a la importancia de la contribución materna en forma de RNA.

1.1. Los genes cigóticos son más susceptibles que los maternos y materno-cigóticos a la recapitulación fenotípica, causando una mayor variabilidad en la expresividad y la penetrancia.

1.2. Las mutaciones *nonsense* y *frameshift* son más propensas a producir alteraciones materno-cigóticas que causan la haploinsuficiencia de los genes que las variantes *missense*.

1.3. La carga materna en forma de RNA y la duplicación genética en pez cebra para muchos genes importantes para el desarrollo embrionario de los vertebrados, aportan un sistema de "autoinmunidad" genética a través de la compensación genética materna y cigótica, para los genes maternos y cigóticos respectivamente.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

2. Las funciones: materna, materno-cigótica y cigótica, del gen *chd7* son regular los programas del desarrollo embrionario mediante la inhibición controlada de la expresión de p53.

2.1. El gen *chd7* presenta un efecto únicamente materno en la impronta del desarrollo embrionario de los vertebrados.

Al igual que en los mamíferos, las mutaciones en *chd7* en el pez cebra son letales en homocigosis. Los embriones materno-cigóticos para *chd7* probablemente no son posibles o se mueren llegado un momento. La proteína Chd7 en pez cebra podría ser un regulador epigenético improntado no solo en forma de proteína sino también en forma de RNA. Esto abre la puerta a especular sobre si *CHD7*, como regulador epigenético, podría tener un papel dentro de la impronta de los vertebrados. Por lo que la pérdida de la proteostasis celular en los humanos adultos, así como las mutaciones en *CHD7* en las gónadas, podrían provocar las desregulaciones de la impronta en los gametos y los fenotipos CHARGE graves. El papel clave de la contribución materna de *CHD7* en los vertebrados a través de la programación celular del desarrollo embrionario, le otorga a este gen un papel imprescindible dentro de la impronta de estos programas en el embrión.

2.1.1. La presencia de defectos fenotípicos en los embriones WT de igual gravedad que los observados en los mutantes homocigotos y morfantes para chd7 revela la importancia de la carga materna gradual positiva y negativa.

2.1.2. La ausencia de fenotipo en mutantes heterocigotos e incluso algunos homocigotos, desvela la importancia de la carga materna negativa y positiva también en humanos al recapitular el aumento en la variabilidad de la expresividad y la penetrancia incompleta para CHD7 observada estos últimos años.

2.2. El gen *chd7* presenta un efecto únicamente materno-cigótico en el mantenimiento de las capacidades senescentes y en la proliferación, migración, diferenciación y apoptosis celulares durante el desarrollo embrionario de los vertebrados.

El efecto observado en el síndrome de CHARGE no es más que los defectos producidos en esta contribución materna, y la posible contribución cigótica, ya que los defectos producidos por la haploinsuficiencia del gen en su mayoría son corregidos en la transición cigótica gracias al establecimiento de la senescencia embrionaria en los tejidos. La alteración de los programas de la senescencia embrionaria pueden contribuir también a la afección del síndrome, pero los defectos más graves son producidos antes del establecimiento de esta, por lo que la senescencia celular ya no puede lograr rescatar el fenotipo.

2.3. El gen *chd7* presenta un efecto únicamente cigótico en la regulación de la senescencia embrionaria.

Los homocigotos se mueren por la incapacidad de las células de entrar en senescencia celular. Todos los tejidos en los que se activa el programa de senescencia embrionaria en la transición cigótica, están dañados en las personas con el síndrome de CHARGE, y los organismos deficientes en *CHD7*. La ausencia total de contribución materna probablemente no exista por la contribución materna gradual, o por el mayor tiempo de duración de las proteínas en el

USC UNIVERSIDADE DE COMPOSTELA

ovocito. No obstante, estos embriones, cuando el producto materno se agota totalmente, no pueden mantener las células en un estado de senescencia debido a la incapacidad de inhibir la expresión de p53. Las capacidades cigóticas de entrada en senescencia celular e inhibir la proliferación y la apoptosis se agotan al establecerse completamente la función cigótica del gen *chd7*. Además, los embriones cigóticos para *chd7* presentan únicamente alteraciones en la regulación de la senescencia embrionaria y celular, por lo que las alteraciones materno-cigóticas se ven recompensadas en heterocigosis.

3. El gen *chd7* juega un papel durante la senescencia celular en la regeneración de tejidos en el de pez cebra adulto

Existe una correlación espacio-temporal entre la expresión de *chd7* y la senescencia embrionaria. Los fenotipos en los humanos adultos se deben a las alteraciones del desarrollo, y pocas veces estos tienen mayores complicaciones que las producidas por estos defectos. Por lo que la función de *CHD7* en el adulto haploinsuficiente, no está clara. El gen *CHD7*, como gen cigótico, se ve recompensado en los adultos con mutaciones *nonsense* y *frameshift*, igual que en el pez cebra por lo que la enfermedad en el adulto pasa desapercibida. Sin embargo, las alteraciones materno-cigóticas en humanos son las más visibles, debido a la influencia de la pérdida de proteostasis durante el envejecimiento de los vertebrados y las carga tóxica en PTCs que agravan el fenotipo por la desregulación transcripcional. Los peces cebra, tienen grandes camadas, y la contribución materna en forma de RNA es muy grande, por lo que la transición materno-cigótica se ve muy recompensada y los individuos heterocigotos con fenotipo CHARGE son muy bajos. Al llegar la transición cigótica, el paso a la función cigótica de *chd7* y establecimiento de la senescencia, recupera el fenotipo de la mayoría de los embriones al ser portadores de mutaciones *nonsense* con PTCs. Lo mismo pasaría en humanos. Sin embargo, estos peces cebra, recompensados por su propio gen sano, producen fenotipos al envejecer en los adultos. Esto podría deberse a la pérdida de la proteostasis y acumulación de PTCs que también se observa en el embrión debido a las mutaciones *nonsense* en el gen *chd7*. Las alteraciones espacio-temporales implican una contribución materna de la carga en *chd7* en las células, produciendo la alteración materno-cigótica local, la variabilidad en la expresividad y la penetrancia incompleta del fenotipo. Sin embargo, la aparición tardía del fenotipo adulto y su alta expresividad y penetrancia contribuyen a la explicación de la función cigótica y en el adulto de *chd7*, seguramente mediante la senescencia celular en la reparación, regeneración y diferenciación de los tejidos adultos. La senescencia celular se ha visto alterada en el proceso de regeneración a través del aumento de la actividad SA-β-Gal en el tejido amputado, lo que podría implicar una mayor activación de la senescencia celular o un mayor número de células con actividad SA-β-Gal como los macrófagos en el tejido. Esta sobreactivación de la senescencia podría deberse a una acumulación de PTC y el aumento de la expresión de *chd7* por la GCR en los adultos mutantes heterocigotos para *chd7* más viejos, o puede que una pérdida de la proteostasis igual que en humanos.

3.1. Las deficiencias en el síndrome de CHARGE se deben a alteraciones en la regulación espacio-temporal de la senescencia embrionaria debido a las alteraciones materno-cigóticas de la carga en *CHD7*

USC UNIVERSIDADE DE COMPOSTELA

3.2. La activación del programa de senescencia embrionario, es dependiente de la carga materna de *chd7*, antes de la ZGA en pez cebra y probablemente en humanos
3.3. Las mutaciones *nonsense* en *chd7* producen alteraciones en la senescencia celular y la regeneración tisular de los adultos de pez cebra.

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

BIBLIOGRAFÍA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

BIBLIOGRAGÍA

Abdelilah S. et al. Implications for dorsoventral axis determination from the zebrafish mutation janus. *Nature* **370**, 468-471 (1994) (doi: 10.1038/370468a0)

Abrahams L. et al. Evidence in disease and non-disease contexts that nonsense mutations cause altered splicing via motif disruption. *Nucleic Acids Res*. **49**, 9665-9685 (2021) (doi: 10.1093/nar/gkab750)

Abrams E.W. y Mullins M.C. Early zebrafish development: it's in the maternal genes. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **19**, 396-403 (2009) (doi: 10.1016/j.gde.2009.06.002)

Acosta J.C. et al. Chemokine signaling via the CXCR2 receptor reinforces senescence. *Cell* **133**, 1006–1018 (2008) (doi: 10.1016/j.cell.2008.03.038)

Acosta J.C. et al. A complex secretory program orchestrated by the inflammasome controls paracrine senescence. *Nat. Cell Biol*. **15**, 978–990 (2013) (doi: 10.1038/ncb2784)

Aguet F. et al. Genetic effects on gene expression across human tissues. *Nature* **550**, 204–213 (2017) (doi: 10.1038/nature24277)

Ahluwalia J.K. et al. Incomplete penetrance and variable expressivity: is there a microRNA connection? *Bioessays* **31**, 981-992 (2009) (doi: 10.1002/bies.200900066)

Albert R. Scale-free networks in cell biology. *J Cell Sci.* **118**(Pt 21), 4947-57 (2005) (doi: 10.1242/jcs.02714)

Alexandrov A. et al. Human eIF4AIII interacts with an eIF4G-like partner, NOM1, revealing an evolutionarily conserved function outside the exon junction complex. *Genes Dev.* **25**, 1078–1090 (2011) (doi: 10.1101/gad.2045411)

Alizadeh Z. et al. Degradation of maternal mRNA in mouse embryos: selective degradation of specific mRNA after fertilization. *Mol. Reprod. Dev.* **72**, 281-290 (2005) (doi: 10.1002/mrd.20340)

Allison C. y Hughes C. Bacterial swarming: an example of prokaryotic differentiation and multicellular behaviour. *Sci Prog*. 75(298 Pt 3-4), 403-22. (1991) (PMID: 1842857)

Altschul S.F. et al. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* **215**, 403-410 (1990) (doi: 10.1016/S0022-2836(05)80360-2)

Amores A. et al. Zebrafish hox clusters and vertebrate genome evolution. *Science* **282**, 1711-1714 (1998) (doi: 10.1126/science.282.5394)

Amorim J.P. et al. A conserved notochord enhancer controls pancreas development in Vertebrates. *Cell Rep.* **32**, 107862 (2020) (doi: 10.1016/j.celrep.2020.107862)

Amoyel M. et al. Wnt1 regulates neurogenesis and mediates lateral inhibition of boundary cell specification in the zebrafish hindbrain. *Development* **132**, 775-785 (2005) (doi: 10.1242/dev.01616)

Amrani N. et al. A faux 3′-UTR promotes aberrant termination and triggers nonsense-mediated mRNA decay. *Nature* **432**, 112–118 (2004) (doi: 10.1038/nature03060)

USC DE SANTIAGO

Amsterdam A. et al. Identification of 315 genes essential for early zebrafish development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**, 12792-12797 (2004) (doi: 10.1073/pnas.0403929101)

Amsterdam A. y Hopkins N. Mutagenesis strategies in zebrafish for identifying genes involved in development and disease. *Trends Genet*. **22**, 473-478 (2006) (doi: 10.1016/j.tig.2006.06.011)

Ando K. et al. Clarification of mural cell coverage of vascular endothelial cells by live imaging of zebrafish. *Development* **143**, 1328-1339 (2016) (doi: 10.1242/dev.132654)

Ando K. et al. Conserved and context-dependent roles for pdgfrb signaling during zebrafish vascular mural cell development. *Dev. Biol.* **479**, 11-22 (2021) (doi: 10.1016/j.ydbio.2021.06.010)

Angelman H. Syndrome of coloboma with multiple congenital abnormalities in infancy. *Br Med J*. **1**(5234), 1212-4. (1961) (doi: 10.1136/bmj.1.5234.1212)

Aramaki M. et al. Embryonic expression profile of chicken CHD7, the ortholog of the causative gene for CHARGE syndrome. *Birth Defects Res. A Clin. Mol. Teratol*. **79**, 50-57 (2007) (doi: 10.1002/bdra.20330)

Arana A. Estudio del fenotipo CHARGE en un pez cebra mutante CRISPR en el gen *chd7* (2016) [Trabajo Fin de Master] Universidade de Santiago de Compostela

Aref-Eshghie E. et al. Genomic DNA methylation signatures enable concurrent diagnosis and clinical genetic variant classification in neurodevelopmental syndromes. *Am. J. Hum. Genet.* **102**, 156-174 (2018) (doi: 10.1016/j.ajhg.2017.12.008)

Arya R. y White K. Cell death in development: Signaling pathways and core mechanisms. *Semin. Cell Dev. Biol.* **39**, 12-19 (2015) (doi: 10.1016/j.semcdb.2015.02.001)

Asad Z. et al. Rescue of neural crest-derived phenotypes in a zebrafish CHARGE model by Sox10 downregulation. *Hum. Mol. Genet.* **25,** 3539-3554 (2016) (doi: 10.1093/hmg/ddw198)

Assing K. et al. CD4+ CD31+ recent thymic emigrants in CHD7 haploinsufficiency (CHARGE syndrome): a case. *Hum. Immunol.* **74**, 1047-1050 (2013) (doi: 10.1016/j.humimm.2013.06.002)

Bachvarova R. y Moy K. Autoradiographic studies on the distribution of labeled maternal RNA in early mouse embryos. *J. Exp. Zool.* **233**, 397-403 (1985) (doi: 10.1002/jez.1402330308)

Badodi S. et al. Convergence of BMI1 and CHD7 on ERK signaling in medulloblastoma. *Cell Rep*. **21**, 2772-2784 (2017) (doi: 10.1016/j.celrep.2017.11.021)

Bajpai R. et al. CHD7 cooperates with PBAF to control multipotent neural crest formation. *Nature* **463**, 958-962 (2010) (doi: 10.1038/nature08733)

Baker KE, Parker R. Nonsense-mediated mRNA decay: terminating erroneous gene expression. Curr Opin Cell Biol. **16**(3); 293-9 (2004) (doi: 10.1016/j.ceb.2004.03.003)

Balasubramanian et al. Functionally compromised CHD7 alleles in patients with isolated GnRH deficiency. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **111,** 17953-17958 (2014) (doi: 10.1073/pnas.1417438111)

Balow S. et al. Knockdown of *fbxl10/kdm2bb* rescues *chd7* morphant phenotype in a zebrafish model of CHARGE syndrome. *Dev. Biol.* **382,** *57-69.* (2013) (doi: 10.1016/j.ydbio.2013.07.026)

USC DE COMPOSTELA

Barabási A.L. y Oltvai Z.N. Network biology: understanding the cell's functional organization. *Nat. Rev. Genet.* **5,** 101-113 (2004) (doi: 10.1038/nrg1272)

Baroux C. et al. The maternal to zygotic transition in animals and plants. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol*. **73**, 89-100 (2008) (doi: 10.1101/sqb.2008.73.053)

Barrangou R. et al. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science*. **315**(5819), 1709-12 (2007) (doi: 10.1126/science.1138140)

Barrenas F. et al. Network properties of complex human disease genes identified through genome-wide association studies. *PLoS One* **4**, e8090 (2009) (doi: 10.1371/journal.pone.0008090)

Bashirullah A. et al. Joint action of two RNA degradation pathways controls the timing of maternal transcript elimination at the midblastula transition in *Drosophila melanogaster*. *EMBO J.* **18**, 2610-2620 (1999) (doi: 10.1093/emboj/18.9.2610)

Bashyam M.D. Nonsense-mediated decay: linking a basic cellular process to human disease. *Expert. Rev. Mol. Diagn.* **9**, 299-303 (2009) (doi: 10.1586/erm.09.18)

Basson M.A. y van Ravenswaaij-Arts C. Functional insights into chromatin remodelling from studies on CHARGE syndrome. *Trends Genet.* **31**, 600-611 (2015) (doi: 10.1016/j.tig.2015.05.009)

Batsukh T. et al. CHD8 interacts with CHD7, a protein which is mutated in CHARGE syndrome. *Hum. Mol. Genet*. **19**, 2858-2866 (2010) (doi: 10.1093/hmg/ddq189)

Batsukh T. et al. Identification and characterization of FAM124B as a novel component of a CHD7 and CHD8 containing complex. *PLoS One* **7**, e52640 (2012) (doi: 10.1371/journal.pone.0052640)

Beattie C.E. Control of motor axon guidance in the zebrafish embryo. *Brain Res. Bull.* **53**, 489-500 (2000) (doi: 10.1016/s0361-9230(00)00382-8)

Bebbere D. et al. The subcortical maternal complex: multiple functions for one biological structure? *J. Assist. Reprod. Genet.* **33**, 1431-1438 (2016) (doi: 10.1007/s10815-016-0788-z)

Benchling [Biology Software]. (2022). Retrieved from https://benchling.com

Bennett JT. et al. Maternal nodal and zebrafish embryogenesis. *Nature*. **450**, E1-2 (2007) doi: 10.1038/nature06314)

Bergman J.E. et al. A novel classification system to predict the pathogenic effects of CHD7 missense variants in CHARGE syndrome. *Hum. Mutat*. **33**, 1251-1260 (2012) (doi: 10.1002/humu.22106)

Bergman J.E.H. et al. CHD7 mutations and CHARGE syndrome: the clinical implications of an expanding phenotype. *J. Med. Genet.* **48,** 334-342 (2011) (doi: 10.1136/jmg.2010.087106)

Bernier R. et al. Disruptive CHD8 mutations define a subtype of autism early in development. *Cell* **158**, 263-276 (2014) (doi: 10.1016/j.cell.2014.06.017)

Bertrand J.Y. et al. Three pathways to mature macrophages in the early mouse yolk sac. *Blood* **106**, 3004-3011(2005) (doi: 10.1182/blood-2005-02-0461)

Bhuiyan Z.A., et al. Recurrent intrauterine fetal loss due to near absence of HERG: clinical and functional characterization of a homozygous nonsense HERG Q1070X mutation. *Heart Rhythm*. **5**, 553-561 (2008) (doi: 10.1016/j.hrthm.2008.01.020)

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Bill B.R. et al. A primer for morpholino use in zebrafish. *Zebrafish* **6,** 69–77 (2009) (doi: 10.1089/zeb.2008.0555)

Birkhoff J.C. et al. ZEB2, the Mowat-Wilson syndrome transcription factor: confirmations, novel functions, and continuing surprises. *Genes (Basel)* **12**, 1037 (2021) (doi: 10.3390/genes12071037)

Bjornsson H.T. The Mendelian disorders of the epigenetic machinery. *Genome Res*. **25**, 1473–1481 (2015) (doi: 10.1101/gr.190629.115)

Blake K.D. et al. CHARGE association: An update and review for the primary pediatrician. *Clin. Pediatr.* **37,** 159–173 (1998) (doi: 10.1177/000992289803700302)

Blake K.D. et al. Adolescent and adult issues in CHARGE syndrome. *Clin Pediatr (Phila)*. **44**, 151-9 (2005) (doi: 10.1177/000992280504400207)

Blustajn J. et al. Olfactory anomalies in CHARGE syndrome: imaging findings of a potential major diagnostic criterion. *AJNR Am. J. Neuroradiol*. **29**, 1266-1269 (2008) (doi: 10.3174/ajnr.A1099)

Boer E.F. et al. Neural crest migration and survival are susceptible to morpholino-induced artifacts. *PLoS One* **11**, e0167278 (2016) (doi: 10.1371/journal.pone.0167278)

Bosman E.A. et al. Multiple mutations in mouse Chd7 provide models for CHARGE syndrome. *Hum. Mol. Genet.* **14**, 3463-3476 (2005) (doi: 10.1093/hmg/ddi375)

Bouazoune K. y Kingston, R.E. Chromatin remodeling by the CHD7 protein is impaired by mutations that cause human developmental disorders. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **109,** 19238–19243 (2012) (doi: 10.1073/pnas.1213825109)

Boukas L. et al. Coexpression patterns define epigenetic regulators associated with neurological dysfunction. *Genome Res*. **29**, 532-542 (2019) (doi: 10.1101/gr.239442.118)

Boycott K.M. et al. International cooperation to enable the diagnosis of all rare genetic diseases. *Am. J. Hum. Genet.* **100**, 695-705 (2017) (doi: 10.1016/j.ajhg.2017.04.003)

Braumüller H. et al. T-helper-1-cell cytokines drive cancer into senescence. *Nature*. **494**(7437), 361-5 (2013) (doi: 10.1038/nature11824)

Brehm A. et al. The many colours of chromodomains. *Bioessays* **26,** 133–140 (2004) (doi: 10.1002/bies.10392)

Bromleigh V.C. y Freedman L.P. p21 is a transcriptional target of HOXA10 in differentiating myelomonocytic cells. *Genes Dev.* **14**, 2581-2586 (2000) (doi: 10.1101/gad.817100)

Bronner-Fraser M. y Fraser S. Developmental potential of avian trunk neural crest cells in situ. *Neuron*. **3**, 755-766 (1989) (doi: 10.1016/0896-6273(89)90244-4)

Bronner-Fraser M. y Fraser S.E. Cell líneage analysis reveals multipotency of some avian neural crest cells. *Nature* **335**, 161-164 (1988) (doi: 10.1038/335161a0)

Brouns S.J.J. et al. Small CRISPR RNA guide antiviral defense in prokaryotes. *Science* **321**, 960-964 (2008) (doi: 10.1126/science.1159689)

Brown D.L. et al. Apoptosis down-regulates inflammation under the advancing epithelial wound edge: Delayed patterns in diabetes and improvement with topical growth factors. *Surgery* **121**, 372-380 (1997) (doi: 10.1016/s0039-6060(97)90306-8)

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Buglo E. et al. Genetic compensation in a stable slc25a46 mutant zebrafish: A case for using F0 CRISPR mutagenesis to study phenotypes caused by inherited disease. *PLoS ONE* **15**, e0230566 (2020) (doi: 10.1371/journal.pone.0230566)

Bühler M. et al. EJC-Independent degradation of nonsense immunoglobulin-mu mRNA depends on 3′ UTR length. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **13**, 462- 464 (2006) (doi: 10.1038/nsmb1081)

Buphamalai P. et al. Network analysis reveals rare disease signatures across multiple levels of biological organization. *Nat. Commun*. **12**, 6306 (2021) (doi: 10.1038/s41467-021-26674-1)

Burger A. et al. Maximizing mutagenesis with solubilized CRISPR-Cas9 ribonucleoprotein complexes. *Development* **143**, 2025-2037 (2016) (doi: 10.1242/dev.134809)

Burns K.H. et al. Roles of NPM2 in chromatin and nucleolar organization in oocytes and embryos. *Science* **300**, 633-636 (2003) (doi: 10.1126/science.1081813)

Buss R.R. et al. Adaptive roles of programmed cell death during nervous system development. *Annu. Rev. Neurosci.* **29**, 1-35 (2006) (doi: 10.1146/annurev.neuro.29.051605.112800)

Butcher D.T. et al. CHARGE and Kabuki syndromes: gene-specific DNA methylation signatures identify epigenetic mechanisms linking these clinically overlapping conditions. *Am. J. Hum. Genet.* **100**, 773-788 (2017) (doi: 10.1016/j.ajhg.2017.04.004)

Cade L. et al. Highly efficient generation of heritable zebrafish gene mutations using homo- and heterodimeric TALENs. *Nucleic Acids Res*. **40**, 8001-10 (2012) (doi: 10.1093/nar/gks518.)

Calloni G.W. et al. Sonic Hedgehog promotes the development of multipotent neural crest progenitors endowed with both mesenchymal and neural potentials. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **104**, 19879-19884 (2007) (doi: 10.1073/pnas.0708806104)

Calloni G.W. et al.High frequency of cephalic neural crest cells shows coexistence of neurogenic, melanogenic, and osteogenic differentiation capacities. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **106**, 8947-8952 (2009) (doi: 10.1073/pnas.0903780106)

Calmont A. et al. Tbx1 controls cardiac neural crest cell migration during arch artery development by regulating Gbx2 expression in the pharyngeal ectoderm. *Development* **136**, 3173-3183 (2009) (doi: 10.1242/dev.028902)

Campisi J. y d'Adda di Fagagna F. Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol*. **8,** 729–740 (2007) (doi: 10.1038/nrm2233)

Campisi J. Cell biology: The beginning of the end. *Nature*. **505**(7481), 35-6. (2014) (doi: 10.1038/nature12844

Cardenas-Rodríguez M. et al. Genetic compensation for cilia defects in cep290 mutants by upregulation of cilia-associated small GTPases. *J. Cell Sci.* **134**, jcs258568 (2021) (doi: 10.1242/jcs.258568)

Carelle-Calmels N. et al. Genetic compensation in a human genomic disorder. *N. Engl. J. Med.* **360**, 1211-1216 (2009) (doi: 10.1056/NEJMoa0806544)

Castel S.E. et al. Modified penetrance of coding variants by cis-regulatory variation contributes to disease risk. *Nat. Genet.* **50**, 1327-1334 (2018) (doi: 10.1038/s41588-018-0192-y)

Cattanach BM. Parental origin effects in mice. *J. Embryol. Exp. Morphol.* **97**, 137-150 (1986)

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Cavanaugh A.M. et al. Two developmentally distinct populations of neural crest cells contribute to the zebrafish heart. *Dev. Biol.* **404**, 103–112 (2015) (doi: 10.1016/j.ydbio.2015.06.002)

Cevenini E. et al. Inflamm-ageing. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. **16**(1):14-20. (2013) (doi: 10.1097/MCO.0b013e32835ada13)

Chai M. et al. Chromatin remodeler CHD7 regulates the stem cell identity of human neural progenitors. *Genes Dev.* **32**, 165-180 (2018) (doi: 10.1101/gad.301887.117)

Chakrabarti S. et al. Frequency of gamma-ray induced specific locus and recessive lethal mutations in mature germ cells of the zebrafish, *Brachydanio rerio*. *Genetics* **103,** 109–123 (1983) (doi: 10.1093/genetics/103.1.109.)

Chang D.C. y Meng C. A localized elevation of cytosolic free calcium is associated with cytokinesis in the zebrafish embryo. *J. Cell Biol.* **131**, 1539-1545 (1995) (doi: 10.1083/jcb.131.6.1539)

Cheng J. et al. CHD7 in oocytes is essential for female fertility. *Ann Transl Med*. **10**(5), 260. (2022) (doi: 10.21037/atm-22-609)

Chen R. et al. FitSNPs: highly differentially expressed genes are more likely to have variants associated with disease. *Genome Biol.* **9**, R170 (2008) (doi: 10.1186/gb-2008-9-12-r170)

Chen X. et al. Key role for CTCF in establishing chromatin structure in human embryos. *Nature.* **576**, 306–310 (2019) (doi.org: 10.1038/s41586-019-1812-0)

Chen N. et al. Case report: novel PCDH15 variant causes usher syndrome type 1F with congenital hearing loss and syndromic retinitis pigmentosa. *BMC Ophthalmol*. **22**(1):441 (2022) (doi: 10.1186/s12886-022-02659-6)

Chennault T. y Podrabsky J.E. et al. Aerobic and anaerobic capacities differ in embryos of the annual killifish Austrofundulus limnaeus that develop on alternate developmental trajectories. *J Exp Zool A Ecol Genet Physiol*. 313(9), 587-96 (2010) (doi: 10.1002/jez.632)

Chiang E.F. et al. Two sox9 genes on duplicated zebrafish chromosomes: expression of similar transcription activators in distinct sites. *Dev. Biol.* **231**, 149-163 (2001) (doi: 10.1006/dbio.2000.0129)

Childs B.G. et al. Senescent Cells: an emerging target for diseases of ageing. *Nat. Rev. Drug Discov.* **16**, 718-735 (2017) (doi: 10.1038/nrd.2017.116)

Chinn I.K. y Shearer W.T. Severe combined immunodeficiency disorders. Immunol. *Allergy Clin. North Am.* **35**, 671-694 (2015) (doi: 10.1016/j.iac.2015.07.002)

Chong J.X. et al. The genetic basis of mendelian phenotypes: discoveries, challenges, and opportunities. *Am. J. Hum. Genet.* **97**, 199-215 (2015) (doi: 10.1016/j.ajhg.2015.06.009)

Christian M. et al. Targeting DNA double-strand breaks with TAL effector nucleases. *Genetics* **186**, 757-761 (2010) (doi: 10.1534/genetics.110.120717)

Christians E. et al. Maternal effect of Hsf1 on reproductive success. *Nature* **407**, 693-694 (2000) (doi: 10.1038/35037669)

Chuprin A. et al. Cell fusion induced by ERVWE1 or measles virus causes cellular senescence. *Genes Dev.* **27**, 2356-2366 (2013) (doi: 10.1101/gad.227512.113)

Ciruna B. et al. Production of maternal-zygotic mutant zebrafish by germ-line replacement. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **99,** 14919–14924 (2002) (doi: 10.1073/pnas.222459999)

USC UNIVERSIDADE DE COMPOSTELA

Clark D.P. et al. Genome Defense. En *Molecular Biology* (Third Edition) (eds. Clark, D.P., Pazdernik, N.J. & McGehee, M.R.) Academic Cell (2019) pp: 622-653

Claussnitzer M. et al. A brief history of human disease genetics. *Nature* **577**, 179-189 (2020) (doi: 10.1038/s41586-019-1879-7)

Cloney K. et al. Etiology and functional validation of gastrointestinal motility dysfunction in a zebrafish model of CHARGE syndrome. *FEBS J.* **285**, 2125-2140 (2018) (doi:10.1111/febs.14473)

Collado M. et al. Cellular senescence in cancer and aging. *Cell* **130,** 223–233 (2007) (doi: 10.1016/j.cell.2007.07.003)

Collado M. y Serrano M. Senescence in tumours: evidence from mice and humans. *Nat. Rev. Cancer* **10**, 51-57 (2010) (doi: 10.1038/nrc2772)

Collado M. y Serrano M. The power and the promise of oncogene- induced senescence markers. *Nat. Rev. Cancer* **6,** 472–476. (2006) (doi: 10.1038/nrc1884)

Coll-Tané M. et al. The CHD8/CHD7/Kismet family links blood-brain barrier glia and serotonin to ASD-associated sleep defects. *Sci. Adv*. **7**, eabe2626 (2021) (doi: 10.1126/sciadv.abe2626)

Conaway R.C. y Conaway J.W. The INO80 chromatin remodeling complex in transcription, replication and repair. *Trends Biochem. Sci.* **34,** 71–77 (2009) (doi: 10.1016/j.tibs.2008.10.010)

Conradt B. Genetic control of programmed cell death during animal development. *Annu. Rev. Genet.* **43,** 493–523 (2009) (doi: 10.1146/annurev.genet.42.110807.091533)

Cooper D.N. et al. Where genotype is not predictive of phenotype: towards an understanding of the molecular basis of reduced penetrance in human inherited disease. *Hum. Genet.* **132**, 1077-1130 (2013) (doi: 10.1007/s00439-013-1331-2)

Cooper D.W. Directed genetic change model for X chromosome inactivation in eutherian mammals. *Nature* **230**, 292-294 (1971) (doi: 10.1038/230292a0)

Coppé J.P. et al. The senescence-associated secretory phenotype: the dark side of tumor suppression. *Annu. Rev. Pathol.* **5,** 99–118 (2010) (doi: 10.1146/annurev-pathol-121808-102144)

Corentine M. The role of Chd7 & Chd8 chromatin remodelers in oligodendrogenesis and (re)myelination. Neurons and Cognition [q-bio.NC]. *Tesis Doctoral.* Université Pierre et Marie Curie- Paris VI (2017). English. NNT: 2017PA066365. tel-01737394 (https://theses.hal.science/tel-01737394/document)

Cornet C. et al. Combining Zebrafish and CRISPR/Cas9: Toward a More Efficient Drug Discovery Pipeline. *Front Pharmacol*. **9**:703 (2018) doi: 10.3389/fphar.2018.00703)

Corsten-Janssen N. y Scambler P.J. Clinical and molecular effects of CHD7 in the heart. *Am. J. Med. Genet. C. Semin. Med. Genet*. **175**, 487-495 (2017) (doi: 10.1002/ajmg.c.31590)

Couly G.F. et al. The triple origin of skull in higher vertebrates: a study in quail-chick chimeras. *Development* **117**, 409-429 (1993) (doi: 10.1242/dev.117.2.409)

Coventry A. et al. Deep resequencing reveals excess rare recent variants consistent with explosive population growth. *Nat Commun*. **1**, 131 (2010) (doi: 10.1038/ncomms1130)

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Cowen L. et al. Network propagation: a universal amplifier of genetic associations. *Nat. Rev. Genet.* **18**, 551-562 (2017) (doi: 10.1038/nrg.2017.38)

Crawford H. et al. Genetic modifiers in rare disorders: the case of fragile X syndrome. *Eur. J. Hum. Genet.* **29**, 173–183 (2021) (doi: 10.1038/s41431-020-00711-x

Cresko W.A. et al. Genome duplication, subfunction partitioning, and líneage divergence: Sox9 in stickleback and zebrafish. *Dev. Dyn.* **228**, 480-489 (2003) (doi: 10.1002/dvdy.10424)

Créton R. et al. Patterns of free calcium in zebrafish embryos. *J. Cell Sci.* **111**, 1613-1622 (1998) (doi: 10.1242/jcs.111.12.1613)

Creyghton M.P. et al. Histone H3K27ac separates active from poised enhancers and predicts developmental state. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107, 21931-21936 (2010) (doi: 10.1073/pnas.1016071107)

Cuadros M.A. et al. First appearance, distribution, and origin of macrophages in the early development of the avian central nervous system. *J. Comp. Neurol.* **330**, 113-129 (1993) (doi: 10.1002/cne.903300110)

Cunningham F et al. Ensembl 2022. *Nucleic Acids Res* **50(D1)**: D988-D995 (2022) (doi: 10.1093/nar/gkab1049.)

Da Silva-Álvarez S. et al. Cell senescence contributes to tissue regeneration in zebrafish. *Aging Cell* **19**, e13052 (2020) (doi: 10.1111/acel.13052)

Da Silva-Álvarez S. et al. Developmentally-programmed cellular senescence is conserved and widespread in zebrafish. *Aging*. **2**(18), 17895-17901. (2020) (doi: 10.18632/aging.103968)

Da Silva-Álvarez S. et al. The development of cell senescence. *Exp. Gerontol*. **128**, 110742 (2019) (doi: 10.1016/j.exger.2019.110742)

Delahaye A. et al. Familial CHARGE syndrome because of CHD7 mutation: clinical intra- and interfamilial variability. *Clin. Genet.* **72**, 112-121 (2007) (doi: 10.1111/j.1399-0004.2007.00821.x)

Delmas V. et al. A mammalian DNA-binding protein that contains a chromodomain and an SNF2/SWI2-like helicase domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 2414-2418 (1993) (doi: 10.1073/pnas.90.6.2414)

Demaria M. et al. An essential role for senescent cells in optimal wound healing through secretion of PDGF-AA. *Dev. Cell.* **31**, 722-733 (2014) (doi: 10.1016/j.devcel.2014.11.012)

Diep C.H. et al. Progesterone receptors induce FOXO1-dependent senescence in ovarian cancer cells. *Cell Cycle*. **12**, 1433-1449 (2013) (doi: 10.4161/cc.24550)

Dilshat R. et al. Epigenetic regulation during melanocyte development and homeostasis. *Exp. Dermatol.* **30**, 1033-1050 (2021) (doi: 10.1111/exd.14391)

Dimri G.P. et al. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **92**, 9363–9367 (1995) (doi: 10.1073/pnas.92.20.9363)

Diogo R. et al. A new heart for a new head in vertebrate cardiopharyngeal evolution. *Nature* **520**, 466-473 (2015) (doi: 10.1038/nature14435)

Dixon J. et al. Treacher Collins syndrome. *Orthod. Craniofac. Res.* **10**, 88-95 (2007) (doi: 10.1111/j.1601-6343.2007.00388.x)

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Doi T. et al. Chd7 Collaborates with Sox2 to regulate activation of oligodendrocyte precursor cells after spinal cord injury. *J. Neurosci.* **37**, 10290-10309 (2017) (doi: 10.1523/JNEUROSCI.1109-17.2017)

Doma M.K. y Parker R. RNA quality control in eukaryotes. *Cell* **131**, 660-668 (2007) (doi: 10.1016/j.cell.2007.10.041)

Dooley C.M. et al. The gene regulatory basis of genetic compensation during neural crest induction. P*LoS Genet*. **15**, e1008213 (2019) (doi: 10.1371/journal.pgen.1008213)

Doudna J.A. y Charpentier E. Genome editing. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science* **346**, 1258096 (2014) (doi: 10.1126/science.1258096)

Doyon Y. et al. Heritable targeted gene disruption in zebrafish using designed zinc-finger nucleases. *Nat. Biotechnol.* **26,** 702–708 (2008) (doi: 10.1038/nbt1409)

Driever W. et al. A genetic screen for mutations affecting embryogenesis in zebrafish. *Development* **123,** 37–46 (1996) (doi: 10.1242/dev.123.1.37)

Durruthy-Durruthy R. et al. Reconstruction of the mouse otocyst and early neuroblast líneage at single-cell resolution. *Cell* **157**, 964-978 (2014) (doi: 10.1016/j.cell.2014.03.036)

Eisen J.S. y Smith J.C. Controlling morpholino experiments: don't stop making antisense. *Development* **135**, 1735-1743 (2008) (doi: 10.1242/dev.001115)

Elabd S. et al. Delay in development and behavioural abnormalities in the absence of p53 in zebrafish. *PLoS One* **14**, e0220069 (2019) (doi: 10.1371/journal.pone.0220069)

El-Brolosy M.A. et al. Genetic compensation triggered by mutant mRNA degradation. *Nature* **568**, 193-197 (2019) (doi: 10.1038/s41586-019-1064-z.)

El-Brolosy M.A. y Stainier D.Y.R. Genetic compensation: A phenomenon in search of mechanisms. *PLoS Genet.* **13**, e1006780 (2017) (doi: 10.1371/journal.pgen.1006780)

Engelen E. et al. Sox2 cooperates with Chd7 to regulate genes that are mutated in human syndromes. *Nat. Genet.* **43**, 607-611 (2011) (doi: 10.1038/ng.825)

Fahrner J.A. y Bjornsson H.T. Mendelian disorders of the epigenetic machinery: postnatal malleability and therapeutic prospects. *Hum Mol Genet.* **28(R2)**, R254-R264 (2019) (doi: 10.1093/hmg/ddz174)

Feil R. y Berger F. Convergent evolution of genomic imprinting in plants and mammals. *Trends Genet.* **23**, 192-199 (2007) (doi: 10.1016/j.tig.2007.02.004)

Field H.A. et al. Formation of the digestive system in zebrafish. I. Liver morphogenesis. *Dev. Biol.* **253,** 279-290 (2003) (doi: 10.1016/s0012-1606(02)00017-9)

Force A. et al. Preservation of duplicate genes by complementary, degenerative mutations. *Genetics* **151**, 1531-1545 (1999) (doi: 10.1093/genetics/151.4.1531)

Frischmeyer P.A. y Dietz H.C. Nonsense-Mediated mRNA decay in health and disease. *Hum. Mol. Genet.* **8**, 1893–1900 (1999) (doi: 10.1093/hmg/8.10.1893)

Fuchs Y. y Steller H. Programmed cell death in animal development and disease. *Cell* **147**, 742-758 (2011) (doi: 10.1016/j.cell.2011.10.033)

Fujita K. et al. Roles of chromatin remodelers in maintenance mechanisms of multipotency of mouse trunk neural crest cells in the formation of neural crest-derived stem cells. *Mech Dev*. **133,126**-45 (2014) (doi: 10.1016/j.mod.2014.05.001)

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Fujita K. et al. CHD7, Oct3/4, Sox2, and Nanog control FoxD3 expression during mouse neural crest-derived stem cell formation. *FEBS J.* **283**, 3791-3806 (2016) (doi: 10.1111/febs.138439)

Gage P.J. et al. Mouse models for the dissection of CHD7 Functions in eye development and the molecular basis for ocular defects in CHARGE syndrome. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **56**, 7923-7930 (2015) (doi: 10.1167/iovs.15-18069)

Gans M. et al. Isolation and characterization of sex-linked female-sterile mutants in *Drosophila melanogaster. Genetics* **81**, 683-704 (1975) (doi: 10.1093/genetics/81.4.683)

Gao X. et al. CHD7 gene polymorphisms are associated with susceptibility to idiopathic scoliosis. *Am. J. Hum. Genet.* **80**, 957-965 (2007) (doi: 10.1086/513571)

Gao Z, Waggoner D, Stephens M, Ober C, Przeworski M. An estimate of the average number of recessive lethal mutations carried by humans. *Genetics*. **199**(4), 1243-54. (2015) (doi: 10.1534/genetics.114.173351)

Gao Z. et al. Zbed3 participates in the subcortical maternal complex and regulates the distribution of organelles. *J. Mol. Cell Biol.* **10**, 74-88 (2018) (doi: 10.1093/jmcb/mjx035)

Garneau J.E. et al. The CRISPR/Cas bacterial immune system cleaves bacteriophage and plasmid DNA. *Nature* **468**, 67-71 (2010) (doi: 10.1038/nature09523)

Geiman T.M. y Robertson K.D. Chromatin remodeling, histone modifications, and DNA methylation-how does it all fit together? *J. Cell Biochem*. **87**, 117-125 (2002) (doi: 10.1002/jcb.10286)

Genade T. et al. Annual fishes of the genus *Nothobranchius* as a model system for aging research. *Aging Cell* **4**, 223-233 (2005) (doi: 10.1111/j.1474-9726.2005.00165.x)

Gennery A.R. et al. Mutations in CHD7 in patients with CHARGE syndrome cause T-B + natural killer cell + severe combined immune deficiency and may cause Omenn-like syndrome. *Clin. Exp. Immunol.* **153**, 75-80 (2008) (doi: 10.1111/j.1365-2249.2008.03681.x)

Gerety S.S. y Wilkinson D.G. Morpholino artifacts provide pitfalls and reveal a novel role for pro-apoptotic genes in hindbrain boundary development. *Dev. Biol.* **350**, 279-289 (2011) (doi: 10.1016/j.ydbio.2010.11.030)

Giacomotto J. et al. Effective heritable gene knockdown in zebrafish using synthetic microRNA. *Nat. Commun*. **6**, 7378 (2015) (doi: 10.1038/ncomms8378)

Gibaja A. et al. TGFβ2-induced senescence during early inner ear development. *Sci Rep*. **9**(1), 5912 (2019) (doi: 10.1038/s41598-019-42040-0)

Giraldez A.J. et al. Zebrafish MiR-430 promotes deadenylation and clearance of maternal mRNA. *Science* **312**, 75-79 (2006) (doi: 10.1126/science.1122689)

Glazier A.A. et al. Allelic imbalance and haploinsufficiency in MYBPC3-linked hypertrophic cardiomyopathy. *Pflugers Arch.* **471**, 781-793 (2019) (doi: 10.1007/s00424-018-2226-9)

Goh KI. et al. The human disease network. *Proc Natl Acad Sci USA*. **104**(21), 8685-90 (2007) (doi: 10.1073/pnas.0701361104)

Gonçalves C.I. et al. High frequency of CHD7 mutations in congenital hypogonadotropic hypogonadism. *Sci. Rep.* **9**, 1597 (2019) (doi: 10.1038/s41598-018-38178-y)

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Gong Q. et al. Nonsense mutations in hERG cause a decrease in mutant mRNA transcripts by nonsense-mediated mRNA decay in human long-QT syndrome. *Circulation* **116**, 17-24 (2007) (doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.107.708818)

Gong Q. et al. Position of premature termination codons determines susceptibility of hERG mutations to nonsense-mediated mRNA decay in long QT syndrome. *Gene* **539**, 190-197 (2014) (doi: 10.1016/j.gene.2014.02.012)

Gong Q. y Zhou Z. Nonsense-mediated mRNA decay of hERG mutations in long QT syndrome. *Methods Mol. Biol.* **1684**, 37-49. (2018) (doi: 10.1007/978-1-4939-7362-0_4)

Gonzaga-Jauregui C. et al. Human genome sequencing in health and disease. Annu Rev Med. **63**, 35-61 (2012) (doi: 10.1146/annurev-med-051010-162644)

Goodrich J.K. et al. Determinants of penetrance and variable expressivity in monogenic metabolic conditions across 77,184 exomes. *Nat. Commun.* **12**, 3505 (2021) (doi: 10.1038/s41467-021-23556-4)

Graf M. et al. Absence of replicative senescence in cultured cells from the short-lived killifish *Nothobranchius furzeri. Exp. Gerontol.* **48**, 17-28 (2013) (doi: 10.1016/j.exger.2012.02.012)

Graham CF. The production of parthenogenetic mammalian embryos and their use in biological research. *Biol Rev Camb Philos Soc*. **49**(3), 399-424 (1974) (doi: 10.1111/j.1469-185x.1974.tb01085.x)

Grant M.G. et al. Modeling syndromic congenital heart defects in zebrafish. *Curr. Top. Dev. Biol.* **124**, 1-40 (2017) (doi: 10.1016/bs.ctdb.2016.11.010)

Green D.J. et al. Variability in gene expression is associated with incomplete penetrance in inherited eye disorders. *Genes (Basel)* **11**, 179 (2020) (doi: 10.3390/genes11020179)

Greenhalgh D.G. The role of apoptosis in wound healing. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* **30**, 1019-1030 (1998) (doi: 10.1016/s1357-2725(98)00058-2)

Gritsman K. et al. The EGF-CFC protein one-eyed pinhead is essential for nodal signaling. *Cell* **97**, 121-132 (1999) (doi: 10.1016/s0092-8674(00)80720-5)

Groenen P.M et al. Nature of DNA polymorphism in the direct repeat cluster of Mycobacterium tuberculosis; application for strain differentiation by a novel typing method. *Mol. Microbiol.* **10**, 1057-1065 (1993) (doi: 10.1111/j.1365-2958.1993.tb00976.x)

Gruber C. y Bogunovic D. Incomplete penetrance in primary immunodeficiency: a skeleton in the closet. *Hum. Genet.* **139**, 745-757 (2020) (doi: 10.1007/s00439-020-02131-9)

Gurtu V.E. et al. Maternal effect for DNA mismatch repair in the mouse. *Genetics* **160**, 271-277 (2002) (doi: 10.1093/genetics/160.1.271)

Haendel M. et al. How many rare diseases are there? *Nat. Rev. Drug Discov.* 19**,** 77-78 (2020) (doi: 10.1038/d41573-019-00180-y)

Haffter P. et al. The identification of genes with unique and essential functions in the development of the zebrafish, *Danio rerio. Development* **123**, 1-36 (1996) (doi: 10.1242/dev.123.1.1)

Hale C.L. et al. Atypical phenotypes associated with pathogenic CHD7 variants and a proposal for broadening CHARGE syndrome clinical diagnostic criteria. *Am. J. Med. Genet. A.* **170A**, 344-354 (2016) (doi: 10.1002/ajmg.a.37435)

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Hale C.L. et al. Atypical phenotypes associated with pathogenic CHD7 variants and a proposal for broadening CHARGE syndrome clinical diagnostic criteria. *Am. J. Med. Genet. A*. **170A**, 344-354 (2016) (doi: 10.1002/ajmg.a.37435)

Hall B.D. Choanal atresia and associated multiple anomalies. *J. Pediatr*. **95,** 395-398 (1979) (doi: 10.1016/s0022-3476(79)80513-2)

Hall J.A. y Georgel P.T. CHD proteins: a diverse family with strong ties. *Biochem. Cell. Biol.* **85**, 463-476 (2007) (doi: 10.1139/O07-063)

Hammerschmidt M. et al. dino and mercedes, two genes regulating dorsal development in the zebrafish embryo. *Development* **123**, 95-102 (1996) (doi: 10.1242/dev.123.1.95)

Hand S.C. et al. Mechanisms of annual diapause: recent developments from nematodes, crustaceans, insects and fish. *Am. J. Phisiol. Regul. Integr. Comp. Physiol*. **310**, R1193–R1211 (2016) (doi: 10.1152/ajpregu.00250.2015)

*Harrington, M.J. et al. Cadherin-mediated adhesion regulates posterior body formation. BMC Developmental Biology. **7**(1):130. (2007) (doi: 10.1186/1471-213X-7-130)

Hartmann N. et al. Mitochondrial DNA copy number and function decrease with age in the short-lived fish *Nothobranchius furzeri. Aging Cell* **10**, 824-831 (2011) (doi: 10.1111/j.1474-9726.2011.00723.x)

Hartmann N. et al. Telomeres shorten while Tert expres- sion increases during ageing of the short-lived fish *Nothobranchius furzeri. Mech. Ageing Dev.* **130**, 290-296 (2009) (doi: 10.1016/j.mad.2009.01.003)

Hartshorne N. et al. Quality of life in adolescents and adults with CHARGE syndrome. Am J Med Genet A. (2016) **170**(8), 2012-21 (doi: 10.1002/ajmg.a.37769)

Hartshorne T.S. et al. Behavior in CHARGE syndrome. *Am. J. Med. Genet. C Semin. Med. Genet.* **175**, 431-438 (2017) 8doi: 10.1002/ajmg.c.31588)

Hartshorne T.S. et al. Behavior in CHARGE syndrome: introduction to the special topic. *Am. J. Med. Genet. A*. **133A**, 228-231 (2005) (doi: 10.1002/ajmg.a.30541)

Harvey A.S. et al. CHARGE association: Clinical manifestations and developmental outcome. *Am. J. Med. Genet.* **39**, 49-55. (1991) (doi: 10.1002/ajmg.1320390112)

Hayflick L. The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains. *Exp. Cell. Res.* **37**, 614 – 636 (1965) (doi: 10.1016/0014-4827(65)90211-9)

He S. y Sharpless N.E. Senescence in health and disease. *Cell* **169**, 1000-1011 (2017) (doi: 10.1016/j.cell.2017.05.015)

Heasman J et al. Beta-catenin signaling activity dissected in the early Xenopus embryo: a novel antisense approach. *Dev. Biol.* **222**, 124-134 (2000) (doi: 10.1006/dbio.2000.9720)

Heintzman N.D. et al. Distinct and predictive chromatin signatures of transcriptional promoters and enhancers in the human genome. *Nat. Genet.* **39** 311–318 (2007) (doi: 10.1038/ng1966)

Herbomel P. et al. Ontogeny and behaviour of early macrophages in the zebrafish embryo. *Development* **126**, 3735-3745 (1999) (doi: 10.1242/dev.126.17.3735)

Herbomel P. et al. Zebrafish early macrophages colonize cephalic mesenchyme and developing brain, retina, and epidermis through a M-CSF receptor-dependent invasive process. *Dev. Biol.* **238**, 274-288 (2001) (doi: 10.1006/dbio.2001.0393)

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Hermans P.W. et al. Insertion element IS987 from Mycobacterium bovis BCG is located in a hot-spot integration region for insertion elements in Mycobacterium tuberculosis complex strains. *Infect. Immun*. **59**, 2695-2705 (1991) (doi: 10.1128/iai.59.8.2695-2705)

Hernandez-Segura A. et al. Hallmarks of cellular senescence. *Trends Cell Biol.* **28**, 436-453 (2018) (doi: 10.1016/j.tcb.2018.02.001)

Hesson .L. et al. Lynch syndrome associated with two MLH1 promoter variants and allelic imbalance of MLH1 expression. *Hum. Mutat.* **36**, 622-630 (2015) (doi: 10.1002/humu.22785)

Hittner H.M. et al. Colobomatous microphthalmia, heart disease, hearing loss and mental retardation: A syndrome. *J. Pediatr. Ophthalmol. Strabismus* **16**,122–128 (1979) (doi: 10.3928/0191-3913-19790301-10)

Hofree M.H. et al. Network-based stratification of tumor mutations. *Nat. Methods* **10**, 1108–1115 (2013) (doi: 10.1038/nmeth.2651)

Holbrook J.A. et al. Nonsense-mediated decay approaches the clinic. *Nat. Genet.* **36**, 801-808 (2004) (doi: 10.1038/ng1403)

Houbrechts A.M. et al. Age-Dependent Changes in Glucose Homeostasis in Male Deiodinase Type 2 Knockout Zebrafish. Endocrinology. **160**, 2759-2772 (2019) (doi: 10.1210/en.2019-00445)

Howe K. The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. *Nature* **14,** 368-369 (2013) (doi: 10.1038/nature12111)

Howell CY. Genomic imprinting disrupted by a maternal effect mutation in the Dnmt1 gene. *Cell.* **104**, 829-838 (2001) (doi: 10.1016/S0092-8674(01)00280-X)

Hruscha A. y Schmid B. Generation of zebrafish models by CRISPR /Cas9 genome editing. *Methods Mol. Biol.* **1254**, 341-350 (2015) (doi: 10.1007/978-1-4939-2152-2_24)

Hu C.-K. et al. Vertebrate diapause preserves organisms long term through Polycomb complex members. *Science* **367**, 870-874 (2020) (doi: 10.1126/science.aaw2601)

Hu Z. et al. A pan-cancer genome-wide analysis reveals tumour dependencies by induction of nonsense-mediated decay. *Nat. Commun.* **8**, 15943 (2017) (doi: 10.1038/ncomms15943)

Huang HT. et al. A network of epigenetic regulators guides developmental haematopoiesis *in vivo. Nat. Cell. Biol.* **15,** 1516-1525 (2013) 8 doi: 10.1038/ncb2870)

Hughes S.S. et al. Family history and clefting as major criteria for CHARGE syndrome. *Am J Med Genet A*. **164A**(1), 48-53 (2014) (doi: 10.1002/ajmg.a.36192)

Hurd E.A. et al. Loss of Chd7 function in gene-trapped reporter mice is embryonic lethal and associated with severe defects in multiple developing tissues. *Mamm. Genome* **18,** 94–104 (2007) (doi: 10.1007/s00335-006-0107-6)

Hurd E.A. et al. The ATP-dependent chromatin remodeling enzyme CHD7 regulates pro-neural gene expression and neurogenesis in the inner ear. *Development* **137**, 3139-3150 (2010) (doi: 10.1242/dev.047894)

Hwang W.Y. et al. Efficient genome editing in zebrafish using a CRISPR-Cas system. *Nat. Biotechnol*. **31**, 227-229 (2013) (doi: 10.1038/nbt.2501)

Icardo J.M. Conus arteriosus of the teleost heart: dismissed, but not missed. *Anat. Rec. A Discov. Mol. Cell. Evol. Biol.* **288**, 900–908 (2006) (doi: 10.1002/ar.a.20361)

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Ishino Y. et al. Nucleotide sequence of the iap gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. *J. Bacteriol.* **169**, 5429-5433 (1987) (doi: 10.1128/jb.169.12.5429-5433.1987)

Islam F, Htun S, Lai LW, Krall M, Poranki M, Martin PM, Sobreira N, Wohler ES, Yu J, Moore A.T. Exome sequencing in patients with microphthalmia, anophthalmia, and coloboma (MAC) from a consanguineous population. C*lin Genet.* **98**(5), 499-506. (2020) (doi: 10.1111/cge.13830)

Israel S. et al. An integrated genome-wide multi-omics analysis of gene expression dynamics in the preimplantation mouse embryo. *Sci. Rep*. **9**, 13356 (2019) (doi: 10.1038/s41598-019-49817-3)

Issekutz KA. et al. An epidemiological analysis of CHARGE syndrome: preliminary results from a Canadian study. *Am J Med Genet A*. **133A**(3), 309-17 (2005) (doi: 10.1002/ajmg.a.30560)f

Ittisoponpisan S. et al. Landscape of pleiotropic proteins causing human disease: structural and system biology insights. *Hum. Mutat.* **38**, 289-296 (2017) (doi: 10.1002/humu.23155)

Ivanov A. et al. PABP enhances release factor recruitment and stop codon recognition during translation termination. *Nucleic Acids Res*. **44**, 7766–7776 (2016) (doi: 10.1093/nar/gkw635)

Jacobs-McDaniels N.L. y Albertson R.C. Chd7 plays a critical role in controlling left–right symmetry during zebrafish somitogenesis. *Dev. Dyn.* **240,** 2272-2280 (2011) (doi: 10.1002/dvdy.22722)

Jaillon O. et al. Genome duplication in the teleost fish *Tetraodon nigroviridis* reveals the early vertebrate proto-karyotype. *Nature* **431**, 946-957 (2004) (doi: 10.1038/nature03025)

Jamadagni P. et al. Chromatin remodeller CHD7 is required for GABAergic neuron development by promoting PAQR3 expression. *EMBO Rep.* **22**, e50958 (2021) (doi: 10.15252/embr.202050958)

Janssen G.E. et al. Protein biogenesis machinery is a driver of replicative aging in yeast. *Elife* **4**, e08527 (2015) (doi: 10.7554/eLife.08527)

Janssen N. et al. Mutation update on the CHD7 gene involved in CHARGE syndrome. *Hum. Mutat.* **33,** 1149–1160 (2012) (doi: 10.1002/humu.22086)

Janssen R. et al. Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. *Mol. Microbiol*. **43**, 1565-1575 (2002) (doi: 10.1046/j.1365-2958.2002.02839.x)

Jao L.E. et al. Efficient multiplex biallelic zebrafish genome editing using a CRISPR nuclease system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **110**, 13904-13909 (2013) (doi: 10.1073/pnas.1308335110)

Jarrell K.F. y McBride M.J. The surprisingly diverse ways that prokaryotes move. *Nat. Rev. Microbiol.* **6**, 466-476 (2008) (doi: 10.1038/nrmicro1900)

Jinek M. et al. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science* **337**, 816-821 (2012) (doi: 10.1126/science.1225829)

Jinek M et al., RNA-programmed genome editing in human cells. *eLife* **2**:e00471. (2013) (doi: 10.7554/eLife.00471)

Johansson M. et al. Autism spectrum disorders and underlying brain pathology in CHARGE association. *Dev Med Child Neurol*. **48**(1), 40-50 (2006) (doi: 10.1017/S0012162206000090)

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Johnson MH. Mammalian development: axes in the egg? *Curr Biol*. **11**(7), R281-4 (2001) (doi: 10.1016/s0960-9822(01)00139-7)

Johnson D. et al. Confirmation of CHD7 as a cause of CHARGE association identified by mapping abalanced chromosome translocation in affected monozygotic twins. *J. Med. Genet.* **43,** 280–284 (2006) (doi: 10.1136/jmg.2005.032946)

Jones K.M. et al. CHD7 maintains neural stem cell quiescence and prevents premature stem cell depletion in the adult hippocampus. *Stem Cells* **33**, 196-210 (2015) (doi: 10.1002/stem.1822)

Jones N.C. et al. Prevention of the neurocristopathy Treacher Collins syndrome through inhibition of p53 function. *Nat. Med*. **14**, 125-133 (2008) (doi: 10.1038/nm1725)

Jongmans M.C. et al. CHD7 mutations in patients initially diagnosed with Kallmann syndrome--the clinical overlap with CHARGE syndrome. *Clin. Genet.* **75**, 65-71 (2009) (doi: 10.1111/j.1399-0004.2008.01107.x)

Jongmans M.C.J. et al. CHARGE syndrome: the phenotypic spectrum of mutations in the CHD7 gene. *J. Med. Genet.* **43,** 306–314 (2006) (doi: 10.1136/jmg.2005.036061)

Jongmans M.C.J. et al. Familial CHARGE syndrome and the CHD7 gene: a recurrent missense mutation, intrafamilial recurrence and variability. *Am. J. Med. Genet. A* **146A**, 43-50 (2008) (doi: 10.1002/ajmg.a.31921)

Jordan W. 3rd et al. Diverse genome topologies characterize dosage compensation across species. *Trends Genet.* **35**, 308-315 (2019) (doi: 10.1016/j.tig.2019.02.001)

Jullien P.E. y Berger F. Gamete-specific epigenetic mechanisms shape genomic imprinting. *Curr. Opin. Plant Biol*. **12**, 637-642 (2009) (doi: 10.1016/j.pbi.2009.07.004)

Jun J.I. y Lau L.F. The matricellular protein CCN1 induces fibro- blast senescence and restricts fibrosis in cutaneous wound healing. *Nat. Cell Biol*. **12,** 676–685 (2010) (doi: 10.1038/ncb2070)

Jyonouchi S. et al. CHARGE (coloboma, heart defect, atresia choanae, retarded growth and development, genital hypoplasia, ear anomalies/deafness) syndrome and chromosome 22q11.2 deletion syndrome: a comparison of immunologic and nonimmunologic phenotypic features. *Pediatrics* **123**, e871-877 (2009) (doi: 10.1542/peds.2008-3400)

Kane D.A. et al. Mitotic domains in the early embryo of the zebrafish. *Nature* **360**, 735-737 (1992) (doi: 10.1038/360735a0)

Kane D.A. y Kimmel C.B. The zebrafish midblastula transition. *Development* **119**, 447-456 (1993) (doi: 10.1242/dev.119.2.447)

Kaushik S. y Cuervo A.M. Degradation of lipid droplet-associated proteins by chaperone-mediated autophagy facilitates lipolysis. Nat. Cell Biol. 17, 759-770 (2015) doi: 10.1038/ncb3166

Kenyon C. et al. A *C. elegans* mutant that lives twice as long as wild type. *Nature* **366**, 461-464 (1993) (doi: 10.1038/366461a0)

Khajavi M. et al. Nonsense-mediated mRNA decay modulates clinical outcome of genetic disease. *Eur. J. Hum. Genet.* **14**, 1074-1081 (2006) (doi: 10.1038/sj.ejhg.5201649)

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Kim H.G. et al. Mutations in CHD7, encoding a chromatin-remodeling protein, cause idiopathic hypogonadotropic hypogonadism and Kallmann syndrome. *Am. J. Hum. Genet.* **83**, 511-519 (2008) (doi: 10.1016/j.ajhg.2008.09.005)

Kim H.G. y Layman L.C. The role of CHD7 and the newly identified WDR11 gene in patients with idiopathic hypogonadotropic hypogonadism and Kallmann syndrome. *Mol. Cell. Endocrinol*. **346**, 74-83 (2011) (doi: 10.1016/j.mce.2011.07.013)

Kim S.H. Congenital Hypogonadotropic Hypogonadism and Kallmann Syndrome: Past, Present, and Future. *Endocrinol. Metab. (Seoul)* **30**, 456-466 (2015) (doi: 10.3803/EnM.2015.30.4.456)

Kim Y. et al. The short-lived African turquoise killifish: an emerging experimental model for ageing. Dis Model Mech. **9**(2), 115-29. (2016) (doi: 10.1242/dmm.023226)

Kirkland J.L. y Tchkonia T. Cellular senescence: a translational perspective. *EbioMedicine* **21**, 21-28 (2017) (doi: 10.1016/j.ebiom.2017.04.013)

Klaips C.L. et al. Pathways of cellular proteostasis in aging and disease. *J. Cell Biol.* **217**, 51-63 (2018) (doi: 10.1083/jcb.201709072)

Kohomoto T. et al. A novel frameshift mutation of *CHD7* in a Japanese patient with CHARGE syndrome. *Hum*. *Genome Var.* **3**, 16004 (2016) (doi: 10.1038/hgv.2016.4)

Kok F.O. et al. Reverse genetic screening reveals poor correlation between morpholino-induced and mutant phenotypes in zebrafish. *Dev. Cell.* **32**, 97-108 (2015) (doi: 10.1016/j.devcel.2014.11.018)

Kolobkov D.S. et al. Genes and diseases: insights from transcriptomics studies. *Genes* **13**, 1168 (2022) (doi: 10.3390/genes13071168)

Koonin E.V. y Aravind L. Origin and evolution of eukaryotic apoptosis: the bacterial connection. *Cell Death Differ.* **9**, 394-404 (2002) (doi: 10.1038/sj.cdd.4400991)

Kourtis N. y Tavernarakis N. Non-developmentally programmed cell death in *Caenorhabditis elegans*. *Semin*. *Cancer Biol*. **17,** 122–133 (2007) (doi: 10.1016/j.semcancer.2006.11.004)

Kouzarides T. Chromatin modifications and their function. *Cell* **128,** 693–705 (2007) (doi: 10.1016/j.cell.2007.02.005)

Krizhanovsky V. et al. Implications of cellular senescence in tissue damage response, tumor suppression, and stem cell biology. *Cold Spring Harb*. *Symp. Quant. Biol.* **73,** 513–522. (2008) (doi: 10.1101/sqb.2008.73.048)

Kuilman T. et al. Oncogene-induced senescence relayed by an interleukin-dependent inflammatory network. *Cell* **133,** 1019–1031 (2008) (doi: 10.1016/j.cell.2008.03.039)

Kuilman T. et al. The essence of senescence. *Genes Dev.* **24,** 2463–2479 (2010) (doi: 10.1101/gad.1971610)

Kuilman T. y Peeper D.S. Senescence-messaging secretome: SMS-ing cellular stress. *Nat. Rev. Cancer.* **9,** 81–94 (2009) (doi: 10.1038/nrc2560)

Kumar K.R. et al. Whole genome sequencing for the genetic diagnosis of heterogenous dystonia phenotypes. *Parkinsonism Relat. Disord.* **69**, 111-118 (2019) (doi: 10.1016/j.parkreldis.2019.11.004)

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Kuzmiak H.A. y Maquat L.E. Applying nonsense-mediated mRNA decay research to the clinic: progress and challenges. *Trends Mol. Med.* **12**, 306-316 (2006) (doi: 10.1016/j.molmed.2006.05.005)

Labbadia J. y Morimoto R.I. The biology of proteostasis in aging and disease. *Annu Rev. Biochem.* **84**. 435-464 (2015) (doi: 10.1146/annurev-biochem-060614-033955)

Lai J.K.H. et al. Induction of interferon-stimulated genes and cellular stress pathways by morpholinos in zebrafish. *Dev. Biol.* **454**, 21-28 (2019) (doi: 10.1016/j.ydbio.2019.06.008)

Lalani S.R. et al. SEMA3E mutation in a patient with CHARGE syndrome. *J. Med. Genet.* **41**, e94 (2004) (doi: 10.1136/jmg.2003.017640)

Lalani S.R. et al. Spectrum of CHD7 mutations in 110 individuals with CHARGE syndrome and genotype-phenotype correlation. *Am. J. Hum. Genet*. **78**, 303-314 (2006) (doi: 10.1086/500273)

Lalonde S. et al. Frameshift indels introduced by genome editing can lead to in-frame exon skipping. *PLoS One* **12**, e0178700 (2017) (doi: 10.1371/journal.pone.0178700)

Latcheva N.K. et al. The epigenetics of CHARGE syndrome. *Front. Biol.* **11**, 85–95 (2016) (doi: 10.1007/s11515-016-1398-y)

Law J.A. y Jacobsen S.E. Establishing, maintaining and modifying DNA methylation patterns in plants and animals. *Nat. Rev. Genet.* **11**, 204-220 (2010) (doi: 10.1038/nrg2719)

Lawson N.D. y Wolfe S.A. Forward and reverse genetic approaches for the analysis of vertebrate development in the zebrafish. *Dev. Cell*. **21**, 48-64 (2011) (doi: 10.1016/j.devcel.2011.06.007)

Layman W.S. et al. Defects in neural stem cell proliferation and olfaction in Chd7 deficient mice indicate a mechanism for hyposmia in human CHARGE. *Hum. Mol. Genet.* **18**, 1909-1923 (2009) (doi: 10.1093/hmg/ddp112)

Leader B. et al. Formin-2, polyploidy, hypofertility and positioning of the meiotic spindle in mouse oocytes. *Nat. Cell Biol.* **4**, 921–928 (2002) (doi: 10.1038/ncb880)

Lee B.Y. et al. Senescence-associated beta-galactosidase is lysosomal beta-galactosidase. *Aging Cell* **5**, 187-195 (2006) (doi: 10.1111/j.1474-9726.2006.00199.x)

Lee H. et al. Clinical exome sequencing for genetic identification of rare Mendelian disorders. *JAMA*. **312**(18), 1880-7 (2014) (doi: 10.1001/jama.2014.14604)

Legendre M. et al. Phenotype and genotype analysis of a French cohort of 119 patients with CHARGE syndrome. *Am. J. Med. Genet. C Semin. Med. Genet.* **175**, 417-430 (2017) (doi: 10.1002/ajmg.c.31591)

Lettieri A. et al. Semaphorin regulation by the chromatin remodeler CHD7: an emerging genetic interaction shaping neural cells and neural crest in development and cancer. *Front. Cell. Dev. Biol*. **9**, 638674 (2021) (doi: 10.3389/fcell.2021.638674)

Levels P.J. et al. Oxygen consumption during embryonic development of the annual fish Nothobranchius korthausae with special reference to diapause. *Comp Biochem Physiol A Comp Physiol*. **84,** 767-70 (1986) (doi: 10.1016/0300-9629(86)90403-2)

Li X. et al. A maternal-zygotic effect gene, Zfp57, maintains both maternal and paternal imprints. *Dev. Cell.* **15**, 547-557 (2008) (doi: 10.1016/j.devcel.2008.08.014)

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Li L. et al. Maternal control of early mouse development. *Development* **137**, 859-870 (2010) (doi: 10.1242/dev.039487)

Li Z. et al. Loss of SLC25A46 causes neurodegeneration by affecting mitochondrial dynamics and energy production in mice. *Hum Mol Genet*. **26**(19), 3776-3791 (2017) (doi: 10.1093/hmg/ddx262)

Li Y. et al. Embryonic senescent cells re-enter cell cycle and contribute to tissues after birth. *Cell Res*. **28**(7), 775-778 (2018) (doi: 10.1038/s41422-018-0050-6)

Li L. et al. CHD7 missense variants and clinical characteristics of Chinese males with infertility. *Mol Genet Genomic Med*. **8**(9):e1372. (2020) (doi: 10.1002/mgg3.1372)

Lin A.E., et al. Central nervous system malformations in the CHARGE association. *Am. J. Med. Genet.* **37**, 304-310 (1990) (doi: 10.1002/ajmg.1320370303)

Lindeboom R.G.H. et al. The rules and impact of nonsense-Mediated mRNA decay in human cancers. *Nat. Genet.* **48**, 1112–1118 (2016) (doi: 10.1038/ng.3664)

Lindeman L.C. et al. Prepatterning of developmental gene expression by modified histones before zygotic genome activation. *Dev. Cell.* **21**, 993-1004 (2011) (doi: 10.1016/j.devcel.2011.10.008)

Lindeman R.E. y Pelegri F. Vertebrate maternal-effect genes: Insights into fertilization, early cleavage divisions, and germ cell determinant localization from studies in the zebrafish. *Mol. Reprod. Dev.* **77**, 299-313 (2010) (doi: 10.1002/mrd.21128)

Litchfield K. et al. Escape from nonsense-mediated decay associates with anti-tumor immunogenicity. *Nat. Commun.* **11**, 3800 (2020) (doi: 10.1038/s41467-020-17526-5

Liu H. y Liu Z.Z. Aggressive-like behavior and increased glycine transporters in a zebrafish model of CHARGE syndrome. *Behav. Brain Res.* **378**, 112293 (2020) (doi: 10.1016/j.bbr.2019.112293)

Liu Y. et al. CHD7 interacts with BMP R-SMADs to epigenetically regulate cardiogenesis in mice. *Hum. Mol. Genet.* **23**, 2145-2156 (2014) (doi: 10.1093/hmg/ddt610)

Liu Z.Z. et al. Chd7 is critical for early t-cell development and thymus organogenesis in zebrafish. *Am. J. Pathol.* **188**, 1043-1058 (2018) (doi: 10.1016/j.ajpath.2017.12.005)

Liu Z.Z. et al. Sema3E is required for migration of cranial neural crest cells in zebrafish: Implications for the pathogenesis of CHARGE syndrome. *Int. J. Exp. Pathol.* **100**, 234-243 (2019) (doi: 10.1111/iep.12331)

Löhr H. y Hammerschmidt M. Zebrafish in endocrine systems: Recent advances and implications for human disease. *Annu. Rev. Physiol*. **73,** 183–211 (2011) (doi: 10.1146/annurev-physiol-012110-142320)

López-Otín C. et al. The hallmarks of aging. *Cell* **153**, 1194-1217 (2013) (doi: 10.1016/j.cell.2013.05.039)

Lorda-Diez C.I. et al. Apoptosis during embryonic tissue remodeling is accompanied by cell senescence. *Aging* (Albany NY) **7**, 974– 985 (2015) (doi: 10.18632/aging.100844)

Lou X. et al. Med14 cooperates with brg1 in the differentiation of skeletogenic neural crest. *BMC Dev. Biol.* **15**, 41 (2015) (doi: 10.1186/s12861-015-0090-9)

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Loureiro A. y da Silva G.J. CRISPR-Cas: converting a bacterial defence mechanism into a state-of-the-art genetic manipulation tool. *Antibiotics* **8**, 18 (2019) (doi: 10.3390/antibiotics8010018)

Lowe SW. et al. Intrinsic tumour suppression. *Nature*. **432**(7015):307-15. (2004) (doi: 10.1038/nature03098. PMID: 15549092)

Lun K. y Brand M. A series of no isthmus (noi) alleles of the zebrafish pax2.1 gene reveals multiple signaling events in development of the midbrain-hindbrain boundary. *Development* **125**, 3049-3062 (1998) (doi: 10.1242/dev.125.16.3049)

Lupski J.R. Genomic rearrangements and sporadic disease. *Nat. Genet.* **39(7 Suppl)**, S43-47 (2007) (doi: 10.1038/ng2084)

Ma Z. et al. PTC-bearing mRNA elicits a genetic compensation response via Upf3a and COMPASS components. *Nature* **568**, 259-263 (2019) (doi: 10.1038/s41586-019-1057-y)

Ma Z. y Chen J. Premature termination codon-bearing mRNA mediates genetic compensation response. *Zebrafish.* 57-162 (2020) (doi:10.1089/zeb.2019.1824)

Machado, R.A.C., Schneider, H., DeOcesano-Pereira, C. *et al.* CHD7 promotes glioblastoma cell motility and invasiveness through transcriptional modulation of an invasion signature. *Sci Rep*. **9**, 3952 (2019). (doi: 10.1038/s41598-019-39564-w)

Mahadevan S. et al. Maternally expressed NLRP2 links the subcortical maternal complex (SCMC) to fertility, embryogenesis and epigenetic reprogramming. *Sci. Rep*. **7**, 44667 (2017) (doi: 10.1038/srep44667)

Mahat U. et al., Heterozygous CTLA4 splice site mutation c.458-1G > C presenting with immunodeficiency and variable degree of immune dysregulation in three generation kindred of Caribbean descent. *Pediatr. Hematol. Oncol.* **38**, 658-662 (2021) (doi: 10.1080/08880018.2021.1906802)

Majumder PK. et al. A prostatic intraepithelial neoplasia-dependent p27 Kip1 checkpoint induces senescence and inhibits cell proliferation and cancer progression. *Cancer Cell*. **14**(2), 146-55 (2008) (doi: 10.1016/j.ccr.2008.06.002)

Makarova K.S. et al. A putative RNA-interference-based immune system in prokaryotes: computational analysis of the predicted enzymatic machinery, functional analogies with eukaryotic RNAi, and hypothetical mechanisms of action. *Biol. Direct* **1**, 7 (2006) (doi: 10.1186/1745-6150-1-7)

Makarova K.S. et al. Evolution and classification of the CRISPR-Cas systems. *Nat. Rev. Microbiol*. **9**, 467-477 (2011) (doi: 10.1038/nrmicro2577)

Manning B.J. y Yusufzai T. The ATP-dependent chromatin remodeling enzymes CHD6, CHD7, and CHD8 exhibit distinct nucleosome binding and remodeling activities. *J. Biol. Chem*. **292**, 11927-11936 (2017) (doi: 10.1074/jbc.M117.779470)

Marie C. et al. Oligodendrocyte precursor survival and differentiation requires chromatin remodeling by Chd7 and Chd8. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **115**, E8246-E8255 (2018) (doi: 10.1073/pnas.1802620115)

Martens J.A. y Winston F. Recent advances in under- standing chromatin remodeling by Swi/Snf complexes. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **13,** 136–142 (2003) (doi: 10.1016/s0959-437x(03)00022-4)

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Martin D.M. et al. CHARGE association with choanal atresia and inner ear hypoplasia in a child with a de novo chromosome translocation t(2;7)(p14;q21.11). *Am. J. Med. Genet.* **99**, 115–119 (2001) (doi: 10.1002/1096-8628(2000)9999:999<00::aid-ajmg1126>3.0.co;2-8)

Martin DM. Epigenetic Developmental Disorders: CHARGE syndrome, a case study. Curr *Genet Med Rep*. **3**(1), 1-7 (2015) (doi: 10.1007/s40142-014-0059-1)

Massa V. et al. Apoptosis is not required for mammalian neural tube closure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **106**, 8233-8238 (2009) (doi: 10.1073/pnas.0900333106)

Mathavan S. et al. Transcriptome analysis of zebrafish embryogenesis using microarrays. *PLoS Genet*. **1**, 260-276 (2005) (doi: 10.1371/journal.pgen.0010029)

Matic I. Bacterial senescence and translational fidelity. *Trends Microbiol.* **9**, 527 (2001) (doi: 10.1016/S0966-842X(01)02233-8)

McDermott J.H. et al. Sibling recurrence of total anomalous pulmonary venous drainage. *Eur. J. Med. Genet.* **60**, 265-267 (20179 (doi: 10.1016/j.ejmg.2017.03.003)

McElwee J.J. et al. Shared transcriptional signature in *Caenorhabditis elegans* dauer larvae and long-lived daf-2 mutants implicates detoxification system in longevity assurance. *J. Biol. Chem.* **279**, 44533-44543 (2004) (doi: 10.1074/jbc.M406207200)

McGowan R.A. y Martin C.C. DNA methylation and genome imprinting in the zebrafish, *Danio rerio*: some evolutionary ramifications. *Biochem. Cell Biol.* **75**, 499-506 (1997)

McGrath J. y Solter D. Completion of mouse embryogenesis requires both the maternal and paternal genomes. *Cell* **37**, 179-183 (1984) (doi: 10.1016/0092-8674(84)90313-1)

McGrath K.E. et al. Circulation is established in a stepwise pattern in the mammalian embryo. *Blood Mar.* **101**, 1669-1676 (2003) (doi: 10.1182/blood-2002-08-2531)

McHale C.M. et al. Global gene expression profiling of a population exposed to a range of benzene levels. *Environ. Health Perspect*. **119**, 628-634 (2011) (doi: 10.1289/ehp.1002546)

McKeown S.J. et al. Sox10 overexpression induces neural crest-like cells from all dorsoventral levels of the neural tube but inhibits differentiation. *Dev. Dyn.* **233**, 430-444 (2005) (doi: 10.1002/dvdy.20341)

McKnight S.L. y Miller Jr O.L. Ultrastructural patterns of RNA synthesis during early embryogenesis of *Drosophila melanogaster. Cell* **8**, 305-319 (1976) (doi: 10.1016/0092-8674(76)90014-3)

Meller C.L. et al. Cell cycle arrest associated with anoxia-induced quiescence, anoxic preconditioning, and embryonic diapause in embryos of the annual killifish *Austrofundulus limnaeus*. *J. Comp. Physiol. B.* **182**, 909–920 (2012) (doi: 10.1007/s00360-012-0672-9)

Meng X. et al. Targeted gene inactivation in zebrafish using engineered zinc-finger nucleases. *Nat*. *Biotechnol*. **26,** 695– 701 (2008) (doi: 10.1038/nbt1398)

Mera-Rodríguez J.A. et al. Is senescence-associated β-galactosidase a reliable in vivo marker of cellular senescence during embryonic development? *Front. Cell Dev. Biol.* **9**, 623175 (2021) (doi: 10.3389/fcell.2021.623175)

Metze S. et al. Comparison of EJC-enhanced and EJC-independent NMD in human cells reveals two partially redundant degradation pathways. *RNA* **19**, 1432–1448 (2013) (doi: 10.1261/rna.038893.113)

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Meunier A. et al. Bacterial cell proliferation: from molecules to cells. *FEMS Microbiol. Rev.* **45**, fuaa046 (2021) (doi: 10.1093/femsre/fuaa046)

Miller J.C. et al. An improved zinc-finger nuclease architecture for highly specific genome editing. *Nat. Biotechnol.* **25**, 778-785 (2007) (doi: 10.1038/nbt1319)

Miller J.L. y Grant P.A. The role of DNA methylation and histone modifications in transcriptional regulation in humans. *Subcell. Biochem.* **61**, 289-317 (2013) (doi: 10.1007/978-94-007-4525-4_13)

Miller-Bertoglio V. et al. Maternal and zygotic activity of the zebrafish ogon locus antagonizes BMP signaling. *Dev. Biol.* **214**, 72-86 (1999) (doi: 10.1006/dbio.1999.9384)

Minikel E.V. et al. Quantifying prion disease penetrance using large population control cohorts. *Sci. Transl. Med.* **8**, 322ra9 (2016) (doi: 10.1126/scitranslmed.aad5169)

Mintzer K.A. et al. *lost-a-fin* encodes a type I BMP receptor, Alk8, acting maternally and zygotically in dorsoventral pattern formation. *Development* **128**, 859-869 (2001) (doi: 10.1242/dev.128.6.859)

Miraoui H. et al. Mutations in FGF17, IL17RD, DUSP6, SPRY4, and FLRT3 are identified in individuals with congenital hypogonadotropic hypogonadism. *Am. J. Hum. Genet.* **92**, 725-743 (2013) (doi: 10.1016/j.ajhg.2013.04.008)

Moccia A. et al. Genetic analysis of CHARGE syndrome identifies overlapping molecular biology. *Genet. Med.* **20**, 1022-1029 (2018) (doi: 10.1038/gim.2017.233)

Mohiuddin M. et al. De novo mutations, genetic mosaicism and human disease. *Front. Genet.* **13**, 983668 (2022) (doi: 10.3389/fgene.2022.983668)

Mojica F.J.M. et al. Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements. *J. Mol. Evol*. **60**, 174-182 (2005) (doi: 10.1007/s00239-004-0046-3)

Mojica F.J.M. et al. Transcription at different salinities of *Haloferax mediterranei* sequences adjacent to partially modified PstI sites. *Mol. Microbiol*. **9**, 613-21 (1993) (doi: 10.1111/j.1365-2958.1993.tb01721.x)

Mondal T. et al. Sense-antisense lncRNA pair encoded by locus 6p22.3 determines neuroblastoma susceptibility via the USP36-CHD7-SOX9 regulatory axis. *Cancer Cell* **33**, 417-434 (2018) (doi: 10.1016/j.ccell.2018.01.020)

Monk D. et al. NLRPs, the subcortical maternal complex and genomic imprinting. *Reproduction* **154**, R161-R170 (2017) (doi: 10.1530/REP-17-0465)

Mooi W.J. y Peeper D.S. Oncogene-induced cell senescence halting on the road to cancer. *N. Engl. J. Med.* **355,** 1037– 1046 (2006) (doi: 10.1056/NEJMra062285)

Moravec C.E. et al. Identification of maternal-effect genes in zebrafish using maternal crispants. *Development* **148**, dev199536 (2021) (doi: 10.1242/dev.199536)

Morcos P.A. et al. Gene editing *versus* morphants. *Zebrafish* **12**, 319 (2015) (doi: 10.1089/zeb.2015.1114)

Morcos, P.A. Achieving targeted and quantifiable alteration of mRNA splicing with Morpholino oligos. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **358**, 521- 527 (2007) (doi: 10.1016/j.bbrc.2007.04.172)

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Moreno R.L. et al. Investigation of Islet2a function in zebrafish embryos: Mutants and morphants differ in morphologic phenotypes and gene expression. *PLoS One*. **13**(6), e0199233 (2018) (doi: 10.1371/journal.pone.0199233)

Moreno-Mateos M.A. et al. CRISPRscan: designing highly efficient sgRNAs for CRISPR-Cas9 targeting in vivo. *Nat Methods*. **12**(10), 982-8 (2015) (doi: 10.1038/nmeth.3543)

Moskalev A.A. et al. Genetics and epigenetics of aging and longevity. *Cell Cycle* **13**, 1063-1077 (2014) (doi: 10.4161/cc.28433)

Mühlemann O. et al. Recognition and elimination of nonsense mRNA. *Biochim. Biophys. Acta* **1779**, 538-549 (2008) (doi: 10.1016/j.bbagrm.2008.06.012)

Mullins M.C. et al. Large-scale mutagenesis in the zebrafish: in search of genes control- ling development in a vertebrate. *Curr. Biol*. **4**, 189–202 (1994) (doi: 10.1016/s0960-9822(00)00048-8)

Muñoz-Espín et al. Programmed cell senescence during mammalian embryonic development. *Cell* **155**, 1104–1118 (2013) (doi: 10.1016/j.cell.2013.10.019)

Muse E.D. et al. Monogenic and polygenic models of coronary artery disease. *Curr. Cardiol. Rep*. 23, 107. (2021) (doi: 10.1007/s11886-021-01540-0)

Muto A. et al. Forward genetic analysis of visual behavior in zebrafish. *PLoS Genet.* **1**, e66 (2005) (doi: 10.1371/journal.pgen.0010066)

Nacher V. et al. The quail mesonephros: a new model for renal senescence? *J. Vasc. Res*. **43**, 581-586 (2006) (doi: 10.1159/000096076)

Nair S. et al. *In vitro* oocyte culture-based manipulation of zebrafish maternal genes. *Dev. Dyn*. **242**, 44-52 (2013) (doi: 10.1002/dvdy.23894)

Nardella C, Chen Z, Salmena L, Carracedo A, Alimonti A, Egia A, Carver B, Gerald W, Cordon-Cardo C. et al. Aberrant Rheb-mediated mTORC1 activation and Pten haploinsufficiency are cooperative oncogenic events. Genes Dev. **22**(16), 2172-7 (2008) (doi: 10.1101/gad.1699608)

Nasevicius A. y Ekker S.C. Effective targeted gene 'knockdown' in zebrafish. *Nat. Genet.* **26**, 216–220 (2000) (doi: 10.1038/79951)

Need AC. et al. Exome sequencing followed by large-scale genotyping suggests a limited role for moderately rare risk factors of strong effect in schizophrenia. *Am J Hum Genet*. **91**(2), 303-12 (2012) (doi: 10.1016/j.ajhg.2012.06.018)

Newport J. y Kirschner M. A major developmental transition in early Xenopus embryos: II. Control of the onset of transcription. *Cell*. **30**, 687-696 (1982) (doi: 10.1016/0092-8674(82)90273-2)

Ng A.N. et al. Formation of the digestive system in zebrafish: III. Intestinal epithelium morphogenesis. *Dev. Biol.* **286,** 114-135 (2005) (doi: 10.1016/j.ydbio.2005.07.013)

Nguengang Wakap S et al. Estimating cumulative point prevalence of rare diseases: analysis of the Orphanet database. *Eur. J. Hum. Genet.* **28**, 165–173 (2020) (doi: 10.1038/s41431-019-0508-0)

Nie J. et al. CHD7 regulates otic líneage specification and hair cell differentiation in human inner ear organoids. *Nat. Commun*. **13**, 7053 (2022) (doi: 10.1038/s41467-022-34759-8)

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Niedernhofer L.J. y Robbins P.D. Senotherapeutics for healthy ageing. *Nat. Rev. Drug Discov*. **17**, 377 (2018) (doi: 10.1038/nrd.2018.44)

Niemi M.E.K. et al. Common genetic variants contribute to risk of rare severe neurodevelopmental disorders. Nature 562, 268-271 (2018) (doi: 10.1038/s41586-018-0566-4)

Nishiyama M. Early embryonic death in mice lacking the beta-catenin-binding protein Duplin. *Mol. Cell Biol.* **24**, 8386-8394 (2004) (doi: 10.1128/MCB.24.19.8386-8394.2004)

Nishiyama M. et al. CHD8 suppresses p53-mediated apoptosis through histone H1 recruitment during early embryogenesis. *Nat. Cell Biol.* **11**, 172-182 (2009) (doi: 10.1038/ncb1831)

Nonomura K. et al. Local apoptosis modulates early mammalian brain development through the elimination of morphogen-producing cells. *Dev. Cell.* **27**, 621-634 (2013) (doi: 10.1016/j.devcel.2013.11.015)

O'Boyle S. et al. Identification of zygotic genes expressed at the midblastula transition in zebrafish. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. **358**, 462-468 (2007) (doi: 10.1016/j.bbrc.2007.04.116)

O'Roak B.J. et al. Multiplex targeted sequencing identifies recurrently mutated genes in autism spectrum disorders. *Science* **338**, 1619-1622 (2012) (doi: 10.1126/science.12277649)

Ogata T. et al. Kallmann syndrome phenotype in a female patient with CHARGE syndrome and *CHD7* mutation. *Endocr. J.* **53,** 741-743 (2006) (doi: 10.1507/endocrj.k06-099)

Ohta H. et al. A possible role of sphingosine in induction of apoptosis by tumor necrosis factor-alpha in human neutrophils. *FEBS Lett*. **355**, 267-270 (1994) (doi: 10.1016/0014-5793(94)01218-0)

Ohta S. et al. CHD7 promotes proliferation of neural stem cells mediated by MIF. *Mol. Brain* **9**, 96 (2016) (doi: 10.1186/s13041-016-0275-6)

Okumura T. et al. Association of PAX2 and other gene mutations with the clinical manifestations of renal coloboma syndrome. *PLoS One* **10**, e0142843 (2015) (doi: 10.1371/journal.pone.0142843)

Okuno H. et al. CHARGE syndrome modeling using patient-iPSCs reveals defective migration of neural crest cells harboring CHD7 mutations. *Elife* **6**, e21114 (2017) (doi: 10.7554/eLife.21114)

* OMIM Gene Map Statistics. (2022) Available at: https://www.omim.org/statistics/geneMap (Accessed 04 11, 2022).

Ori A. et al. Integrated transcriptome and proteome anal- yses reveal organ-specific proteome deterioration in old rats. *Cell Syst.* **1**, 224-237 (2015) (doi: 10.1016/j.cels.2015.08.012)

Ozaki N. et al. Apoptosis mediates decrease in cellularity during the regression of arthus reaction in cornea. *Br. J. Ophthalmol*. **85**, 613-618 (2001) (doi: 10.1136/bjo.85.5.613)

Pagon R.A. et al. Coloboma, congenital heart disease and choanal atresia with multiple anomalies: CHARGE association. *J. Pediatr*. **99**, 223-227 (1981) (doi: 10.1016/s0022-3476(81)80454-4)

Pampal A. CHARGE: an association or a syndrome? *Int. J. Pediatr. Otorhinolaryngol*. **74**, 719-722 (2010) (doi: 10.1016/j.ijporl.2010.03.019)

USC DE COMPOSTELA

Pan L. et al. Rapid identification and recovery of ENU-induced mutations with next-generation sequencing and Paired-End Low-Error analysis. *BMC Genomics* **16**, 83 (2015) (doi: 10.1186/s12864-015-1263-4)

Partridge M. et al. A simple method for delivering morpholino antisense oligos into the cytoplams of cells. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev*. **6**, 169-175 (1996) (doi: 10.1089/oli.1.1996.6.169)

Pasquier J. et al. Gene evolution and gene expression after whole genome duplication in fish: the PhyloFish database. *BMC Genomics* **17**, 368 (2016) (doi: 10.1002/jez.b.22770)

Passeron T. et al. SOX9 is a key player in ultraviolet B-induced melanocyte differentiation and pigmentation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **104**, 13984-13989 (2007) (doi: 10.1073/pnas.0705117104)

Patel N. y Alkuraya F.S. Overlap between CHARGE and Kabuki syndromes: more than an interesting clinical observation? *Am. J. Med. Genet. A*. **167A**, 259-260 (2015) (doi: 10.1002/ajmg.a.36804)

Patten S.A. et al. Role of Chd7 in zebrafish: A model for CHARGE syndrome. *PLoS ONE*. **7,** e31650 (2012) (doi: 10.1371/journal.pone.0031650)

Pauli S. et al. CHARGEd with neural crest defects. *Am. J. Med. Genet. C Semin. Med. Genet.* **175**, 478-486 (2017) (doi: 10.1002/ajmg.c.31584)

Pauli S. et al. *CHD7* mutations causing CHARGE syndrome are predominantly of paternal origin. *Clin. Genet.* **81,** 234-239 (2012) (doi: 10.1111/j.1399-0004.2011.01701.x)

Pauli S. et al. Proven germline mosaicism in a father of two children with CHARGE syndrome. *Clin. Genet*. **75**, 473-479 (2009) (doi: 10.1111/j.1399-0004.2009.01151.x)

Payer B. et al. Stella is a maternal effect gene required for normal early development in mice. *Curr. Biol.* **13**, 2110-2117 (2003) (doi: 10.1016/j.cub.2003.11.026)

Payne S. et al. A critical role for the chromatin remodeller CHD7 in anterior mesoderm during cardiovascular development. *Dev. Biol.* **405**, 82-95 (2015) (doi: 10.1016/j.ydbio.2015.06.017)

Pelegri F. Maternal factors in zebrafish development. *Dev. Dyn.* **228**, 535-554 (2003) (doi: 10.1002/dvdy.10390)

Perlttari K. et al. Adult human neural crest-derived cells for articular cartilage repair. *Sci. Transl. Med.* **6**, 251ra119 (2014) (doi: 10.1126/scitranslmed.3009688)

Peters N. Embryonale Anpassungen oviparer Zahnkarpfen aus periodisch austrocknenden Pensado A. Desarrollo y caracterización de una línea mutante de pez cebra para auts2a, gen candidato a trastornos del espectro autista. (2022) [Tesis de Doctorado] Universidade de Santiago de Compostela

Gewassern. *Int. Rev. Ges. Hydrobiol.* **48**, 257–313 (1963)

Pickart M.A y Klee E.W. Zebrafish approaches enhance the translational research tackle box. *Transl. Res.* **163**, 65-78 (2014) (doi: 10.1016/j.trsl.2013.10.007)

Pickart M.A. et al. Genome-wide reverse genetics framework to identify novel functions of the vertebrate secretome. *PLoS ONE.* **1**, e104. (2006) (doi: 10.1371/journal.pone.0000104)

Pinter S.F. et al. Allelic imbalance is a prevalent and tissue-specific feature of the mouse transcriptome. *Genetics* **200**, 537-549 (2015) (doi: 10.1534/genetics.115.176263)

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Pleasance ED, Stephens PJ, O'Meara S, McBride DJ, Meynert A, Jones D, Lin ML, Beare D, Lau KW, Greenman C, Varela I, Nik-Zainal S, Davies HR, Ordoñez GR, Mudie LJ, Latimer C, Edkins S, Stebbings L, Chen L, Jia M, Leroy C, Marshall J, Menzies A, Butler A, Teague JW, Mangion J, Sun YA, McLaughlin SF, Peckham HE, Tsung EF, Costa GL, Lee CC, Minna JD, Gazdar A, Birney E, Rhodes MD, McKernan KJ, Stratton MR, Futreal PA, Campbell PJ. A small-cell lung cancer genome with complex signatures of tobacco exposure. *Nature.* **463**,184-90 (*2010*) (doi: 10.1038/nature08629)

Podrabsky JE y Hand SC. The bioenergetics of embryonic diapause in an annual killifish, austrofundulus limnaeus. *J Exp Biol*. **202**(Pt 19), 2567-80. (1999) (doi: 10.1242/jeb.202.19.2567)

Podrabsky J.E. et al. Alternative developmental pathways associated with diapause regulated by temperature and maternal influences in embryos of the annual killifish *Austrofundulus limnaeus*. *J. Exp. Biol*. **213**, 3280-3288 (2010) (doi: 10.1242/jeb.045906)

Polacik M. et al. Alternative intrapopulation life-history strategies and their trade-offs in an African annual fish. *J. Evol. Biol.* **27**, 854-865 (2014) (doi: 10.1111/jeb.12359)

Popp M.W. y Maquat L.E. Nonsense-mediated mRNA decay and cancer. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **48**, 44–50 (2018) (doi: 10.1016/j.gde.2017.10.007)

Popp M.W. y Maquat L.E. Leveraging rules of nonsense-mediated mRNA decay for genome engineering and personalized medicine. *Cell* **165**, 1319–1322 (2016) (doi: 10.1016/j.cell.2016.05.053)

Postlethwait J. et al. Subfunction partitioning, the teleost radiation and the annotation of the human genome. *Trends Genet.* **20**, 481-490 (2004) (doi: 10.1016/j.tig.2004.08.001)

Pourcel C. et al. CRISPR elements in *Yersinia pestis* acquire new repeats by preferential uptake of bacteriophage DNA, and provide additional tools for evolutionary studies. *Microbiology* **151**, 653-663 (2005) (doi: 10.1099/mic.0.27437-0)

Priest J.R. et al. De Novo and rare variants at multiple loci support the oligogenic origins of atrioventricular septal heart defects. *PLoS Genet*. **12**, e1005963 (2016) (doi: 10.1371/journal.pgen.1005963)

Prince V.E. y Pickett F.B. Splitting pairs: the diverging fates of duplicated genes. *Nat. Rev. Genet.* **3**, 827-837 (2002) (doi: 10.1038/nrg928)

Prykhozhij S.V. et al. A rapid and effective method for screening, sequencing and reporter verification of engineered frameshift mutations in zebrafish. *Dis. Model Mech.* **10**, 811-822 (2017) (doi:10.1242/dmm.026765)

Przybilla J. et al. Is adult stem cell aging driven by conflicting modes of chromatin remodeling? *Bioessays* **34**, 841-848. (2012) (doi: 10.1002/bies.201100190)

Raftery L.A. et al. Genetic screens to identify elements of the decapentaplegic signaling pathway in *Drosophila. Genetics* **139**, 241-254 (1995) (doi: 10.1093/genetics/139.1.241)

Ragge NK et al. SOX2 anophthalmia syndrome. *Am J Med Genet A.* **135(**1), 1-7; discussion 8. (2005) (doi: 10.1002/ajmg.a.30642.)

Ragland G.J. et al. Mechanisms of suspended animation are revealed by transcript profiling of diapause in the flesh fly. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **107**, 14909–14914 (2010) (doi: 10.1073/pnas.1007075107)

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Rahit K.M.T.H. y Tarailo-Graovac M. Genetic modifiers and rare mendelian disease. *Genes (Basel)* **11**, 239 (2020) (doi: 10.3390/genes11030239)

Raible D.W. y Eisen J.S. Restriction of neural crest cell fate in the trunk of the embryonic zebrafish. *Development* **120**, 495-503 (1994) (doi: 10.1242/dev.120.3.495)

Rajagopalan S. y Long E.O. Cellular senescence induced by CD158d reprograms natural killer cells to promote vascular remodeling. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **109**(50), 20596-601 (2012) (doi: 10.1073/pnas.1208248109)

Randall V. et al. Great vessel development requires biallelic expression of Chd7 and Tbx1 in pharyngeal ectoderm in mice. *J. Clin. Invest*. **119**, 3301-3310 (2009) (doi: 10.1172/JCI37561)

Reddy N.C. et al. CHARGE syndrome protein CHD7 regulates epigenomic activation of enhancers in granule cell precursors and gyrification of the cerebellum. *Nat. Commun*. **12**, 5702 (2021) (doi: 10.1038/s41467-021-25846-3)

Reichwald K. et al. Insights into sex chromosome evolution and aging from the genome of a short-lived fish. *Cell* **163**, 1527-1538 (2015) (doi: 10.1016/j.cell.2015.10.071)

Reik W. et al. Epigenetic reprogramming in mammalian development. *Science* **293,** 1089-1093 (2001) (doi: 10.1126/science.1063443)

Renfree M.B. et al. Evolution of genomic imprinting: insights from marsupials and monotremes. *Annu Rev. Genomics Hum. Genet.* **10**, 241-262 (2009) (doi: 10.1146/annurev-genom-082908-150026)

Retterer K. et al. Clinical application of whole-exome sequencing across clinical indications. *Genet Med*. 18(7), 696-704 (2016) (doi: 10.1038/gim.2015.148.)

Rhinn M. et al. Cellular senescence in development, regeneration and disease. *Development*. **146**(20), (2019) (dev151837. doi: 10.1242/dev.151837)

Rhinn M. et al. Aberrant induction of p19Arf-mediated cellular senescence contributes to neurodevelopmental defects. *PLoS Biol.* **20**, e3001664 (2022) (doi: 10.1371/journal.pbio.3001664)

Robu M. et al. p53 activation by knockdown technologies. *PLoS Genet.* **3,** e78 (2007) (doi: 10.1371/journal.pgen.0030078)

Rodríguez-Paredes M. et al. The chromatin remodeling factor CHD8 interacts with elongating RNA polymerase II and controls expression of the cyclin E2 gene. *Nucleic Acids Res.* **37**, 2449-2460 (2009) (doi: 10.1093/nar/gkp101)

Romney A.L. et al. Temperature-dependent vitamin D signaling regulates developmental trajectory associated with diapause in an annual killifish. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **115**, 12763–12768 (2018) (doi: 10.1073/pnas.1804590115)

Romney A.L. y Podrabsky J.E. Transcriptomic analysis of maternally provisioned cues for phenotypic plasticity in the annual killifish, *Austrofundulus limnaeus*. Evodevo. **8**:6 (2017) (doi: 10.1186/s13227-017-0069-7)

Rossi A. et al. Genetic compensation induced by deleterious mutations but not gene knockdowns. *Nature* 524, 230-233 (2015) (doi: 10.1038/nature14580)

Rothe M. et al. Loss of gene function through rapid mitotic cycles in the *Drosophila* embryo. *Nature* **359**, 156-159 (1992) (doi: 10.1038/359156a0) (doi: 10.1016/j.gendis.2021.12.003)

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Rouf, M. A. et al. The recent advances and future perspectives of genetic compensation studies in the zebrafish model. *Genes and Diseases*. In Press (2022) (doi: 10.1016/j.gendis.2021.12.003)

Salanga C.M. y Salanga M.C. Genotype to phenotype: CRISPR gene editing reveals genetic compensation as a mechanism for phenotypic disjunction of morphants and mutants. *Int. J. Mol. Sci.* **22**, 3472 (2021) (doi: 10.3390/ijms22073472)

Salem-Hartshorne N. y Jacob S. Adaptive behavior in children with CHARGE syndrome. *Am. J. Med. Genet. A*. **133A**, 262-267 (2005) (doi: 10.1002/ajmg.a.30546)

Sanchez-Fernandez C. et al. The methylation status of the embryonic limb skeletal progenitors determines their cell fate in chicken. Commun Biol. **3,** 283 (2020) (doi: 10.1038/s42003-020-1012-3)

Sanlaville D. et al. Phenotypic spectrum of CHARGE syndrome in fetuses with *CHD7* truncating mutations correlates with expression during human development. *J. Med. Genet*. **43,** 211–217 (2006) (doi: 10.1136/jmg.2005.036160)

Sanlaville D. y Verloes A. CHARGE syndrome: an update. *Eur. J. Hum. Genet*. **15,** 389–399 (2007) (doi: 10.1038/sj.ejhg.5201778)

Sanyanusin P. et al. Mutation of PAX2 in two siblings with renal-coloboma syndrome. *Human Molecular Genetics*, **4**(11), 2183–2184, (1995) (doi: 10.1093/hmg/4.11.2183)

Sato H. y Singer R.H. Cellular variability of nonsense-mediated mRNA decay. *Nat. Commun*. **12**, 7203 (2021) (doi: 10.1038/s41467-021-27423-0)

Schacherer J. Beyond the simplicity of Mendelian inheritance. *Comptes Rendus Biol* **339**, 284-288 (2016) (doi: 10.1016/j.crvi.2016.04.006)

Schilling T.F. y Kimmel C.B. Segment and cell type lineage restrictions during pharyngeal arch development in the zebrafish embryo. *Development* **120**, 483-494 (1994) (doi: 10.1242/dev.120.3.483)

Schlüter G. Ultrastructural observations on cell necrosis during formation of the neural tube in mouse embryos. *Z. Anat. Entwickl. Gesch.* **141**, 251–264 (1973) (doi: 10.1007/BF00519046)

Schmitt C.A. et al. A senescence program controlled by p53 and p16INK4a contributes to the outcome of cancer therapy. *Cell* **109**, 335–346. (2002) (doi: 10.1016/s0092-8674(02)00734-1)

Schnetz M.P. et al. CHD7 targets active gene enhancer elements to modulate ES cell-specific gene expression. *PLoS Genet*. **6**, e1001023 (2010) (doi: 10.1371/journal.pgen.1001023)

Schnetz M.P. et al. Genomic distribution of CHD7 on chromatin tracks H3K4 methylation patterns. *Genome Res.* **19,** 590-601 (2009) (doi: 10.1101/gr.086983.108)

Schultz R.M. The molecular foundations of the maternal to zygotic transition in the preimplantation embryo. *Hum. Reprod. Update* **8**, 323-331 (2002) (doi: 10.1093/humupd/8.4.323)

Schulz Y. et al. CHARGE and Kabuki syndromes: a phenotypic and molecular link. *Hum. Mol. Genet.* **23**, 4396–4405 (2014a) (doi: 10.1093/hmg/ddu156)

Schulz Y. et al. CHD7, the gene mutated in CHARGE syndrome, regulates genes involved in neural crest cell guidance. *Hum Genet*. **133**, 997-1009 (2014b) (doi: 10.1007/s00439-014-1444-2)

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Schupbach T. y Wieschaus E. Female sterile mutations on the second chromosome of *Drosophila melanogaster*. I. Maternal effect mutations. *Genetics* **121**, 101-117 (1989) (doi: 10.1093/genetics/121.1.101)

Sekelsky J.J. et al. Genetic characterization and cloning of mothers against dpp, a gene required for decapentaplegic function in *Drosophila melanogaster. Genetics* **139,** 1347-1358 (1995) (doi: 10.1093/genetics/139.3.1347)

Selman K. et al. Stages of oocyte development in the zebrafish, Brachydanio rerio. *J. Morphol.* **218**, 203-224 (1993) (doi: 10.1002/jmor.1052180209)

Serrano M. et al. Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. *Cell* **88**, 593–602 (1997) (doi: 10.1016/s0092-8674(00)81902-9)

Servetti M. et al. Neurodevelopmental disorders in patients with complex phenotypes and potential complex genetic basis involving non-coding genes, and double CNVs. *Front. Genet.* **12**, 732002 (2021) (doi: 10.3389/fgene.2021.732002)

Sha QQ. et al. CNOT6L couples the selective degradation of maternal transcripts to meiotic cell cycle progression in mouse oocyte. *EMBO J.* **37**(24), e99333. (2018) (doi: 10.15252/embj.201899333)

Sha QQ. et al. A story of birth and death: mRNA translation and clearance at the onset of maternal-to-zygotic transition in mammals†. Biol Reprod. **101**(3), 579-590 (2019) (doi: 10.1093/biolre/ioz012)

Shah A.N. et al. Rapid reverse genetic screening using CRISPR in zebrafish. *Nat. Methods* **12**, 535-540 (2015) (doi: 10.1038/nmeth.3360)

Shakhova O. et al. Antagonistic cross-regulation between Sox9 and Sox10 controls an anti-tumorigenic program in melanoma. *PLoS Genet.* **11**, e1004877 (2015) (doi: 10.1371/journal.pgen.1004877)

Shankaran S.S. et al. CRISPR/Cas9-directed gene editing for the generation of loss-of-function mutants in high-throughput zebrafish F0 screens. *Curr. Protoc. Mol. Biol.* **119**, 31.9.1-31.9.22 (2017) (doi: 10.1002/cpmb.42)

Shanks M.O. et al. Chromodomain helicase binding protein 8 (Chd8) is a novel A-kinase anchoring protein expressed during rat cardiac development. *PLoS One* **7**, e46316 (2012) (doi: 10.1371/journal.pone.0046316)

Shawky R.M. Reduced penetrance in human inherited disease. *Egypt. J. Med. Hum. Genet.* **15,** 103–111 (2014) (doi: 10.1016/j.ejmhg.2014.01.003)

She J. et al. Genetic compensation by *epob* in pronephros development in *epoa* mutant zebrafish. Cell Cycle. **18**(20), 2683-2696. (2019) (doi: 10.1080/15384101.2019.1656019)

Sheikh BN, Guhathakurta S, Akhtar A. The non-specific lethal (NSL) complex at the crossroads of transcriptional control and cellular homeostasis. *EMBO Rep*. **20**(7): e47630. (2019) (doi: 10.15252/embr.201847630).

Shermoen A.W. y O'Farrell P.H. Progression of the cell cycle through mitosis leads to abortion of nascent transcripts. *Cell* **67**, 303-310 (1991) (doi: 10.1016/0092-8674(91)90182-x)

Shi M. et al. Premature Termination Codons Are Recognized in the Nucleus in A Reading-Frame Dependent Manner. *Cell Discov*. **1**, 15001 (2015) (doi: 10.1038/celldisc.2015.1)

USC UNIVERSIDADE DE COMPOSTELA

Shi, X. et al. Combinatorial *G*x*G*x*E* CRISPR screen identifies SLC25A39 in mitochondrial glutathione transport linking iron homeostasis to OXPHOS. *Nat Commun.* **13**, 2483 (2022) (doi: 10.1038/s41467-022-30126-9)

Shmakov S. et al. Diversity and evolution of class 2 CRISPR-Cas systems. Nat. Rev. Microbiol. 15, 169-182 (2017) (doi: 10.1038/nrmicro.2016.184)

Singleton A.B. et al. alpha-Synuclein locus triplication causes Parkinson's disease. *Science* **302**, 841 (2003) (doi: 10.1126/science.1090278)

Smart E.J. et al. Annexin 2-caveolin 1 complex is a target of ezetimibe and regulates intestinal cholesterol transport. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **101**, 3450–3455 (2004) (doi: 10.1073/pnas.0400441101)

Sood R. et al. Methods for reverse genetic screening in zebrafish by resequencing and TILLING. *Methods* **39**, 220-227 (2006) (doi: 10.1016/j.ymeth.2006.04.012)

Souriau J. et al. CHARGE syndrome: developmental and behavioral data. *Am. J. Med. Genet. A.* **133A**, 278-281 (2005) (doi: 10.1002/ajmg.a.30549)

Sperry E.D. et al. The chromatin remodeling protein CHD7, mutated in CHARGE syndrome, is necessary for proper craniofacial and tracheal development. *Dev. Dyn*. **243**, 1055-1066 (2014) (doi: 10.1002/dvdy.24156)

Srinivasan S. et al. *Drosophila* Kismet regulates histone H3 lysine 27 methylation and early elongation by RNA polymerase II. *PLoS Genet.* **4**, e1000217 (2008) (doi: 10.1371/journal.pgen.1000217)

Stainier, D.Y.R. et al. Guidelines for morpholino use in zebrafish. *PLOS Genetics* **13**, e1007000 (2017) (doi: 10.1371/journal.pgen.1007000)

Steiner U.K. Senescence in bacteria and its underlying mechanisms. *Front. Cell Dev. Biol.* **9**, 668915 (2021) (doi: 10.3389/fcell.2021.668915)

Stephanou C. et al. Genetic modifiers at the crossroads of personalised medicine for haemoglobinopathies. *J. Clin. Med.* **8**, 1927 (2019) (doi: 10.3390/jcm8111927)

Stephens C. Senescence: even bacteria get old. *Curr. Biol.* **15**, R308-310 (2005) (doi: 10.1016/j.cub.2005.04.006)

Steward R. et al. Isolation of the dorsal locus of *Drosophila. Nature*, **311,** 262-265 (1984) (doi: 10.1038/311262a0)

Stitzel M.L. y Seydoux G. Regulation of the oocyte-to-zygote transition. *Science* **316**, 407-408 (2007) (doi: 10.1126/science.1138236)

Storer M. et al. Mechanism that contributes to embryonic growth and patterning. *Cell* **155,** 1119–1130 (2013) (doi: 10.1016/j.cell.2013.10.041)

Stremmel C. et al. Yolk sac macrophage progenitors traffic to the embryo during defined stages of development. *Nat. Commun*. **9**, 75 (2018) (doi: 10.1038/s41467-017-02492-2)

Su W. et al. miR-30 disrupts senescence and promotes cancer by targeting both p16INK4A and DNA damage pathways. *Oncogene* **37**, 5618-5632 (2018) (doi: 10.1038/s41388-018-0358-1)

Summerton J. y Weller D. Morpholino antisense oligomers: design, preparation, and properties. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev*. **7,** 187-195 (1997) (doi: 10.1089/oli.1.1997.7.187)

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Summerton, J. Morpholino, siRNA, and S-DNA compared: impact of structure and mechanism of action on off-target effects and sequence specificity. *Curr. Top. Med. Chem.* **7,** 651–660 (2007) (doi: 10.2174/156802607780487740)

Sun Y. et al. Craniofacial and cardiac defects in *chd7* zebrafish mutants mimic CHARGE syndrome. *Front. Cell. Dev. Biol*. **10**, 1030587 (2022) (doi: 10.3389/fcell.2022.1030587)

Surani M.A. et al. Development of reconstituted mouse eggs suggests imprinting of the genome during gametogenesis. *Nature* **308**, 548-550 (1984) (doi: 10.1038/308548a0)

Surani M.A. y Barton S.C. Development of gynogenetic eggs in the mouse: implications for parthenogenetic embryos. *Science* **222**, 1034-1036 (1983) (doi: 10.1126/science.6648518)

Suspitsin E.N. et al. Next generation sequencing analysis of consecutive Russian patients with clinical suspicion of inborn errors of immunity. *Clin. Genet*. **98**, 231-239 (2020) (doi.org/10.1111/cge.13789)

Tadros W. y Lipshitz H.D. The maternal-to-zygotic transition: a play in two acts. *Development* **136**, 3033-3042 (2009) (doi: 10.1242/dev.033183)

Takano M. et al. Transcriptional cross talk between the forkhead transcription factor forkhead box O1A and the progesterone receptor coordinates cell cycle regulation and differentiation in human endometrial stromal cells. *Mol. Endocrinol.* **21**, 2334-2349 (2007) (doi: 10.1210/me.2007-0058)

Takata A. et al. Integrative analyses of de novo mutations provide deeper biological insights into autism spectrum disorder. *Cell Rep*. **22**, 734-747 (2018) (doi: 10.1016/j.celrep.2017.12.074)

Tashiro F. et al. Maternal-effect gene Ces5/Ooep/Moep19/Floped is essential for oocyte cytoplasmic lattice formation and embryonic development at the maternal-zygotic stage transition. *Genes Cells* **15**, 813-828 (2010) (doi: 10.1111/j.1365-2443.2010.01420.x)

Tatullo M. et al. Bioimpedance detection of oral lichen planus used as preneoplastic model. *J. Cancer* **6**, 976-983 (2015) (doi: 10.7150/jca.11936)

Taylor J.S. et al. Genome duplication, a trait shared by 22000 species of ray-finned fish. *Genome Res.* **13**, 382-390 (2003) (doi: 10.1101/gr.640303)

Terracol R. y Lengyel J.A. The thick veins gene of *Drosophila* is required for dorsoventral polarity of the embryo. *Genetics* **138**, 165-178 (1994) (doi: 10.1093/genetics/138.1.165)

Terzenidou M.E. et al. Novel insights into SLC25A46-related pathologies in a genetic mouse model. *PLoS Genet*. **13**(4):e1006656 (2017) (doi: 10.1371/journal.pgen.1006656)

Thelin J.W. y Fussner J.C. Factors related to the development of communication in CHARGE syndrome. *Am. J. Med. Genet. A*. **133A**, 282-290 (2005) (doi: 10.1002/ajmg.a.30550). Erratum in: *Am. J. Med. Genet. A*. **137**, 113 (2005)

Thompson A.W. y Ortí G. Annual Killifish Transcriptomics and Candidate Genes for Metazoan Diapause. *Mol Biol Evol*. **33**, 2391-5 (2016) (doi: 10.1093/molbev/msw110)

Tilghman SM. The sins of the fathers and mothers: genomic imprinting in mammalian development. *Cell*. **96**, 185-93 (1999) (doi: 10.1016/s0092-8674(00)80559-0)

Tong Z.B. et al. Mater, a maternal effect gene required for early embryonic development in mice. *Nat. Genet*. **26**, 267-268 (2000) (doi: 10.1038/81547)

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Tozzini E.T. et a. Adult neurogenesis in the short-lived teleost *Nothobranchius furzeri:* localization of neurogenic niches, molecular characterization and effects of aging. *Aging Cell* **11**, 241-251 (2012) (doi: 10.1111/j.1474-9726.2011.00781.x)

Trubiroha A. et al. A rapid CRISPR/Cas-based mutagenesis assay in zebrafish for identification of genes involved in thyroid morphogenesis and function. *Sci. Rep*. **8**, 5647 (2018) (doi: 10.1038/s41598-018-24036-4)

Uribe-Salazar J.M. et al. Evaluation of CRISPR gene-editing tools in zebrafish. *BMC Genomics* **23**, 12 (2022) (doi: 10.1186/s12864-021-08238-1)

Valdesalici S. y Cellerino A. Extremely short lifespan in the annual fish *Nothobranchius furzeri. Proc. Biol. Sci.* **270(Suppl 2)**, S189-S191 (2003) (doi: 10.1098/rsbl.2003.0048)

van Gastel et al. 2020. Lipid availability determines fate of skeletal progenitor cells via SOX9. *Nature* **579**, 111-117 (2020) (doi: 10.1038/s41586-020-2050-19)

Van Nostrand J.L. et al. Inappropriate p53 activation during development induces features of CHARGE syndrome. *Nature* **514**, 228-232. (2014) (doi: 10.1038/nature13585)

Van Nostrand J.L. y Attardi L.D. Guilty as CHARGED: p53's expanding role in disease. *Cell Cycle* **13**, 3798-3807 (2014) (doi: 10.4161/15384101.2014.987627)

van Ravenswaaij-Arts C. Y Martin D.M. New insights and advances in CHARGE syndrome: Diagnosis, etiologies, treatments, and research discoveries. *Am. J. Med. Genet. C Semin. Med. Genet.* **175**, 397-406 (2017) (doi: 10.1002/ajmg.c.31592)

van Ravenswaaij-Arts C.M. et al. Clinical utility gene card for: CHARGE syndrome - update 2015. *Eur. J. Hum. Genet.* **23**(11) (2015) (doi: 10.1038/ejhg.2015.15)

Verhagen J.M. et al.. An unusual presentation of Kabuki syndrome: clinical overlap with CHARGE syndrome. *Eur. J. Med. Genet.* **57**, 510–512 (2014) (doi: 10.1016/ j.ejmg.2014.05.005)

Verloes A. Updated diagnostic criteria for CHARGE syndrome: a proposal. *Am. J. Med. Genet.* **133,** 306-308 (2005) (doi: 10.1002/ajmg.a.30559)

Vidal M. Interactome modeling. *FEBS*. **579**(8), 1834-8 (2005) (doi: 10.1016/ j.febslet.2005.02.030)

Villate O. et al. Functional analyses of a novel splice variant in the CHD7 gene, found by next generation sequencing, confirm its pathogenicity in a Spanish patient and diagnose him with CHARGE syndrome. *Front. Genet.* **9**, 7 (2018) (doi: 10.3389/fgene.2018.00007)

Villiard E. et al. Senescence gives insights into the morphogenetic evolution of anamniotes. *The Comp. of Biolog. Ltd* **6,** 891-896 (2017) (doi: 10.1242/bio.025809)

Vincent S. D. y Buckingham M. E. How to make a heart: the origin and regulation of cardiac progenitor cells. *Curr. Top. Dev. Biol.* **90**, 1-41 (2010) (doi: 10.1016/S0070-2153(10)90001-X)

Vissers L.E. et al. Mutations in a new member of the chromodomain gene family cause CHARGE syndrome. *Nat. Genet*. **36,** 955-957 (2004) (doi: 10.1038/ng1407)

Vogelstein B. et al. Surfing the p53 network. *Nature* **408**, 307-310 (2000) (doi: 10.1038/35042675)

Vuckovic D. et al. The Polygenic and monogenic basis of blood traits and diseases. *Cell* **182**, 1214-1231.e11 (2020) (doi: 10.1016/j.cell.2020.08.008)

USC DE COMPOSTELA

Vuorela P.E. et al. A familial CHARGE syndrome with a CHD7 nonsense mutation and new clinical features. *Clin. Dysmorphol.* **17**, 249-253 (2008) (doi: 10.1097/MCD.0b013e328306a704)

Wagner D.S. et al. Maternal control of development at the midblastula transition and beyond: mutants from the zebrafish II. *Dev. Cell* **6**, 781-790 (2004) (doi: 10.1016/j.devcel.2004.04.001)

Walker C. y Streisinger G. Induction of mutations by gamma-rays in pregonial germ cells of zebrafish embryos. *Genetics* **103***,* 125–136 (1983) (doi: 10.1093/genetics/103.1.125).

Walser C.B. y Lipshitz H.D. Transcript clearance during the maternal-to-zygotic transition. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **21**, 431-443 (2011) (doi: 10.1016/j.gde.2011.03.003)

Wang E.H. et al. DNA helicase and duplex DNA fragment unwinding activities of polyoma and simian virus 40 large T antigen display similarities and differences. *J Biol Chem*. **266**(19), 12668-75. (1991) (PMID: 1648101)

Wang E. Senescent human fibroblasts resist programmed cell death, and failure to suppress bcl2 is involved. *Cancer Res.* **55**, 2284-2292 (1995)

Wang J. et al. Nonsense-associated altered splicing: a frame-dependent response distinct from nonsense-mediated decay. *Mol. Cell.* **10**, 951-957 (2002) (doi: 10.1016/s1097-2765(02)00635-4)

Wang X. et al. Regulatory mechanisms underlying the differential growth of dendrites and axons. *Neurosci. Bull.* **30**, 557-568 (2014) (doi: 10.1007/s12264-014-1447-3)

Wanner E. et al. Senescence and Apoptosis: architects of mammalian development. *Front. Cell Dev. Biol.* **8**, 620089 (2021) (doi: 10.3389/fcell.2020.620089)

Ward E.C. et al. The regulation and function of the forkhead transcription factor, Forkhead box O1, is dependent on the progesterone receptor in endometrial carcinoma. *Endocrinology* **149**, 1942-1950 (2008) (doi: 10.1210/en.2007-0756)

Waskiewicz A.J. et al. Eliminating zebrafish pbx proteins reveals a hindbrain ground state. *Dev. Cell.* **3**, 723-733. (2002) (doi: 10.1016/s1534-5807(02)00319-2)

Webb S.E. et al. Localized calcium transients accompany furrow positioning, propagation, and deepening during the early cleavage period of zebrafish embryos. *Dev. Biol.* **192**, 78-92 (1997) (doi: 10.1006/dbio.1997.8724)

Weil M. et al. Is programmed cell death required for neural tube closure? *Curr. Biol.* **7**, 281-284 (1997) (doi: 10.1016/s0960-9822(06)00125-4)

Weller S. et al. Peroxisome biogenesis disorders. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet*. **4**, 165-211 (2003) (doi: 10.1146/annurev.genom.4.070802.110424)

Wen J. et al. Clinical data and genetic mutation in Kallmann syndrome with CHARGE syndrome: Case report and pedigree analysis. *Medicine (Baltimore)* **97**, e11284 (2018) (doi: 10.1097/MD.0000000000011284)

White R.J. A high-resolution mRNA expression time course of embryonic development in zebrafish. *Elife* **6**, e30860. (2017) (doi: 10.7554/eLife.30860)

White R.J. et al. Allele-specific gene expression can underlie altered transcript abundance in zebrafish mutants. *Elife* **11**, e72825 (2022) (doi: 10.7554/eLife.72825)

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Whitfield T.T. et al. Development of the zebrafish inner ear. *Dev. Dyn*. **223**, 427-458 (2002) (doi: 10.1002/dvdy.10073)

Whitfield T.T. et al. Mutations affecting development of the zebrafish inner ear and lateral line. *Development* **123**, 241-254 (1996) (doi: 10.1242/dev.123.1.241)

Whitlock K.E. y Westerfield M. The olfactory placodes of the zebrafish form by convergence of cellular fields at the edge of the neural plate. *Development* **127**, 3645-3653 (2000) (doi: 10.1242/dev.127.17.3645)

Wienholds E. et al. Efficient Target-selected mutagenesis in zebrafish. *Genome Res*. **13**, 2700–2707 (2003) (doi: 10.1101/gr.1725103)

Williams R. et al. Chromatin remodeller Chd7 is developmentally regulated in the neural crest by tissue-specific transcription factors. *bioRxiv* 2022.11.03.515045 (2022) (https://doi.org/10.1101/2022.11.03.515045)

Wincent J. et al. CHD7 mutation spectrum in 28 Swedish patients diagnosed with CHARGE syndrome. *Clin*. *Genet*. **74,** 31–38. (2008) (doi: 10.1111/j.1399-0004.2008.01014.x)

Wong MT. et al. CHARGE syndrome: a review of the immunological aspects. *Eur J Hum Genet*. **23**(11), 1451-9. (2015) (doi: 10.1038/ejhg.2015.7)

Wourms J.P. The developmental biology of annual fishes I. Stages in the normal development of *Austrofundulus myersi* Dahl. *J. Exp. Zool*. **182**, 143–168 (1972a) (doi: 10.1002/jez.1401820202)

Wourms J.P. The developmental biology of fishes. III. Pre-embryonic diapause of variable duration in the eggs of annual fishes. *J. Exp. Zool*. **182**, 389-414 (1972b) (doi: 10.1002/jez.1401820310)

Wright C.F. et al. Assessing the pathogenicity, penetrance, and expressivity of putative disease-causing variants in a population setting. *Am. J. Hum. Genet*. **104**, 275-286 (2019) (doi: 10.1016/j.ajhg.2018.12.015)

Wu R.S. et al. A rapid method for directed gene knockout for screening in G0 zebrafish. *Dev. Cell.* **46**, 112-125.e4 (2018) (doi: 10.1016/j.devcel.2018.06.003)

Wu X. et al. Zygote arrest 1 (Zar1) is a novel maternal-effect gene critical for the oocyte-to-embryo transition. *Nat. Genet.* **33**, 187-191 (2003) (doi: 10.1038/ng1079)

Wyatt A, et al. Novel heterozygous OTX2 mutations and whole gene deletions in anophthalmia, microphthalmia and coloboma. *Hum Mutat*. **29**(11): E278-83. (2008) (doi: 10.1002/humu.20869)

Xiao C. et al. Chromatin-remodelling factor Brg1 regulates myocardial proliferation and regeneration in zebrafish. *Nat. Commun.* **7**, 13787 (2016) (doi: 10.1038/ncomms13787)

Xu M. et al. Beta-catenin expression results in p53-independent DNA damage and oncogene-induced senescence in prelymphomagenic thymocytes in vivo. *Mol Cell Biol*. **28**(5), 1713-23 (2008) (doi: 10.1128/MCB.01360-07)

Yamauchi Y. et al. A novel transgenic technique that allows specific marking of the neural crest cell líneage in mice. *Dev. Biol.* **212**, 191-203 (1999) (doi: 10.1006/dbio.1999.9323)

Yan Y.L. et al. A pair of Sox: distinct and overlapping functions of zebrafish sox9 co-orthologs in craniofacial and pectoral fin development. *Development* **132**, 1069-1083 (2005) (doi: 10.1242/dev.01674)

USC DE COMPOSTELA

Yang M. et al. Genetic diagnoses in pediatric patients with epilepsy and comorbid intellectual disability. Epilepsy Res. 170, 106552 (2021) (doi: 10.1016/j.eplepsyres.2021.106552)

Ye B. et al. The chromatin remodeler SRCAP promotes self-renewal of intestinal stem cells. *EMBO J.* **39**, e103786 (2020) (doi: 10.15252/embj.2019103786)

Yan S. et al. CHD7 regulates cardiovascular development through ATP-dependent and -independent activities. *Proc*. *Natl. Acad. Sci. USA.* **117,** 28847-28858 (2020) (doi: 10.1073/pnas.2005222117)

Ye J. et al. Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics* 13:134 (2012) (doi: 10.1186/1471-2105-13-134)

Yin S, Deng W, Zheng H, Zhang Z, Hu L, Kong X. Evidence that the nonsense-mediated mRNA decay pathway participates in X chromosome dosage compensation in mammals. *Biochem Biophys Res Commun*. **383**, 378-82 (2009) (doi: 10.1016/j.bbrc.2009.04.021)

Yokoi H, Yan YL, Miller MR, BreMiller RA, Catchen JM, Johnson EA, Postlethwait JH. Expression profiling of zebrafish sox9 mutants reveals that Sox9 is required for retinal differentiation. *Dev Biol*. **329**(1), 1-15 (2009) (doi: 10.1016/j.ydbio.2009.01.002)

Young AP, Schlisio S, Minamishima YA, Zhang Q, Li L, Grisanzio C, Signoretti S, Kaelin WG Jr. VHL loss actuates a HIF-independent senescence programme mediated by Rb and p400. *Nat Cell Biol*. **10**(3), 361-9 (2008) (doi: 10.1038/ncb1699)

Yu T. et al. Deregulated FGF and homeotic gene expression underlies cerebellar vermis hypoplasia in CHARGE syndrome. *Elife* **2**, e01305 (2013) (doi: 10.7554/eLife.01305)

Yu X.-J. et al. The subcortical maternal complex controls symmetric division of mouse zygotes by regulating F-actin dynamics. *Nat. Commun*. **5**, 4887 (2014) (doi: 10.1038/ncomms5887)

Yu H. et al. Rapid molecular diagnostics of severe primary immunodeficiency determined by using targeted next-generation sequencing. J. Allergy Clin. Immunol. **138**, 1142-1151.e2. (2016) (doi: 10.1016/j.jaci.2016.05.035)

Yun M.H. Cellular senescence in tissue repair: Every cloud has a silver lining. *Int. J. Dev. Biol.* **62**, 591-604 (2018) (doi: 10.1387/ijdb.180081my)

Yun M.H. et al. Recurrent turnover of senescent cells during regeneration of a complex structure. *Elife* **4**, e05505 (2015) (doi: 10.7554/eLife.05505)

Yurttas P. et al. Role for PADI6 and the cytoplasmic lattices in ribosomal storage in oocytes and translational control in the early mouse embryo. *Development* **135**, 2627-2636 (2008) (doi: 10.1242/dev.016329)

Zahn J.J. et al. Transcriptional profiling of aging in human muscle reveals a common aging signature. *PLoS Genet.* **2**, e115 (2006) (doi: 10.1371/journal.pgen.0020115.eor)

Zalokar M. et al. Developmental defects of female-sterile mutants of *Drosophila melanogaster. Dev. Biol*. **47,** 419-432 (1975) (doi: 10.1016/0012-1606(75)90295-x)

Zamir E. et al. Transcription-dependent induction of G1 phase during the zebra fish midblastula transition. *Mol. Cell Biol.* **17**, 529-536 (1997) (doi: 10.1128/MCB.17.2.529)

Zarraga I.G. et al. Nonsense-mediated mRNA decay caused by a frameshift mutation in a large kindred of type 2 long QT syndrome. *Heart Rhythm.* **8**, 1200-1206 (2011) (doi: 10.1016/j.hrthm.2011.03.039)

USC DE COMPOSTELA

Zentner G.E. et al. Molecular and phenotypic aspects of *CHD7* mutation in CHARGE syndrome. *Am. J. Med. Genet. A*. **152A,** 674–686 (2010) (doi: 10.1002/ajmg.a.33323)

Zhang F. et al. Efficient generation of zebrafish maternal-zygotic mutants through transplantation of ectopically induced and Cas9/gRNA targeted primordial germ cells. *J. Genet. Genomics*. **47**, 37-47 (2020) (doi: 10.1016/j.jgg.2019.12.004)

Zhang Y. et al. Programmable base editing of zebrafish genome using a modified CRISPR-Cas9 system. *Nat. Commun*. **8**, 118 (2017) (doi: 10.1038/s41467-017-00175-6)

Zhang C. et al. Rapid generation of maternal mutants via oocyte transgenic expression of CRISPR-Cas9 and sgRNAs in zebrafish. *Sci Adv*. **7**(32), eabg4243. (2021) (doi: 10.1126/sciadv.abg4243)

Zhao C. et al. Dual requirement of CHD8 for chromatin landscape establishment and histone methyltransferase recruitment to promote CNS myelination and repair. *Dev. Cell.* **45**, 753-768 (2018a) (doi: 10.1016/j.devcel.2018.05.022)

Zhao Y. et al. Naked mole rats can undergo developmental, oncogene-induced and DNA damage-induced cellular senescence. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **115**(8), 1801-1806. (2018b) (doi: 10.1073/pnas.1721160115)

Zhu P. et al. Short body length phenotype is compensated by the upregulation of nidogen family members in a deleterious nid1a mutation of zebrafish. *J. Genet. Genomics.* **44**, 553-556 (2017) (doi: 10.1016/j.jgg.2017.09.011)

Zhu Y. et al. Migratory neural crest cells phagocytose dead cells in the developing nervous system. *Cell* **179**, 74-89.e10 (2019) (doi: 10.1016/j.cell.2019.08.001)

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

VICERREITORADO DE INVESTIGACIÓN
E INNOVACIÓN
Oficina de Investigación e Tecnoloxía

Edificio CACTUS – Campus universitario sur
15782 Santiago de Compostela
Tel. 981 547 040 - Fax 981 547 077
Correo electrónico: ciltinfo@usc.es
http://imaisd.usc.es

Informe del Comité de Ética de Experimentación Animal (CEEA) de los centros usuarios de animales de experimentación de la USC en el Campus de Lugo

El CEEA de los centros usuarios de animales de experimentación de la USC en el Campus de Lugo, tras evaluar el Proyecto titulado "El pez cebra y su aplicación en biomedicina, acuicultura y medio ambiente" del que es Investigadora responsable Dª. Ana Quelle Regaldie, acordó con fecha 30 de enero de 2020 emitir

INFORME FAVORABLE

para la realización de dicho Proyecto, así como los procedimientos que incluye, en las instalaciones del establecimiento usuario Animalario de la Facultad de Veterinaria, con número de registro ES270280346401 (AE-LU-003), y siempre que, en cumplimiento del RD 53/2013, se obtenga la correspondiente autorización administrativa (en concreto, en relación con el artículo 27.2 y el apartado 1.b de la cláusula de salvaguardia enunciada en la disposición adicional segunda).

En Lugo, a 30 de enero de 2020

Fdo.: La presidenta

Sonia Vázquez Rodríguez

Supervisora das instalacións de experimentación, cría e subministro de animais de laboratorio da Universidade de Santiago de Compostela

Responsable administrativo:	Nombre:Montserrat Valcárcel Armesto Cargo:Vicerreitora de Coordinación do Campus de Lugo	VºBº Firma y sello

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

RESOLUCIÓN DE AUTORIZACIÓN DE PROXECTOS DE EXPERIMENTACIÓN ANIMAL

Expediente núm.: 01/20/LU-003
Interesado: **Ana Quelle Regaldie**
Procedemento: RESOLUCIÓN DE AUTORIZACIÓN DE PROXECTOS DE EXPERIMENTACIÓN ANIMAL
Data de inicio: 1 de marzo de 2020
Forma de inicio: solicitude da interesada

ANTECEDENTES

A interesada, como responsable do proxecto "**El pez cebra y su aplicación en biomedicina, acuicultura y medio ambiente"** presentou con data 12 de febreiro de 2020 solicitude para a realización do proxecto de experimentación animal cuxos datos se detallan a continuación:

Denominación do proxecto : El pez cebra y su aplicación en biomedicina, acuicultura y medio ambiente
Nome do centro usuario: Animalario da Facultade de veterinaria(AE-LU-003).
Persoa responsable do proxecto: Ana Quelle Regaldie
Establecemento onde se realizarán os procedementos do proxecto (ou lugar xeográfico no caso de traballos de campo) Animalario da Facultade de veterinaria(AE-LU-003).
Clasificación do proxecto : **Tipo III.**

CONSIDERACIÓNS LEGAIS E TÉCNICAS

Real decreto 53/2013, de 1 de febreiro (BOE núm. 34, do 8 de febreiro), polo que se establecen as normas básicas aplicables para a protección dos animais utilizados en experimentación e outros fins científicos, incluíndo a docencia, establece no seu artigo 33 as condicións de autorizacións dos proxectos con animais de experimentación.

Artigo 88 da Lei 39/2015, do 1 de outubro, do procedemento administrativo común das administracións públicas (BOE núm. 236, do 2 de outubro) establece que a resolución que poña fin ao procedemento decidirá todas as cuestións formuladas polos interesados e aquelas outras derivadas del.

Esta xefatura territorial é competente para ditar resolución de conformidade co artigo 11 do Decreto 245/2009, do 30 de abril, polo que se regulan as delegacións territoriais da Xunta de Galicia e o Decreto 149/2018, do 5 de decembro, polo que establece a estrutura orgánica da Consellería do Medio Rural. O Servizo Provincial de Gandería de Lugo revisou a documentación presentada coa solicitude e visto o informe favorable da avaliación do proxecto, de data 30 de xaneiro de 2020 emitido polo órgano habilitado, e o Comité de Ética da Universidade de Santiago de Compostela, esta xefatura territorial resolve AUTORIZAR o proxecto solicitado.

CVE: ZMvUqwGI15
Verificación: https://sede.xunta.gal/cve

A autorización deste proxecto terá unha duración de 5 ANOS e unha vez que transcorran deberán renovala.

A autorización é unicamente válida nas condicións que figuran no expediente. Ante calquera cambio significativo no proxecto que poida ter efectos negativos sobre o benestar dos animais, deberá solicitar a confirmación da autorización ao Servizo Provincial de Gandería.

Esta autorización poderá ser suspendida no caso de que o proxecto non se leve a cabo de acordo coas condicións de autorización e retirala previo expediente tramitado ao que se lle dará audiencia.

Contra a presente resolución, que non pon fin á vía administrativa, poderá interpor recurso de alzada ante o conselleiro de Medio Rural da Xunta de Galicia no prazo dun mes contado a partir da recepción da notificación da presente resolución, conforme cos artigos 121 e 122 da Lei 39/2015, do 1 de outubro, do procedemento administrativo común das administracións públicas.

Documento asinado electronicamente á marxe

Asinado por: IGLESIAS FONTAL, MARIA OLGA
Cargo: Xefa Territorial
Data e hora: 06/03/2020 13:49:44

CVE: ZMvUqwGl15
Verificación: https://sede.xunta.gal/cve

Centro Andaluz de Biología del Desarrollo
Universidad Pablo de Olavide -
CSIC - Junta de Andalucía

Diploma de aprovechamiento

La organizadora del curso de formación

Hace constar que:

que D. ÁLVARO JESÚS ARANA DÍAZ con NIF 504150145A, ha superado el curso de experimentación animal habiendo obtenido la calificación de APTO.

DENOMINACIÓN DEL CURSO: "CURSO DE MANIPULACIÓN DE ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN. EDICIÓN 2018."

DURACIÓN TOTAL: 55 horas FUNCIONES: a, b y c ESPECIES: Peces-Anfibios y Roedores
MODALIDAD: Presencial FECHA RESOLUCIÓN IFAPA: 16/03/18 CÓDIGO: 18EX3BAX1001

El curso se ha realizado en el Centro Andaluz de Biología del Desarrollo, situado en el Campus de la Universidad Pablo de Olavide, del 07 al 17 Mayo de 2018 con temario en base a los requerimientos del Anexo VII del Real Decreto 53 /2013 de 1 de Febrero y conforme a la Orden ECC/566/2015.

V° Bueno del Director del
Centro Andaluz de Biología del Desarrollo

Fdo: James Castelli-Gair Hombría

Organizadora,

Fdo: Ana Fernández Miñán

Centro Andaluz de Biología del Desarrollo
UPO
CSIC
CICE-JA
CABD

Número de registro: CABD077

Curso en Experimentación Animal para obtener la capacitación en las funciones: cuidado de los animales (a), eutanasia de los animales (b) y realización de los procedimientos (c)

TEMARIO MÓDULO TEÓRICO

Tema I. Uso de animales en experimentación. Legislación nacional vigente.
- Instituciones Mundiales implicadas en Legislación y Normativa nacional en vigor. Regulación sobre el uso de animales en experimentación. RD 1201/2005, Ley 32/2007, RD 53/2013, Orden ECC/566/2015. Capacitación del personal involucrado en experimentación con animales. Órganos Encargado del Bienestar Animal y sus funciones. Animales incluidos en la legislación vigente.

Tema II. Uso de animales en experimentación. Ética, bienestar y 3R.
- Ética en la experimentación animal. Cómites Éticos. Bienestar Animal.

Tema III. Modelos experimentales y alternativas al uso de organismos vivos.
- Concepto de método alternativo. Principio de las "Tres Erres": Validación de métodos alternativos. Alternativas en Investigación y docencia. Alternativas en la evaluación de la eficacia. Alternativas en la evaluación de la seguridad de productos químicos, farmacéuticos y cosméticos. Estrategias Integradas.

Tema IV. Reconocimiento de la angustia, dolor y sufrimiento en animales de laboratorio.
- Métodos para la evaluación de la angustia, dolor y sufrimiento en animales de laboratorio. Anestesia y analgesia. Punto final humanitario. Métodos de eutanasia.

Tema V. Biología básica en peces y anfibios.
- Anatomía general. Fisiología. Reproducción. Cría. Comportamiento.

Tema VI. Cuidado, salud y manejo en peces y anfibios.
- Manipulación. Salud e higiene. Nutrición. Transporte. Cuarentena. Zoonosis.

Tema VII. Métodos de sacrificio en peces y anfibios.
- La "buena muerte". Métodos de sacrificio. Métodos de sacrificio en peces y anfibios.

Tema VIII. Biología de los modelos teleósteos y de anfibios.
Genómica de los teleósteos. Genética y modificaciones genéticas de los teleósteos. Ventajas experimentales de los modelos teleósteos. Genómica de los anfibios. Genética y modificaciones genéticas de los anfibios. Ventajas experimentales de los anfibios.

Tema IX. Intervenciones quirúrgicas en peces
- Anestesia para intervenciones quirúrgicas o procedimientos prolongados. El pez cebra como modelo de infarto de miocardio.

Tema X: El ratón como modelo de enfermedades humanas. Genética y modificaciones genéticas.

TEMARIO MÓDULO PRÁCTICO

Práctica 1. Cuidado, salud y manejo en peces y anfibios.
- Cuidados generales. Nutrición. Alojamiento. Transporte. Identificación. Normas del animalario de peces. Registros de los animales y su bienestar. Cuarentena. Protocolo de esterilización de huevos ("bleaching"). Ciclo de vida. Protocolo de cría de peces y ranas. Cultivos auxiliares: artemia y rotíferos.

Práctica 2. Métodos incruentos de sacrificio.
- Reconocimiento del dolor, sufrimiento y angustia en peces y anfibios. Identificación de síntomas de estrés. Tratamiento con antibióticos. Anestesia, analgesia y eutanasia en peces y anfibios. Procesamiento de cadáveres.

Práctica 3. Manejo y establecimiento de cruces en peces y anfibios.
- Manejo de peces y anfibios. Identificación de machos y hembras en peces y anfibios. Condiciones necesarias para la consecución de embriones y el mantenimiento de las líneas silvestres y transgénicas. Establecimiento de cruces para producción de embriones silvestres. Establecimiento de cruces para producción de embriones transgénicos. Tratamiento hormonal para estimular la producción de huevos en anfibios.

Práctica 4. Técnicas de micro-inyección en peces.
- Puesta de adultos para producción de huevos. Recolección de huevos en estadio de una célula. Transgenesis mediada por elementos Tol2. Micro-inyección de morfolino. Micro-inyección de RNAm.

Práctica 5. Técnicas de micro-inyección en ranas.
- Obtención de huevos en ranas. Fertilización in vitro. Microinyección. Evaluación de los resultados.

Práctica 6. Microscopia confocal "in vivo" en pez cebra.
- Selección de transgénicos. Decorionar larvas de pez cebra. Anestesia para la captura de fotos "in vivo". Identificación macroscópica de tejidos y órganos de peces cebra transgénicos. Montaje para microscopía confocal. Microscopía "Time-lapse".

Práctica 7. Toma de muestras para genotipado en peces.
- Anestesia y toma de muestras.

Práctica 8. Técnicas de criopreservación en peces.
- Anestesia. Preparación del medio de criopreservación para esperma. Extracción de esperma y congelación. Conservación y archivo. Fecundación in vitro.

Práctica 9. Técnicas quirúrgicas en ranas.
- Asepsia. Preparación del campo quirúrgico e instrumental básico. Técnicas quirúrgicas básicas. Extracción de testículos, útero, intestino, hígado, cerebro. Eutanasia. Procesamiento de cadáveres.

Práctica 10 . Anestesia menor/avanzada
- Reconocimiento del dolor, sufrimiento y angustia ratones.- Anestesia, analgesia y eutanasia ratones.- Procesamiento de cadáveres.

Práctica 11. Determinación de la fuerza muscular y comportamiento.
- Determinación del tono muscular. Estudios de comportamiento en ratón.

Práctica 12. Técnicas quirúrgicas básicas en ratón.
- Asepsia. Preparación del campo quirúrgico e instrumental básico. Técnicas quirúrgicas básicas. Extracción de ovario, oviducto y útero.

Instituto de Investigación y Formación Agraria y Pesquera
CONSEJERÍA DE AGRICULTURA, PESCA Y DESARROLLO RURAL

UNIÓN EUROPEA

CERTIFICADO DE CAPACITACIÓN

Artículo 13, Orden ECC/566/2015, de 20 de marzo por la que se establecen los requisitos de capacitación que debe cumplir el personal que maneje animales utilizados, criados o suministrados con fines de experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia.

1. IDENTIFICACIÓN

1.1. Apellidos y Nombre ARANA DÍAZ, ÁLVARO

1.2. DNI/NIE 504150145A

1.3. Fecha de Nacimiento	1.4. Lugar y país de nacimiento	1.5. Nacionalidad
02/09/1993	OURENSE (ESPAÑA)	ESPAÑOLA

2. FECHA DE RESOLUCIÓN DEL RECONOCIMIENTO DE LA CAPACITACIÓN INICIAL Y Nº DE CERTIFICADO

20/11/2018 - EXP-000884

3. FUNCIONES Y GRUPOS DE ESPECIES ANIMALES PARA LOS QUE SE RECONOCE LA CAPACITACIÓN (Artículo 3 y Anexo II Orden ECC/566/2015, de 20 de marzo)

a) Cuidado de los animales
b) Eutanasia de los animales
c) Realización de los procedimientos

GRUPO DE ESPECIES ANIMALES

1. Roedores
8. Peces y anfibios

4. ORGANISMO QUE EXPIDE EL CERTIFICADO

4.1. Nombre y dirección del organismo que expide el certificado

CONSEJERÍA DE AGRICULTURA, PESCA Y DESARROLLO RURAL
INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN Y FORMACIÓN AGRARIA Y PESQUERA
Edificio de Servicios Múltiples "los Bermejales"
Avda. de Grecia s/n. 41012 Sevilla (España)

4.2. Teléfono	4.3. Fax	4.4. Correo electrónico
958 056 000	955 519 107	experimentacion.ifapa@juntadeandalucia.es

4.5. Fecha de expedición* 20/11/2018
4.6. Lugar SEVILLA
4.7. Sello

4.8. Nombre y Firma

El Presidente del Instituto de Investigación y Formación Agraria y Pesquera

CONSEJERÍA DE AGRICULTURA, PESCA Y DESARROLLO RURAL
Instituto de Inv. y Formación Agraria y Pesquera
JUNTA DE ANDALUCIA
Servicios Centrales
Sevilla
C.I.F.: Q-4100689-A

Fdo. Jerónimo José Pérez Parra

* La fecha de expedición coincide con el inicio del periodo de vigencia establecido en el artículo 21.8 de la Orden ECC/566/2015, de 20 de marzo.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

NOTE: Please save this file locally before filling in the table, DO NOT work on the file within your internet browser as changes will not be saved. Adobe Acrobat Reader (available free here) is recommended for completion.

The ARRIVE guidelines 2.0: author checklist

The ARRIVE Essential 10

These items are the basic minimum to include in a manuscript. Without this information, readers and reviewers cannot assess the reliability of the findings.

Item		Recommendation	Section/line number, or reason for not reporting
Study design	1	For each experiment, provide brief details of study design including: a. The groups being compared, including control groups. If no control group has been used, the rationale should be stated. b. The experimental unit (e.g. a single animal, litter, or cage of animals).	Material y Métodos p. 102 Líneas de Pez Cebra y Killifish Resultados p. 135-180 Resultados p. 135-180 (pie de Figuras)
Sample size	2	a. Specify the exact number of experimental units allocated to each group, and the total number in each experiment. Also indicate the total number of animals used. b. Explain how the sample size was decided. Provide details of any *a priori* sample size calculation, if done.	Resultados p. 135-180 (pie de Figuras) No aplica
Inclusion and exclusion criteria	3	a. Describe any criteria used for including and excluding animals (or experimental units) during the experiment, and data points during the analysis. Specify if these criteria were established *a priori.* If no criteria were set, state this explicitly. b. For each experimental group, report any animals, experimental units or data points not included in the analysis and explain why. If there were no exclusions, state so. c. For each analysis, report the exact value of *n* in each experimental group.	Los criterios de selección fueron establecidos a priori. NINGÚN INDIVIDUO FUE EXCLUIDO PARA LOS ANÁLISIS NINGÚN ANIMAL NI DATO EXTRAÍDO FUE EXCLUIDO PARA LOS ANÁLISIS Resultados p. 135-180 (pie de Figuras)
Randomisation	4	a. State whether randomisation was used to allocate experimental units to control and treatment groups. If done, provide the method used to generate the randomisation sequence. b. Describe the strategy used to minimise potential confounders such as the order of treatments and measurements, or animal/cage location. If confounders were not controlled, state this explicitly.	No aplica Material y Métodos p. 102-104
Blinding	5	Describe who was aware of the group allocation at the different stages of the experiment (during the allocation, the conduct of the experiment, the outcome assessment, and the data analysis).	Material y Métodos p. 102-104 Resultados p. 143-144 y 158-164
Outcome measures	6	a. Clearly define all outcome measures assessed (e.g. cell death, molecular markers, or behavioural changes). b. For hypothesis-testing studies, specify the primary outcome measure, i.e. the outcome measure that was used to determine the sample size.	Material y métodos p. 101-121 No aplica
Statistical methods	7	a. Provide details of the statistical methods used for each analysis, including software used. b. Describe any methods used to assess whether the data met the assumptions of the statistical approach, and what was done if the assumptions were not met.	Material y Metodos y Resultados Materia y Métodos p. 121 Resultados p.125-180
Experimental animals	8	a. Provide species-appropriate details of the animals used, including species, strain and substrain, sex, age or developmental stage, and, if relevant, weight. b. Provide further relevant information on the provenance of animals, health/immune status, genetic modification status, genotype, and any previous procedures.	Introduction p. 67 y 71 Materia y Métodos p. 102-104
Experimental procedures	9	For each experimental group, including controls, describe the procedures in enough detail to allow others to replicate them, including: a. What was done, how it was done and what was used. b. When and how often. c. Where (including detail of any acclimatisation periods). d. Why (provide rationale for procedures).	Material y Métodos 101-121 Resultados 125-180 (pie de Figuras) Material y Métodos p. 101-121 Material y Métodos p. 101-121 Resultados p.125.180
Results	10	For each experiment conducted, including independent replications, report: a. Summary/descriptive statistics for each experimental group, with a measure of variability where applicable (e.g. mean and SD, or median and range). b. If applicable, the effect size with a confidence interval.	Resultados p.125-180 (Pie de Figuras) Resultados p.125-180 (Pie de Figuras)

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

The Recommended Set

These items complement the Essential 10 and add important context to the study. Reporting the items in both sets represents best practice.

Item		Recommendation	Section/line number, or reason for not reporting
Abstract	11	Provide an accurate summary of the research objectives, animal species, strain and sex, key methods, principal findings, and study conclusions.	Resumen p. 41-49
Background	12	a. Include sufficient scientific background to understand the rationale and context for the study, and explain the experimental approach. b. Explain how the animal species and model used address the scientific objectives and, where appropriate, the relevance to human biology.	Introducción p. 53-90 Introducción p. 53-90
Objectives	13	Clearly describe the research question, research objectives and, where appropriate, specific hypotheses being tested.	Hipótesis y Objetivos p. 95-97
Ethical statement	14	Provide the name of the ethical review committee or equivalent that has approved the use of animals in this study, and any relevant licence or protocol numbers (if applicable). If ethical approval was not sought or granted, provide a justification.	p. 11 Material y Métodos p. 102
Housing and husbandry	15	Provide details of housing and husbandry conditions, including any environmental enrichment.	Material y Métodos p. 102-104
Animal care and monitoring	16	a. Describe any interventions or steps taken in the experimental protocols to reduce pain, suffering and distress. b. Report any expected or unexpected adverse events. c. Describe the humane endpoints established for the study, the signs that were monitored and the frequency of monitoring. If the study did not have humane endpoints, state this.	Material y Métodos p. 102 No aplica No aplica
Interpretation/ scientific implications	17	a. Interpret the results, taking into account the study objectives and hypotheses, current theory and other relevant studies in the literature. b. Comment on the study limitations including potential sources of bias, limitations of the animal model, and imprecision associated with the results.	Discusión p. 185-305 Discusión p. 185-305
Generalisability/ translation	18	Comment on whether, and how, the findings of this study are likely to generalise to other species or experimental conditions, including any relevance to human biology (where appropriate).	Discusión p. 185-305
Protocol registration	19	Provide a statement indicating whether a protocol (including the research question, key design features, and analysis plan) was prepared before the study, and if and where this protocol was registered.	p. 102, 105 y 132 (Arana, 2016)
Data access	20	Provide a statement describing if and where study data are available.	No aplica
Declaration of interests	21	a. Declare any potential conflicts of interest, including financial and non-financial. If none exist, this should be stated. b. List all funding sources (including grant identifier) and the role of the funder(s) in the design, analysis and reporting of the study.	p. 8 p. 12

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

ZEBRA BIORES

Zebrafish Biological Research

El síndrome de CHARGE es una enfermedad genética humana que produce un conjunto de malformaciones físicas y del comportamiento durante el desarrollo embrionario debidas a la haploinsuficiencia del gen CHD7. A través de la generación de un modelo mutante CRISPR/Cas9 de pez cebra (D. rerio), se llevará a cabo la comparación fenotípica y molecular de la línea mutante sa11593 del Sanger Centre y de la microinyección de morfolinos para chd7, con la finalidad de incrementar el conocimiento de la base genética y molecular de esta enfermedad y su relación con la senescencia embrionaria. Además, se introducirá por primera vez al killifish como un modelo útil para el estudio de la senescencia embrionaria y del síndrome de CHARGE.