



**Universidad de Concepción**  
**Facultad de Ciencias Biológicas**  
**Programa de Magíster en Bioquímica y Bioinformática**

**ROL DE Armc9 EN EL ESTABLECIMIENTO Y  
MANTENCIÓN DEL EJE AXIAL DE LA ESPINA DORSAL  
EN EL PEZ CEBRA**

**POR CARLOS HUMBERTO MUÑOZ MONTECINOS**

Tesis presentada a la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad de Concepción para optar al grado de Magíster en Bioquímica y Bioinformática

Profesor Guía: Dr. Ricardo Fuentes Pardo  
Profesor Co-Guía: Dr. Felipe Aguilera Muñoz

Diciembre 2022  
Concepción, Chile.

## Agradecimientos

Quisiera agradecer a los miembros de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad de Concepción, a sus docentes, paradocentes y estudiantes que de una u otra forma contribuyeron al desarrollo del proyecto y a hacer que mi experiencia en esta universidad fuera sumamente enriquecedora. Agradecimientos especiales a mis tutores, Dres. Ricardo Fuentes y Felipe Aguilera, por confiar en mí y ayudarme a ser un mejor investigador, al LAFET, a los miembros del GDeP y a mis compañeros del programa de Magister.

También le agradezco a los Dres. Miguel Allende (Universidad de Chile) y Raúl Araya-Secchi (Universidad San Sebastián) por permitirme usar su laboratorio para el desarrollo de los objetivos de la tesis, y por orientarme y estar siempre con la disposición de ayudar en lo relacionado al ensayo de *docking*, respectivamente.

Agradecimientos también al proyecto Apoyo FCBI2019-01, Proyecto VRID Investigación Multidisciplinaria 220.031.117-M y Proyecto Fondecyt de Iniciación 11201118 del Dr. Fuentes y a ANID, por financiar esta tesis a través de su programa de Becas de Magíster Nacional 22191268.

## Tabla de Contenidos

Índice de Figuras .....	v
Índice de Tablas.....	vii
1 Resumen .....	viii
2 Abstract .....	x
3 Introducción.....	1
3.1 Genética de la EIA .....	5
3.2 Sistemas modelos animales para el estudio de la EIA .....	7
3.3 Avances en la genética y etiología de la EIA utilizando al pez cebra como sistema modelo vertebrado.....	10
3.4 Biología de los cilios y su relación con la mantención de la curvatura de la CV del pez cebra .....	13
3.5 La proteína ciliar Armc9 y la familia de proteína Armcs .....	18
4 Hipótesis.....	23
5 Objetivos .....	24
5.1 Objetivo General.....	24
5.2 Objetivos específicos.....	24
6 Materiales y Métodos .....	25

6.1	Mantenimiento y manejo de líneas de pez cebra silvestres, mutante <i>armc9</i> y transgénica <i>mpeg1:dendra2</i> .....	25
6.2	Genotipificación de individuos adultos y embriones <i>armc9</i> .....	25
6.3	Inmunodetección de Sco-espondina en el órgano subcomisural y la fibra de Reissner .....	26
6.4	Tinción del esqueleto con rojo de alizarina .....	27
6.5	Evaluación de la inflamación en la región curvada del eje axial en embriones transgénicos ( <i>armc9/mpeg1:dendra2</i> ) .....	28
6.6	Análisis filogenético de los miembros de la familia ARMC en animales .....	29
6.7	Modelamiento de la estructura tridimensional de la proteína Armc9 de pez cebra.....	32
6.8	Análisis de interacción o <i>docking</i> proteína-proteína entre Armc9 y Togaram1 del pez cebra.....	33
7	Resultados .....	34
7.1	Naturaleza molecular de la mutación en el gen <i>armc9</i> en pez cebra ..	34
7.2	La curvatura axial se manifiesta durante períodos larvales en el mutante <i>armc9</i> .....	36
7.3	Los componentes del líquido cefalorraquídeo aparecen inalterados en larvas mutantes <i>armc9</i> de pez cebra.....	39

7.4	Correlación entre la respuesta inflamatoria y la curvatura axial en larvas mutantes <i>armc9</i> .....	42
7.5	Historia evolutiva de la familia de proteínas Armc en animales .....	44
7.6	Armc9 y Togaram1 forman un complejo de interacción proteína-proteína en el pez cebra. ....	51
8	Discusión.....	62
8.1	El mutante <i>armc9</i> de pez cebra como modelo de EIA.....	63
8.2	El flujo del líquido cefalorraquídeo parece inalterado en el mutante <i>armc9</i> .....	65
8.3	Inflamación y curvatura del eje axial El mutante <i>armc9</i> no recluta anormalmente macrófagos en el sitio de curvatura del eje axial .....	67
8.4	La interacción entre Armc9-Tog1 depende del dominio “ARM-type fold” 69	
8.5	Historia evolutiva de la familia ARMC en animales.....	74
9	Conclusiones.....	80
10	Referencias .....	82

## Índice de Figuras

<b>Figura 1</b>	Anatomía de la columna vertebral humana.	2
<b>Figura 2</b>	Plan corporal, curvaturas de la columna vertebral y medición del ángulo de Cobb para el diagnóstico de la escoliosis.	3
<b>Figura 3</b>	Estructura y organización ósea de la espina dorsal de humano y pez cebra.	12
<b>Figura 4</b>	Estructura de cilios primarios y móviles.	14
<b>Figura 5</b>	Fenotipo del mutante <i>armc9</i> <sup>sa29834</sup> .	34
<b>Figura 6</b>	Impacto de la mutación puntual en el gen <i>armc9</i> .	35
<b>Figura 7</b>	Genotipificación de mutantes <i>armc9</i> .	37
<b>Figura 8</b>	Estructura y organización del esqueleto de individuos silvestres y mutantes <i>armc9</i> del pez cebra a las 5 spf.	39
<b>Figura 9</b>	Morfología del órgano subcomisural de embriones silvestre y <i>armc9</i> .	41
<b>Figura 10</b>	Análisis de la distribución de macrófagos en la región curvada de peces cebra juveniles de 6 spf.	43
<b>Figura 11</b>	Filogenia de los miembros de la familia ARMC.	50
<b>Figura 12</b>	Análisis de calidad de los modelos de estructura tridimensional de <i>Armc9</i> generados con los servidores I-TASSER y trRosetta.	52
<b>Figura 13</b>	Análisis del modelo de <i>Armc9</i> generado por trRosetta con QMEANDisCo y refinado con locPREFMD.	54

<b>Figura 14</b>	Análisis con QMEANDisCo del modelo de Tog1 y Armc9 mutante generados con trRosetta y refinados con locPREFMD.	55
<b>Figura 15</b>	Modelo de interacción de Armc9 silvestre y mutante con Tog1 del pez cebra	57



## Índice de Tablas

<b>Tabla 1</b>	Genes de la familia <i>armc</i> de pez cebra, humano y ratón, y su respectivo código UniProt.	30
<b>Tabla 2</b>	Lista de especies utilizadas en los análisis filogenéticos.	31
<b>Tabla 3</b>	Análisis de dominios funcionales presentes en los miembros de la familia ARMC de pez cebra.	46
<b>Tabla 4</b>	Número de proteínas con el dominio “ARM-type fold” en las distintas especies escogidas para análisis filogenético.	47
<b>Tabla 5</b>	Análisis con HawkDock del <i>docking</i> realizado con los servidores ClusPro y ZDOCK entre <i>Armc9</i> silvestre y <i>Tog1</i> .	58
<b>Tabla 6</b>	Análisis con HawkDock del <i>docking</i> realizado con los servidores ClusPro y ZDOCK entre <i>Armc9</i> mutante y <i>Tog1</i> .	59
<b>Tabla 7</b>	Análisis con PRODIGY de la afinidad de unión y el número de contactos entre <i>Armc9</i> silvestre y mutante con <i>Togaram1</i> .	61



## 1 Resumen

La columna vertebral (CV) constituye el eje central del esqueleto que define a los vertebrados. Diversas malformaciones afectan a la CV, siendo la escoliosis idiopática adolescente (EIA) una de las más comunes. Esta condición consiste en una curvatura lateral que se desarrolla en ausencia de anomalías congénitas. A pesar de ser un importante problema de salud pública, la etiología de esta condición es desconocida, principalmente por su heterogeneidad genética y la falta de modelos animales adecuados para su estudio. Recientemente, estudios genéticos utilizando el sistema modelo conocido como pez cebra han vinculado el desarrollo de curvaturas tipo EIA a alteraciones en la esqueletogénesis, en la estructura y organización de cilios, en el flujo del líquido cefalorraquídeo, y en la respuesta inflamatoria. Sin embargo, la identidad de la mayoría de los genes que regulan el establecimiento y mantención del eje axial de la CV es aún desconocida.

En este trabajo se realizó una caracterización fenotípica del mutante *armc9* del pez cebra, el cual muestra una malformación tipo EIA y anomalías asociadas a ciliopatías. Nuestros hallazgos revelaron que el fenotipo curvado no se debe a deformaciones de las vértebras. Por otro lado, la organización de componentes asociados a la biología del líquido cefalorraquídeo, como del órgano subcomisural (OSC) y la fibra de Reissner, no se encontró alterada en los individuos mutantes. Adicionalmente, se evaluó la respuesta inflamatoria

mediante el estudio *in vivo* del comportamiento de macrófagos en la región en que se origina la curvatura espinal, sin un claro reclutamiento de estas células en dicho lugar.

Asimismo, se realizó una caracterización bioinformática de la proteína *Armc9*, la cual está constituida por dominios LisH y Armadillo (ARM)-type fold en la región N- y C-terminal, respectivamente. Una predicción de *Armc9* mutante sugiere que este último estaría ausente en la proteína. Además, nuestro análisis *in silico* indica que *Armc9* interaccionaría con *Togaram1* (*Tog1*) en el pez cebra, a través del dominio ARM-type fold. Finalmente, se analizaron las relaciones evolutivas de los miembros de la familia ARMC, indicando que estos se pueden clasificar en 12 grupos filogenéticos.

En resumen, los resultados de esta tesis muestran que el mutante *armc9* representa el fenotipo de EIA, y sugieren que este sería causado por la pérdida de la porción C-terminal del dominio “ARM-type fold” de la proteína *Armc9*. Además, los análisis bioinformáticos y filogenéticos nos permitieron determinar los sitios y regiones funcionalmente importantes de la proteína *Armc9* y las posibles funciones de los otros miembros de la familia ARMC.

## 2 Abstract

The vertebral column (VC) constitutes the central axis defining vertebrate organisms. Diverse malformations affect the VC, being adolescent idiopathic scoliosis (AIS) one of the most common. It consists in a lateral curvature developed in absence of congenital abnormalities. Despite being an important public health issue, the etiology of AIS remains unknown, mainly because of its genetic heterogeneity and the lack of suitable animal models for its study. Recently, using zebrafish as animal model, genetic studies have linked the development of AIS curves to skeletogenesis, cilia structure and organization, cerebrospinal-fluid flow, and inflammatory response. However, most of genes that regulate the establishment and maintenance of axial axis of the VC are still unknown.

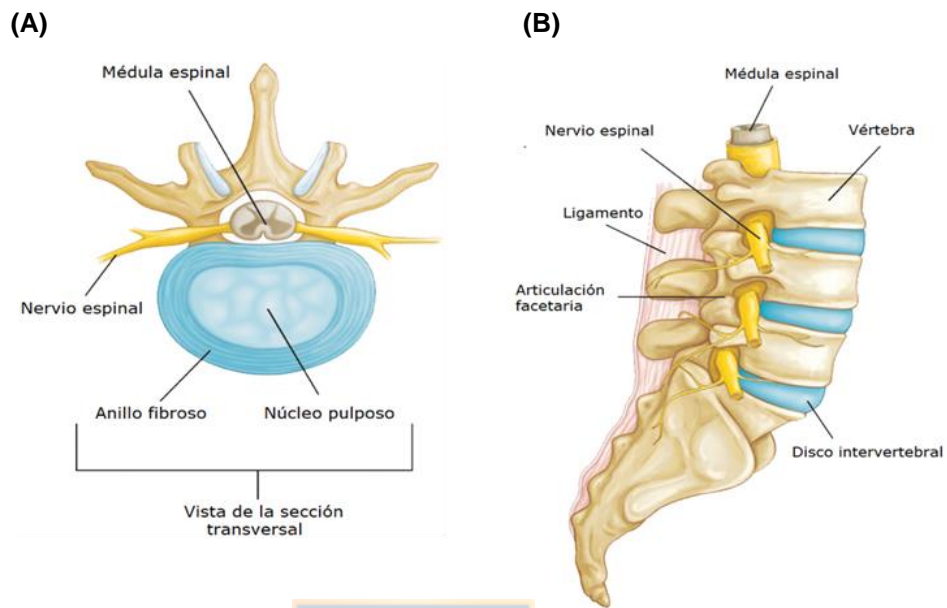
In this work, we performed a phenotypic characterization of the zebrafish *armc9* mutant, which displays an AIS-like malformation and ciliopathy-associated anomalies. Our findings revealed that the curved phenotype is not due to vertebrae malformations. On the other hand, CSF components organization, associated with its biology, such as the subcommissural organ and the Reissner fiber, were not affected in mutant individuals. Moreover, the inflammatory response was assessed by studying *in vivo* macrophages behavior in the area where the curve is originated, without observing a clear recruitment of these cells in that region.

Likewise, we performed a bioinformatic characterization of the zebrafish *Armc9* protein, which is constituted by LisH and ARM-type fold domains in the N- and C-terminal region, respectively. A predicted mutant *Armc9* suggests that the ARM-type fold domain would be absent in the protein. Further, our *in silico* analysis indicates that *Armc9* would interact with Togaram1 (Tog1) in zebrafish, through the ARM-type fold domain. Finally, the evolutionary relationships of ARMC family members were analyzed, indicating that these can be classified in 12 phylogenetic groups.

In summary, our results show that the *armc9* mutant represents the AIE phenotype, and suggests that this would be caused by the loss of the C-terminal portion of the *Armc9*' "ARM-type fold" domain. Furthermore, the bioinformatic and phylogenetic analyses allowed us to determine the functionally relevant sites and regions of *Armc9*, and hypothetical functions of additional members of the ARMC family.

### 3 Introducción

La columna vertebral (CV) es la característica distintiva de los animales vertebrados, constituyendo el eje central del esqueleto. Esta estructura se extiende desde el cráneo hasta la pelvis y consiste en una serie de huesos apilados llamados vértebras, separados y soportados por discos intervertebrales, músculos y ligamentos. Cada vértebra se compone de un cuerpo vertebral o centro que envuelve a la médula espinal, y de arcos vertebrales (Figura 1). La CV da soporte estructural y flexibilidad al eje axial, y permite la distribución simétrica del peso corporal tanto en reposo como en movimiento. Además, protege a la médula espinal, a elementos vasculares y permite el anclaje de la caja torácica, sirviendo como plataforma para la protección del corazón y los pulmones.

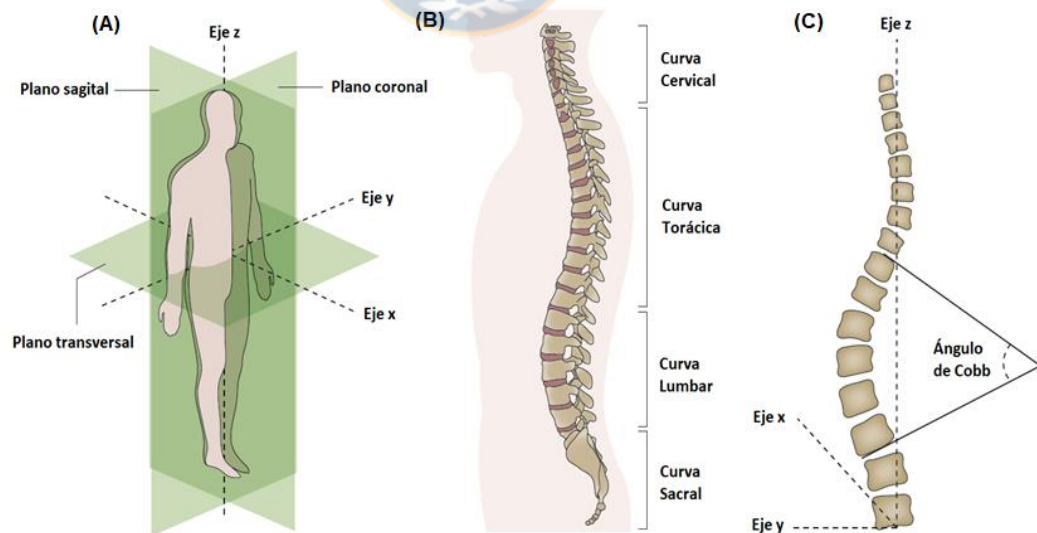


**Figura 1. Anatomía de la columna vertebral humana.** (A) Vista transversal de la vértebra y disco intervertebral. (B) Vista lateral de la región lumbar de la columna. Modificado de “*About your back*” de la Academia americana de cirujanos ortopédicos (<https://orthoinfo.aaos.org/globalassets/pdfs/about-your-back.pdf>).

A lo largo del eje anteroposterior, la CV de humanos presenta cuatro curvaturas: cervical, torácica, lumbar y sacral (Figura 2). Las curvaturas torácicas y sacral se forman tempranamente durante la etapa prenatal, mientras que la cervical y lumbar lo hacen en la etapa fetal, y terminan su desarrollo tras el nacimiento en respuesta a los movimientos de la cabeza y a las posiciones adoptadas al sentarse y al caminar (Bagnall et al., 1977; Panattoni & Todros, 1988). Anormalidades en el desarrollo de estas curvas conllevan a tres deformidades congénitas: cifosis (curvatura exagerada de la región torácica),

lordosis (curvatura lumbar anormal) y escoliosis (deformidad tridimensional de la columna y el tronco) (Lonstein, 1999).

La escoliosis es la deformidad más común de la CV de niños y adolescentes (Konieczny et al., 2013). La escoliosis se define como una deformidad tridimensional, con una curvatura lateral mayor a  $10^\circ$  mientras el paciente se encuentra de pie, acompañada en algunos casos de defectos rotacionales (Negrini et al., 2012). La forma de medir el ángulo de curvatura se basa en el método de Cobb, el cual consiste en tomar una radiografía de la columna vertebral en el plano coronal y medir el ángulo que se forma con la intersección de las rectas perpendiculares a la vértebra anterior y posterior involucradas en la curvatura (Cheng et al., 2015) (Figura 2).



**Figura 2. Plan corporal, curvaturas de la columna vertebral y medición del ángulo de Cobb para el diagnóstico de la escoliosis. (A)** Ejes de coordenadas y planos del cuerpo humano. **(B)** Regiones y curvaturas de la columna vertebral. **(C)** Medición del ángulo de Cobb en el plano coronal del cuerpo humano.

La escoliosis se clasifica en diversos tipos dependiendo de la edad del paciente en que aparece, etiología, severidad y tipo de curva, siendo los dos grupos principales de clasificación los relativos a su causa: escoliosis no idiopática (de causa conocida) y la escoliosis idiopática (de causa desconocida) (Cheng et al., 2015) Esta última se subclasifica en tres tipos de acuerdo con la edad en que aparece: infantil (hasta 3 años), juvenil (de 3 a 10 años) y adolescente (mayores de 10 años) (Konieczny et al., 2013). La escoliosis idiopática adolescente (EIA) es la forma más común de escoliosis, representando cerca del 80% de los casos a nivel mundial (Konieczny et al., 2013). Esta deformidad se desarrolla en individuos sanos y que no presentan defectos estructurales en la columna, lo que hace difícil su detección al momento de la aparición (Konieczny et al., 2013). La complicación primaria asociada a la aparición de la EIA es la desfiguración del torso con asimetría de hombros o cadera, desbalance del tronco o rotación de las costillas (Hresko, 2013). Si bien, en general, esta no es una condición progresiva, la escoliosis puede causar diversos problemas dependiendo del grado de curvatura. Por ejemplo, curvas severas están relacionadas a un incremento en el riesgo de problemas de salud en la adultez, como problemas estéticos, discapacidad, dolor de espalda, y problemas respiratorios. La calidad de vida relacionada a la salud de los pacientes con EIA se ve afectada principalmente en aspectos relacionados a malestar físico, autoestima, problemas psicológicos, y susceptibilidad a la depresión (Freidel et al., 2002; Negrini et al., 2006). A pesar de la abundante



información que poseemos a la fecha respecto a la morfogénesis de la EIA y de los esfuerzos que se han realizado para el diseño de herramientas terapéuticas para impedir el avance de esta patología, aún existe una enorme carencia en el conocimiento de los mecanismos celulares y moleculares que contribuyen al mantenimiento de la curvatura de la CV durante periodos post-embriónicos del desarrollo (transición del estado juvenil al adulto).

### **3.1 Genética de la EIA**

A pesar de ser una condición de causa desconocida, la evidencia sugiere que el desarrollo de EIA tiene un componente genético (Muñoz-Montecinos et al., 2022). La escoliosis fue inicialmente descrita como una condición familiar, debido a la alta incidencia entre parientes, presentándose comúnmente en varios miembros de una sola familia. Además, tiene un marcado sesgo hacia las mujeres, quienes tienen una prevalencia dos veces mayor en comparación a los hombres, y un riesgo 10 veces mayor de desarrollar curvaturas que requieran cirugía (Karol et al., 1993; Konieczny et al., 2013; Wynne-Davies, 1968). Estudios realizados en poblaciones de gemelos europeos revelaron que los monocigóticos tienen una mayor incidencia a padecer de EIA que los dicigóticos (Kesling & Reinker, 1997). Por otro lado, se ha propuesto que el 38% de la varianza en el riesgo de desarrollar escoliosis es explicada por efectos genéticos aditivos (Grauers et al., 2012). En este contexto, se han llevado a cabo variados análisis

genéticos con el objetivo de encontrar genes o regiones génicas asociadas al desarrollo de EIA, principalmente del tipo de asociación de genoma completo (*genome wide association studies* o GWAS) y secuenciación del exoma completo (*whole exome sequencing* o WES). Así, se ha reportado que variaciones en las secuencias de los genes HD7, HSP2 y POC5 cosegregan con EIA en familias cuyos miembros padecían esta condición (Baschal et al., 2015; Gao et al., 2007; Patten et al., 2015). Además, se han encontrado polimorfismos de nucleótido único (*single nucleotide polymorphisms* o SNPs) asociados a diversos *loci* relacionados con funciones génicas que regulan proliferación y migración celular (CDH13), y condrogénesis (SOX6) (Khanshour et al., 2018). Para más información se recomienda revisar la siguiente página web: <https://www.ebi.ac.uk/gwas/>. Adicionalmente, estudios de secuenciación de genoma y de exomas completos han logrado establecer asociaciones de variantes genéticas poco frecuentes con la EIA (Pérez-Machado et al., 2020). Debido a que estas variantes poco frecuentes alteran la función proteica, son capaces de contribuir fuertemente al riesgo de desarrollar EIA en un individuo respecto a las variantes comunes (Manolio et al., 2009). Dentro de estas variantes poco frecuentes podemos mencionar a aquellas asociadas a los genes *fibrillin 1* y *2* (FBN1 y FBN2), las cuales se encontraron en un 7,6% de los pacientes con EIA comparado al 2,4% en pacientes control, y contribuyen a la progresión de la severidad de la curvatura espinal (Buchan, Alvarado, et al., 2014a).

Gracias a los avances en torno a la genética de la EIA es que hoy es ampliamente aceptado que esta condición tiene un componente genético en su etiopatogénesis (Revisado en Muñoz-Montecinos et al., 2022). Sin embargo, dichos avances representan asociaciones estadísticas en lugar de relaciones de causalidad. La herencia de la EIA no sigue un mecanismo mendeliano simple, sino más bien patrones de herencia variables que sugieren heterogeneidad genética, cuya consecuencia es un indescifrable modelo de transmisión genética (Cheng et al., 2015). Como resultado de este desconocimiento, no existen actualmente pruebas genéticas capaces de predecir, con la precisión suficiente, la prognosis de la condición (Zamborský et al., 2019).

El uso de ensayos de genética directa y reversa, junto con el uso de tecnologías de secuenciación masiva en sistemas modelos animales han contribuido enormemente a identificar a los genes involucrados en la etiología de la EIA (Muñoz-Montecinos et al., 2022). Ampliar este conocimiento, junto con dilucidar la genética del desarrollo de la CV, es crucial para entender no sólo el origen de la EIA, sino también para desarrollar mejores herramientas diagnósticas y de prognosis, que ayudarán a mejorar la calidad de vida de miles de personas en el mundo.

### **3.2 Sistemas modelos animales para el estudio de la EIA**

Una de las razones detrás de que se ignoren las causas de la EIA es la carencia de sistemas modelos animales que desarrollen escoliosis de forma similar a la condición patológica humana. A pesar que la estructura de la CV es similar entre los vertebrados (Boswell & Ciruna, 2017), la escoliosis idiopática ha sido descrita históricamente como propia de humanos (Arkin, 1949; Naique et al., 2003). Una característica importante que diferencia a los humanos de otros vertebrados es que los primeros se desplazan en una postura completamente erguida, con el centro de gravedad ubicado directamente sobre la pelvis (Le Huec et al., 2011). Por otro lado, los otros vertebrados, tanto bípedos como cuadrúpedos, se desplazan con las rodillas y caderas flectadas, lo que posiciona su columna de forma más horizontal y determina que el centro de masa se ubique frente a la pelvis (D'Août et al., 2002). Como consecuencia de lo anterior, la distribución de cargas mecánicas a lo largo de la columna es diferente entre humanos y otros vertebrados, lo que podría explicar por qué esta condición no se observa en otros mamíferos (Castelein et al., 2005).

El hecho que la EIA no se desarrolle naturalmente en tetrápodos, no ha sido un impedimento para inducir el desarrollo de esta condición mediante diversas aproximaciones, principalmente quirúrgicas. A finales del siglo XIX se reportó una escoliosis experimental en conejos tras la disección unilateral del nervio frénico, y durante el siglo XX, una serie de especies animales se usaron como sistemas modelos experimentales, incluyendo el pollo, conejos, ratones, y perros (Revisado en Ouellet & Odent, 2013). En 1993, se estableció un modelo

popular de escoliosis en aves, a los cuales se les removió quirúrgicamente la glándula pineal, órgano responsable, entre otras funciones, de la producción de melatonina (Machida et al., 1993). El modelo fue posteriormente validado tras observar que los pollos pinealectomizados no desarrollaron escoliosis tras la administración de melatonina exógena (Machida et al., 1996). Este modelo permitió proponer un mecanismo para explicar el desarrollo de escoliosis. Sin embargo, al realizar experimentos similares en mamíferos, como ratones o incluso en primates, no se logró reproducir el mismo resultado (Cheung et al., 2005; Machida et al., 1999; Robin & Stein, 1975). Adicionalmente, un estudio observacional en niños que han sufrido la resección de su glándula pineal mostró que no hay relación entre la cirugía y el posterior desarrollo de escoliosis (Day et al., 2007). El uso de estos sistemas modelos animales para el estudio de escoliosis ha logrado reproducir principalmente curvaturas similares a las de la EIA, pero no su etiopatogénesis, aportando más bien al desarrollo de cirugías correctivas o tratamientos mecánicos, y no a la comprensión de las causas de esta condición (Bobyne et al., 2015). Por lo tanto, se requiere el desarrollo de estrategias experimentales y el uso de otros sistemas modelos animales capaces de recapitular fielmente las características propias de la EIA.

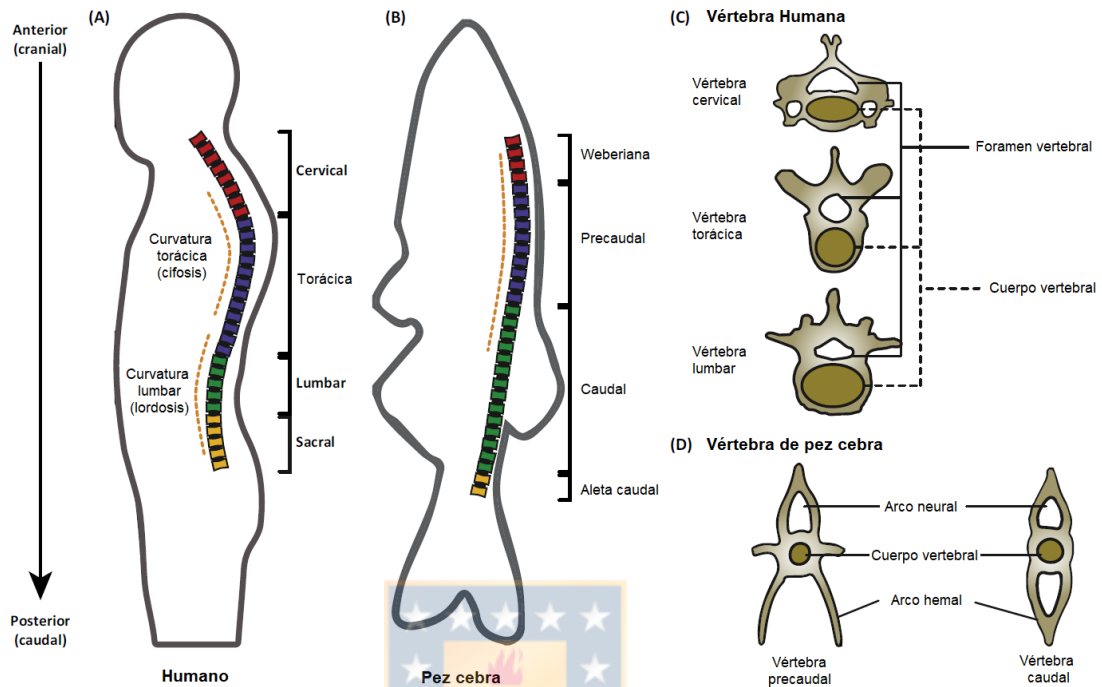
A diferencia de los mamíferos, otros organismos vertebrados sí desarrollan naturalmente escoliosis, tal como los peces. Así, se han reportado curvaturas tipo escoliosis en diversas especies de peces teleósteos, incluyendo guppy, medaka y pez cebra (*Danio rerio*) (Gorman et al., 2007; Lleras-Forero et al., 2020; Muñoz-

Montecinos et al., 2022). A pesar de no ser bípedos y vivir en un ambiente acuático, los peces generan fuerzas físico-mecánicas producto del nado que son similares a las que son ejercidas por humanos al estar en posición erguida (Gorman & Breden, 2009). Esto representa una ventaja en comparación con los mamíferos como el ratón, cuyas cargas en la CV y centro de gravedad son muy distintos a las del humano (Gorman & Breden, 2009). Por lo tanto, diversificar los sistemas modelos animales más allá de los ratones murino ha revelado interesantes aspectos de la EIA en humanos (Lv et al., 2021), y será crucial para lograr comprender a cabalidad la etiología de esta condición.

### **3.3 Avances en la genética y etiología de la EIA utilizando al pez cebra como sistema modelo vertebrado**

Originalmente utilizado para estudios de biología del desarrollo, el pez cebra ha ido ganando terreno en diversas áreas de investigación, siendo una de ellas la biomedicina (Lieschke & Currie, 2007). El pez cebra posee una combinación de importantes características genéticas y fisiológicas compartidas con los mamíferos, incluyendo la capacidad de experimentar a gran escala y fácil manipulación. Además, cerca del 70% de los genes humanos tienen un ortólogo en el genoma del pez cebra (Howe et al., 2013), mientras que las técnicas modernas de edición genética como el sistema CRISPR/Cas9 también están validadas en este modelo animal (Ablain et al., 2015; Sung et al., 2014). Asimismo, la transparencia del embrión en estadios tempranos del desarrollo

hace fácilmente observable la morfogénesis de órganos y estructuras durante la formación del animal completo. A pesar de que no todos los órganos o estructuras humanas tienen una contraparte en el pez cebra, se han hecho importantes avances en la comprensión de enfermedades que afectan sistemas, tales como el nervioso, cardiovascular, muscular, renal, visual, que son comunes entre organismos vertebrados (Santoriello & Zon, 2012). A nivel estructural, la arquitectura ósea de la CV es bastante similar entre el pez cebra y el humano (Figura 3). La CV del pez cebra está compuesta de vértebras óseas alternadas con discos intervertebrales, tal como en humanos (Revisado en Boswell & Ciruna, 2017). Comparable con las vértebras y la caja torácicas humanas, las vértebras precaudales del pez cebra son también asociadas a los segmentos de las costillas. Los peces además exhiben una cifosis anterior natural similar a los organismos bípedos (Boswell & Ciruna, 2017). Finalmente, tanto en peces como humanos, la notocorda forma el cuerpo central de la vértebra y la médula espinal pasa entre los arcos neurales (Revisado en Boswell & Ciruna, 2017).



**Figura 3. Estructura y organización ósea de la espina dorsal de humano y pez cebra.** (A) Espina dorsal de humano, compuesta por aproximadamente 30 vértebras, distribuidas en 4 regiones desde el eje anterior a posterior: cervical (en rojo; región que se une con el cráneo), torácica (en azul), lumbar (en verde) y sacral (en amarillo; región que se une con la pelvis). (B) Espina dorsal de pez cebra. Similar a la de humano, la espina dorsal del pez cebra adulto contiene entre 29 y 33 vértebras, y se divide en 4 regiones, que desde el eje anterior a posterior son: Weberiana (rojo), precaudal (azul), caudal (verde) y aleta caudal (amarillo). Entre las diferentes regiones, tanto las vértebras de humano (C), como las de pez cebra (D), difieren en número, estructura y tamaño. Adaptado de Boswell et al. 2017.

Las sistemáticas búsquedas genéticas realizadas mediante mutagénesis a gran escala para la identificación de factores y fenotipos que regulan la embriogénesis han permitido identificar numerosos genes reguladores tempranos involucrados en la formación de la CV (Driever et al., 1996; Gray et al., 2021; Haffter et al., 1996). Sin embargo, los mecanismos genético-

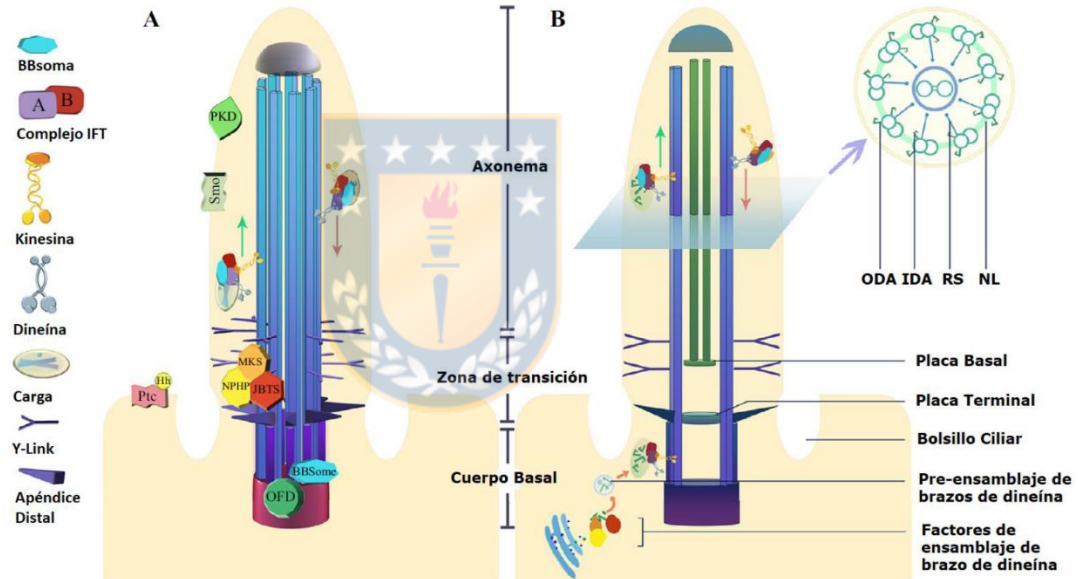


moleculares que contribuyen a la mantención de los ejes de coordenadas durante periodos post-embriónicos, son aún desconocidos. Así, en la última década se han realizado considerables avances en torno a la etiopatogénesis de la EIA gracias al uso del pez cebra, lo que ha abierto un nuevo campo de investigación que involucra este modelo y la función, por ejemplo, de los cilios celulares, entre otros (Muñoz-Montecinos et al., 2022; Xie et al., 2022).

#### **3.4 Biología de los cilios y su relación con la mantención de la curvatura de la CV del pez cebra**

Los cilios son estructuras alargadas, que sobresalen desde la membrana celular al espacio extracelular. Estas estructuras se encuentran en una gran variedad de organismos desde protozoos a vertebrados, y están presentes en casi todos los tipos celulares de mamíferos (Wheatley et al., 1996). Estructuralmente consisten en un esqueleto de microtúbulos llamado axonema, el cual está rodeado por el cuerpo basal, estructura que permite el anclaje del axonema a la membrana plasmática (Figura 4) (Satir & Christensen, 2007). Según la organización de los microtúbulos, los cilios se clasifican en: a) móviles con nueve dobletes de microtúbulos rodeando un par de microtúbulos central (9+2), y brazos de dineína que permiten el movimiento de los cilios catalizado por la hidrólisis de ATP, y b) no móviles o cilios primarios, los cuales carecen del par central de microtúbulos (9+0) y no tiene brazos de dineína (Satir & Christensen, 2007).

Funcionalmente, los cilios móviles generan fuerzas para la movilidad celular y pueden moverse rítmicamente para guiar el flujo de fluidos sobre las células epiteliales, además de generar gradientes de señales físicas o químicas. Por otro lado, los cilios primarios actúan como transductores de ese tipo de señales desde el ambiente pericelular hacia el interior de la célula (Wang & Dynlacht, 2018).



**Figura 4. Estructura de cilios primarios y móviles.** (A) Estructura clásica tipo 9+0 de los cilios primarios. (B) Estructura clásica tipo 9+2 de cilios móviles. Las estructuras de ambos cilios son similares, con la adición de brazos de dineína internos en la zona del axonema de los cilios móviles. Abreviaciones (siglas en inglés): ODA, brazo de dineína externo; IDA, brazo de dineína interno; RS, radios de unión a microtúbulos; NL, unión a lexina. Modificado de Song et al., 2016.

Defectos en la estructura o función de los cilios, tanto primarios como móviles, están involucrados con un amplio espectro de enfermedades humanas,

conocidas como ciliopatías. Al menos se han descrito 35 ciliopatías en humanos, que afectan diversos órganos como el cerebro, riñones, el esqueleto, las vías respiratorias, y ojos (Reiter & Leroux, 2017). Recientemente, se ha visto que la homeostasis ciliar es crucial para el correcto desarrollo de la CV, y defectos en la función de cilios primarios y móviles se han asociado a escoliosis (Revisado en Bearce & Grimes, 2020; Boswell & Ciruna, 2017; Grimes, 2019). Por ejemplo, en cultivos de osteoblastos primarios derivados de cirugía ósea de pacientes con EIA se encontraron cilios primarios anormalmente alargados y con defectos en la transducción de señales mecánicas (Oliazadeh et al., 2017). Por otro lado, mutaciones en la proteína centrosomal POC5, que ha sido asociada a EIA, alteran su propia localización subcelular e inducen una retracción de cilios primarios, afectando la capacidad de interacción con otras proteínas importantes para su función (Hassan et al., 2019). A su vez, alteraciones en cilios móviles también han sido asociadas a la escoliosis. Pacientes con discinesia ciliar primaria, la principal ciliopatía que afecta cilios móviles, muestran una mayor prevalencia de escoliosis comparado con la población general (Knowles et al., 2013).

El uso del sistema modelo pez cebra ha sido crucial para la comprensión del rol de los cilios en la mantención recta del eje corporal. De hecho, esta relación se reveló principalmente gracias al trabajo de Grimes y colaboradores (2016), quienes mostraron que embriones mutantes del gen *protein tyrosine kinase-7 (ptk7)*, con un fenotipo de eje axial curvado tipo EIA, tenían defectos

estructurales en los cilios de las células endoteliales del sistema nervioso central. Al restaurar la expresión de *ptk7* mediante transgénesis, y por lo tanto la función ciliar, la curvatura de estos peces no se desarrollaba (Grimes et al., 2016). Estudios posteriores, han mostrado que embriones mutantes de varios genes ciliares muestran características similares a las observadas en las ciliopatías humanas, incluyendo la curvatura del eje corporal (Revisado en Song et al., 2016). Los cilios móviles son fundamentales para el correcto flujo del líquido cefalorraquídeo (LCR), el cual ha sido reconocido como un fluido corporal relevante en el desarrollo de vertebrados (Lun et al., 2015). El principal componente del LCR es la fibra de Reissner, una estructura extracelular que se extiende desde el diencéfalo a través de todo el canal central de la médula espinal. Esta fibra se forma tras la agregación de la proteína Sco-espondina, una glicoproteína de alto peso molecular y altamente conservada en vertebrados. La Sco-espondina es secretada por el órgano subcomisural, una glándula cerebral ubicada en el límite entre el diencéfalo y el mesencéfalo de todos los vertebrados (Revisado en Muñoz-Montecinos et al., 2022).

Estudios recientes han demostrado que componentes del LCR como la fibra de Reissner o señales adrenérgicas son requeridos para establecer una linealidad temprana del eje corporal durante el desarrollo del pez cebra (Cantaut-Belarif et al., 2018; Troutwine et al., 2020; Zhang et al., 2018). Mutantes del gen que codifica para la proteína Sco-espondina del pez cebra, forman una fibra de Reissner defectuosa y desarrollan un fenotipo curvado (Rose et al., 2020;

Troutwine et al., 2020). Adicionalmente, la curvatura del eje axial respondería al aumento de señales inflamatorias, como TNF- $\alpha$ , en el telencéfalo (Rose et al., 2020). Previamente, ya se había descrito la relación entre la inflamación y el desarrollo de escoliosis en el pez cebra, por lo que esta respuesta inmune ha sido propuesta como una de las causas que promueve la curvatura del eje axial en embriones de este modelo vertebrado (Rose et al., 2020; Van Gennip et al., 2018).

En relación a los cilios primarios, considerando la función sensorial que éstos tienen, su ensamblaje y mantención son claves para coordinar una variedad de vías de señalización que controlan procesos de desarrollo, incluyendo aquellos regulados por la vía Hedgehog, Wnt, y TGF- $\beta$ /BMP (Anvarian et al., 2019). Por ejemplo, Centrosomal protein 290 (Cep290) es una proteína ciliar que se ubica en los centriolos y cuerpos basales de cilios primarios, y que promueve el ensamblaje de estos (Wu et al., 2020). Mutaciones en el gen *cep290* han sido implicadas en 6 ciliopatías humanas, incluyendo el síndrome de Joubert, el cual se caracteriza por malformaciones encefálicas, y problemas motores y cognitivos (Saraiva & Baraitser, 1992). El fenotipo de larvas de pez cebra morfantes o mutantes para *cep290* recapitula al de ciliopatías humanas, incluyendo la curvatura del eje axial, defectos en el desarrollo del cerebelo, quistes renales, y problemas de visión (Baye et al., 2011; Lessieur et al., 2019; Sayer et al., 2006).

En su conjunto, la evidencia indica que la función ciliar, tanto de cilios primarios como móviles, está involucrada en procesos biológicos cruciales para el desarrollo y la correcta formación del eje axial. Vías de señalización como la de Hedgehog, o el flujo del LCR son los primeros procesos relacionados al desarrollo de fenotipos patológicos como el de EIA, abriendo así el paso hacia la comprensión de la etiología de esta condición.

### **3.5 La proteína ciliar Armc9 y la familia de proteína ARMCs**

El uso de tecnologías de secuenciación ha revelado alteraciones génicas que explican el desarrollo de las ciliopatías, identificando varios genes candidatos (Reiter & Leroux, 2017). Uno de ellos es el gen *armc9*, que recientemente fue asociado al desarrollo de síndrome de Joubert, gracias al uso de secuenciación del exoma completo (Van De Weghe et al., 2017). Tal como otras proteínas previamente asociadas a este síndrome, la proteína *Armadillo repeat containig 9* (*Armc9*) se localiza en los cilios, específicamente en el centriolo y en el cuerpo basal de cilios primarios, y se ha visto que puede migrar hacia la región distal en respuesta a la señalización de Hedgehog (Breslow et al., 2018; Van De Weghe et al., 2017). *Armc9* tiene una red de interacción con otras proteínas ciliares. Por ejemplo, *Armc9* interactúa indirectamente con CEP290 y CEP104, y directamente con CSPP1, CCDC66, y TOGARAM1 (*Tog1*). Interesantemente, la mayoría de las proteínas mencionadas están involucradas

en ciliopatías como el síndrome de Joubert (Latour et al., 2020; Valente et al., 2006). Adicionalmente, se ha descrito que los cilios de células deficientes de *Armc9* son más cortos y con menores niveles de tubulina acetilada y poliglutamilada, y que estas células exhiben una menor acumulación de proteínas GLI2 y GLI3, conocidas reguladoras positivas de la vía Hedgehog (Breslow et al., 2018). Lo anterior, sugiere que *Armc9* participa en el tráfico y/o retención de estos reguladores en la región distal del cilio. Variantes de empalme alternativos o *splicing* de *armc9* también han sido asociadas con problemas en el desarrollo de tres hermanos diagnosticados con retardo mental, ptosis, y polidactilia (Kar et al., 2018). Con el objetivo de comprender el rol sistémico de este factor ciliar en un modelo animal vertebrado, Van de Weghe y colaboradores (2017) desarrollaron un crispante de *armc9* en el pez cebra, cuyo fenotipo fue consistente con el obtenido para las ciliopatías, mostrando características como distrofia retinal, un número disminuido de cilios en células de la superficie ventricular, y la curvatura del eje corporal tipo EIA (Van De Weghe et al., 2017). Estos resultados confirman el rol de ARMC9 en la función ciliar de vertebrados. Sin embargo, a la fecha no se describe aún los procesos morfogénicos afectados y que determinan la aparición del fenotipo mutante. Por otro lado, las observaciones realizadas en el mutante de pez cebra fueron hechas en individuos adultos, dejando inexplorados aspectos fundamentales de la etiología de la EIA. Por lo tanto, contar con el mutante *armc9* del pez cebra representa una oportunidad única para comprender los procesos biológicos afectados en el

desarrollo de la curvatura de la CV. Lo anterior, no sólo a nivel fisiológico, sino también a nivel molecular, permitiendo así explorar las posibles redes de interacción de Armc9 con otras proteínas en la señalización ciliar.

La proteína Armc9 es parte la familia de proteínas *Armadillo repeat-containing protein* (ARMC, por sus siglas en inglés) (Huang et al., 2021). El primer miembro de esta familia fue descrito en *Drosophila melanogaster*, esta fue una proteína llamada *armadillo* y cuyo ortólogo corresponde a la proteína de mamíferos  $\beta$ -catenina, codificada por el gen *CTNNB1* (Riggelman et al., 1989). Estas proteínas tienen como característica común la presencia un dominio repetido de aproximadamente 42 aminoácidos, el cual se pliega tridimensionalmente de forma conservada en tres hélices alfa (Peifer, 1994). A pesar de no compartir una alta identidad de secuencia entre ellas, las proteínas de la familia ARMC tienen un alto grado de identidad estructural (Gul et al., 2017). En general, repeticiones en tándem de estas secuencias repetidas se pliegan juntas como súper hélices, formando una plataforma de unión con diversas proteínas, razón por la cual las proteínas de la familia ARMC tienen más de una función celular independiente (Coates, 2003). Hasta ahora, se han descrito roles para los miembros de la familia ARMC en procesos celulares como adhesión celular, transducción de señales, regulación de la función mitocondrial, oncogénesis, regulación del citoesqueleto, y transporte intracelular (Huang et al., 2021; Tewari et al., 2010).



Alrededor de 70 genes humanos codifican para proteínas que contienen dominios repetidos del tipo *armadillo* (Gul et al., 2017). Dentro de ellos, los más caracterizados son los del tipo Cateninas,  $\alpha$ -Importinas y Forminas, mientras que la función génica del resto de los factores ha sido poco descrita (Gul et al., 2017). Estudios de pérdida de función de proteínas con dominio *armadillo repeat* en diversas líneas celulares han relacionado a estas proteínas con el ciclo celular (ej., ARMC5) (Cavalcante et al., 2018), con la movilidad y distribución de mitocondrias (ej., ARMC1) (Wagner et al., 2019), en adhesiones célula-célula y transición epitelio-mesénquima en células tumorales (ej., ARMC8) (Gul et al., 2019; Liang et al., 2017), y en la progresión tumoral (ej., ARMC12) (Li et al., 2018). Sin embargo, modelos animales de pérdida de función de estas proteínas no han sido generados, dejando muchas interrogantes abiertas acerca del rol de esta familia de proteínas a nivel de la embriogénesis y desarrollo animal. Comprender las relaciones evolutivas de los miembros de esta familia de proteínas puede ser de gran ayuda en la comprensión de sus funciones, además de dar luces acerca de la función de aquellos miembros individuales que no han sido caracterizados.

En esta tesis, y utilizando herramientas genéticas, de biología molecular y bioinformáticas, se realizó una caracterización fenotípica del mutante *armc9* del pez cebra, el cual presenta una severa escoliosis. Nuestras observaciones indican que el defecto de CV curvada no se debe a alteraciones de su estructura ósea, ni a la composición del LCR. Por otro lado, consecuencias de una

respuesta inflamatoria, tampoco serían causantes del fenotipo mutante. A nivel molecular, la interacción de la proteína Armc9 del pez cebra con Togaram1 dependería del dominio “ARM-type fold”. Este dominio se encuentra interrumpido en la proteína mutante, lo que no generaría una correcta interacción entre ambas proteínas. Finalmente, análisis filogenético de 148 proteínas de la familia ARMC en diversas especies de animales demostró la formación de 12 grupos filogenéticos que corresponden al total de los miembros descritos para esta familia. En conjunto, nuestros resultados descartan la ocurrencia de defectos en aquellos procesos que comúnmente se encuentran alterados en otros modelos de escoliosis, lo que permitirá generar nueva información respecto a la etiología de esta patología. Además, aportan valiosa información funcional en relación con los aminoácidos involucrados en la interacción de Armc9 con Togaram1. Estos resultados, combinados con las relaciones filogenéticas de los miembros de la familia ARMC, permiten inferir el origen evolutivo y la función de los diferentes miembros de esta familia en animales.

## 4 Hipótesis

La función de los cilios es crucial para diversos procesos biológicos, entre ellos el correcto desarrollo de la columna vertebral. Se ha demostrado que pérdidas de función de proteínas tanto de estructura como de función ciliar, conlleva a problemas en el flujo del LCR, lo que conduce al desarrollo de una curvatura anormal en la espina dorsal. La pérdida de función de la proteína ciliar *Armc9* involucra anomalías clásicas observadas en las ciliopatías, y conlleva al desarrollo de escoliosis. Basado en estos antecedentes, se plantea la siguiente hipótesis:

**“*Armc9* y la red génica asociada a su función son críticas para el establecimiento y mantenimiento del eje axial de la espina dorsal durante periodos post-embrionarios del pez cebra”**

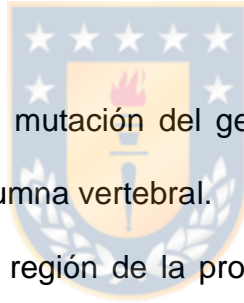
## 5 Objetivos

### 5.1 Objetivo General

Determinar el rol de la proteína Armc9 en el establecimiento y mantención del eje axial en periodos post-embrionarios del pez cebra

### 5.2 Objetivos específicos

1. Determinar cómo la mutación del gen *armc9* del pez cebra impacta la morfología de la columna vertebral.
2. Dilucidar *in silico* la región de la proteína Armc9 que interactúa con su blanco molecular Tog1
3. Analizar la historia evolutiva de las proteínas de la familia ARMC de vertebrados e invertebrados



## 6 Materiales y Métodos

### 6.1 Mantención y manejo de líneas de pez cebra silvestres, mutante *armac9* y transgénica *mpeg1:dendra2*

Animales adultos de pez cebra de la línea silvestre AB, mutante *armac9* y transgénica *mpeg1:dendra2* fueron mantenidos a 28°C en agua aireada y desionizada preparada con 60 mg/L de Instant Ocean pH 7.0, y sometidos a un fotoperiodo de 14 horas de luz y 10 horas de oscuridad. La obtención de embriones silvestres, heterocigotos y homocigotos recesivos *armac9*, se realizó a partir de cruces naturales entre individuos adultos y se crecieron en medio E3 1X (stock 10X: 5 mM NaCl, 0,17 mM KCl, 0,33 mM CaCl<sub>2</sub>, 0,33 mM MgSO<sub>4</sub>, pH 7.0), suplementado con azul de metileno al 0.01% p/v.

Todos los experimentos que involucraron manejo de animales se hicieron acorde a la normativa indicada por el Comité de Bioética y Bioseguridad de la Universidad de Concepción y el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de la Universidad de Chile.

### 6.2 Genotipificación de individuos adultos y embriones *armac9*

Para identificar el genotipo de individuos adultos y embriones heterocigotos y mutantes, previamente anestesiados en solución de triclaína (MS-222, Sigma-Aldrich) 0.02 y 0.002 mg/ml, respectivamente, se utilizó el sistema

KASPar genotyping (KBiosciences). En el caso de los embriones, estos fueron obtenidos a partir del cruce de parentales heterocigotos. Para la extracción de ADN genómico (ADNg), se realizó una transección de la aleta caudal de individuos adultos y/o larvas de 3 días post-fertilización (dpf), la cual fue procesada mediante el sistema HotSHOT (Meeker et al., 2007). Una vez extraído el ADNg, se realizó una amplificación por PCR basado en el sistema KASPar, la cual utiliza partidores fluorescentes diseñados específicamente para el alelo silvestre y para el mutante (Cuppen, 2007).

### **6.3 Inmunodetección de Sco-espondina en el órgano subcomisural y la fibra de Reissner**



Para la realización de inmuntinciones de Sco-espondina, embriones silvestres y mutantes de 3 y 6 dpf fueron fijados usando una solución de Carnoy (etanol, ácido acético y cloroformo en una relación de 6:3:1) durante 3 horas (hrs) a temperatura ambiente o durante la noche a 4°C. Para retirar el exceso de pigmentos, los embriones fueron expuestos a una solución de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3% - KOH 0.5% durante 30 – 60 minutos (min) a temperatura ambiente. Posteriormente, los embriones fueron dejados durante la noche en solución de bloqueo (BSA 2% en PBS 1X), y fueron incubados con el anticuerpo primario policlonal anti-Sco-espondina (Afru-11) durante la noche a 4°C, dilución de 1:250. Luego, los embriones fueron incubados en el anticuerpo secundario Alexa-488, dilución de 1:500. El resultado de la inmunodetección se observó mediante microscopía

confocal con el equipo Zeiss LSM 710 y LSM 880, utilizando los objetivos Plan-Apochromat 10×/0.45, Plan-Apochromat 20×/0.8 y el de inmersión en agua Plan-Apochromat 40×/1.2. El cálculo del área del OSC se realizó mediante la herramienta *ROI Manager* del software ImageJ (Schindelin et al., 2012), tras definir manualmente el umbral de intensidad de fluorescencia que selecciona el área del OSC y elimina el ruido adyacente.

#### **6.4 Tinción del esqueleto con rojo de alizarina**

Animales juveniles silvestres y *armac9<sup>-/-</sup>* de 5 a 7 semanas post-fertilización (spf) se sacrificaron por sobredosis del anestésico Tricaina 0.02 mg/ml y fueron fijados en formaldehído 4% durante la noche a 4°C, usando PBS 1X como solvente, para luego ser almacenados a 4°C en etanol 70%. Para la despigmentación de los animales, se preparó una solución compuesta por 15 ml de KOH 1% con 4 gotas de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3%. Los ejemplares juveniles fueron sometidos a un gradiente de concentración creciente en una escala de 25%, 50%, 75% y 100% de solución de despigmentación disuelta en etanol 70%, y se guardaron a temperatura ambiente durante la noche. La tinción del esqueleto de los animales se realizó agregando 4 gotas de rojo de alizarina al 0,5% a 20 ml de KOH 1%, a temperatura ambiente durante la noche. Tras comprobar que las vértebras estaban teñidas, se retiraron las escamas mecánicamente y se almacenaron los

individuos en glicerol, en un gradiente creciente de 25%, 50% 75% y 100% disuelto en KOH 1%.

### **6.5 Evaluación de la inflamación en la región curvada del eje axial en embriones transgénicos *armc9/mpeg1:dendra2***

Para la generación de una línea estable de animales transgénicos mutantes *armc9* peces adultos de la línea mutante *armc9* se cruzaron con individuos transgénicos de la línea Tg(*mpeg1:dendra2*), los cuales expresan la proteína fluorescente *dendra2* específicamente en células macrófagas del pez cebra (Harvie et al., 2013). De esta forma, se logró obtener peces que portan la mutación en el gen *armc9* en un *background* genético reportero de células del sistema inmune. Una vez establecida una línea de adultos Tg(*armc9/mpeg1:dendra2*) heterocigotos para el gen *armc9*, se obtuvieron embriones a través de cruces naturales y fueron crecidos en condiciones normales hasta observar la aparición de la curvatura del eje corporal. Para el registro de imágenes las larvas fueron anestesiadas con Tricaína al 0,01 mg/ml, y montadas en agarosa de bajo punto de fusión a una concentración del 1%, y mediante microscopía de fluorescencia en un microscopio Olympus IX81 a un aumento de 10x se cuantificó la intensidad de fluorescencia del área inmediatamente anterior al comienzo de la aleta caudal, en una región denominada región lateral determinada de alrededor de 900  $\mu\text{m}^2$ , utilizando la herramienta *ROI Manager* del software ImageJ.



## 6.6 Análisis filogenético de los miembros de la familia ARMC en animales

Para determinar las relaciones filogenéticas de las proteínas que conforman la familia ARMC en animales, se descargaron las secuencias de aminoácidos de los miembros de la familia ARMC en pez cebra (*Danio rerio*), ratón (*Mus musculus*) y humano (*Homo sapiens*) desde la base de datos de Uniprot (Consortium, 2019). Para aquellas proteínas con más de una isoforma, se descargó la secuencia canónica; es decir, aquella que fuese la más larga (Tabla 1). Las proteínas ARMC de pez cebra, humano y ratón se analizaron usando el servidor InterProScan (Jones et al., 2014), encontrándose en todas ellas el elemento estructural “ARM-type fold” (Dominio InterProScan: IPR016024). Al analizar con este servidor el conjunto de proteínas de las especies de animales que se muestran en la Tabla 2, se usó como criterio excluyente la presencia de este dominio InterPro para determinar que proteínas serían usadas en los análisis filogenéticos posteriores.

**Tabla 1. Genes de la familia *armc* de pez cebra, humano y ratón, y su respectivo código UniProt.**

Nombre del Gen	Código UniProt		
	Pez cebra	Humano	Ratón
<i>armc1</i>	Q5PR58	Q9NVT9	Q9D7A8
<i>armc2</i>	F1QBI9	Q8NEN0	Q3URY6
<i>armc3</i>	E7F083	Q5W041	A2AU72
<i>armc4</i>	E7FB07	Q5T2S8	B2RY50
<i>armc5</i>	U3JA44	Q96C12	Q5EBP3
<i>armc6</i>	A0A0G2K	Q6NXE6	Q8BNU0
<i>armc7</i>	F1R1C2	Q9H6L4	Q3UJZ3
<i>armc8</i>	Q05AL1	Q8IUR7	Q9DBR3
<i>armc9</i>	E7F187	Q7Z3E5	Q9D2I5
<i>armc10</i>	F6NIY4	Q8N2F6	Q9D0L7
<i>armc12</i>	-	Q5T9G4	Q80X86
<i>armc1-like</i>	F1R385	-	-

**Tabla 2. Lista de especies utilizadas para el análisis filogenético de la familia de proteínas ARMC.** Las secuencias de proteínas de estas especies fueron descargadas desde la base de datos Ensembl (<https://www.ensembl.org/index.html>).

<b>Especie</b>	<b>Clase</b>
<i>Homo sapiens</i>	Mammalia
<i>Mus musculus</i>	Mammalia
<i>Gallus gallus</i>	Aves
<i>Anolis carolinensis</i>	Reptilia
<i>Xenopus tropicalis</i>	Anfibia
<i>Danio rerio</i>	Osteíctios
<i>Crassostrea gigas</i>	Mollusca
<i>Drosophila melanogaster</i>	Arthropoda
<i>Caenorhabditis elegans</i>	Nematoda
<i>Ciona intestinalis</i>	Urochordata
<i>Amphimedon queenslandica</i>	Porífera
<i>Adineta vaga</i>	Rotífera

Las secuencias de proteínas de cada especie (Tabla 2) fueron compilados en un solo archivo “fasta” con el objetivo de buscar todas las proteínas que tuvieran en su secuencia la región “ARM-type fold”. Se utilizó el programa BLASTP (Camacho et al., 2009), para la búsqueda de proteínas homólogas a los miembros de la familia ARMC; y usando el servidor InterProScan sólo se seleccionaron aquellas secuencias que poseían el dominio IPR016024. Posteriormente, las proteínas homólogas a ARMC y que poseían el dominio IPR016024 fueron alineadas con el programa MAFFT usando parámetros por

defecto (Katoh & Standley, 2013). A través del programa trimAl (Capella-Gutiérrez et al., 2009) se seleccionaron las regiones con señal filogenéticamente informativa en el alineamiento múltiple, y con el programa ProtTest3 (Darriba et al., 2011) se determinó el mejor modelo evolutivo para realizar los análisis filogenéticos. Finalmente, la reconstrucción filogenética se realizó mediante el método de Máxima Verosimilitud, utilizando el programa RAxML (Stamatakis, 2014), usando el modelo de sustitución LG+G y un número de *bootstrap* de 500. El árbol filogenético fue visualizado con el programa iTOL (Letunic & Bork, 2021).

### **6.7 Modelamiento de la estructura tridimensional de la proteína Armc9 de pez cebra.**

Para la generación de un modelo molecular de la proteína Armc9 del pez cebra, se utilizó la secuencia de aminoácidos (código: E7F187) desde la base de datos UniProt (Consortium, 2019). Posteriormente, se modeló su estructura tridimensional mediante el uso de los servidores trRosetta (Yang et al., 2020) e I-TASSER (Yang & Zhang, 2015). Una vez descargados los modelos generados por estos servidores, se evaluaron los resultados obtenidos mediante QMEANDisCo (Studer et al., 2020) y ProSA (Wiederstein & Sippl, 2007), escogiendo para futuros análisis el modelo con mejor puntaje o *score*. Luego se usó el servidor trRosetta para modelar la estructura tridimensional de la proteína Tog1 del pez cebra (NCBI: XP\_021322924.1) y, además, para generar una predicción de Armc9 mutante. Los modelos generados fueron refinados usando

el servidor locPREFMD (Feig, 2016). La calidad de estos modelos fue nuevamente evaluada con QMEANDisCo.

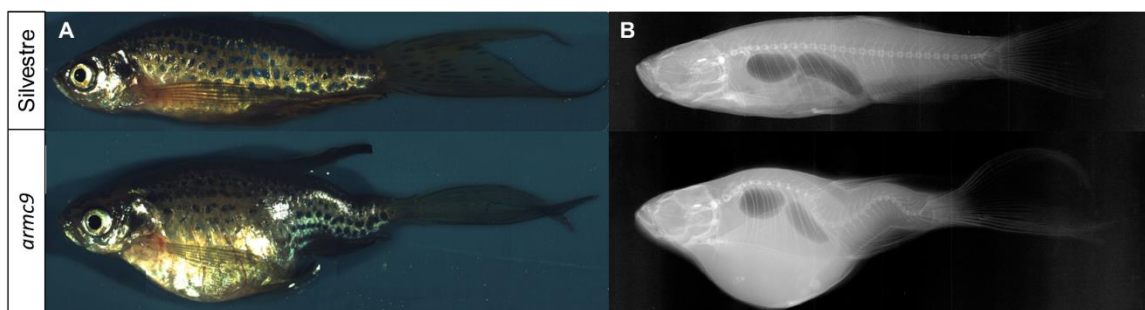
### **6.8 Análisis de interacción o *docking* proteína-proteína entre Armc9 y Togaram1 del pez cebra**

Para evaluar la posible formación del complejo proteico Armc9-Tog1, se utilizaron las estructuras terciarias obtenidas por el servidor trRosetta y refinados con el servidor locPREFMD, referidos en la sección 6.7. El reconocimiento de la región de interacción entre la proteína Armc9 y Tog1 de pez cebra fue determinado utilizando los servidores ClusPro 2.0 (Kozakov et al., 2017) y ZDOCK (3.0.2f + IRaPPA re-ranking) (Pierce et al., 2014). Por otra parte, el *docking* rígido se realizó con parámetros estándar, y de los modelos obtenidos se seleccionó aquel con menor energía de formación del complejo, para posteriormente evaluar la energía libre de interacción entre los aminoácidos involucrados utilizando el servidor HawkDock (Weng et al., 2019). La afinidad de unión y la identificación de la interface biológica se llevó a cabo mediante el servidor PRODIGY (Xue et al., 2016). La visualización del modelo de *docking* se realizó con PyMOL v2.3.2 (DeLano, 2002).

## 7 Resultados

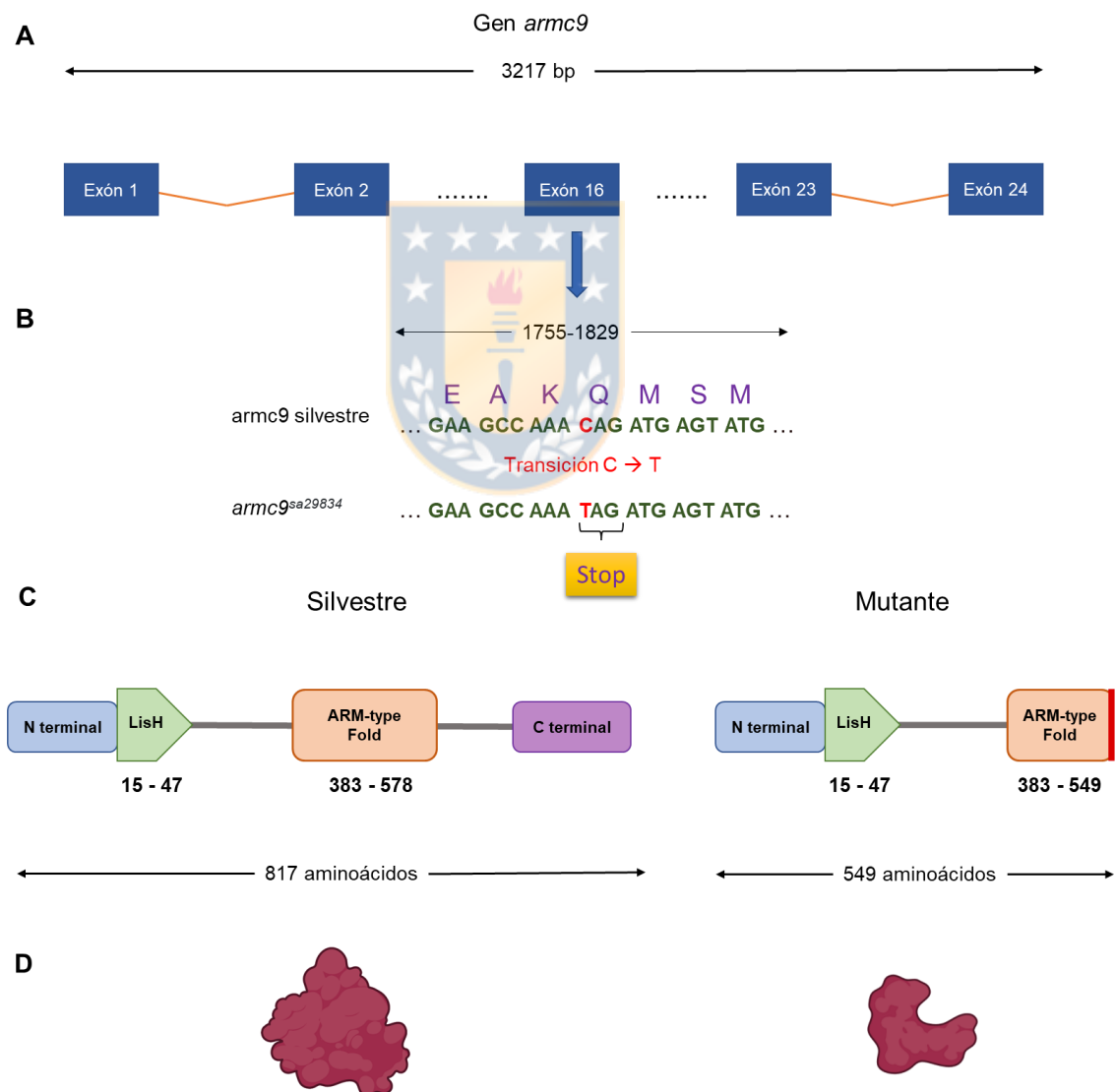
### 7.1 Naturaleza molecular de la mutación en el gen *armc9* en pez cebra

El mutante *armc9*<sup>sa29834</sup> fue generado y aislado por el consorcio del proyecto de mutagénesis de genoma del pez cebra mediado por TILLING y realizado en el *Sanger Institute* (<https://zfin.org/ZDB-ALT-161003-13911>) (Kettleborough et al., 2013). Posteriormente, el fenotipo mutante fue identificado en una búsqueda de genes con función post-embriónica (Fuentes et al., datos no publicados). El fenotipo mutante *armc9*<sup>sa29834</sup> corresponde a una curvatura tipo escoliosis en todos los individuos mutantes adultos analizados (Figura 5A). Análisis del esqueleto de los individuos mutantes mediante rayos X confirmó la anomalía de la CV (Figura 5B).



**Figura 5. Fenotipo del mutante *armc9*<sup>sa29834</sup>.** (A) Vista lateral bajo microscopio de disección de un individuo adulto silvestre y mutante en *armc9*, el cual muestra una severa curvatura corporal. (B) Imágenes de rayos X de los individuos mostrados en (A), que revela que la curvatura del eje corporal se debe a una deformación de la CV de tipo escoliosis.

La identificación de la mutación en el gen *armc9* se realizó mediante la secuenciación del exoma completo de los espermatozoides de machos mutagenizados (Kettleborough et al., 2013). Esta corresponde a una mutación de tipo puntual, la cual genera un codón de término prematuro en la posición 549 de la secuencia de aminoácidos silvestre (Figura 6).



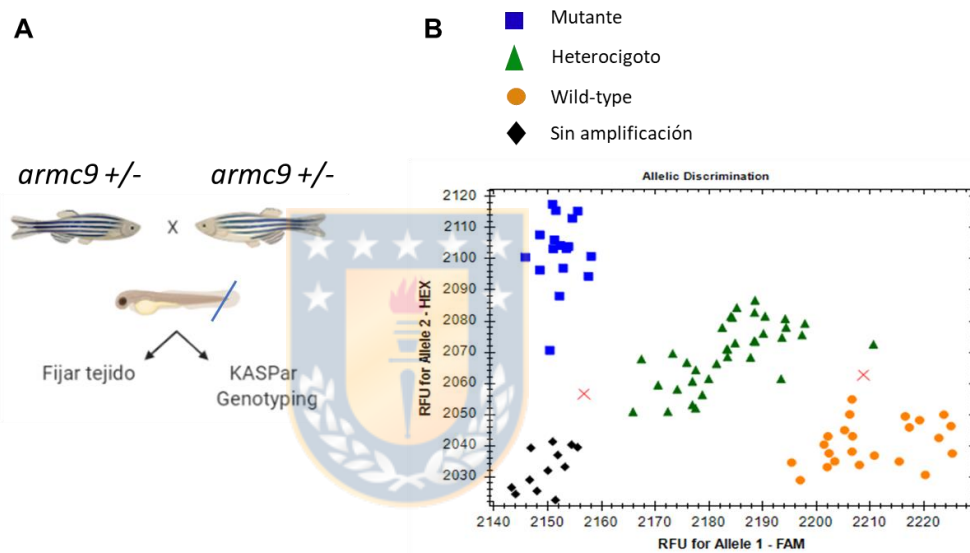
**Figura 6. Impacto de la mutación puntual en el gen *armc9*.** (A) Estructura fina del gen *armc9* del pez cebra, el cual posee una longitud de 3217 pares de bases (bp) y 24 exones codificantes. (B) Una mutación puntual, cambio de una Citocina por una Timina, en el exón 16 fue identificada en el mutante *armc9*<sup>sa29834</sup>. Esta transición genera un codón de término prematuro. (C) Representación esquemática del efecto de la mutación a nivel de proteína silvestre. Esta está constituida por 817 aminoácidos y el codón de término prematuro generado por la mutación, trunca la proteína en el aminoácido 549. Lo anterior genera una pérdida del dominio “ARM-type fold” y del resto de la porción C-terminal. (D) Representación esquemática de la estructura 3D de la proteína *Armc9* silvestre y mutante. En esta última se representa el impacto de la mutación, traducido en la pérdida de la región C-terminal y cambio en el tamaño y forma de la proteína.

## 7.2 La curvatura axial de la CV se manifiesta durante períodos larvales en el mutante *armc9*

Como se mencionó más arriba, el fenotipo mutante fue identificado en individuos adultos; sin embargo, se desconoce en qué momento del desarrollo este fenotipo es originado. Para determinar el efecto temprano de la mutación, se realizó un análisis fenotípico de embriones a partir de los 3 dpf. Los resultados indican que el fenotipo curvado que muestran los individuos mutantes adultos es detectado aproximadamente tras 5-6 spf en una población de animales proveniente de un cruce entre padres heterocigotos. Sin embargo, para confirmar que el fenotipo mutante observado corresponde al asociado a la mutación *sa29834*, era necesario analizar su genotipo tempranamente. Para genotipificar los individuos fecundados tras el cruce de adultos *armc9* heterocigotos, se utilizó el sistema KASPar (Biosearch Technologies), el cual se basa en una reacción de PCR alelo específico competitivo. Este sistema permite la identificación del genotipo del embrión mediante la lectura de emisión de fluorescencia que es



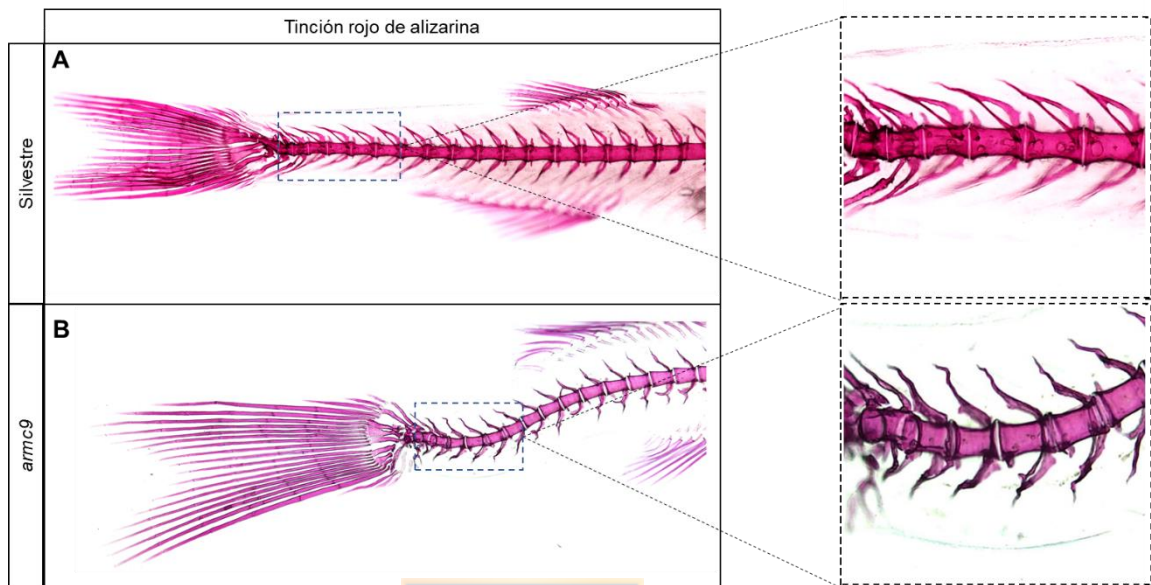
específica para el alelo mutante y el silvestre (Cuppen, 2007). Se estandarizó el sistema KASPar en embriones de 3 dpf, y se logró la identificación clara de los tres genotipos esperados tras el cruce de adultos heterocigotos (Figura 7).



**Figura 7. Genotipificación de mutantes *armc9*.** (A) Estrategia utilizada para la obtención de embriones mutantes. Adultos portadores de la mutación en heterocigosis fueron cruzados, y a los embriones obtenidos se les realizó una transección de la aleta caudal para realizar el genotipado. (B) Gráfico tipo cluster obtenido tras la genotipificación con el sistema KASPar. Se muestra el resultado entregado por el software tras la reacción de PCR, el cual indica en cuadrados azules los individuos mutantes, ya que amplificaron exclusivamente el alelo portador de la mutación. En verde se indican los individuos heterocigotos, los cuales amplifican tanto el alelo mutante como el silvestre. Los círculos amarillos muestran a los individuos silvestres, portadores exclusivamente de ese alelo. Finalmente, en negro se indican los individuos en los que no ocurrió reacción y que por lo tanto no pueden ser clasificados.

Una vez estandarizada la técnica de genotipificación, los individuos mutantes se dejaron crecer hasta observar cambios en la morfología axial.

Nuevamente, entre las 5-6 spf se observaron curvaturas tipo escoliosis en los individuos mutantes, confirmando así lo encontrado previamente. Una característica central de la EIA es que la curvatura no se produce por una malformación de las vértebras, como ocurre en la congénita (Arlet et al., 2003). Para examinar el estado morfológico de las vértebras de individuos mutantes juveniles, aquellos que presentaron una curvatura axial a los 5-6 spf fueron fijados y teñidos con rojo de alizarina. Los resultados mostraron que la estructura de las vértebras de los individuos silvestres presenta las características asociadas a la condición normal, como la presencia de un arco neural dorsal, un arco hemal ventral y un centro de vértebra que tiene la forma bicónica que se asemeja a la de un reloj de arena (Figura 8). Por otro lado, pese a que los individuos *armc9* mostraron una clara curvatura de la CV, estos mantuvieron las características propias de las vértebras de los individuos silvestres, tanto en la región curvada como no curvada de la CV (Figura 8). Tanto los arcos neurales como hemales están presentes y carecen de alteraciones estructurales, al igual que el centro de la vértebra. Tampoco hay presencia de fusión de vértebras, o cambio en el número de éstas, ya que los mutantes registraron entre 29 y 32 vértebras, número normal para el pez cebra (Morin-Kensicki & Eisen, 1997). Este resultado indica que el fenotipo mutante presenta las características de una escoliosis del tipo idiopática, la cual no está asociada a alteraciones que afecten la estructura, ni el número de vértebras.

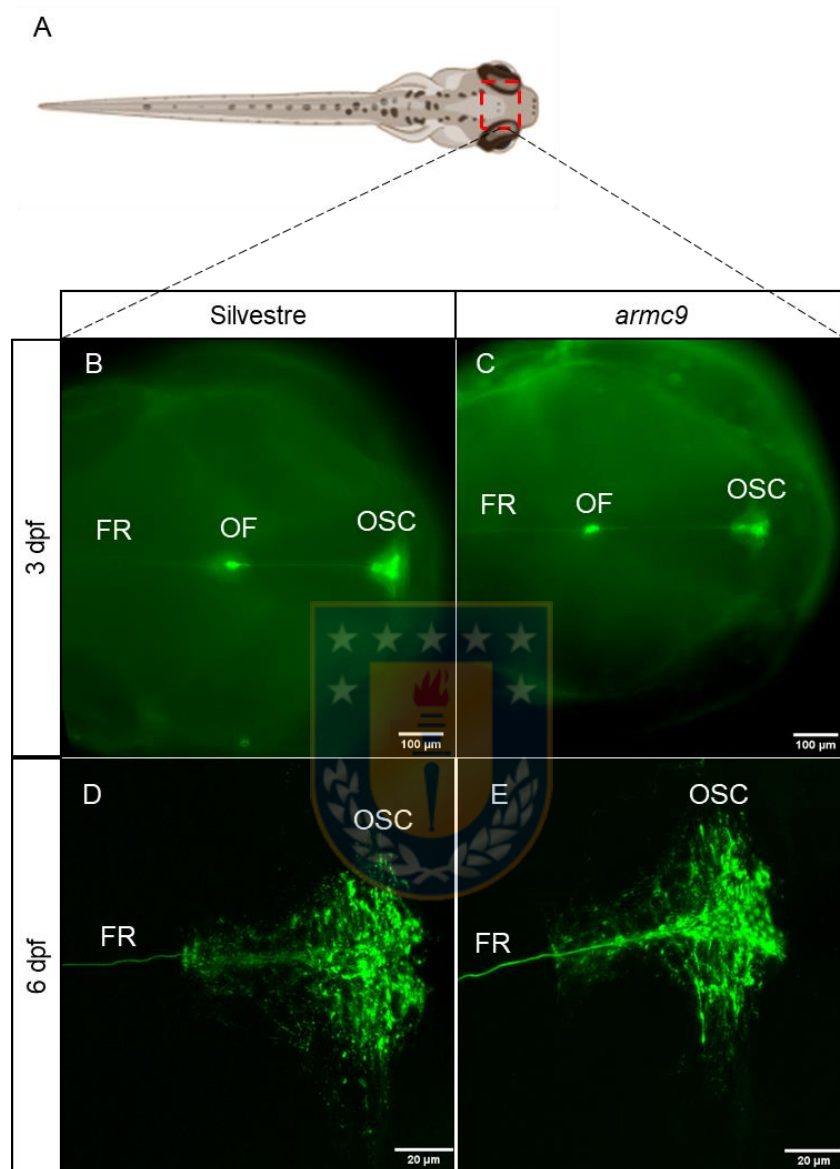


**Figura 8. Estructura y organización del esqueleto de individuos silvestres y mutantes *armc9* del pez cebra a las 5 spf. (A)** Esqueleto de un pez juvenil silvestre, con vista aumentada de la región caudal de la CV (N = 5). **(B)** Esqueleto curvado de un individuo mutante *armc9*. En la vista aumentada de la región alterada del pez, no se observan defectos estructurales a nivel de las vértebras (N = 4).

### 7.3 El OSC y la FR aparecen inalterados en larvas mutantes *armc9* de pez cebra

Estudios recientes realizados en mutantes del pez cebra que desarrollan una curvatura del eje axial tipo escoliosis, como *ptk7*, *scospondin* o *dmh4*, han identificado defectos ya sea en la dinámica del flujo de LCR, o en la estructura de uno de sus principales componentes, la fibra de Reissner (Cantaut-Belarif et al., 2018; Grimes et al., 2016; Rose et al., 2020). Esta fibra se forma producto de la agregación de la proteína SCO-espondina, la cual es secretada por el OSC.

Con el objetivo de explorar la morfología del órgano subcomisural y de la fibra de Reissner en el mutante *armac9*, se realizó la inmunodetección de la proteína SCO-espondina en individuos de 6 dpf. En el individuo silvestre de 6 dpf, la forma del OSC se asemeja a la de un embudo, el cual en su región posterior da origen a una hebra única que corresponde a la fibra de Reissner. El área del órgano tiene un valor de  $2.562 \pm 161,448$  [ $\mu\text{m}^2$ ] (media  $\pm$  desviación estándar, N = 3). Por otro lado, en el mutante *armac9* de 6 dpf no se observaron defectos evidentes tanto en el órgano como en la fibra de Reissner a lo largo del eje axial del individuo analizado. Así, la morfología tipo embudo del OSC se mantendría con un área de  $2.462$  [ $\mu\text{m}^2$ ] (N = 1), sugiriendo una condición similar al individuo silvestre. Por otro lado, el mutante daría origen a una sola hebra que constituye la fibra de Reissner, al igual que la formada en individuos silvestres (Figura 9).

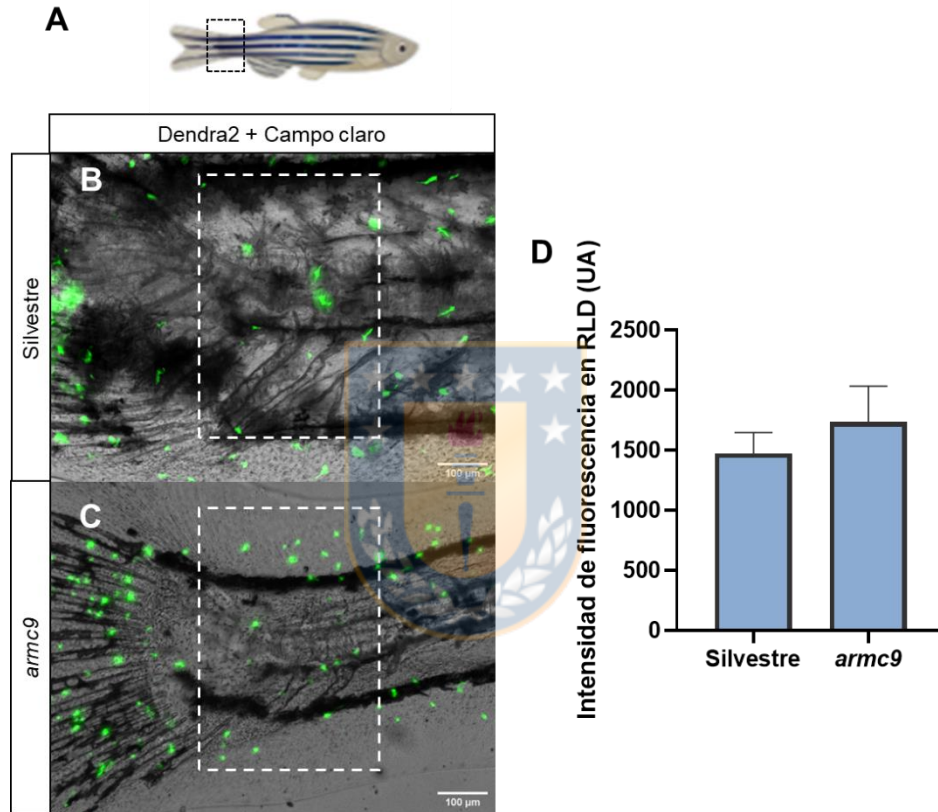


**Figura 9. Morfología del órgano subcomisural de embriones silvestres y *armc9*.** (A) Esquema de larva de pez cebra. Se destaca en el rectángulo rojo la zona y la vista (dorsal) desde donde se tomaron las imágenes. La inmunodetección fluorescente de la proteína SCO-espondina revela la morfología del OSC, el órgano flexural (OF) y la fibra de Reissner (FR) en embriones de 3 dpf silvestres (B) y mutantes en *armc9* (C). Magnificación del OSC de larvas de 6 dpf silvestre (D) y mutante en *armc9* (E). No se observan diferencias evidentes en la morfología del órgano entre los individuos silvestres (N = 3) y mutantes (N=1).

#### 7.4 Ausencia de correlación entre la respuesta inflamatoria y la curvatura axial en larvas mutantes *armc9*

Tras años de carencia de una hipótesis respecto de los posibles procesos fisiológicos alterados en el desarrollo de la EIA, recientemente se ha sugerido que la inflamación podría ser uno de estos. Analizando el mutante *ptk7*, Van Gennip y colaboradores (2018) demostraron que la activación focal de señales proinflamatorias dentro de la espina dorsal induce su curvatura. Además, observaron presencia de macrófagos en la zona curvada (Van Gennip et al., 2018). Con el objetivo de evaluar si un proceso inflamatorio está involucrado en la curvatura de los mutantes *armc9*, se observó la presencia de macrófagos en la región de la curvatura de peces juveniles *armc9* de 6 spf usando la línea transgénica reportera de macrófagos  $Tg(\textit{armc9/mpeg1:dendra2})$ . Primero, el  $Tg(\textit{mpeg1:dendra2})$  se introdujo dentro del *background* mutante *armc9* para la línea transgénica estable  $Tg(\textit{armc9/mpeg1:dendra2})$ . Segundo, la presencia de macrófagos se evaluó tras la aparición de la curvatura en individuos juveniles (Figura 10A). En el silvestre, la región justo anterior al comienzo de la aleta caudal se mantuvo recta, y al observar la distribución de macrófagos en una región lateral determinada (RLD) estos se mostraron distribuidos de forma aleatoria y uniforme, sin observar agrupaciones de estas células en la región (Figura 10B). El mismo análisis realizado en el mutante muestra que la distribución de los macrófagos siguió un patrón similar al observado en el silvestre, en el que no hubo una aglomeración de células en la región curvada (Figura 10C). Al

cuantificar la intensidad de fluorescencia en el área curvada de los individuos *armac9* no se observó un incremento de este parámetro comparado con el observado en los individuos con el gen *armac9* silvestre (Figura 10D).





**Figura 10. Análisis de la distribución de macrófagos en la región curvada de peces cebras *armc9* juveniles de 6 spf. (A)** Esquema de un individuo juvenil de 6 spf. El cuadro negro muestra la región anterior a la aleta caudal en la que se analizó la distribución de macrófagos. **(B)** Imagen compuesta de microscopía de fluorescencia más campo claro de la región anterior a la aleta caudal de un pez cebra juvenil *armc9/mpeg1:dendra2* silvestre transgénico de la línea *mpeg1:dendra2*, en el cual dicha región del eje axial se observa recta. Los macrófagos se muestran en color verde. **(C)** Imagen compuesta de microscopía de fluorescencia más campo claro de un individuo *armc9/mpeg1:dendra2* mutante en la que se observa una leve curvatura del eje axial. En verde se muestra la presencia de macrófagos en la región curvada. **(D)** Cuantificación de la intensidad de fluorescencia RLD demarcada por el recuadro blanco en (B) y (C). Se muestra el valor medio más la desviación estándar, indicando que no hay diferencias entre los animales silvestres y los mutantes (N = 3 individuos por grupo).

## 7.5 Historia evolutiva de la familia de proteínas ARMC en animales

Armc9 es parte de la familia de proteínas que se caracteriza por tener un dominio *Armadillo repeat containing protein* (ARMC). Se realizó una búsqueda de estas proteínas en animales modelo como el pez cebra, ratón y humano, encontrándose que cada animal modelo tiene 11 de estas proteínas (Tabla 1). Las proteínas identificadas fueron analizadas con InterProScan para identificar elementos estructurales comunes entre ellas. De esta manera, se encontraron dos dominios funcionales: el *Armadillo repeat-containing domain* (Arm-rpt) en Armc10, y el dominio LisH en Armc9. Además, se encontraron elementos repetidos (clasificados como Armadillo, Arm o Arm-repeat por las bases de datos de InterPro, Pfam y Prosite, respectivamente) en todas las proteínas, excepto Armc1, Armc9, y Armc10. Todas las proteínas ARMC tienen como elemento común la presencia de un dominio tipo *Armadillo*, clasificado según la misma base de datos InterProScan como “ARM-type fold” (IPR016024) (Tabla 3). Por lo



tanto, la presencia de este dominio se convirtió en criterio necesario para considerar otras proteínas homólogas como parte de la familia ARMC. Con el objetivo de conocer las relaciones filogenéticas entre los diferentes miembros de la familia de proteínas ARMC, se analizaron 12 especies que abarcan los grandes grupos taxonómicos de los animales (Tabla 2). Para ello y utilizando las proteínas ARMC de humano, ratón y pez cebra, se realizaron búsquedas de similitud de secuencias mediante el algoritmo BLASTp en las secuencias codificantes (proteínas) de las especies que se muestran en la Tabla 2. Un total de 148 proteínas homólogas fueron identificadas en las 12 especies estudiadas (Tabla 4). Todas las proteínas poseen el dominio “ARM-type fold” que es característico de la familia ARMC.



**Tabla 3. Análisis de dominios funcionales presentes en los miembros de la familia ARMC del pez cebra.** Se encontraron diversos elementos estructurales entre las distintas proteínas ARMC, siendo el dominio ARM-like y el ARM-type fold los únicos elementos comunes en todas las proteínas ARMC de pez cebra.

Proteína/Dominio	Domain		Homologous Superfamily		Repeat		
	Interpro		Interpro		Interpro	pfam	Prosite
	Arm-rpt_domain	LisH domain	ARM-like	ARM-type fold	Armadillo	Arm	Arm-repeat
Armc1	no	no	si	si	no	no	no
Armc2	no	no	si	si	si	no	no
Armc3	no	no	si	si	si	si	si
Armc4	no	no	si	si	si	no	si
Armc5	no	no	si	si	si	no	si
Armc6	no	no	si	si	si	no	si
Armc7	no	no	si	si	si	si	no
Armc8	no	no	si	si	si	no	si
Armc9	no	si	si	si	no	no	no
Armc10	si	no	si	si	no	no	no
Armc11	no	no	si	si	si	si	no



**Tabla 4. Número de proteínas con el dominio “ARM-type fold” en las distintas especies escogidas para análisis filogenético.**

<b>Especie</b>	<b>Número de proteínas “ARM-type fold”</b>
<i>Homo sapiens</i> (Mammalia)	23
<i>Mus musculus</i> (Mammalia)	23
<i>Gallus gallus</i> (Aves)	12
<i>Anolis carolinensis</i> (Reptilia)	13
<i>Xenopus tropicalis</i> (Amphibia)	14
<i>Danio rerio</i> (Osteíctios)	16
<i>Crassostrea gigas</i> (Mollusca)	12
<i>Drosophila melanogaster</i> (Arthropoda)	6
<i>Caenorhabditis elegans</i> (Nematoda)	1
<i>Ciona intestinalis</i> (Urochordata)	9
<i>Amphimedon queenslandica</i> (Porifera)	10
<i>Adineta vaga</i> (Rotífera)	9

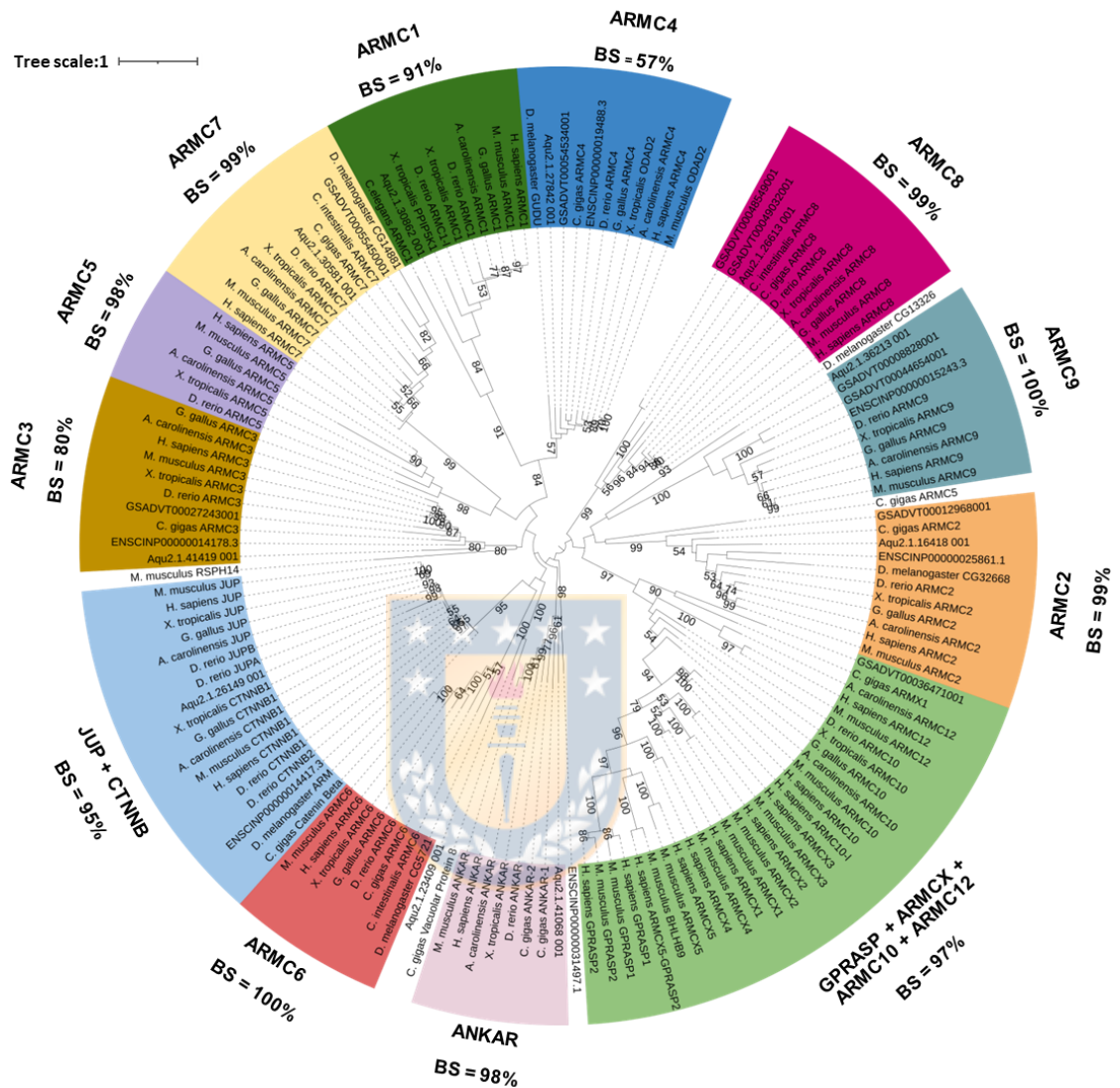
Posteriormente se realizó un alineamiento múltiple con las 148 proteínas identificadas como parte de la familia ARMC, y luego de la identificación de sitios filogenéticamente informativos y la determinación del mejor modelo evolutivo que se ajustaba al alineamiento, se generó un árbol filogenético mediante el método de Máxima Verosimilitud, usando el programa RAxML (Figura 11). La Figura 11 muestra la formación de 12 clados con alto soporte estadístico. Dentro de estos clados, podemos observar la presencia de proteínas de representantes de especies de vertebrados e invertebrados, sugiriendo que estas proteínas son

conservadas en términos evolutivos. Interesantemente, las proteínas ARMC10, ARMC12, GPRASP y ARMCx se agrupan en un mismo clado, lo que sugiere que estas proteínas poseen una estrecha relación filogenética, y que probablemente, fueron originadas desde un ancestro común. En el caso de ARMC9, en el árbol filogenético se encuentra estrechamente relacionada a ARMC8 y ARMC2. Sin embargo, dicha cercanía no muestra una significancia estadística. A pesar de lo anterior, el árbol filogenético obtenido agrupa a las proteínas ARMC entre las distintas especies con un alto valor de *bootstrap* (que es un estimador de confianza). En general, todos los miembros de la familia ARMC se agrupan con valores de *bootstrap* mayores a 80%; con excepción de ARMC4 cuyo clado se soporta por un valor de *bootstrap* de 57%, aunque sigue siendo un valor adecuado para determinar relaciones filogenéticas. Esto significa que el árbol es resolutivo entregando información relevante sobre las relaciones filogenéticas de los miembros de la familia ARMC.

Seis proteínas quedaron excluidas de los 12 clados formados en el árbol filogenético, sugiriendo que la secuencia de estas proteínas ha tenido un grado de divergencia tal, que la identidad de secuencia con las proteínas de las otras especies es muy baja para agruparse juntas.

El clado de ARMC9 está formado por proteínas de especies tanto de animales vertebrados como invertebrados. Dentro de los últimos, se encuentra la especie *Amphimedon queenslandica*, una especie representante del *phylum*

Porífera, el cual corresponde a las esponjas de mar. Este *phylum* se encuentra en la base de metazoos, y se le considera el grupo hermano de todos los animales (Feuda et al., 2017), lo que sugiere que la proteína ARMC9 probablemente se encontraba en el ancestro común de los metazoos o animales. Esto se repite para los clados de ARMC1, ARMC2, ARMC3, ARMC4, ARMC7, ARMC8, JUP + CTNNB y ANKAR. Por su parte, el clado de ARMC5 está formado exclusivamente por especies de vertebrados, sugiriendo que esta proteína se originó en el ancestro común de estos animales. Por otro lado, los clados de ARMC6 y el de GPRASP + ARM CX + ARMC10 + ARMC12 incluyen especies de vertebrados e invertebrados, lo que sugiere que estas proteínas se encontraban en el ancestro común de los animales bilaterados. Por lo tanto, los resultados indican que las proteínas de la familia ARMC aparecieron tempranamente en la historia evolutiva de los animales, originándose probablemente en el ancestro común de los metazoos.

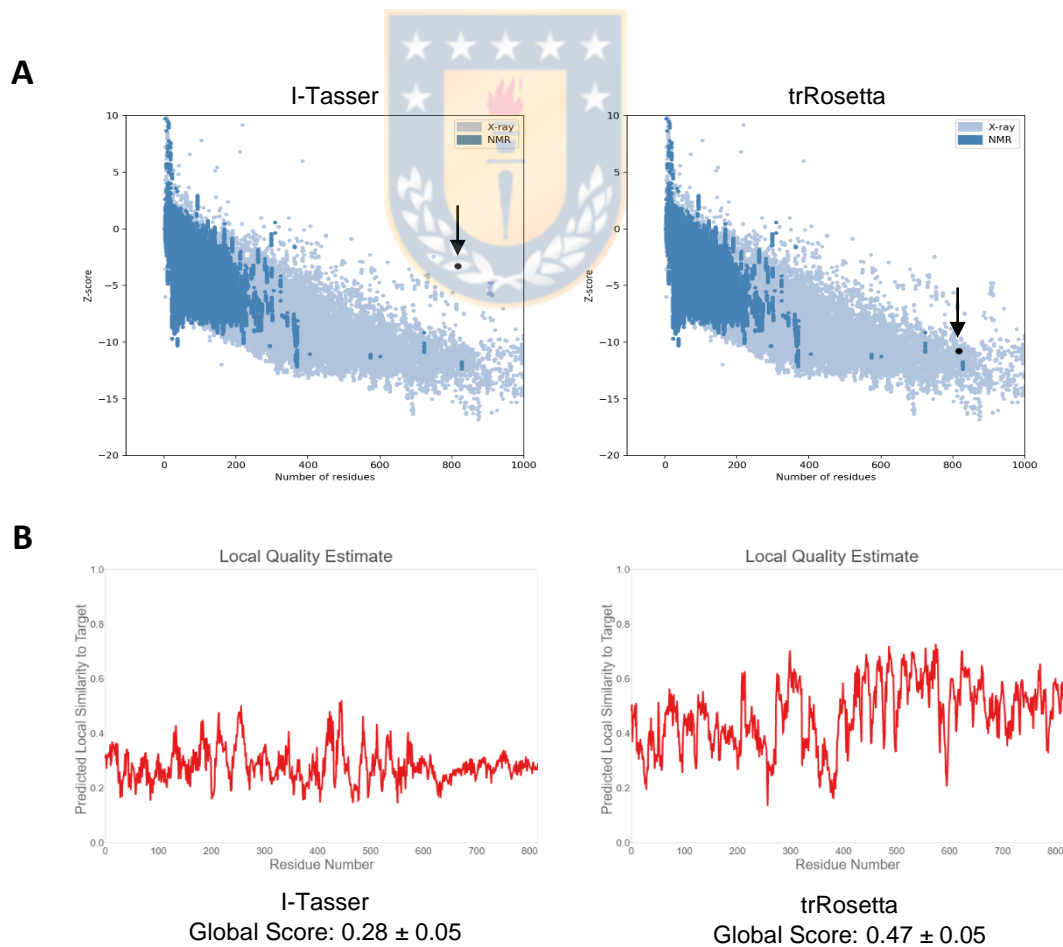


**Figura 11. Filogenia de los miembros de la familia ARMC en metazoos.** De las 148 proteínas analizadas, 142 se agruparon en 12 clados, dejando 6 de estas excluidas. Al observar 12 clados filogenéticos bien definidos y que contienen especies de vertebrados e invertebrados, se muestra que los miembros de la familia ARMC son conservados evolutivamente. Se muestran sólo los valores de *bootstrap* > 50. BS: valor de *bootstrap*.

## 7.6 Armc9 y Togaram1 forman *in silico* un complejo de interacción proteína-proteína en el pez cebra.

Armc9 es una proteína de señalización que forma parte de la región proximal de cilios primarios en células de mamífero, aunque también se ha sugerido que se encuentra localizada en el centriolo (Breslow et al., 2018; Van De Weghe et al., 2017). Recientemente se reportó que esta proteína interactúa directa e indirectamente con diversas proteínas ciliares (Latour et al., 2020), dando las primeras luces respecto a su red de interacción. Así, ARMC9 interactúa directamente con las proteínas CSPP1, CCDC66 y TOG1, siendo esta última una proteína implicada en el síndrome de Joubert (Latour et al., 2020). Para responder a la hipótesis de si esta interacción también ocurre en el pez cebra, y que el fenotipo de curvatura axial observado en el mutante *armc9* podría explicarse por una alteración en la formación del complejo Armc9-Tog1 realizamos un análisis *in silico* de dicha interacción. Como fue descrito en la sección 5.1, la mutación en el gen *armc9* del pez cebra genera la aparición de un codón de término prematuro en el aminoácido 549 en la proteína silvestre, perdiendo la región C-terminal donde se encuentra parte del dominio “Armadillo type fold” y del resto de su estructura (aminoácidos 383-578). Este dominio, se ha descrito como crucial para la asociación de ARMC9 con sus interactores (Latour et al., 2020). Para identificar cuáles son los aminoácidos involucrados en la interacción entre Armc9 y Tog1 del pez cebra, se realizó un análisis de *docking* proteína-proteína usando el servidor ClusPro (<https://cluspro.bu.edu/>). Dado que

la proteína Armc9 no cuenta con una estructura tridimensional resuelta experimentalmente, se generaron modelos *in silico* de ambas proteínas de pez cebra utilizando los servidores trRosetta (<https://yanglab.nankai.edu.cn/trRosetta/>) e I-TASSER (<https://zhanggroup.org/I-TASSER/>). Finalmente, la calidad de los modelos se evaluó con el servidor QMEANDisCo (<https://swissmodel.expasy.org/qmean>) y ProSA (<https://prosa.services.came.sbg.ac.at/prosa.php>) (Figura 12).



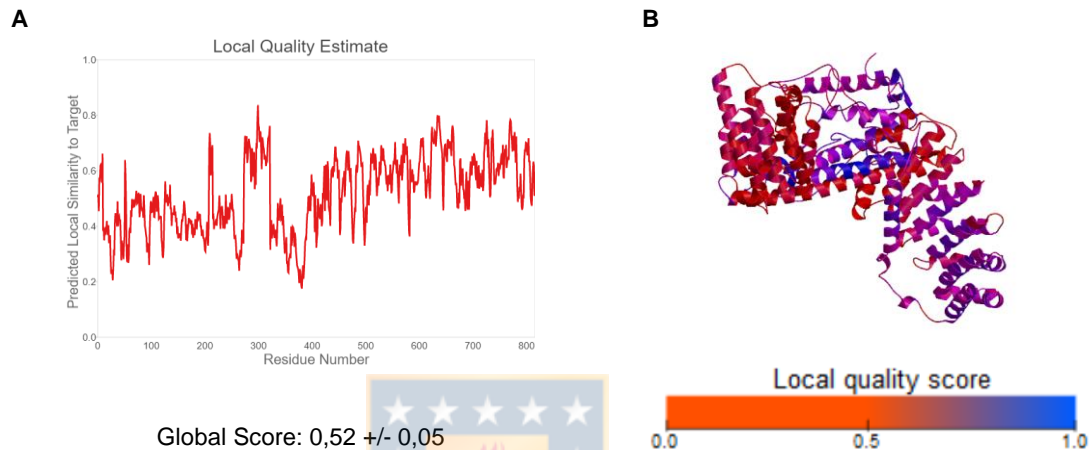


**Figura 12. Análisis de calidad de los modelos de estructura tridimensional de Armc9 generados con los servidores I-TASSER y trRosetta. (A)** Análisis con el servidor ProSA, en el que se muestra el rango de valores de Z-score obtenidos por modelos de estructura tridimensional resueltos experimentalmente mediante cristalografía de rayos x (celeste) y resonancia magnética nuclear (azul). La flecha señala el valor de Z-score obtenido para cada modelo. **(B)** Resultado del análisis con QMEANDisCo. El gráfico muestra el valor de similitud local al objetivo para cada uno de los residuos. Se indica además el valor global de puntaje, siendo mayor el puntaje obtenido por el modelo generado por trRosetta.

El servidor ProSA entrega un puntaje global de calidad del modelo, llamado *Z-score*, y compara el valor del modelo con el rango de valores de *Z-score* de aquellos cuya estructura fue resuelta experimentalmente (Wiederstein & Sippl, 2007). Si el *Z-score* de nuestro modelo se encuentra fuera de ese rango, es probable que el modelo no se aproxime correctamente a la estructura nativa. En nuestro análisis, el *z-score* del modelo generado con I-TASSER está fuera del rango de valores para proteínas de 817 aminoácidos ( $Z\text{-score} = -3,29$ ), mientras que el modelo generado con trRosetta está dentro de dicho rango ( $Z\text{-score} = -9,75$ ). Por otro lado, el análisis con QMEANDisCo entregó un puntaje global de 0.28 al modelo de I-TASSER, y de 0.47 al de trRosetta; por lo que, considerando la evaluación de ambos servidores, se escogió el modelo de trRosetta para seguir con futuras simulaciones computacionales.

Tras escoger el modelo basal, se realizó un refinamiento de éste usando el servidor locPREFMD (<http://feig.bch.msu.edu/locprefmd/>), el cual mejora la estereoquímica local del modelo mediante dinámicas moleculares. Tras el mejoramiento, el modelo fue nuevamente evaluado por el servidor

QMEANDisCo, mostrando una importante mejora en su puntaje global (Figura 13).

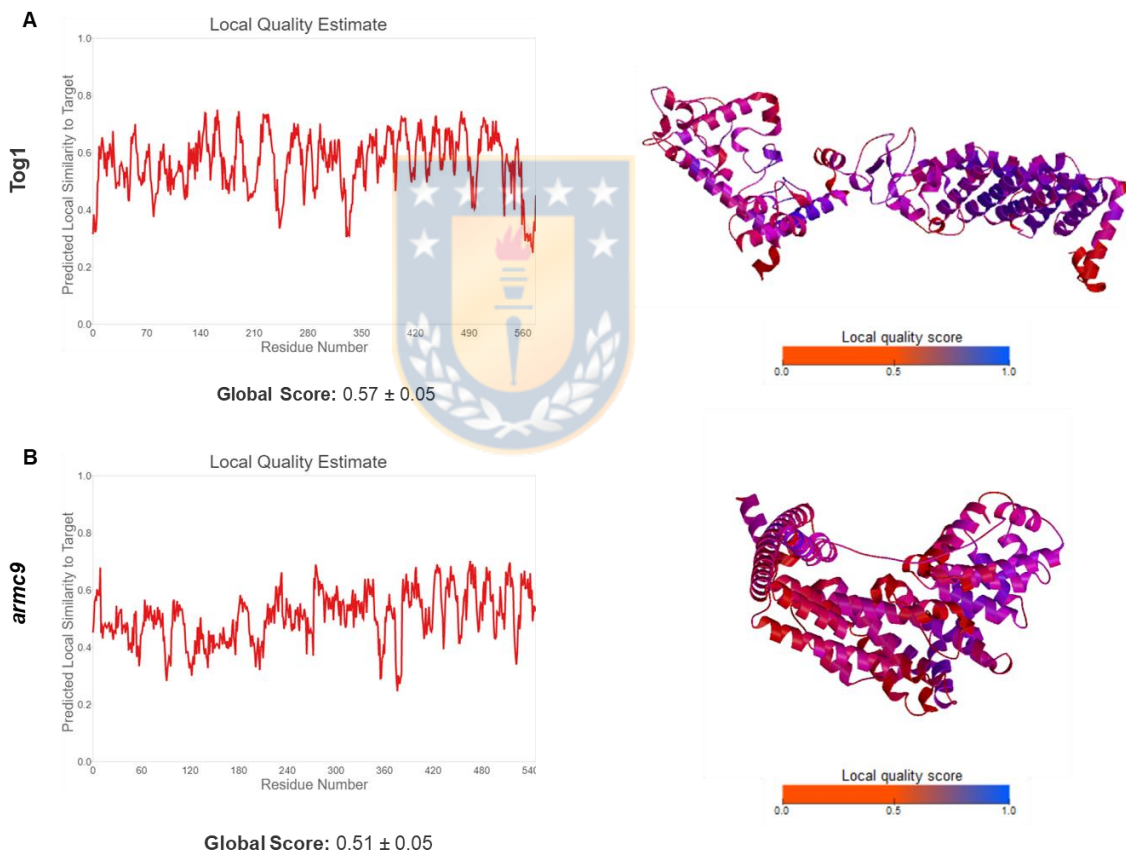


**Figura 13. Análisis del modelo de Armc9 del pez cebra generado por trRosetta con QMEANDisCo y refinado con locPREFMD. (A)** Gráfico de similitud local al objetivo y puntaje global del modelo. Se observa que a lo largo del modelo de Armc9 hay regiones con mejor calidad de la estructura, sobretodo aquellas que están hacia el C-terminal **(B)** Visualización del Modelo 3D con código de color para el puntaje de calidad de cada aminoácido. Las regiones en azul indican una alta calidad de modelamiento. El puntaje global de Armc9 fue mayor a 0,5, lo que reduce la probabilidad que este sea un modelo de baja calidad.

Para el modelamiento de Tog1 y Armc9 mutante se realizó el mismo protocolo aplicado a Armc9 silvestre, obteniendo valores de puntaje global por sobre 0,5 para ambas estructuras (Figura 14).

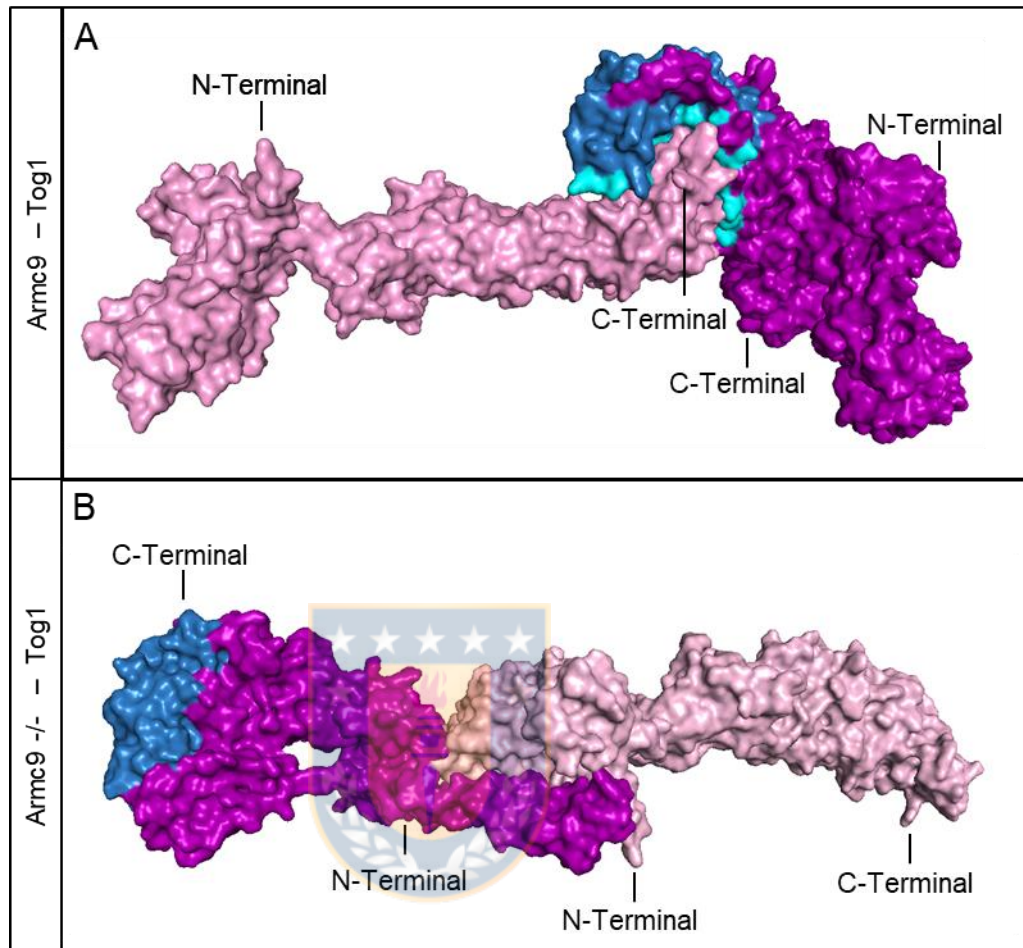
Una vez refinados y validados todos los modelos de estructura tridimensional, se utilizó el servidor ClusPro y ZDOCK para determinar la interacción molecular mediante *docking* proteína-proteína entre Armc9 silvestre-

Tog1 y Armc9 mutante-Tog1. La visualización del mejor modelo de interacción molecular entregado por ambos servidores mostró que la formación del complejo Armc9 silvestre-Tog1 está mediada por el dominio “ARM-type fold” (Figura 15A). Por otro lado, dicha interacción, no es ejecutada para el caso de Armc9 mutante-Tog1 (Figura 15B).



**Figura 14. Análisis con QMEANDisCo del modelo de Tog1 y Armc9 mutante generados con trRosetta y refinados con locPREFMD.** Gráfica de similitud local al objetivo con puntaje global (izquierda), y visualización 3D del modelo con código de color para el puntaje de cada aminoácido (derecha) del modelo 3D de Tog1 (A) y para el modelo 3D de Armc9 mutante (B). Ambos modelos lograron un puntaje global mayor a 0,5, reduciendo así la probabilidad de ser modelos de baja calidad.

El modelo con una mayor probabilidad entregado por cada servidor de *docking* fue posteriormente analizado con el servidor HawkDock (<http://cadd.zju.edu.cn/hawkdock/>) para conocer la energía de interacción entre ambas proteínas. HawkDock determinó que la energía de libre interacción en el *docking* realizado con ClusPro del complejo Armc9-Togaram1 fue de -126,41 [kcal/mol], mientras que para el *docking* realizado con ZDOCK fue de -61,68 [kcal/mol]. Lo anterior, sugiere que los modelos de interacción entregados por ambos modelos ocurren espontáneamente, aunque siendo más favorable energéticamente el modelo entregado por ClusPro. Por otro lado, se determinó que de los 25 aminoácidos más relevantes en la interacción entre las proteínas Armc9 silvestre y Tog1, 14 y 18 de estos, respectivamente, se encuentran en el dominio “Armadillo type fold” (Tabla 4). Por su parte, el análisis con HawkDock para el *docking* de Armc9 mutante reveló que la energía de libre de interacción global del complejo es mayor para los modelos de ambos servidores en comparación con la energía global de Armc9 silvestre, lo que indicaría una unión menos espontánea con Togaram1. Adicionalmente, ninguno de los aminoácidos involucrados en la interacción entre Armc9 mutante y Tog1 pertenece al dominio “ARM-type fold” (Tabla 5).



**Figura 15. Modelo de interacción de Armc9 silvestre y mutante con Tog1 del pez cebra.** (A) Se muestra la estructura terciaria de Armc9 silvestre (púrpura) y de Tog1 (rosado). Se destaca el dominio “ARM-type fold” (azul) y los aminoácidos de Armc9 que son parte del dominio “ARM-type fold” y que interactúan con Togaram1 (cian). (B) Estructura terciaria de Armc9 mutante (púrpura) y Tog1 (rosado). En Armc9, se destaca el dominio “ARM-type fold” (azul). A diferencia de lo que ocurre en el silvestre, la interacción entre ambas proteínas no ocurre a través del dominio “ARM-type fold”.

**Tabla 5. Análisis con HawkDock del *docking* realizado con los servidores ClusPro y ZDOCK entre Armc9 silvestre y Tog1.** Se muestran los valores de energía libre de unión de los 25 aminoácidos de Armc9 más relevantes en la interacción con Tog1. En rojo se destacan los referidos aminoácidos pertenecientes al dominio “ARM-type fold”.

ClusPro					
Energía libre de unión del complejo: -126.41 [kcal/mol]					
Ranking	Residuo	Energía libre de unión	Ranking	Residuo	Energía libre de unión
1	A-GLU-566	-4.83	14	A-LEU-610	-1.73
2	A-TYR-529	-4.29	15	A-GLU-596	-1.7
3	A-ASP-597	-4.17	16	A-GLU-603	-1.7
4	A-TYR-528	-4.13	17	A-ASN-564	-1.62
5	A-ASP-595	-3.25	18	A-LEU-496	-1.16
6	A-GLU-602	-2.97	19	A-GLY-532	-1.1
7	A-ASP-599	-2.87	20	A-SER-590	-1.01
8	A-PRO-565	-2.41	21	A-LEU-567	-0.94
9	A-GLU-563	-2.39	22	A-TYR-486	-0.88
10	A-ASP-600	-2.23	23	A-GLU-525	-0.84
11	A-MET-492	-2.02	24	A-ASN-523	-0.8
12	A-MET-606	-1.8	25	A-GLU-593	-0.77
13	A-GLU-485	-1.77			
ZDOCK					
Energía libre de unión del complejo: -61.68 [kcal/mol]					
Ranking	Residuo	Energía libre de unión	Ranking	Residuo	Energía libre de unión
1	A-GLU-566	-6.11	14	A-TYR-529	-1.81
2	A-TYR-482	-4.06	15	A-GLU-602	-1.8
3	A-MET-606	-3.87	16	A-VAL-438	-1.33
4	A-HIE-524	-3.85	17	A-GLU-525	-1.19
5	A-LEU-610	-3.23	18	A-GLY-532	-1.13
6	A-ASN-523	-3	19	A-ASP-611	-1.12
7	A-ILE-526	-2.78	20	A-MET-492	-0.97
8	A-TYR-528	-2.48	21	A-PRO-565	-0.74
9	A-TYR-535	-2.28	22	A-GLU-593	-0.66
10	A-ARG-401	-2.24	23	A-ASP-411	-0.6
11	A-TRP-350	-2.21	24	A-GLU-433	-0.59
12	A-PHE-573	-1.97	25	A-ASP-598	-0.59
13	A-ASP-592	-1.94			

**Tabla 6. Análisis con HawkDock del *docking* realizado con los servidores ClusPro y ZDOCK entre Armc9 mutante y Tog1.** Se muestran los valores de energía libre de unión de los 25 aminoácidos de Armc9 más relevantes en la interacción con Togaram1. Ninguno de los referidos aminoácidos se encuentra en el dominio “ARM-type fold”.

ClusPro					
Energía libre de unión del complejo: -124,21 [kcal/mol]					
Ranking	Residuo	Energía libre de unión	Ranking	Residuo	Energía libre de unión
1	A-ARG-45	-7.2	14	A-GLU-261	-2.71
2	A-ARG-238	-7.03	15	A-LEU-249	-2.57
3	A-ARG-298	-6.45	16	A-GLN-243	-2.53
4	A-ARG-265	-5.72	17	A-LEU-294	-2.45
5	A-ILE-250	-5.58	18	A-ASP-245	-1.94
6	A-LYS-46	-5.2	19	A-ILE-236	-1.44
7	A-HIE-235	-3.92	20	A-GLY-47	-1.17
8	A-PHE-239	-3.51	21	A-LEU-256	-1.11
9	A-LEU-260	-3.32	22	A-PRO-49	-1.07
10	A-HIE-246	-2.81	23	A-ALA-254	-0.84
11	A-LYS-52	-2.79	24	A-THR-253	-0.83
12	A-LEU-242	-2.78	25	A-VAL-264	-0.78
13	A-VAL-257	-2.77			
ZDOCK					
Energía libre de unión del complejo: -34,19 [kcal/mol]					
Ranking	Residuo	Energía libre de unión	Ranking	Residuo	Energía libre de unión
1	A-ARG-497	-5.95	14	A-SER-198	-0.92
2	A-ARG-454	-4.61	15	A-PHE-3	-0.79
3	A-LEU-414	-3.69	16	A-ASP-98	-0.74
4	A-PRO-99	-3.26	17	A-GLN-418	-0.67
5	A-SER-417	-2.71	18	A-TYR-415	-0.62
6	A-ILE-94	-2.63	19	A-SER-458	-0.58
7	A-ARG-376	-2.46	20	A-CYS-410	-0.57
8	A-LEU-206	-2.25	21	A-TYR-377	-0.54
9	A-PHE-97	-2.24	22	A-ALA-459	-0.54
10	A-ALA-455	-1.9	23	A-ALA-56	-0.47
11	A-VAL-100	-1.1	24	A-ARG-59	-0.41
12	A-ALA-197	-1.07	25	A-LEU-203	-0.4
13	A-VAL-193	-0.95			



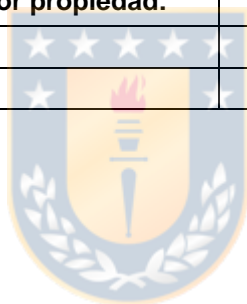
Estos resultados apoyan la idea que el dominio “Armadillo type-fold” sería la región de Armc9 que interactúa con Tog1, y proporcionan la identidad de posibles aminoácidos que serían los responsables de dicha interacción molecular. Entre los 25 aminoácidos con menor energía de interacción que entregó cada servidor de *docking*, hay 8 aminoácidos en común y que son parte de la región “Armadillo type-fold” de Armc9. Estos corresponderían a: GLU-566, TYR-529, TYR-528, PRO-565, MET-492, GLY-532, GLU-525, ASN-523. Estos aminoácidos serían candidatos a ser los de mayor relevancia en la interacción molecular entre ambas proteínas.

Finalmente, usando el modelo de docking entregado por ClusPro, se evaluó por medio del servidor PRODIGY (<https://wenmr.science.uu.nl/prodigy/>) la afinidad de interacción entre Armc9 silvestre y Tog1, y se comparó con el valor de afinidad entre Armc9 mutante y Tog1. Este servidor calcula la constante de disociación ( $K_d$ ), además del número de contactos entre proteínas. Comparado con el mutante, la constante de disociación de la interacción de Armc9 con Tog1 tiene un valor en el mismo orden de magnitud ( $7,4 \times 10^{-10}$  [M] versus  $5,5 \times 10^{-10}$  [M]), lo que sugiere que tanto la proteína Armc9 silvestre como la Armc9 mutante interactúan con una fuerza similar con Tog1, aunque las regiones que contribuyen a la formación del complejo son completamente diferentes.



**Tabla 7. Análisis con PRODIGY de la afinidad de unión y el número de contactos entre Armc9 silvestre y mutante con Togaram1.** Se muestran los valores de la constante de disociación ( $K_d$ ) de la interacción entre Armc9 silvestre con Tog1, y de Armc9 mutante con Tog1. Además, se cuantifica el tipo de contactos entre las proteínas y se muestra el porcentaje de superficie no interactuante cargado y apolar.

Valores predichos	Armc9 silvestre	Armc9 mutante
Constante de disociación $K_d$ [M] a 28°C	$7,4 \times 10^{-10}$	$5,5 \times 10^{-10}$
<b>Número de contactos interfaciales por tipo:</b>		
Cargado-Cargado	29	22
Cargado-polar	10	18
Cargado-apolar	32	31
Polar-Polar	2	0
Polar-Apolar	11	14
Apolar-Apolar	19	21
<b>Superficie no interactuante por propiedad:</b>		
Cargado	32.48%	33.13%
Apolar	37.13%	37.33%



## 8 Discusión

A pesar de ser un problema de salud de alta prevalencia y de relevancia global (Konieczny et al., 2013) la EIA es una condición de etiología desconocida. La carencia de sistemas modelos animales adecuados para su estudio es una de las razones que explica por qué aún no se conocen los procesos fisiológicos involucrados en su desarrollo. Recientemente, el modelo de pez cebra ha permitido grandes avances en relación con la patología molecular de la EIA (Muñoz-Montecinos et al., 2022), brindando pistas claves sobre sus causas. En este trabajo se estudió el rol del factor *Armc9* en el establecimiento y mantención de la curvatura lineal de la CV en el pez cebra. Para lo anterior, se utilizaron variadas estrategias de fenotipado morfológico y molecular para investigar la etiología de la curvatura tipo escoliosis en el mutante *armac9*, durante la transición de larva a juvenil. Además, se determinó la historia evolutiva de los miembros de la familia ARMC en animales. De esta manera, se pretende contribuir a entender los mecanismos genético-moleculares involucrados en la adquisición de la EIA y su regulación por parte del gen *armac9*, lo cual resulta ser fundamental para comprender las causas de esta condición que afecta la calidad de vida de millones de adolescentes y adultos alrededor del mundo.

## 8.1 El mutante *armc9* del pez cebra como modelo de EIA

Históricamente, diversos sistemas modelos animales han sido utilizados para el estudio de la escoliosis (Revisado en Lv et al., 2021). Sin embargo, la mayoría de los estudios buscaban recrear una curvatura de tipo escoliosis por medios mecánicos o quirúrgicos, y no buscaban entender las causas moleculares y celulares detrás del desarrollo de esta patología (Ouellet & Odent, 2013). Actualmente, gracias al avance de las tecnologías de secuenciación, los modelos genéticos de escoliosis han emergido exponencialmente, siendo el pez cebra uno de los organismos más utilizados (Lv et al., 2021).

El mutante de pez cebra *armc9* corresponde a uno de los modelos genéticos sugeridos para el estudio de la EIA. Este mutante, inicialmente fue descrito en la literatura por Van de Weghe y colaboradores el año 2017, quienes reportaron que crispantes desarrollaban características típicas de las ciliopatías en la F0, como la distrofia retinal, disminución en número y tamaño de cilios, colobomas, y la curvatura del eje axial (Van De Weghe et al., 2017). Sin embargo, la descripción realizada por estos autores corresponde a características del fenotipo observado en individuos adultos, dejando abiertas numerosas preguntas relacionadas a la temporalidad de ocurrencia y los procesos biológicos afectados en el desarrollo de la escoliosis.

La EIA tiene dos características fundamentales que la diferencian de otros tipos de escoliosis: 1) la etapa de aparición, y 2) la ausencia de malformaciones

en las vértebras (Cheng et al., 2015). El mutante *armc9*, a diferencia de otros modelos de escoliosis del pez cebra, desarrolla la curvatura del eje axial durante períodos post-embrionarios, específicamente durante la etapa juvenil, y no en la etapa embrionaria o adulta (Revisado en Muñoz-Montecinos et al., 2022). Aproximadamente, entre las 5 y 6 semanas de desarrollo comienza a manifestarse la curvatura en la región distal del eje antero-posterior, justo antes del comienzo de la aleta caudal (Van De Weghe et al., 2017). Otros modelos de escoliosis en pez cebra suelen desarrollar una curvatura en la cola en la etapa embrionaria, como los mutantes *ptk7* (Hayes et al., 2013), *zmynd10* y *kif3b* (Zhang et al., 2018), *sspo<sup>dmh4/dmh4</sup>* (Rose et al., 2020). Por lo tanto, en la escala temporal del desarrollo, la generación de escoliosis en el mutante *armc9* se asemeja y correlaciona a la de tipo idiopática adolescente de humanos.

Por otro lado, la curvatura del eje axial del mutante no se genera por deformidades estructurales, fusión o un cambio en el número de vértebras, fenocopiando a la EIA de humanos (Figura 8). En conclusión, considerando la temporalidad de la curvatura y sus características morfológicas, el mutante *armc9* cuenta con características que lo posicionan como un atractivo modelo para el estudio de la EIA.

## 8.2 Algunos de los componentes del líquido cefalorraquídeo parecen estar inalterados en el mutante *armc9*

Uno de los primeros mecanismos fisiológicos propuestos como causantes de escoliosis es el flujo aberrante del LCR (Muñoz-Montecinos et al., 2022). El mutante *ptk7* del pez cebra muestra defectos en dicho flujo, enfocando el interés tanto en su dinámica, como en sus componentes (Grimes et al., 2016). La fibra de Reissner es un componente del LCR, y se forma gracias a la agregación de la proteína SCO-espondina, la que es secretada por el órgano subcomisural (Rodríguez et al., 1992). Se ha observado que mutantes del pez cebra para este gen no desarrollan o no ensamblan correctamente la fibra de Reissner, y fallan en la formación de un eje corporal recto durante la etapa embrionaria (Cantaut-Belarif et al., 2018; Rose et al., 2020; Troutwine et al., 2020). El mutante *armc9*, sin embargo, no muestra una morfología del órgano subcomisural alterada, ni tampoco defectos aparentes en el ensamblaje de la fibra de Reissner (Figura 9). A pesar de que los estudios en los que se ha analizado el rol de la fibra de Reissner en el desarrollo de escoliosis han demostrado una relación de causalidad entre el genotipo y fenotipo, no todos los modelos de escoliosis en pez cebra manifiestan problemas con esta estructura. De hecho, se han descrito otros mutantes que, al igual que el mutante *armc9*, curvan su eje axial sin mostrar defectos en la fibra de Reissner en etapas larvales, como el mutante *kif7* o el mutante *adamts9* (Gray et al., 2021; Terhune et al., 2021). Esto sugiere que la escoliosis desarrollada por causa de la mutación en el gen *armc9* es

independiente de la formación de la fibra de Reissner, o que obedece a algún proceso de señalización río abajo de su biosíntesis. Es importante destacar que la observación de la estructura del OSC se realizó en etapas tempranas del desarrollo larval, por lo que no podemos descartar que surjan alteraciones estructurales en etapas más avanzadas, como la juvenil. A pesar de que el desarrollo de una curvatura tipo EIA en pez cebra es completamente compatible con un desarrollo normal del OSC y la fibra de Reissner, experimentos adicionales en el mutante *armc9* dirigidos a observar la dinámica estructural de la fibra de Reissner a través del desarrollo del organismo, en etapas juveniles previo a la aparición de la curvatura, podrían asegurar por completo que esta estructura se encuentra inalterada en comparación con individuos silvestres. Además, junto con estudiar los componentes del LCR, como la fibra de Reissner, es importante evaluar el flujo de éste, el cuál es crucial para la correcta formación del eje axial (Grimes et al., 2016). Finalmente, considerando que *Armc9* es una proteína ciliar, se requieren estudios para examinar la morfología de los cilios en el canal central de la médula espinal, para establecer relaciones funcionales entre la estructura ciliar y la biología del LCR. Estos estudios en su conjunto podrán esclarecer el rol de los componentes del LCR y su flujo en la formación de la curvatura del eje axial en el mutante *armc9*.

### 8.3 El mutante *armac9* no recluta anormalmente macrófagos en el sitio de curvatura del eje axial

Si bien la etiología de la escoliosis es aún desconocida, la desregulación de procesos inflamatorios ha sido propuesta en la formación de la curvatura del eje axial tanto en sistemas modelos animales como en humanos (Muñoz-Montecinos et al., 2022). El síndrome de hiperinmunoglobulina-E es una rara enfermedad hereditaria caracterizada por la presencia de abscesos en piel y pulmones, problemas musculoesqueléticos y escoliosis (Leung & Geha, 1988). La causa de esta enfermedad es una mutación en el gen STAT3, la cual impide la normal diferenciación de linfocitos T cooperadores, los cuales tienen una importante función en la regulación de la respuesta inmune (Papanastasiou et al., 2010). Por otra parte, más del 30% de las personas con infección de micobacteria no tuberculosa pulmonar recurrente presentan escoliosis o *pectus excavatum*, que es una malformación esquelética que afecta a las costillas y el esternón (Kartalija et al., 2013). Esta relación entre eventos inflamatorios con el desarrollo de escoliosis se ha propuesto en el pez cebra (Sanders et al., 2012). El parásito más común en los acuarios de investigación del pez cebra es *Pseudoloma neurophilia*, el cual infecta de forma crónica el sistema nervioso central y los músculos de los peces, generando problemas como la emaciación y curvatura del eje axial (Sanders et al., 2012). Recientemente, se reportó que la pérdida de función de *stat3* genera una severa curvatura lateral y vertical de la espina dorsal, la que aparece en etapa juvenil. El análisis transcriptómico de los mutantes

sugiere alteraciones en la expresión de genes involucrados en inmunidad y respuesta a infecciones (Xiong et al., 2017). Por otro lado, Van Gennip y colaboradores (2018) demostraron que la activación focal de señales proinflamatorias dentro de la espina dorsal está asociada, y es suficiente, para inducir un fenotipo de tipo escoliosis en el pez cebra. Adicionalmente, tras administrar un antiinflamatorio no esterooidal, se logró disminuir la progresión de la curvatura (Van Gennip et al., 2018).

Ante un evento inflamatorio, las células del sistema inmune innato del pez cebra migran hacia el sitio de inflamación guiadas por señales moleculares. Los neutrófilos son las primeras células en llegar a dicho lugar, y luego lo hacen los macrófagos (Ellett et al., 2011). Un número elevado de macrófagos en la región de la espina dorsal fue observado en mutantes *ptk7*, sugiriendo la presencia de moléculas inflamatorias en la región (Van Gennip et al., 2018). En nuestro estudio, se generó una línea reportera de macrófagos Tg(*mpeg1:dendra2*) en el *background* mutante *armc9* con el objetivo de evaluar la presencia anormal de estas células en el sitio de origen de la curvatura. A las 5 semanas aproximadamente, se evaluó la presencia de los macrófagos en la zona, no encontrándose diferencias entre los individuos curvados y los no curvados (Figura 10). Es posible que, en caso de haber sobreexpresión de moléculas proinflamatorias en la zona curvada, ésta haya ocurrido en un espacio temporal distinto al que se consideró para examinar la presencia de macrófagos, lo que explicaría la posible ausencia de estas células al momento de la observación.



Otra posibilidad es que la curvatura no se relacione con la presencia de células inmune en la zona, como ha sido descrito en otros modelos de peces curvados (Rose et al., 2020). En el mutante *sspo<sup>dmh4/+</sup>*, a pesar que la expresión de la molécula  $TNF\alpha$  se vio aumentada en la región del telencéfalo de animales juveniles, no se observó un reclutamiento anormal de macrófagos en dicha zona (Rose et al., 2020). Experimentos adicionales que monitoreen el movimiento de las células inmunes durante diferentes etapas del desarrollo, o evaluar la expresión de moléculas relacionadas a la respuesta inflamatoria podrían esclarecer si este tipo de respuesta está involucrada en el surgimiento de la curvatura axial en el mutante *armc9*.



#### **8.4 La interacción entre Armc9-Tog1 depende del dominio “ARM-type fold” en el pez cebra**

Armc9 es una proteína estructural de los cilios celulares. Esta proteína se localiza en la región proximal de éstos en células de mamíferos, y también ha sido asociada a los centriolos en células del epitelio pigmentario de la retina (Breslow et al., 2018; Van De Weghe et al., 2017). Recientemente, Latour y colaboradores (2020), utilizaron la proteína ARMC9 de humano como cebo en una búsqueda o *screening* de interacción. Estos autores encontraron que ARMC9 interactúa directamente con TOG1, CCDC66, y CSPP1, y que lo hace a través del dominio “ARM-type fold” (Latour et al., 2020). Los autores identificaron la

región de interacción de ARMC9 con TOG1 entre los aminoácidos 150–665, aportando información relevante a la formación de un complejo o zona de interacción molecular entre estas proteínas. Sin embargo, la región estructural señalada es amplia y poco específica, ya que abarca casi tres cuartas partes de la proteína total.

En este trabajo, mediante un análisis de *docking* rígido proteína-proteína, se determinaron los aminoácidos que podrían estar involucrados en la interacción directa entre ARMC9 y TOG1. En el desarrollo de esta estrategia, la calidad del modelo de las estructuras tridimensionales es crucial para un resultado confiable que pueda ser comparados entre proteínas silvestres y mutantes. En general, modelos o estructuras tridimensionales de proteínas se obtienen experimentalmente mediante cristalografía de rayos X, espectroscopía de resonancia magnética nuclear, o microscopía crioelectrónica (Sali et al., 2003). Sin embargo, con la aparición del grupo DeepMind en la competencia CASP13 y su algoritmo AlphaFold que se basa en aprendizaje automatizado o *deep learning*, la calidad del modelamiento computacional de estructura 3D de proteínas creció enormemente (AlQuraishi, 2019). Posteriormente, con AlphaFold2, la segunda iteración del algoritmo AlphaFold, hubo un progreso sin precedentes en el campo de la predicción de estructuras 3D de proteínas, catalogado por algunos como “los más emocionantes de la historia de la predicción de estructura de proteínas”, obteniendo resultados en la CASP14 que

en algunos casos fueron muy similares a los modelamientos experimentales (Jumper et al., 2021; Pearce & Zhang, 2021).

Tanto Armc9 como Tog1 de pez cebra carecen de modelos 3D determinados experimentalmente, por lo que es necesario generar uno de manera *in silico* para realizar el análisis de *docking* o interacción molecular entre estas proteínas. Kar y colaboradores (2018) generaron un modelo para ARMC9 de humanos usando el servidor I-TASSER, el cual mostró características similares a la de otras proteínas con dominio “ARM-type fold”, como  $\beta$ -catenina (Kar et al., 2018). Sin embargo, previo al 2018, los servidores para predecir estructura aún no incorporaban los avances en el modelamiento de proteínas generados por AlphaFold. Además, el modelo presentado no fue evaluado, ni fue refinado con el fin de mejorar la predicción inicial, por lo que se decidió no utilizar dicho modelo para realizar el *docking* entre Armc9 y Tog1 de pez cebra.

Para nuestro análisis de interacción molecular, se generaron modelos 3D mediante el uso de los servidores trRosetta y I-TASSER. Si bien, este último tiene una gran trayectoria de uso para generar modelos o predicciones tridimensional de proteínas, trRosetta mostró una mejora significativa en el TM-score de 31 modelos que se usaron en la CASP13, obteniendo valores similares, e incluso a veces mejores, que los obtenidos por AlphaFold (Yang et al., 2020). Tras generar estructuras 3D para Armc9 con ambos servidores, la evaluación con QMEANDisCo y ProSA indicó que las estructuras 3D generadas por trRosetta

fueron de mejor calidad que los generados por I-TASSER (Figura 12), por lo que se utilizaron los modelos de trRosetta para el *docking*.

El *docking* rígido de Armc9 con Togaram1 se llevó a cabo con dos de los servidores de docking más usados y que otorgan mejores resultados: ClusPro y ZDOCK (Porter et al., 2019). Ambos servidores coincidieron en que la zona de interacción entre Armc9 con Tog1 corresponde principalmente al dominio “ARM-type fold” (Tabla 5). En el caso del resultado de ClusPro, los 25 aminoácidos con menor energía libre de unión se encontraron entre los aminoácidos 485-610, acotando la zona de interacción a 125 aminoácidos, una reducción notable en comparación a lo descrito previamente por Latour y colaboradores (2020) en humanos.

Comparado con el silvestre, Armc9 mutante no interactúa con Tog1 a través del dominio “ARM-type fold” (Figura 15). Este resultado sugiere que en nuestro mutante la interacción entre estas dos proteínas está fuertemente alterada, lo que podría tener un impacto en la función de este complejo. El cilio primario es una estructura sensorial esencial para la organización de diversas señales tanto mecánicas como moleculares, y su funcionalidad depende fuertemente de su correcto ensamble y organización (Mitchison & Valente, 2017). Se ha descrito que los cilios de células humanas con pérdida de función de ARMC9 o TOG1 son más cortos que los silvestres (Latour et al., 2020), lo que estaría relacionado con el desarrollo de ciliopatías como el síndrome de Joubert,

en la cual el largo y la organización de los cilios se ha visto alterada (Dafinger et al., 2011; Srivastava et al., 2017; Van De Weghe et al., 2017). Además, el análisis de cilios en células con pérdida de función de ARMC9 ha mostrado una disminución en las modificaciones postraduccionales de los axonemas (Breslow et al., 2018; Latour et al., 2020), las cuales son cruciales para la estabilidad y el correcto funcionamiento de los microtúbulos (Wloga et al., 2017). Es posible entonces que el fenotipo de nuestro mutante sea consecuencia de la pérdida de la estabilidad y estructura de sus cilios primarios producto de la pérdida de la correcta interacción entre Armc9 y Tog1, lo que generaría la interrupción de la transducción de señales mecánicas o de importantes vías como la de Sonic-Hedgehog o Wnt, todas previamente asociadas al desarrollo de ciliopatías y escoliosis (Breslow et al., 2018; Buchan, Gray, et al., 2014; Hayes et al., 2014; Oliazadeh et al., 2017). Adicionalmente, se evaluaron parámetros energéticos de los modelos de interacción molecular con los servidores HawkDock y PRODIGY. La energía libre de unión, es decir, la energía liberada tras la unión de dos moléculas, es una medida de la espontaneidad de una reacción, y a valores negativos quiere decir que la reacción es espontánea. Al comparar la interacción molecular de Armc9 silvestre con Tog1 modelada tanto por ClusPro y ZDOCK, se observa una energía libre de unión más negativa, sugiriendo que la interacción es más espontánea (Tabla 5 y 6). Sin embargo, la diferencia entre la energía de unión de Armc9 silvestre y Tog1, comparado con Armc9 mutante y Tog1, es mínima. Así, ambos valores están en el mismo orden de magnitud, lo que implica

que ambas interacciones tendrían la misma fuerza de interacción (Tabla 5 y 6). Este resultado es congruente con el resultado mostrado por PRODIGY (Tabla 7). La constante de disociación (que indica la afinidad de un ligando con su blanco) de la interacción con Tog1 también se mantuvo en el mismo orden de magnitud tanto para Armc9 silvestre como mutante. Por lo tanto, la proteína mutante tendría el mismo potencial de unirse a Tog1 que la silvestre, potencialmente a través de una región distinta.

Adicionalmente, el análisis con HawkDock mostró que ambos servidores de interacción molecular o *docking* coincidieron en 8 de los 25 aminoácidos con menor energía libre de unión, aumentando así la robustez de nuestros resultados. Experimentos posteriores de mutaciones específicas de los aminoácidos aquí propuestos como claves para la interacción de Armc9 con Togaram1 podrán corroborar el rol y la relevancia de estos aminoácidos en dicha interacción.

## **8.5 Historia evolutiva de la familia ARMC en animales**

La familia de proteínas ARMC comprende diferentes miembros que se caracterizan por la presencia de repeticiones en tándem de 42 aminoácidos aproximadamente (Huber et al., 1997). La función de varias de estas proteínas ha sido previamente descrita (Huang et al., 2021). Sin embargo, aún no hay conocimiento acerca del rol que cumplen a nivel celular otros miembros de la familia ARMC. Para comprender las relaciones filogenéticas entre los miembros

de esta familia y realizar inferencias respecto a similitudes estructurales y funcionales, se realizó una filogenia molecular a partir de la secuencia de aminoácidos de las proteínas ARMCs en diferentes representantes de grupos taxonómicos de vertebrados e invertebrados.

Todas las proteínas ARMCs del pez cebra, de humano y ratón contienen el dominio “ARM-type fold”, aunque además contienen otros dominios que las diferencian y que explican la diversidad de funciones que han sido reportadas (Huang et al., 2021). Como criterio discriminatorio para poder determinar las relaciones filogenéticas de los miembros de la familia ARMC, se escogió la presencia del dominio “ARM-type fold”, excluyendo otros dominios presentes en varios miembros pero que no están todas las proteínas ARMCs. Gul y colaboradores (2017) construyeron una filogenia de proteínas *armadillo*, pero consideraron sólo la secuencia repetidas del dominio ARM, los cuales no están presentes en todas las proteínas con dominio “ARM-type fold” (Tabla 2), dejando excluidas secuencias que corresponden a miembros de esta familia (Gul et al., 2017). Esta aproximación, que compara regiones acotadas, aumenta la probabilidad de obtener árboles filogenéticos más confiables en términos de consistencia estadística entre los grupos, pero excluye dominios importantes que son parte de la historia evolutiva de esta superfamilia de proteínas, y que podrían ayudar a la comprensión de su evolución y sus relaciones filogenéticas.

El árbol filogenético obtenido no logró un alto valor de confianza en sus ramas internas (Figura 15). Este resultado se podría explicar porque en las proteínas ARMC, los dominios repetidos *armadillo* comparten una baja identidad de secuencia (Kidd III et al., 2005; Tewari et al., 2010). Adicionalmente, al usar la secuencia completa de la proteína, es mayor la divergencia entre las secuencias alineadas, haciendo difícil la obtención de un árbol filogenético resolutorio a nivel interno. No obstante, en posiciones más externas del árbol filogenético se pueden observar altos valores de soporte estadístico, lo que sugiere la formación de 12 clados o grupos (Figura 15). En estos 12 grupos se observan que los miembros de la familia ARMCN se agruparon juntas, siendo “N” el número del 1 al 9 de las diferentes ARMCs. Las proteínas ARMC10 y ARMC12 se agruparon junto a las proteínas ARMCX y GPRASP. Interesantemente, se ha descrito que la familia ARMCX se originó por retrotransposición del gen *Armc10*, localizado en el cromosoma 7 de humanos (López-Doménech et al., 2012), lo que está en estrecha relación a la ubicación de representantes de este miembro de la familia ARMC en el árbol filogenético obtenido. En términos funcionales, tanto ARMCX1, ARMCX3, ARMC10 y ARMC12 son reguladas por la vía Wnt/ $\beta$ -catenina, y participan en la regulación del ciclo celular o de la dinámica mitocondrial (Chen et al., 2019; Iseki et al., 2010; Li et al., 2018; López-Doménech et al., 2012; Shimada et al., 2021). Por lo tanto, la similitud de funciones entre estas proteínas es coherente con su agrupación en el árbol filogenético.



Las familias de ARMC1 y ARMC4 fueron las únicas que, según el árbol filogenético obtenido, tienen el soporte estadístico para afirmar que derivan de un ancestro común (Figura 15). Interesantemente, estos miembros se ubicaron juntos en el árbol filogenético, a pesar de que no ha sido descrita una similitud funcional entre ambos grupos de proteínas. Por ejemplo, se ha reportado que ARMC1 se localiza tanto en el citosol como en las mitocondrias, y participa en la distribución celular de éstas (Wagner et al., 2019). En el caso de ARMC4, se ha descrito que participa en el ensamble del brazo externo de dineína en el cilio primario, y su pérdida de función está ligada al desarrollo de discinesia ciliar primaria (Hjeij et al., 2013). A nivel estructural ninguna de estas proteínas tiene su estructura 3D resuelta experimentalmente, y los modelos generados tampoco han mostrado grandes similitudes estructurales entre ellas (Huang et al., 2021). Por lo tanto, se requieren estudios adicionales para poder explicar funcional o estructuralmente la relación entre ARMC1 y ARMC4.

Las proteínas ARMC9 de vertebrados formaron un clado junto con proteínas de algunos invertebrados (rotíferos, poríferos y urocordados), lo que demuestra que ésta estuvo presente en el ancestro común de las especies de animales que habitó el planeta Tierra hace unos 800-700 millones de años atrás (Dos Reis et al., 2015; Erwin et al., 2011). En la base de datos de *Ensembl* se muestra que las 4 proteínas de invertebrados emparentadas con las proteínas ARMC9 de vertebrados comparten tanto la región “ARM-type fold” como la región

“LisH domain”, indicando que hay una conservación estructural de esta proteína durante la evolución.

Los resultados mostrados en el análisis filogenético de la familia de proteínas ARMC permiten generar variadas hipótesis respecto a la evolución de estas proteínas y a sus posibles funciones. Futuros experimentos que aborden la funcionalidad de proteínas ARMC incluirán un punto de partida desde la base de las relaciones evolutivas acá mostradas. El uso de animales modelo como el pez cebra u otros para generar nuevos mutantes en estas proteínas ayudará a dilucidar las funciones de las proteínas ARMC, y también a esclarecer las relaciones filogenéticas obtenidas en nuestro análisis,

Los resultados de esta tesis muestran que el mutante *armc9* es un modelo que recapitula las características generales de la EIA de humanos, como la temporalidad y la ausencia de defectos estructurales. No se observaron alteraciones en componentes del LCR ni en el reclutamiento de células inmunes en la región curvada. Sin embargo, se requieren experimentos adicionales ya sea para confirmar estas observaciones, aumentando el N de individuos analizados, o para profundizar en el estudio de los procesos mencionados, como el análisis de la dinámica *in vivo* del flujo del LCR, o la expresión de moléculas inflamatorias tanto en la región curvada como en otras regiones del animal. Por otro lado, gracias a los análisis bioinformáticos se reveló la región de interacción de *Armc9* con *Tog1*, proponiéndose incluso la participación de algunos de los aminoácidos

involucrados en esta. Lo anterior, contribuye a la comprensión de la función del complejo formado por estas proteínas en el cilio primario. Experimentos de mutagénesis dirigida a los aminoácidos propuestos en esta tesis podrán ahondar en el mecanismo bioquímico detrás de la interacción de Armc9 con Tog1. Finalmente, el análisis filogenético mostró que las proteínas ARMC se agrupan en 12 clados, y sugiriendo que 9 de ellos, incluidas las proteínas ARMC9, estaban presentes en el ancestro común de los animales. Estudios posteriores que aborden las relaciones evolutivas más internas de esta familia de proteínas podrán aclarar la historia de la divergencia de las proteínas ARMC desde el ancestro común de los animales hasta los vertebrados.



## 9 Conclusiones

En base a los resultados expuestos en esta tesis, se puede concluir lo siguiente:

1. El mutante *armc9* del pez cebra es un atractivo modelo para el estudio de la escoliosis idiopática adolescente humana.
2. El mutante *armc9*<sup>sa29834</sup> presenta una mutación puntual en el exón 16 que genera un codón de término prematuro, causando la pérdida de parte del dominio ARM-type fold y de la región C-terminal de la proteína Armc9.
3. La curvatura del eje axial observada en el mutante *armc9* se genera en etapa juvenil, y no es consecuencia de deformidades de las vértebras, similar a lo que ocurre en humanos.
4. El mutante *armc9* no presentaría alteraciones en la fibra de Reissner ni en el OSC, al menos en etapas embrionarias del desarrollo.
5. La curvatura axial del mutante *armc9* no sería producida por una respuesta inflamatoria mediada por el reclutamiento de macrófagos en la zona donde se genera la curvatura, al menos en la etapa de desarrollo examinada.
6. El análisis filogenético de la familia de proteínas ARMC no fue resolutiva en las ramas internas, pero sí lo fue en las zonas externas del árbol filogenético. Las 148 proteínas ARMC provenientes de 12 especies de vertebrados e invertebrados se agruparon en 12 clados con un alto soporte estadístico.

7. Nueve de los doce clados, incluido el de ARMC9, estarían presentes en el ancestro común de los animales.
8. Se obtuvieron modelos 3D de la estructura de Armc9 y de Tog1 confiables, gracias al uso de servidores modernos que utilizan algoritmos de *Deep learning* en el modelamiento.
9. La región “Armadillo-type fold” de Armc9 es crucial para la interacción de esta proteína con Togaram1. El mutante, al tener interrumpida esta región, muestra una interacción alterada, uniéndose a través de una región distinta a su blanco.



## 10 Referencias

Ablain, J., Durand, E. M., Yang, S., Zhou, Y., & Zon, L. I. (2015). A CRISPR/Cas9 vector system for tissue-specific gene disruption in zebrafish. *Developmental cell*, 32(6), 756-764.

AlQuraishi, M. (2019). AlphaFold at CASP13. *Bioinformatics*, 35(22), 4862-4865.

Anvarian, Z., Mykytyn, K., Mukhopadhyay, S., Pedersen, L. B., & Christensen, S. T. (2019). Cellular signalling by primary cilia in development, organ function and disease. *Nature Reviews Nephrology*, 15(4), 199-219.

Arkin, A. M. (1949). The mechanism of the structural changes in scoliosis. *JBJS*, 31(3), 519-528.

Arlet, V., Odent, T., & Aebi, M. (2003). Congenital scoliosis. *European Spine Journal*, 12(5), 456-463.

Bagnall, K., Harris, P., & Jones, P. (1977). A radiographic study of the human fetal spine. 1. The development of the secondary cervical curvature. *Journal of anatomy*, 123(Pt 3), 777.

Baschal, E. E., Wethey, C. I., Swindle, K., Baschal, R. M., Gowan, K., Tang, N. L., Alvarado, D. M., Haller, G. E., Dobbs, M. B., & Taylor, M. R. (2015). Exome sequencing identifies a rare HSPG2 variant associated with familial idiopathic scoliosis. *G3: Genes, Genomes, Genetics*, 5(2), 167-174.

Baye, L. M., Patrinostrro, X., Swaminathan, S., Beck, J. S., Zhang, Y., Stone, E. M., Sheffield, V. C., & Slusarski, D. C. (2011). The N-terminal region of centrosomal protein 290 (CEP290) restores vision in a zebrafish model of human blindness. *Human molecular genetics*, 20(8), 1467-1477.

Bearce, E. A., & Grimes, D. T. (2020). On being the right shape: Roles for motile cilia and cerebrospinal fluid flow in body and spine morphology. *Seminars in Cell & Developmental Biology*,

Bobyn, J. D., Little, D. G., Gray, R., & Schindeler, A. (2015). Animal models of scoliosis. *Journal of orthopaedic research*, 33(4), 458-467.

Boswell, C., & Ciruna, B. (2017, Mar). Understanding idiopathic scoliosis: a new zebrafish school of thought. *Trends in Genetics*, 33(3), 183-196. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2017.01.001>

Breslow, D. K., Hoogendoorn, S., Kopp, A. R., Morgens, D. W., Vu, B. K., Kennedy, M. C., Han, K., Li, A., Hess, G. T., & Bassik, M. C. (2018). A CRISPR-based screen for Hedgehog signaling provides insights into ciliary function and ciliopathies. *Nature Genetics*, 50(3), 460-471.

Buchan, J. G., Alvarado, D. M., Haller, G. E., Cruchaga, C., Harms, M. B., Zhang, T., Willing, M. C., Grange, D. K., Braverman, A. C., & Miller, N. H. (2014). Rare variants in FBN1 and FBN2 are associated with severe adolescent idiopathic scoliosis. *Human molecular genetics*, 23(19), 5271-5282.

Buchan, J. G., Gray, R. S., Gansner, J. M., Alvarado, D. M., Burgert, L., Gitlin, J. D., Gurnett, C. A., & Goldsmith, M. I. (2014). Kinesin family member 6 (kif6) is necessary for spine development in zebrafish. *Developmental Dynamics*, 243(12), 1646-1657.

Camacho, C., Coulouris, G., Avagyan, V., Ma, N., Papadopoulos, J., Bealer, K., & Madden, T. L. (2009). BLAST+: architecture and applications. *BMC bioinformatics*, 10(1), 1-9.

Cantaut-Belarif, Y., Sternberg, J. R., Thouvenin, O., Wyart, C., & Bardet, P.-L. (2018). The Reissner fiber in the cerebrospinal fluid controls morphogenesis of the body axis. *Current Biology*, 28(15), 2479-2486. e2474.

Capella-Gutiérrez, S., Silla-Martínez, J. M., & Gabaldón, T. (2009). trimAl: a tool for automated alignment trimming in large-scale phylogenetic analyses. *Bioinformatics*, 25(15), 1972-1973.

Castelein, R. M., van Dieën, J. H., & Smit, T. H. (2005). The role of dorsal shear forces in the pathogenesis of adolescent idiopathic scoliosis—a hypothesis. *Medical hypotheses*, 65(3), 501-508.

Cavalcante, I. P., Nishi, M., Zerbini, M. C. N., Almeida, M. Q., Brondani, V. B., de Arruda Botelho, M. L. A., Tanno, F. Y., Srougi, V., Chambo, J. L., & Mendonca, B. B. (2018). The role of ARMC5 in human cell cultures from nodules of primary macronodular adrenocortical hyperplasia (PMAH). *Molecular and cellular endocrinology*, 460, 36-46.

Chen, Z., Lei, C., Wang, C., Li, N., Srivastava, M., Tang, M., Zhang, H., Choi, J. M., Jung, S. Y., & Qin, J. (2019). Global phosphoproteomic analysis reveals ARMC10 as an AMPK substrate that regulates mitochondrial dynamics. *Nature communications*, 10(1), 1-14.

Cheng, J. C., Castelein, R. M., Chu, W. C., Danielsson, A. J., Dobbs, M. B., Grivas, T. B., Gurnett, C. A., Luk, K. D., Moreau, A., & Newton, P. O. (2015). Adolescent idiopathic scoliosis. *Nature reviews disease primers*, 1(1), 1-21.

Cheung, K. M., Wang, T., Poon, A. M., Carl, A., Tranmer, B., Hu, Y., Luk, K. D., & Leong, J. C. (2005). The effect of pinealectomy on scoliosis development in young nonhuman primates. *Spine*, 30(18), 2009-2013.

Coates, J. C. (2003). Armadillo repeat proteins: beyond the animal kingdom. *Trends in cell biology*, 13(9), 463-471.

Consortium, U. (2019). UniProt: a worldwide hub of protein knowledge. *Nucleic acids research*, 47(D1), D506-D515.

Cuppen, E. (2007). Genotyping by allele-specific amplification (KASPar). *CSH protocols*, 2007, pdb. prot4841-pdb. prot4841.

D'Août, K., Aerts, P., De Clercq, D., De Meester, K., & Van Elsacker, L. (2002). Segment and joint angles of hind limb during bipedal and quadrupedal walking of the bonobo (*Pan paniscus*). *American Journal of Physical Anthropology: The Official Publication of the American Association of Physical Anthropologists*, 119(1), 37-51.

Dafinger, C., Liebau, M. C., Elsayed, S. M., Hellenbroich, Y., Boltshauser, E., Korenke, G. C., Fabretti, F., Janecke, A. R., Ebermann, I., & Nürnberg, G. (2011). Mutations in KIF7 link Joubert syndrome with Sonic Hedgehog signaling and microtubule dynamics. *The Journal of clinical investigation*, 121(7), 2662-2667.

Darriba, D., Taboada, G. L., Doallo, R., & Posada, D. (2011). ProtTest 3: fast selection of best-fit models of protein evolution. *Bioinformatics*, 27(8), 1164-1165.

Day, G., McPhee, I., Tuffley, J., Tomlinson, F., Chaseling, R., Kellie, S., Torode, I., Sherwood, M., Cutbush, K., & Geddes, A. (2007). Idiopathic scoliosis and pineal lesions in Australian children. *Journal of orthopaedic surgery*, 15(3), 327-333.

DeLano, W. L. (2002). Pymol: An open-source molecular graphics tool. *CCP4 Newsl. Protein Crystallogr*, 40(1), 82-92.

Dos Reis, M., Thawornwattana, Y., Angelis, K., Telford, M. J., Donoghue, P. C., & Yang, Z. (2015). Uncertainty in the timing of origin of animals and the limits of precision in molecular timescales. *Current Biology*, 25(22), 2939-2950.



Driever, W., Solnica-Krezel, L., Schier, A., Neuhauss, S., Malicki, J., Stemple, D., Stainier, D., Zwartkruis, F., Abdelilah, S., & Rangini, Z. (1996). A genetic screen for mutations affecting embryogenesis in zebrafish. *Development*, 123(1), 37-46.

Ellett, F., Pase, L., Hayman, J. W., Andrianopoulos, A., & Lieschke, G. J. (2011). mpeg1 promoter transgenes direct macrophage-lineage expression in zebrafish. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 117(4), e49-e56.

Erwin, D. H., Laflamme, M., Tweedt, S. M., Sperling, E. A., Pisani, D., & Peterson, K. J. (2011). The Cambrian conundrum: early divergence and later ecological success in the early history of animals. *Science*, 334(6059), 1091-1097.

Feig, M. (2016). Local protein structure refinement via molecular dynamics simulations with locPREFMD. *Journal of chemical information and modeling*, 56(7), 1304-1312.

Feuda, R., Dohrmann, M., Pett, W., Philippe, H., Rota-Stabelli, O., Lartillot, N., Wörheide, G., & Pisani, D. (2017). Improved modeling of compositional heterogeneity supports sponges as sister to all other animals. *Current Biology*, 27(24), 3864-3870. e3864.

Freidel, K., Petermann, F., Reichel, D., Steiner, A., Warschburger, P., & Weiss, H. R. (2002). Quality of life in women with idiopathic scoliosis. *Spine*, 27(4), E87-E91.

Gao, X., Gordon, D., Zhang, D., Browne, R., Helms, C., Gillum, J., Weber, S., Devroy, S., Swaney, S., & Dobbs, M. (2007). CHD7 gene polymorphisms are associated with susceptibility to idiopathic scoliosis. *The American Journal of Human Genetics*, 80(5), 957-965.

Gorman, K. F., & Breden, F. (2009). Idiopathic-type scoliosis is not exclusive to bipedalism. *Medical hypotheses*, 72(3), 348-352.

Gorman, K. F., Tredwell, S. J., & Breden, F. (2007). The mutant guppy syndrome curveback as a model for human heritable spinal curvature. *Spine*, 32(7), 735-741.

Grauers, A., Rahman, I., & Gerdhem, P. (2012). Heritability of scoliosis. *European Spine Journal*, 21(6), 1069-1074.

Gray, R. S., Gonzalez, R., Ackerman, S. D., Minowa, R., Griest, J. F., Bayrak, M. N., Troutwine, B., Canter, S., Monk, K. R., & Sepich, D. S. (2021). Postembryonic screen for mutations affecting spine development in zebrafish. *Developmental biology*, 471, 18-33.

Grimes, D., Boswell, C., Morante, N., Henkelman, R., Burdine, R., & Ciruna, B. (2016). Zebrafish models of idiopathic scoliosis link cerebrospinal fluid flow defects to spine curvature. *Science*, 352(6291), 1341-1344.

Grimes, D. T. (2019). Developmental biology: go with the flow to keep the body straight. *Current Biology*, 29(3), R101-R103.

Gul, I. S., Hulpiau, P., Saeys, Y., & Van Roy, F. (2017). Metazoan evolution of the armadillo repeat superfamily. *Cellular and molecular life sciences*, 74(3), 525-541.

Gul, I. S., Hulpiau, P., Sanders, E., Van Roy, F., & van Hengel, J. (2019). Armc8 is an evolutionarily conserved armadillo protein involved in cell–cell adhesion complexes through multiple molecular interactions. *Bioscience reports*, 39(8).

Haffter, P., Granato, M., Brand, M., Mullins, M. C., Hammerschmidt, M., Kane, D. A., Odenthal, J., Van Eeden, F., Jiang, Y.-J., & Heisenberg, C.-P. (1996). The identification of genes with unique and essential functions in the development of the zebrafish, *Danio rerio*. *Development*, 123(1), 1-36.

Harvie, E. A., Green, J. M., Neely, M. N., & Huttenlocher, A. (2013). Innate immune response to *Streptococcus iniae* infection in zebrafish larvae. *Infection and immunity*, 81(1), 110-121.

Hassan, A., Parent, S., Mathieu, H., Zaouter, C., Molidperee, S., Bagu, E. T., Barchi, S., Villemure, I., Patten, S. A., & Moldovan, F. (2019). Adolescent idiopathic scoliosis associated POC5 mutation impairs cell cycle, cilia length and centrosome protein interactions. *PLoS One*, 14(3), e0213269.

Hayes, M., Gao, X., Lisa, X. Y., Paria, N., Henkelman, R. M., Wise, C. A., & Ciruna, B. (2014). *ptk7* mutant zebrafish models of congenital and idiopathic scoliosis implicate dysregulated Wnt signalling in disease. *Nature communications*, 5(1), 1-11.

Hayes, M., Naito, M., Daulat, A., Angers, S., & Ciruna, B. (2013). Ptk7 promotes non-canonical Wnt/PCP-mediated morphogenesis and inhibits Wnt/ $\beta$ -catenin-dependent cell fate decisions during vertebrate development. *Development*, 140(8), 1807-1818.

Hjeij, R., Lindstrand, A., Francis, R., Zariwala, M. A., Liu, X., Li, Y., Damerla, R., Dougherty, G. W., Abouhamed, M., & Olbrich, H. (2013). ARMC4 mutations cause primary ciliary dyskinesia with randomization of left/right body asymmetry. *The American Journal of Human Genetics*, 93(2), 357-367.

Howe, K., Clark, M. D., Torroja, C. F., Torrance, J., Berthelot, C., Muffato, M., Collins, J. E., Humphray, S., McLaren, K., & Matthews, L. (2013). The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. *Nature*, 496(7446), 498-503.

Hresko, M. T. (2013). Idiopathic scoliosis in adolescents. *New England Journal of Medicine*, 368(9), 834-841.

Huang, Y., Jiang, Z., Gao, X., Luo, P., & Jiang, X. (2021). ARMC Subfamily: Structures, Functions, Evolutions, Interactions, and Diseases. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 1190.

Huber, A. H., Nelson, W. J., & Weis, W. I. (1997). Three-dimensional structure of the armadillo repeat region of  $\beta$ -catenin. *Cell*, 90(5), 871-882.

Iseki, H., Takeda, A., Andoh, T., Takahashi, N., Kurochkin, I. V., Yarmishyn, A., Shimada, H., Okazaki, Y., & Koyama, I. (2010). Human Arm protein lost in epithelial cancers, on chromosome X 1 (ALEX1) gene is transcriptionally regulated by CREB and Wnt/ $\beta$ -catenin signaling. *Cancer science*, 101(6), 1361-1366.

Jones, P., Binns, D., Chang, H.-Y., Fraser, M., Li, W., McAnulla, C., McWilliam, H., Maslen, J., Mitchell, A., & Nuka, G. (2014). InterProScan 5: genome-scale protein function classification. *Bioinformatics*, 30(9), 1236-1240.

Jumper, J., Evans, R., Pritzel, A., Green, T., Figurnov, M., Ronneberger, O., Tunyasuvunakool, K., Bates, R., Židek, A., & Potapenko, A. (2021). Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature*, 596(7873), 583-589.

Kar, A., Phadke, S. R., Das Bhowmik, A., & Dalal, A. (2018). Whole exome sequencing reveals a mutation in ARMC9 as a cause of mental retardation, ptosis, and polydactyly. *American Journal of Medical Genetics Part A*, 176(1), 34-40.

Karol, L. A., Johnston 2nd, C., Browne, R. H., & Madison, M. (1993). Progression of the curve in boys who have idiopathic scoliosis. *JBJS*, 75(12), 1804-1810.

Kartalija, M., Ovrutsky, A. R., Bryan, C. L., Pott, G. B., Fantuzzi, G., Thomas, J., Strand, M. J., Bai, X., Ramamoorthy, P., & Rothman, M. S. (2013). Patients with nontuberculous mycobacterial lung disease exhibit unique body and immune phenotypes. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 187(2), 197-205.

Katoh, K., & Standley, D. M. (2013). MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Molecular biology and evolution*, 30(4), 772-780.

Kesling, K. L., & Reinker, K. A. (1997). Scoliosis in twins: a meta-analysis of the literature and report of six cases. *Spine*, 22(17), 2009-2014.

Kettleborough, R. N., Busch-Nentwich, E. M., Harvey, S. A., Dooley, C. M., De Bruijn, E., Van Eeden, F., Sealy, I., White, R. J., Herd, C., & Nijman, I. J. (2013). A systematic genome-wide analysis of zebrafish protein-coding gene function. *Nature*, 496(7446), 494-497.

Khanshour, A. M., Kou, I., Fan, Y., Einarsdottir, E., Makki, N., Kidane, Y. H., Kere, J., Grauers, A., Johnson, T. A., & Paria, N. (2018). Genome-wide meta-analysis and replication studies in multiple ethnicities identify novel adolescent idiopathic scoliosis susceptibility loci. *Human molecular genetics*, 27(22), 3986-3998.

Kidd III, A. R., Miskowski, J. A., Siegfried, K. R., Sawa, H., & Kimble, J. (2005). A  $\beta$ -catenin identified by functional rather than sequence criteria and its role in Wnt/MAPK signaling. *Cell*, 121(5), 761-772.

Knowles, M. R., Daniels, L. A., Davis, S. D., Zariwala, M. A., & Leigh, M. W. (2013). Primary ciliary dyskinesia. Recent advances in diagnostics, genetics, and characterization of clinical disease. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 188(8), 913-922.

Konieczny, M. R., Senyurt, H., & Krauspe, R. (2013). Epidemiology of adolescent idiopathic scoliosis. *Journal of children's orthopaedics*, 7(1), 3-9.

Kozakov, D., Hall, D. R., Xia, B., Porter, K. A., Padhorny, D., Yueh, C., Beglov, D., & Vajda, S. (2017). The ClusPro web server for protein-protein docking. *Nature protocols*, 12(2), 255-278.

Latour, B. L., Van De Weghe, J. C., Rusterholz, T. D., Letteboer, S. J., Gomez, A., Shaheen, R., Gesemann, M., Karamzade, A., Asadollahi, M., & Barroso-Gil, M. (2020). Dysfunction of the ciliary ARMC9/TOGARAM1 protein module causes Joubert syndrome. *The Journal of clinical investigation*, 130(8), 4423-4439.

Le Huec, J.-C., Saddiki, R., Franke, J., Rigal, J., & Aunoble, S. (2011). Equilibrium of the human body and the gravity line: the basics. *European Spine Journal*, 20(5), 558-563.

Lessieur, E. M., Song, P., Nivar, G. C., Piccillo, E. M., Fogerty, J., Rozic, R., & Perkins, B. D. (2019). Ciliary genes *arl13b*, *ahi1* and *cc2d2a* differentially modify expression of visual acuity phenotypes but do not enhance retinal degeneration due to mutation of *cep290* in zebrafish. *PLoS One*, *14*(4), e0213960.

Letunic, I., & Bork, P. (2021). Interactive Tree Of Life (iTOL) v5: an online tool for phylogenetic tree display and annotation. *Nucleic acids research*, *49*(W1), W293-W296.

Leung, D. Y., & Geha, S. (1988). Clinical and immunologic aspects of the hyperimmunoglobulin E syndrome. *Hematology/oncology clinics of North America*, *2*(1), 81-100.

Li, D., Song, H., Mei, H., Fang, E., Wang, X., Yang, F., Li, H., Chen, Y., Huang, K., & Zheng, L. (2018). Armadillo repeat containing 12 promotes neuroblastoma progression through interaction with retinoblastoma binding protein 4. *Nature communications*, *9*(1), 1-16.

Liang, X., Men, Q.-L., Li, Y.-w., Li, H.-C., Chong, T., & Li, Z.-l. (2017). Silencing of armadillo repeat-containing protein 8 (ARMC8) inhibits TGF- $\beta$ -induced EMT in bladder carcinoma UMUC3 cells. *Oncology research*, *25*(1), 99.

Lieschke, G. J., & Currie, P. D. (2007). Animal models of human disease: zebrafish swim into view. *Nature Reviews Genetics*, *8*(5), 353-367.

Lleras-Forero, L., Winkler, C., & Schulte-Merker, S. (2020). Zebrafish and medaka as models for biomedical research of bone diseases. *Developmental biology*, *457*(2), 191-205.

Lonstein, J. E. (1999). Congenital spine deformities: scoliosis, kyphosis, and lordosis. *Orthopedic Clinics of North America*, *30*(3), 387-405.

López-Doménech, G., Serrat, R., Mirra, S., D'aniello, S., Somorjai, I., Abad, A., Viturera, N., García-Arumí, E., Alonso, M. T., & Rodríguez-Prados, M. (2012). The Eutherian *Armxc* genes regulate mitochondrial trafficking in neurons and interact with Miro and Trak2. *Nature communications*, *3*(1), 1-12.

Lun, M. P., Monuki, E. S., & Lehtinen, M. K. (2015). Development and functions of the choroid plexus–cerebrospinal fluid system. *Nature Reviews Neuroscience*, *16*(8), 445-457.

Lv, X., Xu, J., Jiang, J., Wu, P., Tan, R., & Wang, B. (2021). Genetic animal models of scoliosis: A systematical review. *Bone*, *152*, 116075.

Machida, M., Dubousset, J., Imamura, Y., Iwaya, T., Yamada, T., & Kimura, J. (1993). An experimental study in chickens for the pathogenesis of idiopathic scoliosis. *Spine*, *18*(12), 1609-1615.

Machida, M., Dubousset, J., Imamura, Y., Miyashita, Y., Yamada, T., & Kimura, J. (1996). Melatonin: a possible role in pathogenesis of adolescent idiopathic scoliosis. *Spine*, *21*(10), 1147-1152.

Machida, M., Murai, I., Miyashita, Y., Dubousset, J., Yamada, T., & Kimura, J. (1999). Pathogenesis of idiopathic scoliosis: experimental study in rats. *Spine*, *24*(19), 1985.

Manolio, T. A., Collins, F. S., Cox, N. J., Goldstein, D. B., Hindorf, L. A., Hunter, D. J., McCarthy, M. I., Ramos, E. M., Cardon, L. R., & Chakravarti, A. (2009). Finding the missing heritability of complex diseases. *Nature*, *461*(7265), 747-753.

Meeker, N. D., Hutchinson, S. A., Ho, L., & Trede, N. S. (2007). Method for isolation of PCR-ready genomic DNA from zebrafish tissues. *Biotechniques*, *43*(5), 610-614.

Mitchison, H. M., & Valente, E. M. (2017). Motile and non-motile cilia in human pathology: from function to phenotypes. *The Journal of pathology*, *241*(2), 294-309.

Morin-Kensicki, E. M., & Eisen, J. S. (1997). Sclerotome development and peripheral nervous system segmentation in embryonic zebrafish. *Development*, *124*(1), 159-167.

Muñoz-Montecinos, C., Romero, A., Sepúlveda, V., Vira, M. Á., Fehrmann-Cartes, K., Marcellini, S., Aguilera, F., Caprile, T., & Fuentes, R. (2022). Turning the Curve Into Straight: Phenogenetics of the Spine Morphology and Coordinate Maintenance in the Zebrafish. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 3973.

Naique, S. B., Porter, R., Cunningham, A. A., Hughes, S. P., Sanghera, B., & Amis, A. A. (2003). Scoliosis in an Orangutan. *Spine*, *28*(7), E143-E145.

Negrini, S., Aulisa, A. G., Aulisa, L., Circo, A. B., De Mauroy, J. C., Durmala, J., Grivas, T. B., Knott, P., Kotwicki, T., & Maruyama, T. (2012). 2011 SOSORT guidelines: orthopaedic and rehabilitation treatment of idiopathic scoliosis during growth. *Scoliosis*, *7*(1), 3.

Negrini, S., Grivas, T. B., Kotwicki, T., Maruyama, T., Rigo, M., & Weiss, H. R. (2006). Why do we treat adolescent idiopathic scoliosis? What we want to obtain and to avoid for our patients. SOSORT 2005 Consensus paper. *Scoliosis*, 1(1), 4.

Oliazadeh, N., Gorman, K. F., Eveleigh, R., Bourque, G., & Moreau, A. (2017). Identification of elongated primary cilia with impaired mechanotransduction in idiopathic scoliosis patients. *Scientific reports*, 7, 44260.

Ouellet, J., & Odent, T. (2013). Animal models for scoliosis research: state of the art, current concepts and future perspective applications. *European Spine Journal*, 22(2), 81-95.

Panattoni, G. L., & Todros, T. (1988). Postural aspects of the human fetal spine. Morphometric and functional study.

Papanastasiou, A. D., Mantagos, S., Papanastasiou, D. A., & Zarkadis, I. K. (2010). A novel mutation in the signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) gene, in hyper-IgE syndrome. *Molecular immunology*, 47(7-8), 1629-1634.

Patten, S. A., Margaritte-Jeannin, P., Bernard, J.-C., Alix, E., Labalme, A., Besson, A., Girard, S. L., Fendri, K., Fraisse, N., & Biot, B. (2015). Functional variants of POC5 identified in patients with idiopathic scoliosis. *The Journal of clinical investigation*, 125(3), 1124-1128.

Pearce, R., & Zhang, Y. (2021). Deep learning techniques have significantly impacted protein structure prediction and protein design. *Current opinion in structural biology*, 68, 194-207.

Peifer, M. (1994). A repeating amino acid motif shared by proteins with diverse cellular roles. *Cell*, 76, 789-791.

Pérez-Machado, G., Berenguer-Pascual, E., Bovea-Marco, M., Rubio-Belmar, P. A., García-López, E., Garzón, M. J., Mena-Mollá, S., Pallardó, F. V., Bas, T., & Viña, J. R. (2020). From genetics to epigenetics to unravel the etiology of adolescent idiopathic scoliosis. *Bone*, 140, 115563.

Pierce, B. G., Wiehe, K., Hwang, H., Kim, B.-H., Vreven, T., & Weng, Z. (2014). ZDOCK server: interactive docking prediction of protein–protein complexes and symmetric multimers. *Bioinformatics*, 30(12), 1771-1773.



Porter, K. A., Desta, I., Kozakov, D., & Vajda, S. (2019). What method to use for protein–protein docking? *Current opinion in structural biology*, 55, 1-7.

Reiter, J. F., & Leroux, M. R. (2017). Genes and molecular pathways underpinning ciliopathies. *Nature reviews Molecular cell biology*, 18(9), 533-547.

Riggleman, B., Wieschaus, E., & Schedl, P. (1989). Molecular analysis of the armadillo locus: uniformly distributed transcripts and a protein with novel internal repeats are associated with a *Drosophila* segment polarity gene. *Genes & development*, 3(1), 96-113.

Robin, G. C., & Stein, H. (1975). Experimental scoliosis in primates: Failure of a technique. *The Journal of bone and joint surgery. British volume*, 57(2), 142-145.

Rodríguez, E. M., Oksche, A., Hein, S., & Yulis, C. R. (1992). Cell biology of the subcommissural organ. In *International review of cytology* (Vol. 135, pp. 39-121). Elsevier.

Rose, C. D., Pompili, D., Henke, K., Van Gennip, J. L., Meyer-Miner, A., Rana, R., Gobron, S., Harris, M. P., Nitz, M., & Ciruna, B. (2020). SCO-Spondin Defects and Neuroinflammation Are Conserved Mechanisms Driving Spinal Deformity across Genetic Models of Idiopathic Scoliosis. *Current Biology*.

Sali, A., Glaeser, R., Earnest, T., & Baumeister, W. (2003). From words to literature in structural proteomics. *Nature*, 422(6928), 216-225.

Sanders, J. L., Watral, V., & Kent, M. L. (2012). Microsporidiosis in zebrafish research facilities. *Ilar Journal*, 53(2), 106-113.

Santoriello, C., & Zon, L. I. (2012). Hooked! Modeling human disease in zebrafish. *The Journal of clinical investigation*, 122(7), 2337-2343.

Saraiva, J. M., & Baraitser, M. (1992). Joubert syndrome: a review. *American journal of medical genetics*, 43(4), 726-731.

Satir, P., & Christensen, S. T. (2007). Overview of structure and function of mammalian cilia. *Annu. Rev. Physiol.*, 69, 377-400.

Sayer, J. A., Otto, E. A., O'Toole, J. F., Nurnberg, G., Kennedy, M. A., Becker, C., Hennies, H. C., Helou, J., Attanasio, M., & Fausett, B. V. (2006). The centrosomal protein



nephrocystin-6 is mutated in Joubert syndrome and activates transcription factor ATF4. *Nature Genetics*, 38(6), 674-681.

Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., & Schmid, B. (2012). Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature methods*, 9(7), 676-682.

Shimada, K., Park, S., Miyata, H., Yu, Z., Morohoshi, A., Oura, S., Matzuk, M. M., & Ikawa, M. (2021). ARMC12 regulates spatiotemporal mitochondrial dynamics during spermiogenesis and is required for male fertility. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 118(6), e2018355118.

Song, Z., Zhang, X., Jia, S., Yelick, P. C., & Zhao, C. (2016). Zebrafish as a model for human ciliopathies. *Journal of Genetics and Genomics*, 43(3), 107-120.

Srivastava, S., Ramsbottom, S. A., Molinari, E., Alkanderi, S., Filby, A., White, K., Henry, C., Saunier, S., Miles, C. G., & Sayer, J. A. (2017). A human patient-derived cellular model of Joubert syndrome reveals ciliary defects which can be rescued with targeted therapies. *Human molecular genetics*, 26(23), 4657-4667.

Stamatakis, A. (2014). RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics*, 30(9), 1312-1313.

Studer, G., Rempfer, C., Waterhouse, A. M., Gumienny, R., Haas, J., & Schwede, T. (2020). QMEANDisCo—distance constraints applied on model quality estimation. *Bioinformatics*, 36(6), 1765-1771.

Sung, Y. H., Kim, J. M., Kim, H.-T., Lee, J., Jeon, J., Jin, Y., Choi, J.-H., Ban, Y. H., Ha, S.-J., & Kim, C.-H. (2014). Highly efficient gene knockout in mice and zebrafish with RNA-guided endonucleases. *Genome research*, 24(1), 125-131.

Terhune, E. A., Cuevas, M. T., Monley, A. M., Wethey, C. I., Chen, X., Cattell, M. V., Bayrak, M. N., Bland, M. R., Sutphin, B., & Trahan, G. D. (2021). Mutations in KIF7 implicated in idiopathic scoliosis in humans and axial curvatures in zebrafish. *Human mutation*, 42(4), 392-407.

Tewari, R., Bailes, E., Bunting, K. A., & Coates, J. C. (2010). Armadillo-repeat protein functions: questions for little creatures. *Trends in cell biology*, 20(8), 470-481.

Troutwine, B. R., Gontarz, P., Konjikusic, M. J., Minowa, R., Monstad-Rios, A., Sepich, D. S., Kwon, R. Y., Solnica-Krezel, L., & Gray, R. S. (2020). The Reissner fiber is highly dynamic in vivo and controls morphogenesis of the spine. *Current Biology*.

Valente, E. M., Silhavy, J. L., Brancati, F., Barrano, G., Krishnaswami, S. R., Castori, M., Lancaster, M. A., Boltshauser, E., Boccone, L., & Al-Gazali, L. (2006). Mutations in CEP290, which encodes a centrosomal protein, cause pleiotropic forms of Joubert syndrome. *Nature Genetics*, 38(6), 623-625.

Van De Weghe, J. C., Rusterholz, T. D., Latour, B., Grout, M. E., Aldinger, K. A., Shaheen, R., Dempsey, J. C., Maddirevula, S., Cheng, Y.-H. H., & Phelps, I. G. (2017). Mutations in ARMC9, which encodes a basal body protein, cause Joubert syndrome in humans and ciliopathy phenotypes in zebrafish. *The American Journal of Human Genetics*, 101(1), 23-36.

Van Gennip, J., Boswell, C., & Ciruna, B. (2018). Neuroinflammatory signals drive spinal curve formation in zebrafish models of idiopathic scoliosis. *Science advances*, 4(12), eaav1781.

Wagner, F., Kunz, T. C., Chowdhury, S. R., Thiede, B., Fraunholz, M., Eger, D., & Kozjak-Pavlovic, V. (2019). Armadillo repeat-containing protein 1 is a dual localization protein associated with mitochondrial intermembrane space bridging complex. *PLoS One*, 14(10), e0218303.

Wang, L., & Dynlacht, B. D. (2018). The regulation of cilium assembly and disassembly in development and disease. *Development*, 145(18).

Weng, G., Wang, E., Wang, Z., Liu, H., Zhu, F., Li, D., & Hou, T. (2019). HawkDock: a web server to predict and analyze the protein–protein complex based on computational docking and MM/GBSA. *Nucleic acids research*, 47(W1), W322-W330.

Wheatley, D. N., Wang, A. M., & Strugnell, G. E. (1996). Expression of primary cilia in mammalian cells. *Cell biology international*, 20(1), 73-81.

Wiederstein, M., & Sippl, M. J. (2007). ProSA-web: interactive web service for the recognition of errors in three-dimensional structures of proteins. *Nucleic acids research*, 35(suppl\_2), W407-W410.

Wloga, D., Joachimiak, E., Louka, P., & Gaertig, J. (2017). Posttranslational modifications of tubulin and cilia. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 9(6), a028159.

Wu, Z., Pang, N., Zhang, Y., Chen, H., Peng, Y., Fu, J., & Wei, Q. (2020). CEP290 is essential for the initiation of ciliary transition zone assembly. *PLoS biology*, 18(12), e3001034.

Wynne-Davies, R. (1968). Familial (idiopathic) scoliosis: a family survey. *The Journal of bone and joint surgery. British volume*, 50(1), 24-30.

Xie, H., Li, M., Kang, Y., Zhang, J., & Zhao, C. (2022). Zebrafish: an important model for understanding scoliosis. *Cellular and molecular life sciences*, 79(9), 506.

Xiong, S., Wu, J., Jing, J., Huang, P., Li, Z., Mei, J., & Gui, J.-F. (2017). Loss of stat3 function leads to spine malformation and immune disorder in zebrafish. *Science Bulletin*, 62(3), 185-196.

Xue, L. C., Rodrigues, J. P., Kastritis, P. L., Bonvin, A. M., & Vangone, A. (2016). PRODIGY: a web server for predicting the binding affinity of protein–protein complexes. *Bioinformatics*, 32(23), 3676-3678.

Yang, J., Anishchenko, I., Park, H., Peng, Z., Ovchinnikov, S., & Baker, D. (2020). Improved protein structure prediction using predicted interresidue orientations. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 117(3), 1496-1503.

Yang, J., & Zhang, Y. (2015). I-TASSER server: new development for protein structure and function predictions. *Nucleic acids research*, 43(W1), W174-W181.

Zamborský, R., Liščák, B., Trepáč, M., Švec, A., & Danisovič, Ľ. (2019). Adolescent Idiopathic Scoliosis-Future Molecular-Based Diagnostic and Prognostic Testing. *Ortopedia, Traumatologia, Rehabilitacja*, 21(4), 253-260.

Zhang, X., Jia, S., Chen, Z., Chong, Y. L., Xie, H., Feng, D., Wu, X., Song, D. Z., Roy, S., & Zhao, C. (2018). Cilia-driven cerebrospinal fluid flow directs expression of urotensin neuropeptides to straighten the vertebrate body axis. *Nature Genetics*, 50(12), 1666-1673.