



Universidad de Concepción  
Dirección de Postgrado  
Facultad de Ciencias Biológicas  
Programa de Doctorado en ciencias biológicas área Biología Celular y Molecular

**Rol de la pareja regulatoria Sp7/Dlx5  
en la emergencia del esqueleto mineralizado en  
vertebrados**

**Tesis para optar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas  
Área Biología Celular y Molecular**

**DAVID NICOLAS MUÑOZ MAULÉN  
CONCEPCIÓN-CHILE  
2020**

Profesor guía: Dr. Sylvain Marcellini Liotaud  
Departamento de Biología Celular y Molecular

Facultad de Ciencias Biológicas

Universidad de Concepción

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

Profesores integrantes Comisión Evaluadora:

---

Dr. Sylvain Marcellini L.  
Profesor Guía de Tesis  
Facultad de Ciencias Biológicas

---

Dra. Marcela Torrejon Q.  
Facultad de Ciencias Biológicas

---

Dr. José Gutiérrez C.  
Facultad de Ciencias Biológicas

---

Dr. Giancarlo De Ferrari V.  
Profesor Evaluador Externo  
Universidad Andrés Bello

---

Dr. Ariel Castro A.  
Director  
Programa Doctorado en Ciencias Biológicas  
Área Biología Celular y Molecular

**DEDICATORIA**

*Para todo aquel que busca la verdad con sinceridad y entrega*



## **AGRADECIMIENTOS**

Mis agradecimientos a mi familia central Gloria y Pía que han sido mi compañía, mi amor, mi visión distinta de la vida que han hecho de esta intensa experiencia de 5 años una historia digna de narrar, bendita su paciencia. Agradezco a Sylvain por ser un tutor responsable y dedicado, a Adrián por ser un colega incansable, a Fret por ser un buen amigo, a Héctor por dar las ideas precisas en el momento adecuado. Nuestro equipo de trabajo por estos años ha sido productivo gracias a la buena comunicación y compromiso.

Agradezco a nuestros colaboradores internacionales al Dr. Hector Escrivá y la Dra. Stephanie Bertrand y a su equipo Lydvina, Lucie y Anthony por ser amigables y acogedores durante mi estadía en Francia, fue una agradable experiencia aprender sobre los anfibios. A la Dra Melanie Debiais-Thibaud y su incalculable aporte a la tesis por facilitar las muestras de los embriones del tiburón elefante y por las colaboraciones en las publicaciones. Así también, las colaboraciones del Edificio de biología Molecular a los Laboratorio del Dr Henríquez, Dr. Nualart, Dra. María de los Ángeles Rodríguez, Dra. Marcela Torrejón y Dra. Amparo Uribe, gracias a todos ellos y a sus integrantes por apoyarnos incondicionalmente con reactivos, equipos y protocolos. A mi amigo Cristian Gidi, que discutimos cuestiones científicas, políticas e histórica haciendo ameno las esperas de los experimentos. También agradezco a nuestros colaboradores del centro de biotecnología, me refiero a la Dra. Valentina Valenzuela, Dr. Cristian Gallardo y Paula González que nos facilitaron amablemente los equipos

Tesis de Doctorado Financiado por:

Beca Universidad de Concepción para postgrado (2016)

Beca CONICYT para estudios de Doctorado Nacional (2017-2020)

Gastos Operacionales CONICYT folio 21170393 (2019)

Proyecto FONDECYT REGULAR #111196

## ÍNDICE

Contenido	
ÍNDICE .....	I
ÍNDICE DE FIGURAS .....	V
ÍNDICE DE TABLAS .....	VI
GLOSARIO .....	VII
RESUMEN .....	IX
ABSTRACT .....	X
1. INTRODUCCIÓN .....	1
1.1. Origen evolutivo de los tejidos mineralizados en los vertebrados .....	1
1.1.1 Emergencia de los tejidos esqueléticos en los cordados .....	1
1.1.2 Registro fósil de conodontos ofrece pautas sobre el origen entre hueso y dentina .....	2
1.1.3 En Ostracodermos emergió el esqueleto mineralizado con hueso acelular .....	3
1.1.4 En placodermos la dentina está restringida en los dientes y el dermoesqueleto es de hueso celular .....	5
1.1.5 Historia dinámica de hueso y dentina en gnatóstomos vivos .....	5
1.2 Características celulares y moleculares entre osteoblastos y odontoblastos .....	6
1.2.1 Diferencias y similitudes celulares entre osteoblastos/osteocitos y odontoblastos .....	6
1.2.2 Estudios moleculares ofrecen nuevos horizontes para entender la homología entre hueso y dentina .....	8
1.3 Red regulatoria génica: como las interacciones entre MCRs y promotores definen programas genéticos .....	8
1.3.1 Promotores basales y módulos cis-regulatorios .....	8
1.3.2 Tecnologías de next generation han permitido identificar MCRs putativos: .....	9
1.3.3 Red regulatoria génica de mineralización: rol de Sp7 y Dlx5 .....	12
1.4 Los factores de transcripción Sp7 y Dlx5 son claves para entender el origen evolutivo entre hueso y dentina .....	13
1.4.1 Defectos de Dlx5 genera fenotipos ancestrales .....	13
1.4.2 Historia evolutiva de Sp7 coincide con la presencia/ausencia de dentina y hueso .....	13
1.4.3 Cambios drásticos en la función molecular de Sp7 coinciden con el origen de hueso y dentina en gnatóstomos .....	14
1.5 Modelos animales para entender la evolución de tejidos mineralizados .....	16
1.5.1 La rana africana: <i>Xenopus tropicalis</i> , .....	17
1.5.2 El tiburón elefante: <i>Callorhynchus milii</i> .....	17
1.5.3 El anfibio lanceta: <i>Branchiostoma lanceolatum</i> .....	18
1.5.4 Ensayos de expresión de heterólogos .....	18
1.6 Hipótesis y objetivos .....	20
2. MATERIALES Y MÉTODOS .....	21
2.1. Bioterio, y preparación de los tejidos .....	21
2.2. Diseño de partidores y plásmidos .....	21

**Comentado [L1]:** Revisar el paginado. En general hay un desfase de 1 página respecto de lo que se indica en el índice.

2.2.1. Identificación de Marcos de lectura de factores de transcripción .....	21
2.2.2. Plásmido pBLRP contiene ML de Sp7 de <i>Callorhinchus milli</i> o SpC de <i>Branchiostoma floridae</i> .....	22
2.3. PCR: Amplificación de fragmentos de ADN .....	23
2.3.1. Generación de ADNc a partir de tejidos óseos mediante RT-PCR.....	23
2.3.2. Amplificación de ADNc mediante PCR de alta fidelidad .....	23
2.4. Generación de bacterias competentes .....	24
2.4.1. Bacterias Calcio-competentes.....	24
2.4.2. Bacterias Electro-competentes.....	24
2.5. Clonación molecular .....	24
2.5.1. Clonación mediante ligación.....	25
2.5.2. Transformación bacteriana.....	25
2.5.3. Purificación de plásmidos.....	26
2.5.4. Digestiones analíticas mediante enzimas de restricción.....	26
2.5.5. Electroforesis en geles de agarosa .....	26
2.6. Reacción de transcripción con UTP-DIG .....	26
2.6.1. Linearización de plásmidos .....	27
2.6.2. Reacción de transcripción y purificación de sondas ARN-Dig mediante precipitación con LiCl <sub>2</sub> .....	27
2.7. Hibridación in situ.....	27
2.7.1. HIS en cortes embebidos en parafina en tejidos mineralizados de <i>Xenopus tropicalis</i> y <i>Callorhincus milii</i> .....	27
2.7.2. HIS en embrión completo de <i>Branchiostoma lanceolatum</i> .....	29
2.8. Análisis Histológicos .....	30
2.8.1. Tinción Hematoxilina-Cromotopo.....	30
2.8.2. Tinción de Von-kossa .....	30
2.8.3. Tinción Tricrómico de Masson.....	30
2.9. Tecnología de clonamiento Gateway .....	30
2.9.1. Vectores Entry-FT obtenidos por reacciones Gateway BP .....	30
2.9.2. Construcción del vector CMV:BirA-Cherry/CMV:[R1-orf-R2] .....	31
2.9.3. Generación de vectores de expresión de factores de transcripción biotinilables mediante reacción de recombinación Gateway LR.....	32
2.10. Cultivo primario de osteoblastos a partir de calvarias de <i>Xenopus tropicalis</i> .....	33
2.11. Transfección en células HEK293 y electroporación en cultivo primario de osteoblastos ...	34
2.11.1. Transfección mediante Lipofectamina en la línea celular HEK293.....	34
2.11.2. Electroporación en Cultivo primario de osteoblastos mediante el sistema Neon. ....	34
2.12. Fluorescencia por afinidad.....	35
2.13. Western blot contra proteínas biotiniladas sobreexpresadas en HEK293 .....	35
2.13.1 Extracción de proteínas a partir de HEK293 Lipotransfectadas .....	35
2.13.2 Western blotting utilizando Streptavidina conjugada con Horseradish .....	36

2.14. Citometría de flujo .....	36
2.14.1. Preparación de células HEK293 y osteoblastos electroporados para citometría de flujo .....	36
2.15. ATAC-seq.....	37
2.15.1 Reacción de tagmentación .....	37
2.15.2 Amplificación de ADN transposado .....	38
2.15.3 Análisis informáticos sobre librería de ADN transposado .....	39
2.16. Precipitación por afinidad de la cromatina y secuenciación de alto rendimiento utilizando tecnología de transposas hiperactivada Tn5 (HT-CHAPmentacion) .....	40
2.16.1 Entrecruzamiento con formaldehído al 1%.....	40
2.16.2 Extracción de núcleos mediante Sonicación (NEXSON) .....	40
2.16.3 Fragmentación de la cromatina .....	41
2.16.4 Precipitación de la cromatina por afinidad biotina-estreptavidina .....	41
2.16.5 Reacción de tagmentación .....	42
2.16.6 Preparación de la librería para secuenciación masiva .....	42
3. RESULTADOS .....	44
3.1. Expresión esquelética del módulo regulatorio Sp7/Dlx5.....	44
3.1.1 Búsqueda de genes parálogos de la familia SP en el genoma de <i>Xenopus tropicalis</i> ...	44
3.1.2 Alineamiento de secuencia de aminoácidos de los miembros del clado Sp6-Sp9 .....	45
3.1.3 Análisis filogenético de la familia SP en vertebrados.....	46
3.1.4 Análisis de la expresión de la familia Dlx en <i>Xenopus tropicalis</i> .....	47
3.1.5 Patrón de expresión espacio-temporal del módulo regulatorio Sp7/Dlx5 en Cordados .....	48
3.2 Co-unión de Sp7/Dlx5 a enhancer esqueléticos.....	54
3.2.1 Detección de proteínas biotiniladas en cultivo primario de osteoblastos de <i>Xenopus tropicalis</i> .....	54
3.2.2 Preparación de la cromatina usando ultrasonificación.....	55
3.2.3 Clasificación de células (Cell sorting).....	57
3.2.4 Generación de librería HT-CM .....	60
3.2.5 ATAC-seq .....	62
4. DISCUSIÓN.....	67
4.1. Los factores de transcripción Sp6 y Sp7 son una novedad evolutiva de los Gnatóstomos ..	67
4.2. Los factores de transcripción Sp8 y Sp9 conservan la expresión de su ortólogo SpC de <i>Branchiostoma</i> .....	68
4.3 Los miembros de la familia Dlx conservan la expresión ancestral de Dll .....	68
4.4 Co-expresión de genes Sp/Dlx en metazoa .....	68
4.5 Co-opción del módulo Sp7/Dlx5 en el ancestro de los gnatóstomos .....	69
4.6 Expresión de Col1a1 y Col2a1 en placa dental de <i>Callorhinchus milii</i> da luces sobre el origen de hueso, dentina y cartílago .....	70
4.7 ATAC-seq revela arquitectura regulatoria de genes que participan en la mineralización .....	71
5. CONCLUSIÓN.....	73
6. PERSPECTIVAS .....	74

6.1 Patrón de expresión de la familia Sp .....	74
6.2 Nueva hipótesis ancestral del módulo Sp/DII en cordados .....	74
6.3 Secuenciación de librerías de HT-CM y análisis funcional de MCR .....	74
7. ANEXOS.....	75
8. REFERENCIAS.....	81





## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Tejidos esqueléticos presentes en cordados. A la izquierda son representadas las relaciones filogenéticas dentro de los cordados entre Branchiostoma, Ciclostomos, Gnatostomos raíz o fósiles, Osteíctios y Condrictios.	2
Figura 2. Distribución evolutiva de tejidos mineralizados en gnatostomos.	4
Figura 3. Similitudes celulares y moleculares entre osteoblastos/osteocitos y odontoblastos sugieren una red regulatoria génica común.	7
Figura 4. Técnicas de <i>next-generation</i> permiten identificar elementos regulatorios.	10
Figura 5. Sp7 pertenece a la familia Sp y es co-factor de Dlx5 regulando MCR esqueléticos.	16
Figura 6. Esquema del plásmido pBLRP.	23
Figura 7. Esquema de reacción Gateway BP para obtener vectores pENTRY-FT.	31
Figura 8. Esquema de construcción del vector pDestino-FT.	32
Figura 9. Esquema de reacción de recombinación Gateway LR.	33
Figura 10. Niveles relativos de expresión de genes de los miembros de la familia SP en distintos tejidos de <i>Xenopus tropicalis</i> .	45
Figura 11. Alineamiento muestra regiones conservadas de aminoácidos entre los ortólogos de la familia SP en gnatostomos.	46
Figura 12. Niveles relativos de expresión de genes de los miembros de la familia DLX en distintos tejidos de <i>Xenopus tropicalis</i> .	48
Figura 13. Los genes SpC (Sp6/7/8/9) y Dll están coexpresados en estructuras neuronales durante el desarrollo embrionario de <i>Branchiostoma lanceolatum</i> .	49
Figura 14. Los genes Sp7 y Dlx5 están coexpresados en odontoblastos en estadio 34 del desarrollo de <i>Callorhinchus milii</i> .	51
Figura 15. Análisis histológicos de la placa dental de <i>Callorhinchus milii</i> en estadio de eclosión.	52
Figura 16. Los genes Sp7 y Dlx5 están coexpresados en osteoblastos y odontoblastos en <i>Xenopus tropicalis</i> .	53
Figura 17. Detección de Factores de transcripción biotinilados por BirA mediante fluorescencia por afinidad en cultivo primario de osteoblastos de <i>Xenopus tropicalis</i> .	55
Figura 18. Lisis celular mediante NEXSON en osteoblastos primarios de <i>Xenopus tropicalis</i> permite la la correcta fragmentación de la cromatina para su precipitación.	57
Figura 19. Ensayo FACS para evaluar reporteros de vector de expresión BirA en línea celular HEK293.	58

Figura 20. Ensayo de fluorescencia por afinidad en línea celular HEK293 que sobreexpresa el factor de transcripción Sp7 de <i>Xenopus tropicalis</i> y clasificados por FACS.	59
Figura 21. Ensayo FACS para evaluar reporteros de vector de expresión BirA en osteoblastos primarios de <i>Xenopus tropicalis</i> .	60
Figura 22. Librerías de ChAPmentación de alto rendimiento generados a partir de 10,000 osteoblastos electroporados de <i>Xenopus tropicalis</i> con vectores de expresión BirA.	61
Figura 23. Generación de librería de ADN transposado para ATAC-seq de osteoblastos nativos de calvarias de <i>Xenopus tropicalis</i> .	62
Figura 24. Identificación de MCR putativos en genes sobreexpresados en osteoblastos de <i>Xenopus tropicalis</i> .	64
Figura 25. Arquitectura regulatoria de <i>Klf4</i> .	66
Figura 26. Modelo evolutivo del módulo regulatorio sp/dll en metazoa.	70
Figura Anexo 1: Relaciones filogenéticas de la familia SP.	75
Figura Anexo 2. Electroporación del vector de expresión TBP biotinilable en cultivo primario de osteoblastos de <i>Xenopus tropicalis</i> .	76

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Resumen de estudios de genómica, función y expresión de sp7 en hueso y dentina de distintas especies de vertebrados.	14
Tabla 2. Partidores para clonamiento de ML de H3, GFP, TBP, CTCF, Sp7 y Dlx5 de <i>Xenopus tropicalis</i> .	22
Tabla 3. Reactivos utilizados para amplificar el ADN transposado.	38
Tabla 4. Secuencia de <i>Primers</i> Nextera utilizadas para generar las distintas librerías.	39
Tabla 5. Reactivos utilizados para amplificar librería de HT-Chapmentación.	42
Tabla 6. Referencias genómicas de las unidades de transcripción de los miembros de la familia SP de <i>Xenopus tropicalis</i> .	44
Tabla 7. Referencias genómicas de las unidades de transcripción de los miembros de la familia SP de <i>Xenopus tropicalis</i> .	47
Tabla Anexo 1. Lista de genes fuertemente regulados durante diferenciación ósea.	77-79
Tabla Anexo 2. Análisis de motivos en los 4 MCR del gen <i>Klf4</i> .	80

## GLOSARIO

Actinopterigios: Son un grupo de animales vertebrados Osteíctios con aletas radiadas. Incluyen a los peces teleósteos.

Anfioxo: Invertebrado perteneciente a los cefalocordados que posee notocorda, cordón nervioso dorsal hueco, hendiduras faríngeas, cola post-anal y una cabeza.

Aspidina: Es un tipo de hueso acelular encontrado en algunos fósiles de Ostracodermos.

Ciclóstomas: Vertebrados que no poseen mandíbulas. Poseen un esqueleto cartilaginoso reducido, con una notocorda que persiste en la fase adulta. Poseen una boca con dientes córneos (queratina). No hay hueso o dentina y no se aprecia mineralización esquelética.

Condrictios (peces cartilagosos): Son un grupo de animales vertebrados que poseen un endoesqueleto de cartilago, mandíbulas y dentición. El tegumento o su sistema de protección, tiene escamas placoides (odontodos) que se forman en la dermis y emergen atravesando la epidermis. No presentan hueso pero se ha demostrado que provienen de ancestro con tejido óseo.

Esqueleto dérmico: Un sistema de formaciones óseas que se desarrolla en la capa conectiva de la piel, o dermal, de vertebrados.

Grupo troncal: Dentro del contexto filogenético y paleontológico, corresponde al grupo de animales extintos que están ubicados entre el ancestro común más cercano entre dos grupos de especies con representantes vivos.

Gnatóstomos: Son un grupo de animales vertebrados que se clasifican por poseer mandíbulas articuladas. Incluyen a los Osteíctios y Condrictios.

Invertebrado: Grupo de animales que no son vertebrados, que no poseen columna vertebral y cráneo.

Odontodo: Son unidades mineralizadas repetidas compuestas de dentina y cubiertas por esmalte que rodean una cavidad pulpal. Se encuentran ya sea rodeando el aparato oral (Por ejemplo, dentículos faríngeos) o en la superficie del cuerpo (Por ejemplo, escamas de tiburones).

Osteíctios (peces óseos): Son un grupo de vertebrados que poseen un endoesqueleto óseo, mandíbulas y dentición. Incluyen a los peces teleósteos, anfibios y mamíferos y excluyen los ciclostomas y Condrictios.

Ostracodermos: Son un grupo de vertebrados amandibulados extintos que se caracterizaban por estar recubiertos de escamas y una coraza mineralizada. Solo se conocen como fósiles.

Red Regulatoria Génica: Es la sumatoria de todas las interacciones funcionales entre las regiones génicas que interactúan entre sí y sus reguladores (factores de transcripción, microRNA, etc) que modifican la actividad de genes que participan en un proceso biológico específico.

Sarcopterigios: Son un grupo de animales vertebrados Osteíctios con aletas lobuladas. Incluyen al celacanto, anfibios y mamíferos.

Vertebrado (Craniata): Grupo de animales que se caracterizan por poseer un cuerpo con simetría bilateral, segmentado en tres partes, cabeza, tronco y cola. Además poseen un cráneo que protege al cerebro, y un esqueleto cartilaginoso u óseo con columna vertebral, compuesta de vértebras. Durante la fase embrionaria desarrollan la notocorda que posteriormente es sustituido por la columna vertebral.



## RESUMEN

El éxito evolutivo de los vertebrados ha sido asociado a la emergencia de tejidos esqueléticos mineralizados. Sin embargo, el origen de hueso y dentina no ha sido resuelto y se desconoce si ambos tejidos aparecieron de forma independiente, conjuntamente, o si uno derivó del otro. Una vía para abordar esta problemática yace, por un lado, en la expresión común de genes entre osteoblastos y odontoblastos, y por el otro, en el módulo regulatorio Sp7/Dlx5, ya que la pérdida de función de ambos factores de transcripción conlleva a defectos de la mineralización en vertebrados. Además, Sp7 actúa como co-factor de Dlx5 uniéndose a módulos cis-regulatorios (MCR) esqueléticos en mamíferos. Esto evidencia la existencia de una red regulatoria génica común de mineralización donde el módulo Sp7/Dlx5 participa. Por lo tanto, para entender la participación del módulo Sp7/Dlx5 en vertebrados nos planteamos determinar la conservación evolutiva de la pareja regulatoria Sp7/Dlx5, a nivel de su co-expresión, y de su capacidad para unirse a módulos cis-regulatorios de genes expresados en osteoblastos y odontoblastos. Para ello evaluamos la co-expresión de los homólogos de *Sp7* y *Dlx5* en larvas de *Branchiostoma lanceolatum* (*Bl*) y en elementos esqueléticos de *Callorhincus milli* (*Cm*) y *Xenopus tropicalis* (*Xt*), así como también determinamos si los homólogos de Sp7 de *Bl*, *Cm* y *Xt* son capaces de co-unirse con Dlx5 a MCR de genes expresados tanto en osteoblastos como en odontoblastos. Efectivamente, Sp7/Dlx5 están co-expresados en osteoblastos y odontoblastos en *Xt*, y en odontoblastos de la región hipermineralizada de la placa dental de *Cm*. Además, los ortólogos SpC/Dll están co-expresados en tejido neuronal en cordados. Determinamos los MCR putativos que contienen sitios de unión para Dlx5 en genes que están expresados tanto en osteoblastos como en odontoblastos mediante ATAC-seq, ChIP-seq y ARN-seq. Evidenciamos que el módulo Sp7/Dlx5 surgió en el ancestro de los gnatóstomos asociado al programa de mineralización de hueso y dentina, y que el módulo Sp/Dll es antiguo y ancestralmente neuronal. Se sugiere fuertemente que los MCR putativos asociados a genes de mineralización poseen motivos de unión a Dlx5. Esta tesis argumenta la existencia de una red regulatoria génica común entre osteoblastos y odontoblastos dependiente del módulo Sp7/Dlx5 reclutada en el ancestro de los gnatóstomos indicando que hueso y dentina son homólogos.

**Comentado [L2]:** Falta mejorar la gramática, principalmente en términos de ubicación de las comas.

## ABSTRACT

The evolutionary success of vertebrates has been associated with the emergence of mineralized skeletal tissues, however, the origin of bone and dentin has not been resolved, and it is unknown whether both tissues appeared independently, together, or if one derived from the other. One way to address this problem lies, on the one hand, in the common expression of genes between osteoblasts and odontoblasts and, on the other, in the Sp7/Dlx5 regulatory module, since the loss of function of both transcription factors leads to mineralization defects in vertebrates. In addition, Sp7 acts as a co-factor of Dlx5 binding to skeletal enhancer in mammals. This shows the existence of a common mineralization gene regulatory network where the Sp7/Dlx5 module participates. Therefore, to understand the participation of the Sp7/Dlx5 module in vertebrates, we set out to determine the evolutionary conservation of the regulatory couple Sp7/Dlx5, at the level of its co-expression, and its ability to bind to cis-regulatory gene modules expressed in osteoblasts and odontoblasts. To do this, we evaluated the co-expression of the Sp7 and Dlx5 homologues in *Branchiostoma lanceolatum* (Bl) larvae and in skeletal elements of *Callorhincus milii* (Cm) and *Xenopus tropicalis* (Xt), thus also determining if the Sp7 homologues of Bl, Cm and Xt are able to co-bind with Dlx5 to cis-regulatory modules of genes expressed in both osteoblasts and odontoblasts. Indeed, Sp7/Dlx5 are co-expressed in osteoblasts and odontoblasts in Xt, and in odontoblasts of the hypermineralized region of dental plaque in Cm. Furthermore, SpC/Dll orthologs are co-expressed in chordate neuronal tissue. We determined putative CRMs that contain binding sites for Dlx5 in genes that are expressed in both osteoblasts and odontoblasts by ATAC-seq, ChIP-seq, and RNA-seq. We show that the Sp7/Dlx5 module arose in the ancestor of the gnathostomes associated with the mineralization program of bone and dentin, and that the Sp/Dll module is ancient and ancestrally neuronal. It is strongly suggested that putative CRMs associated with mineralization genes possess Dlx5 binding motifs. This thesis argues the existence of a common gene regulatory network between osteoblasts and odontoblasts dependent on the Sp7/Dlx5 module recruited in the ancestor of gnathostomes, indicating that bone and dentin are homologous.

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1. Origen evolutivo de los tejidos mineralizados en los vertebrados.

Los tejidos mineralizados como cartílago, hueso, dentina y esmalte, son innovaciones evolutivas de los vertebrados que les ha permitido adaptarse a diferentes nichos ecológicos. Dada su dureza, los fósiles de huesos y dientes han permitido reconstruir la historia evolutiva de los sistemas esqueléticos.

No obstante, surgen las preguntas ¿Cuál es el origen de estos tejidos mineralizados? ¿Existe homología entre hueso y dientes? Para responder estas preguntas es necesario entender el contexto actual de la biología de la mineralización y es que la mayoría de los estudios están centrados en mamíferos existiendo un importante sesgo **en el campo de la mineralización**. Por lo tanto, para entender la historia evolutiva de estos tejidos mineralizados es necesario estudiar otras especies.

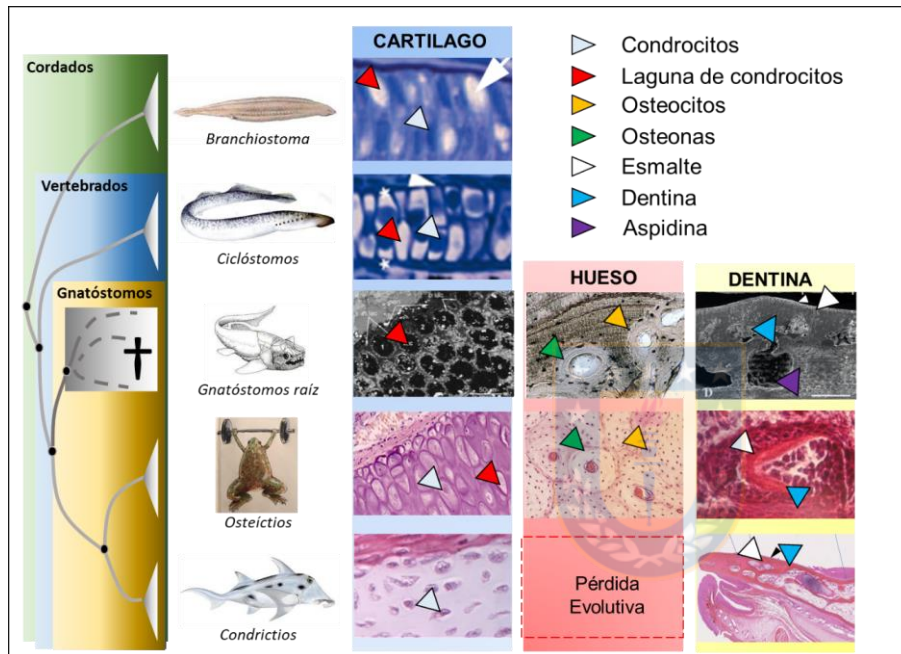
#### 1.1.1 Emergencia de los tejidos esqueléticos en los cordados

Los cordados son un grupo animal evolutivamente interesante, debido a que presentan los planes corporales con mayor adaptabilidad que les ha permitido ocupar la mayoría de los nichos ecológicos. Estos se caracterizan por presentar notocorda, cordón nervioso tubular dorsal, hendiduras faríngeas, endostilo y cola postanal [1]. Estas características están presentes durante el desarrollo embrionario, aunque en algunos grupos como los Tunicados pueden desaparecer en estadios avanzados de su ciclo vital. Los cordados se pueden organizar filogenéticamente en tres grupos: **tunicados**, **cefalocordados** y **vertebrados** [1]. Los Tunicados son los invertebrados filogenéticamente más cercanos a los vertebrados, pero como han derivado morfológicamente a lo largo de su linaje, perdiendo elementos esqueléticos como el cartílago, no serán considerados en esta tesis. Brevemente, los cefalocordados o anfioxos son considerados como un aproximado aceptable para el ancestro de todos los cordados. En otras palabras, **los Cefalocordados son el grupo hermano actual de los vertebrados** (Figura 1). Sin embargo, estos animales pelágicos están restringidos en las costas marinas, mientras que los vertebrados son un grupo amplio y diverso, presentes en la mayoría de los hábitats ecológicos.

Una de las innovaciones adaptativas de los vertebrados más representativas fue el desarrollo de **tejidos mineralizados**, característica que ha sido asociada a su éxito evolutivo. Es por esta razón que dilucidar los mecanismos que permitieron la emergencia evolutiva de **cartílago, hueso, dentina y esmalte** representa uno de los principales desafíos del campo de investigación en la disciplina de **EvoDevo** ("Evolución del Desarrollo" en inglés) [2]. Se ha determinado que antes de la emergencia de los vertebrados, ya existía un **tipo inmaduro de cartílago** (caracterizado por ser una estructura flexible, avascular y estar compuesto de Col2/agrecano [3]) presente en moluscos y artrópodos [3-7]. Asimismo, los cirrios orales de *Branchiostoma* poseen un cartílago inmaduro, el cual ha sido considerado **homólogo** al cartílago inmaduro de los vertebrados (Figura 1) [2]. No obstante, el origen

**Comentado [L3]:** Lo ideal es que una figura esté en la página siguiente de la página en que se alude por primera vez a ella.

del **cartilago mineralizado** (estructura rígida, calcificada, con condrocitos hipertróficos y matriz compuesta de Col2/Col10/agrecano [3]), aún no ha sido dilucidado dado a que pudo haber surgido tanto en el ancestro de los **ciclóstomos** o en los **gnatóstomos raíz** [3, 8-12] (Figura 1) [10]. Sin embargo, es necesario examinar la evidencia fósil, para indagar sobre el origen evolutivo del hueso y la dentina.



**Figura 1** Tejidos esqueléticos presentes en cordados. A la izquierda son representadas las relaciones filogenéticas dentro de los cordados entre *Branchiostoma*, *Ciclóstomos*, *Gnatóstomos raíz* o fósiles, *Osteíctios* y *Condrictios*. Nótese que *Branchiostoma* es el grupo externo de los vertebrados. A la derecha son mostrados cortes histológicos de cartilago, hueso y dentina entre los grupos de cordados. Obsérvese la pérdida evolutiva de hueso en condrictios. En la leyenda están indicados los elementos esqueléticos y mineralizados presentes en cordados.

### 1.1.2 Registro fósil de conodontos ofrece pautas sobre el origen entre hueso y dentina

Hace 540-201 millones de años, entre los periodos del Cámbrico y Triásico, aparecieron los **Conodontos**, peces agnatos (o amandibulados) extintos, que poseían piezas bucales con 3 o 4 tipos de denticulos mineralizados, que estructuralmente consiste en un cuerpo mineral interno de dentina rodeado por esmalte o enameloide (Figura 2) [13]. Al respecto, Murdock *et al* [13] mediante el análisis sobre la microestructura de los elementos minerales de los denticulos de conodontos concluyó que



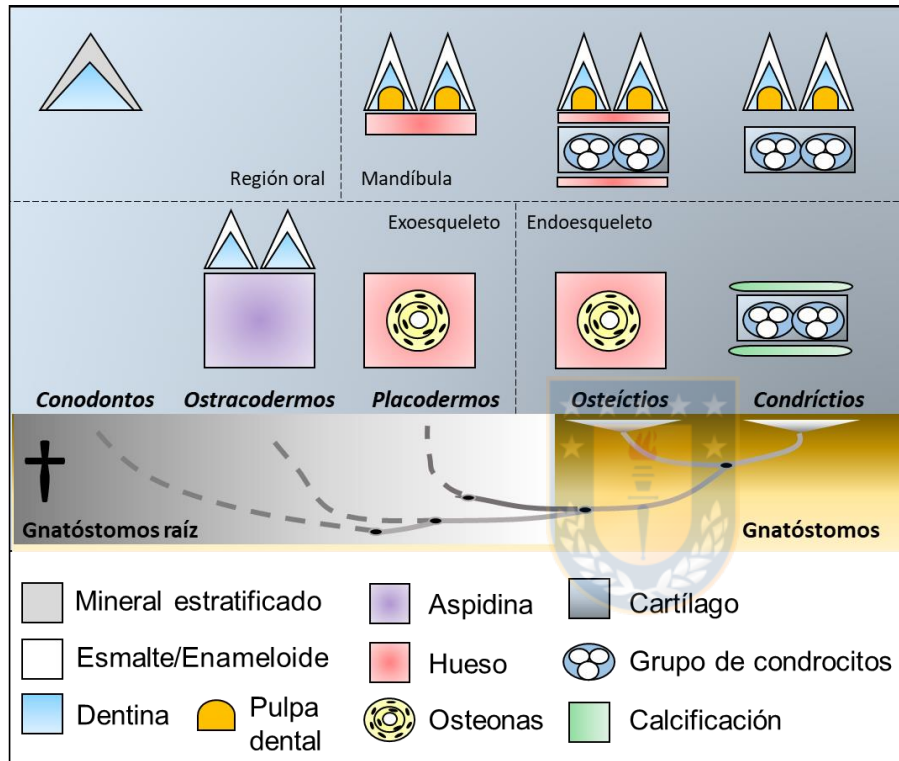
la corona dental evolucionó independientemente del esmalte mientras que el cuerpo basal evolucionó convergentemente de la dentina, dicho de otra manera, el esmalte y la dentina no son homólogos. Sin embargo, por su similitud estructural con dientes y denticulos dérmicos presentes en gnatóstomos [14], se ha definido este tipo de estructuras como **odontodos, concepto útil** para entender la evolución de los tejidos mineralizados (Figura 2) [15]. Los odontodos son estructuras que se encuentran en las superficies externas corporales de los animales o cerca de su aparato oral, consisten en una estructura interna blanda, o pulpa, rodeada de dentina y cubierta por esmalte o enameloide [16]. No son reemplazados de la misma manera que los dientes como ocurre con la mayoría de los vertebrados. Son ejemplos de odontodos los denticulos dérmicos de las escamas de los tiburones y los dientes faríngeos de algunos peces.

Por otra parte, los estudios sobre la composición del cuerpo basal han dado lugar a diferentes interpretaciones que incluyen a hueso o a dentina sugiriendo distintos escenarios evolutivos con respecto a su origen y homología entre hueso y dentina. Después de todo, se ha demostrado que el cuerpo basal posee mayor afinidad con la dentina [14, 17, 18]. Además, se han identificado en el cuerpo basal de los denticulos mineralizados tres tipos posibles de dentina: i) tubular, ii) lamelar y iii) mesodentina [19]. Adicionalmente, estos cuerpos basales están asociados a estructuras esferulíticas, que tienen características de cartílago calcificado globular [20]. Este hecho, sugiere que estas estructuras esferulíticas son un boceto del cartílago de Meckel de los gnatóstomos. En suma, la dentina y el esmalte no son homólogos, el cuerpo basal de la estructura mineralizada más antigua en los vertebrados es de tipo dentina, sin embargo **se desconoce si el hueso derivó de la dentina, o si hueso y dentina tiene orígenes evolutivos independientes**. A pesar de esta evidencia **no hay estudios que permitan fundamentar la homología entre hueso y dentina**.

#### *1.1.3 En Ostracodermos emergió el esqueleto mineralizado con hueso acelular*

Hace 450-350 millones de años, en los periodos Siluriano-Devoniano surgieron los ostracodermos. Fueron un grupo diverso de peces extintos agnatos, los primeros vertebrados en poseer un **exo esqueleto dérmico mineralizado (dermoesqueleto)** [4, 14] así como un endoesqueleto cartilaginoso, con similitud al esqueleto de las lampreas [14]. El **dermoesqueleto** posee tres capas minerales: capa superficial, media y profunda. La capa superficial ostentaba de unidades repetidas y fusionadas de odontodos, compuesto de enameloide y de dentina asociado a una base de aspidina (Figura 2), la base de aspidina se caracteriza por poseer una red de canales vasculares. La capa media contenía **aspidina trabecular** con estructuras de tipo osteonas. Por último, la capa profunda, estaba compuesta principalmente de isopedina [15, 21]. Décadas atrás se especulaba que la aspidina puede ser un tipo de dentina, hueso celular/acelular o tejido transicional entre la dentina y el hueso, sin embargo se ha determinado que la naturaleza mineral de la aspidina es **hueso dermal acelular** [22]. Además, en el fósil *Astraspis* algunas regiones del dermoesqueleto exhiben alineamientos de lagunas tipo condrocito, cercanos a la capa profunda, sugiriendo la presencia de

un endoesqueleto parcialmente mineralizado con un cartílago proliferativo (Figura 2) [23]. En resumen, este grupo de fósiles exhiben la primera evidencia concreta de la aparición de **hueso**, además poseen los primeros esbozos de los planes corporales esqueléticos que darán origen a los gnatóstomos.



**Figura 2** Distribución evolutiva de tejidos mineralizados en gnatóstomos. En la región superior se representan los elementos esqueléticos de los gnatóstomos raíz, como *conodontos*, *ostracodermos* y *placodermos*, así como a los gnatóstomos corona o vivos, como *osteíctios* y *condriktios*. Los elementos esqueléticos pueden estar ubicados en la región oral de agnatos, mandíbula de gnatóstomos, exoesqueleto dérmico mineralizado y endoesqueleto. En la región media, se muestran las relaciones filogenéticas de los gnatóstomos. Raíz (fondo gris) y gnatóstomos corona (fondo amarillo). Además, se indica si las especies están extintas (línea discontinua) o vivas (línea continua). En la región inferior, se indican los distintos elementos esqueléticos. Imagen adaptada de [15]

#### 1.1.4 En placodermos la dentina está restringida en los dientes y el dermoesqueleto es de hueso celular

Los placodermos son una clase extinta de peces acorazados, poseen mandíbulas y un exoesqueleto dérmico mineralizado compuesto de hueso celular (Figura 1). Se ha evidenciado en este hueso procesos de remodelación ósea y presencia de osteonas secundarias en desarrollo (Figura 2) [14, 24]. Además, las placas óseas presentes en sus mandíbulas son homólogas con los huesos maxilar, premaxilar, y dentario asociado al cartílago de Meckel en gnatóstomos vivos [25]. También, los análisis histológicos sobre el exoesqueleto han revelado que la dentina está prácticamente ausente en la mayoría de los placodermos [26]. Lo último implica que el hueso tal y como lo conocemos ya estaba presente en este grupo extinto, sugiriendo **que emergió en el ancestro de los gnatóstomos**.

En relación a la homología entre hueso y dentina, los placodermos derivados (*Artrodites*) poseen filas de dientes compuestos de dentina y hueso, desarrollándose en ubicaciones específicas, además presentan pulpa dental que se llenan a medida que avanza el desarrollo (Figura 2) [27, 28]. Sin embargo, dentro del linaje de los placodermos, entre ellos difieren en la estructura y en el desarrollo de sus dientes, así como en el esqueleto dérmico, esta evidencia fósil sugiere que la homología entre hueso y diente está relacionado con la unidad modular mandíbula-diente, teniendo distintos orígenes evolutivos dentro del linaje de los gnatóstomos [28].

#### 1.1.5 Historia dinámica de hueso y dentina en gnatóstomos vivos

Los gnatóstomos vivos están representados por dos clases de vertebrados denominados condriictios y osteíctios (Figura 1). Los condriictios o peces con esqueleto cartilaginoso tales como los tiburones, rayas y quimeras, aparecieron en el devónico tardío hace 358 millones de años. En sus elementos esqueléticos encontramos los odontodos compuestos de enameloide y dentina, los cuales forman dientes y denticulos dermales, (Figura 2) [29]. Debido a la ausencia de osificación esquelética en este grupo, los condriictios se llaman comúnmente “peces cartilaginosos”, sugiriendo que son un eslabón evolutivo previo a la emergencia de hueso. Como ya hemos visto, “peces cartilaginosos” no es un buen apodo del punto de vista biológico, dado que la presencia de hueso en fósiles placodermos demuestra de forma inequívoca que **perdieron la capacidad de generar hueso** (Figura 1) [14]. Se han observado elementos de calcificación esquelética a nivel de las vértebras de tiburón, como cartílago y tejido conectivo mineralizado, los cuales no corresponden a hueso (Figura 2) [8].

Por otra parte, los osteíctios, el grupo hermano de los condriictios, son el grupo de vertebrados que poseen un endoesqueleto óseo (Figura 1). En este grupo encontramos a los actinoptergios (como los peces teleósteos) y sarcopterigios (pez pulmonado, celacanto y tetrápodos). En tetrápodos, encontramos que anfibios, reptiles y mamíferos poseen un endoesqueleto óseo y dientes con dentina y esmalte, mientras que en aves ocurrió la pérdida evolutiva de los dientes.

En resumen, a partir de la evidencia fósil encontramos que hueso y dentina son tejidos muy antiguos y que probablemente la dentina apareció primero que el hueso (Figura 2). Además, es probable que el esqueleto mineralizado de los vertebrados se construyó sobre la base de odontodos con presencia de **hueso acelular** (Figura 2). Es curioso que en los placodermos la dentina está prácticamente ausente en el dermoesqueleto y que este compuesto de hueso celular, esto nos sugiere que ocurrió un proceso de co-opción en el ancestro de los gnatóstomos que reemplazó la dentina por hueso celular. **La dentina y el hueso tal como lo conocemos tienen su origen en el ancestro de los gnatóstomos**, y para entender su homología debemos centrarnos en el módulo diente-mandíbula. No obstante, el debate está abierto **para confirmar si el hueso derivó de la dentina o surgieron independientemente** [4, 13]. Para profundizar sobre este debate es necesario conocer las células que lo forman.

## 1.2 Características celulares y moleculares entre osteoblastos y odontoblastos

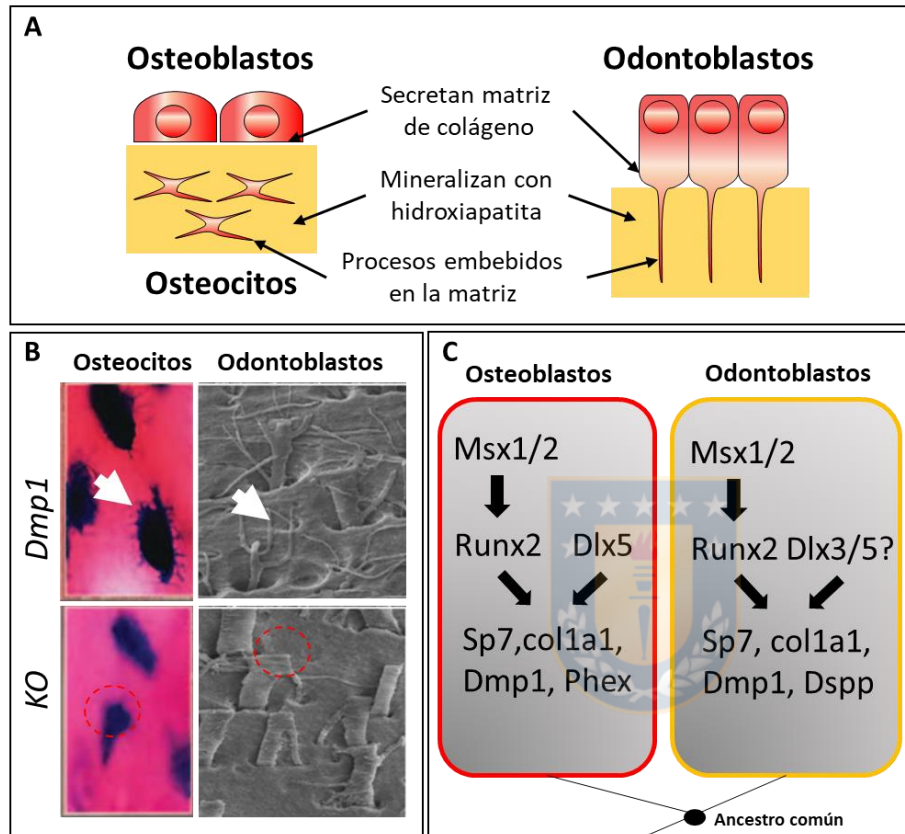
### 1.2.1 Diferencias y similitudes celulares entre osteoblastos/osteocitos y odontoblastos

Para comprender **la homología entre hueso y dentina** es necesario examinar las similitudes y diferencias entre las células que lo generan.

En primer lugar, los osteoblastos son los encargados de formar hueso, estas células se caracterizan por estar polarizadas y organizadas como pseudoepitelio cúbico (Figura 3A) [30, 31]. Además, los osteoblastos se diferencian a osteocitos cuya función consiste en orquestar la remodelación ósea [32, 33]. Una característica importante de los osteocitos es que están embebidos en la matriz ósea y se interconectan mediante proyecciones citoplasmáticas (Figura 3A). Por otra parte, existen dos mecanismos que permiten la formación de hueso, la osificación intramembranosa y la endocondral. Por un lado, **la osificación intramembranosa** se caracteriza por la diferenciación directa de células mesenquimáticas provenientes de la cresta neural o del mesodermo paraxial, a osteoblastos [34, 35]. Este mecanismo es predominante durante la formación de los huesos del cráneo y faciales. Por el otro lado, **la osificación endocondral**, dominante en el esqueleto apendicular y axial, ocurre en dos etapas: i) la condensación de células mesenquimáticas de la placa lateral del mesodermo (miembros) y de la región ventral de los somitos (columna vertebral) generan un molde de cartilago, ii) El molde de cartilago es osificado y mineralizado por los osteoblastos [34, 35].

En segundo lugar, los odontoblastos son los encargados de formar la dentina. Los odontoblastos son células polarizadas que presentan una prolongación odontoblástica insertada en la predentina, además se organizan como epitelio cilíndrico simple (Figura 3A) [36-38]. Durante el desarrollo embrionario células de la cresta neural craneal migran para poblar las regiones del primer arco branquial formando las células ectomesenquimales que darán origen a los tejidos craneofaciales [39]. Las células ectomesenquimales sufren una condensación celular una vez que son estimuladas por el engrosamiento y proliferación del epitelio oral, estableciendo la papila dental [39]. Esta interacción epitelio-ectomesénquima es responsable del inicio de la dentinogénesis, las células

epiteliales se diferencian en ameloblastos, encargados de formar el esmalte, mientras que las células ectomesenquimales en odontoblastos [40].



**Figura 3** Similitudes celulares y moleculares entre osteoblastos/osteocitos y odontoblastos sugieren una red regulatoria génica común. A) Representación gráfica de las similitudes celulares entre osteoblastos/osteocitos y odontoblastos. En rojo son representadas las células, en amarillo las matrices secretadas. B) Ratones nulo de *Dmp1* muestran pérdida de prolongaciones citoplasmáticas embebidas en la matriz de osteocitos y odontoblastos. Imágenes de cortes histológicos de transgénicos reporteros lacz (*dmp1*) y mutantes condicionales cre-lox para *dmp1* (KO) fueron obtenidas de [44]. Imágenes de microscopía electrónica de barrido sobre los túbulos dentinarios de odontoblastos de ratones silvestres (*Dmp1*) y de mutantes condicionales cre-lox de *dmp1* (KO) fueron obtenidas de [45]. Las prolongaciones citoplasmáticas están indicadas con flecha blanca, y su ausencia con círculo discontinuo rojo. C) Representación de la red regulatoria génica común entre osteoblastos y odontoblastos.

Por otro lado, osteoblastos/osteocitos y odontoblastos comparten las siguientes características i) generan matrices extracelulares mineralizadas de composición similar, ii) están polarizados, iii)

secretan una gran cantidad de colágenos y otras proteínas extracelulares involucradas en la nucleación de cristales de hidroxiapatita, iv) poseen origen embrionario común participando en la formación del módulo mandíbula-diente, v) presentan prolongaciones embebidas en la matriz mineralizada que los rodea, cuya función está asociada a la detección de fuerzas mecánicas que se ejercen sobre hueso y dentina [37, 41, 42]. **Estas similitudes sugieren que osteoblastos/osteocitos y odontoblastos provienen de un tipo celular común, no obstante dicha hipótesis ha sido abordada de forma muy escasa en la literatura [43] y nunca estudiada experimentalmente.**

### 1.2.2 Estudios moleculares ofrecen nuevos horizontes para entender la homología entre hueso y dentina

Es probable que las semejanzas entre osteoblastos/osteocitos y odontoblastos se deban a la participación de un mismo conjunto de genes, por ejemplo los ratones mutantes de *Dmp1* exhiben defectos en los procesos dendríticos de osteocitos y odontoblastos (Figura 3B) [44, 45]. Además, poseen la expresión común de genes de colágenos fibrilares como *col1a1* [46], *col1a2* [47], *col5a2* [48] y *col11a1* [49] y proteínas no colágenas de matriz como *Osteocalcina* [50], *Phex* [50], DSPP [51] SPARC [52, 53], BSP [52, 53] y MEPE [54]. De hecho, enfermedades genéticas humanas relacionadas con la dentina están ubicadas en el locus 4q21, donde encontramos los genes SPARC (OPN), BSP, MEPE, DMP1 y DSPP [55]. Así también, ambos tipos celulares expresan factores de transcripción como *Msx2* [56, 57], *Sp3* [58, 59], *Osterix* o *Sp7* (en adelante *Sp7*) [50, 60], *Dlx3* [61, 62], *Dlx5* [63, 64] y *Runx2* [65, 66], estudios con mutantes en estos factores de transcripción conllevan a defectos en la mineralización tanto del hueso como de la dentina. Esta similitud en la expresión de genes entre osteoblastos y odontoblastos nos sugiere la existencia de una **red regulatoria génica común** asociada al programa genético de mineralización que pudo haber emergido en el ancestro de los gnatóstomos. (Figura 3C)

1.3 Red regulatoria génica: como las interacciones entre MCRs y promotores definen programas genéticos.

#### 1.3.1 Promotores basales y módulos cis-regulatorios

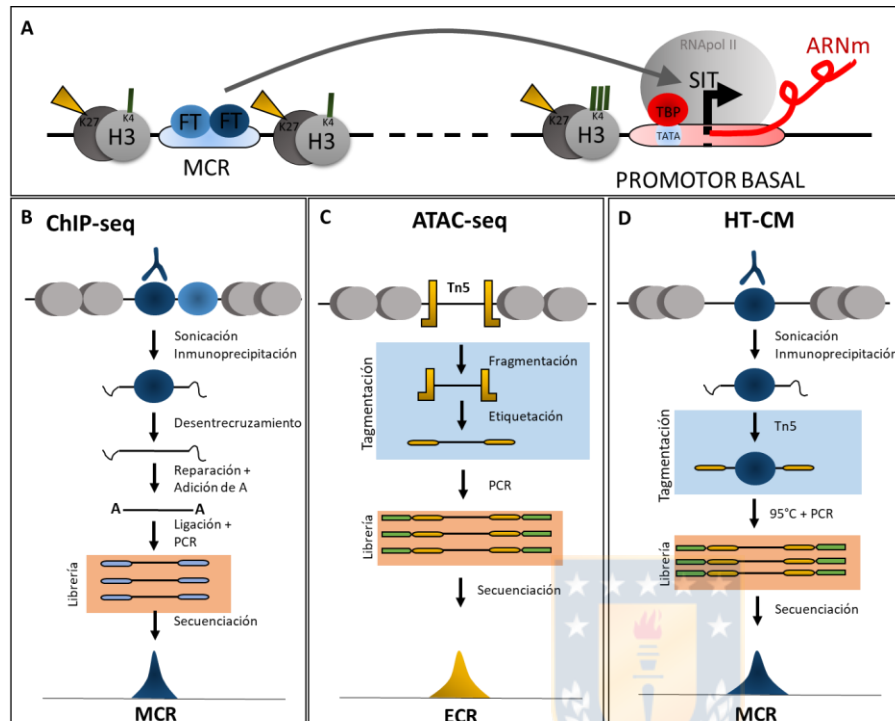
El desarrollo embrionario, la regeneración de un tejido o la respuesta fisiológica ante cambios ambientales implican cambios coordinados de programas transcripcionales. En principio, la transcripción depende de diferentes tipos de **elementos cis-regulatorios** (ECR), que son secuencias de ADN reconocidas por factores de transcripción que generalmente están ubicadas en regiones genómicas no codificantes para proteínas como intrones, regiones proximales y distales al sitio de inicio de transcripción. Actualmente, se han descrito a lo menos cuatro ECR, a saber:

Promotor basal, módulos cis-regulatorios (MCR), silenciadores e insuladores [67]. En general, cada gen posee al menos un promotor basal (Figura 4A) cuya secuencia mínima de ADN permite el inicio de la transcripción. Dentro de esta secuencia se ubican los **sitios de inicio de transcripción (SIT)**, y secuencias generales de reconocimiento como la **caja GC**, o la **caja TATA donde se une la proteína TBP** [68]. Estas secuencias en conjunto permiten el ensamblaje de la maquinaria transcripcional y el arranque de la ARN polimerasa II [69].

Otro ECR importante son los MCRs que son secuencias de ADN **que poseen sitios de unión a factores de transcripción que potencian la actividad del promotor basal** (Figura 4A). Los factores de transcripción controlan la expresión espacio-temporal y dosifican la actividad transcripcional de un gen [70]. Según su ubicación en el genoma, los MCRs pueden ser proximales, hallándose a menos de 5kb río arriba del promotor basal (alrededor del 15% de los genes poseen estos MCR) o pueden ser distales, éstos se encuentran más allá de los 5kb del promotor basal, este tipo de MCR lo poseen el 85% de los genes [71]. Otra característica de los MCRs es que actúan como unidades modulares, es decir, tienen la capacidad de integrar las señales de múltiples vías de señalización y de factores de transcripción (FT), para luego manifestarlas en una respuesta espacio-temporal específica de expresión genética [72]. Esta actividad de los MCR permite la orquestación precisa de un proceso biológico, y es precisamente por su funcionamiento modular intrínseco (combinaciones de sitios de unión) y extrínseco (acciones independientes o aditivas de distintos MCRs) que han sido nombrados como “Módulos” Cis Regulatorios (Figura 4A) [73].

### *1.3.2 Tecnologías de next generation han permitido identificar MCRs putativos:*

Para identificar los MCR es necesario identificar los sitios de unión de proteínas que interactúan de forma específica con el ADN, y los sitios de modificación de histonas a lo largo del cromosoma. En la última década, se han identificado múltiples ECR utilizando las diferentes modificaciones químicas de histonas, por ejemplo, la combinación de las marcas de histona H3K4me3 y H3K27ac facilita la caracterización de los **promotores basales** de genes activos (Figura 4A) [73]; mientras que la combinación de las marcas de histona H3K4me1 y H3K27ac es un buen predictor de **MCR activos** (Figura 4A) [73, 74] y H3K27me3 es un marcador de represión transcripcional [71, 73]. Además, cada MCR posee uno o varios sitios de unión para factores de transcripción, y para su directa identificación se recurre a tecnologías de inmunoprecipitación de la cromatina asociado a su secuenciación masiva o ChIP-seq (Chromatin immunoprecipitation-sequencing).



**Figura 4** Técnicas de next-generation permiten identificar elementos regulatorios. A) Representación gráfica de elementos regulatorios mínimos para la activación de la transcripción génica. El promotor basal contiene el sitio de inicio de transcripción (SIT) y elementos de reconocimiento como la caja TATA, que permite el reclutamiento de la ARN polimerasa II para la síntesis de ARNm. Están asociados a las marcas de histonas H3K4me3 y H3K27ac. Los MCR contienen sitios de unión para factores de transcripción que permitirán el control espacio-temporal del gen, su actividad está asociada a las marcas de histonas H3K4me y H3K27ac. B) Metodología de precipitación de la cromatina mediante anticuerpos (ChIP-seq), seguidos por el desarme de la interacción proteína-ADN mediante desentrecruzamiento, el ADN libre está dañado por la sonicación, luego le siguen los procesos de Reparación, adición de Adeninas, ligación de adaptámeros y amplificación de la librería por PCR para posteriormente ser secuenciados masivamente. C) ATAC-seq, consiste en la obtención de regiones abiertas de cromatina en contexto nativo mediante Tagmentación de la Tn5 generando ADN etiquetado (amarillo), seguidamente es amplificado a través de primers (verde) produciendo la librería para luego secuenciar masivamente. C) HT-CM aprovecha la Tn5 para tagmentar el precipitado para reducir los pasos de reparación, adición y ligación en un solo paso, consecutivamente mediante PCR, añadiendo un paso inicial de 95°C por 5 minutos, ocurre el desentrecruzamiento y amplificación de la librería. Luego, es secuenciado masivamente.



### 1.3.2.1 ChIP-seq y ChAP-seq

Las tecnologías de ChIP-seq consisten en inmunoprecipitar la cromatina mediante anticuerpos específicos contra marcas de histonas o factores de transcripción permitiendo la identificación de elementos regulatorios de manera directa (Figura 4B).

El ADN genómico asociado a estas proteínas es recuperado y sometido a secuenciación masiva. Consiguientemente, las secuencias son mapeadas sobre un genoma de referencia permitiendo identificar regiones del genoma enriquecidas sobre una marca de interés. Por esta vía, es posible predecir e identificar los elementos regulatorios que participan en un contexto celular específico, sean estos activos o reprimidos [74-78].

Las desventajas del ChIP-seq residen en la gran cantidad de células fijadas (en el orden de  $10^7$ ) por inmunoprecipitado, la especificidad y disponibilidad de anticuerpos, y los tratamientos posteriores de la precipitación tales como la reparación de los extremos, adición de Adenina, ligación de adaptámeros, amplificación por PCR de la librería y pasos de purificaciones con extracción fenol-cloroformo. Una vía para resolver la dependencia del anticuerpo yace en el uso de etiquetas como His<sub>6</sub>-TEV-FLAG<sub>3</sub> [79], epitope V5 [80], o el sistema BirA-BLRP-biotina [81-84] que ha permitido mapear las interacciones de proteínas sobre el genoma. Estas técnicas las nombramos como "precipitación de la cromatina por afinidad" o ChAP-seq (Figura 4B) (Chromatin Affinity-precipitation-sequencing).

### 1.3.2.2 ATAC-seq

Últimamente ha surgido una nueva tecnología para mapear la accesibilidad de la cromatina y se denomina "Ensayo de secuenciación de cromatina accesible por transposasa" (ATAC-seq, Assay for transposase-accessible chromatin sequencing) una vía alternativa a DNase-seq o MNase [85]. Este método evalúa la accesibilidad de la cromatina mediante la transposasa hiperactiva **Tn5**, la cual fragmenta regiones accesibles de la cromatina e inserta adaptámeros, proceso denominado tagmentación (Figura 4C) [85]. La secuenciación es utilizada para mapear regiones de unión a factores de transcripción y posicionamiento nucleosomal, que ha permitido reconstruir, alternativamente, la arquitectura tridimensional de la cromatina en el locus del gen *Six* en pez cebra [86], caracterizar regiones regulatorias de tumores en desarrollo *in vivo* [87] y determinar el linaje específico a partir de una población celular heterogénea [88].

### 1.3.2.3 ChIPmentación de alto rendimiento

ChIPmentación es una innovación en las tecnologías ChIP-seq que consiste en la incorporación de la transposasa Tn5 después de realizar la inmunoprecipitación, permitiendo la adición, en las regiones accesible de la cromatina, adaptámeros compatibles con la secuenciación en una sola

reacción (Figura 4D) lo que reduce el tiempo en el flujo de trabajo [89]. Por consiguiente, esto soluciona las desventajas de los tratamientos posteriores a la inmunoprecipitación, tales como la reparación de los extremos, adición de Adenina y ligación de adaptámeros. Por otra parte, la adición de un tratamiento de intenso calor por 5 min en la etapa inicial de la PCR permite el desentrecruzamiento de la interacción proteína-ADN [90]. Además de reducir aún más el tiempo de trabajo, favorece la complejidad de la librería. Esta implementación la denominaron ChIPmentación de alto rendimiento (HT-CM, High-Throughput ChIPmentation) (Figura 4D) [90]. Ciertamente, HT-CM requiere una baja cantidad de células, desde 500 células para marcas de histonas y 1000 células para factores de transcripción [90]. En fin, esto soluciona la desventaja del ChIP-seq sobre la alta demanda de células para realizar el inmunoprecipitado. Sin dudas, esta nueva aproximación experimental facilita el estudio de los MCR en poblaciones celulares raras y/o específicas.

### 1.3.3 Red regulatoria génica de mineralización: rol de Sp7 y Dlx5

El desarrollo embrionario es una sucesión ordenada de pasos programados que van definiendo los destinos celulares y los tipos celulares especializados, estos irán moldeando las distintas estructuras corporales. En cada evento de diferenciación, múltiples señales estimulan las vías de señalización que definirán un conjunto de factores de transcripción que interactuarán físicamente sobre los MCR, activando los genes objetivos requeridos para la formación de los distintos tejidos. En efecto, la sumatoria de interacciones descrita define la **Red Regulatoria Génica** (RRG). Para ejemplificar, en estudios sobre las RRG en corazón [91], sobre el crecimiento por duplicación en *E. coli* [92] y en la formación de la cresta neural [93] se ha concluido que estas RRG están evolutivamente conservados entre vertebrados y se concluye que fueron co-optados de programas antiguos provenientes de organismos "invertebrados".

En concreto, la RRG de osteoblastos está compuesta por *AP1*, *ATF*,  *$\beta$ -catenina*, *bmp2*, *C/EBP*, *dlx5*, *dlx6*, *fgf2*, *Msx1*, *Msx2*, *PPAR $\gamma$ 2*, *runx2*, *sp3*, *sp7*, entre otros [35, 94]. Dentro de esta lista, *runx2* y *Sp7* son conocidos como los **factores de transcripción maestros** de la osteogénesis donde *runx2* regula río-abajo a *sp7* [34, 95]. Sin embargo, *Sp7* posee vías de regulación independientes de *runx2* donde células mesenquimáticas se diferencian a osteoblastos por *msx2* o *dlx5* inducidos por *bmp-2* [57, 96]. Interesantemente, el factor de transcripción homeótico *dlx5* regula a *runx2* durante el compromiso inicial de células mesenquimáticas a osteoblastos inmaduros, así también regula a *sp7* promoviendo su madurez [96]. De hecho, la sobreexpresión de *dlx5* en osteoblastos de pollo induce la aceleración de la mineralización [97], sobre lo mismo, la inhibición de la expresión de *dlx5* bloquea la expresión de *sp7* [98]. **Estos antecedentes sugieren que los procesos de mineralización en hueso requieren a *sp7* y *dlx5*.**

En odontoblastos la RRG está formada por  *$\beta$ -catenina*, *bmp2*, *bmp4*, *dlx1*, *dlx2*, *dlx3*, *dlx5*, *fgf3*, *fgf8*, *fgf10*, *gli1*, *gli2*, *msx1*, *msx2*, *notch2*, *pax9*, *pitx2*, *runx2* y *sp7* [99-101]. En este contexto, *runx2* controla la morfogénesis dental [102] por lo tanto está presente en preodontoblastos y odontoblastos

inmaduros [103]. En este contexto, sp7 no es requerido para la morfogénesis dental pero es obligatorio para la maduración funcional de odontoblastos debido a que su ausencia, los mutantes presentan odontoblastos no polarizados y sin prolongaciones citoplasmáticas [104], además exhiben defectos en la mineralización de la dentina [50, 105]. En efecto, la sobreexpresión de sp7 favorece el incremento de *dspp* [106], gen que codifica la proteína de matriz dental no-colágena esencial para la formación de dentina [55]. Otro factor de transcripción involucrado, es *dlx5* ya que su presencia favorece el incremento de *dspp* vía *bmp2* [107]. Recientemente, se ha descrito que la inhibición de *dlx5* disminuye los transcritos de sp7 [108], argumentando la importancia de sp7 y *dlx5* en el contexto de la mineralización dental. Alternativamente, se ha descrito que sp7 y *dlx3* interactúan sobre el promotor de *dspp* promoviendo su expresión inducido por *bmp2* [101]. Por lo tanto, **en la RRG de la mineralización de la dentina requieren a sp7 y *dlx5*.**

En suma, podemos notar que la RRG entre osteoblastos y odontoblastos tienen en común la mayoría de los factores de transcripción y a pesar del alto número de actores moleculares, tanto hueso como dentina dependen del **módulo Sp7/Dlx5**. Cabe plantearse **si este módulo interactúa con los mismos MCR** y si la interacción entre estos está conservada evolutivamente en gnatóstomos. Responder a este planteamiento nos permitiría comprender la **homología entre hueso y dentina**.

1.4 Los factores de transcripción Sp7 y Dlx5 son claves para entender el origen evolutivo entre hueso y dentina

#### 1.4.1 Defectos de Dlx5 genera fenotipos ancestrales

El factor de transcripción homeótico *Dlx5* está expresado en el linaje óseo desde etapas tempranas de la osteogénesis [109] y en estadios tardíos de diferenciación [62]. Así también, está presente durante la organogénesis de los odontodos, diente y dentículos dérmicos, del tiburón gato [29], así como en los dientes faríngeos del pez cebra [110] y dientes orales de mamíferos [111, 112]. Lo anterior, sugiere que *dlx5* está presente en tejidos mineralizados en el linaje de los gnatóstomos. Funcionalmente, estudios en ratones *dlx5<sup>-/-</sup>* revelan severas malformaciones craneales, retraso en la osificación de la calvaria y osteogénesis anormal [63]. Esto sugiere que *dlx5* participa en el proceso de diferenciación de osteoblastos. Además, ratones doble KO *dlx5/dlx6* exhiben una transformación de la mandíbula inferior en mandíbula superior generando una boca simétrica, así también exhiben severas anomalías en el desarrollo óseo y dental [113]. Particularmente, los autores discuten que sin *dlx5/dlx6* el fenotipo del mutante es como si hubiera recapitulado el patrón mandibular de los primeros osteíctios [77]. En efecto, esto evidencia que ***dlx5* es un actor esencial en el desarrollo del módulo mandíbula-diente, por lo tanto** podría ser un gen clave para entender la emergencia del programa de mineralización en gnatóstomos.

#### 1.4.2 Historia evolutiva de Sp7 coincide con la presencia/ausencia de dentina y hueso

La historia evolutiva del gen *Sp7* nos muestra un escenario fascinantemente complejo, resumido en la tabla 1. Por ejemplo, en peces óseos mutantes de *Sp7* forman hueso y dentina pero con defectos

en su mineralización [114-116]; en aves *Sp7* se perdió [116] por lo tanto no es requerido en hueso y coincide con la pérdida de dientes; en mamíferos *Sp7* es fundamental en la mineralización de hueso [60, 117] sin embargo posee un rol secundario en dientes [50, 105]. Sin embargo, **la participación de *Sp7* en tejidos mineralizados de anfibios y de condricios es desconocida, así también es escasamente abordada en la literatura [118]. En consecuencia, determinar si *Sp7* se expresa en odontoblastos de condricios** representaría una fuerte evidencia a favor de un programa genético común entre hueso y dentina en el ancestro de los gnatóstomos.

Entonces, podemos deducir que *sp7* surgió en el ancestro de los gnatóstomos coincidiendo con la emergencia de hueso celular dérmico, debido a que no hay ortólogos identificables en ciclóstomos, cordados sin tejido mineral (Tabla 1). **Por lo tanto, *sp7* es un candidato idóneo para entender la emergencia, homología y evolución entre hueso y dentina.**

Grupo de vertebrado		Gen <i>Sp7</i>	Rol de <i>Sp7</i> en Hueso	Rol de <i>Sp7</i> en Dentina
Ciclóstomos		Sin ortólogo de <i>Sp7</i> identificable	Especies sin hueso. El cartílago no mineraliza.	Especies sin dentina, poseen queratina bucal.
Condrictios		Presente.	Pérdida evolutiva de hueso. Sin estudios de expresión de <i>Sp7</i> en cartílago mineralizado.	<b>No hay estudios que describan a <i>Sp7</i> en odontoblastos</b>
Osteíctios	Peces teleósteos	Presente.	Mutaciones en <i>Sp7</i> causan defectos en la osteogénesis [114, 115].	Mutaciones en <i>Sp7</i> causan defectos en la dentición. [114, 116]
	Anfibios	Presente.	Expresión en osteoblastos (resultados de RNA-seq de nuestro laboratorio [118]).	<b>Se desconoce la expresión y función de <i>Sp7</i> en dentina de anfibios.</b>
	Aves	Ausente en el genoma	<i>Sp7</i> no es requerido por los osteoblastos	Pérdida evolutiva de dientes y dentina.
	Mamíferos	Presente.	Ratones mutantes para <i>Sp7</i> carecen de hueso [60, 117].	Dentinogénesis anormal en ratones KO [50, 105]

Tabla 1: Resumen de estudios de genómica, función y expresión de *sp7* en hueso y dentina de distintas especies de vertebrados.

#### 1.4.3 Cambios drásticos en la función molecular de *Sp7* coinciden con el origen de hueso y dentina en gnatóstomos

#### 1.4.3.1 Familia de factores de transcripción Sp: Sp7 es un miembro divergente

El gen *Sp7* pertenece a la familia de factores de transcripción Sp (*Specific Protein*). Esta familia es antigua, ya que antes de la emergencia de los eumetazoa ya estaban presentes 3 genes parálogos en tándem llamados SpA, SpB y SpC (Figura 5A) [119, 120]. Durante la emergencia de los vertebrados, estos 3 genes se diversificaron producto de las dos rondas de duplicaciones genómicas que ocurrieron en el ancestro de los vertebrados [121], generando a los 10 miembros actuales, y según análisis filogenéticos están subdivididos en 3 clados: i) Sp1-Sp4, ii) Sp5-Sp5L y iii) Sp6-Sp9, provenientes de SpA, SpB y SpC, respectivamente (Figura 5A) [119, 120]. Todos los miembros de esta familia se caracterizan por poseer **tres dedos de zinc** C2H2 (dominios de unión al ADN) ubicados en el extremo C-terminal. Los miembros de esta familia reconocen motivos ricos en Guanina, tales como cajas-GC (GGGGCGGGG) y cajas-GT/CACC (GGTGTGGGG) [122, 123]. Además, estos sitios de unión están ubicados en regiones promotoras de genes expresados ubicuamente [124, 125].

A diferencia de sus 9 parálogos, el gen *Sp7* es un miembro divergente ya que la mayoría de los genes *Sp* están expresados ubicuamente y tienden a regular funciones celulares generales [125], mientras que *Sp7* está específicamente expresado en elementos esqueléticos mineralizados, mayoritariamente en osteoblastos [60, 126, 127]. Por consiguiente, estudiar la aparición, diversificación y expresión de *Sp7* en el linaje de los vertebrados nos ayudaría a comprender la homología entre hueso y dentina. Sin embargo, **no existen estudios que describan los patrones de expresión espacio-temporal de *Sp7* en el esqueleto de tiburones ni en dientes de anfibios, ni de su ortólogo SpC en Branchiostoma. Por lo mismo, estas lagunas impiden reconstruir la historia evolutiva de *Sp7*.**

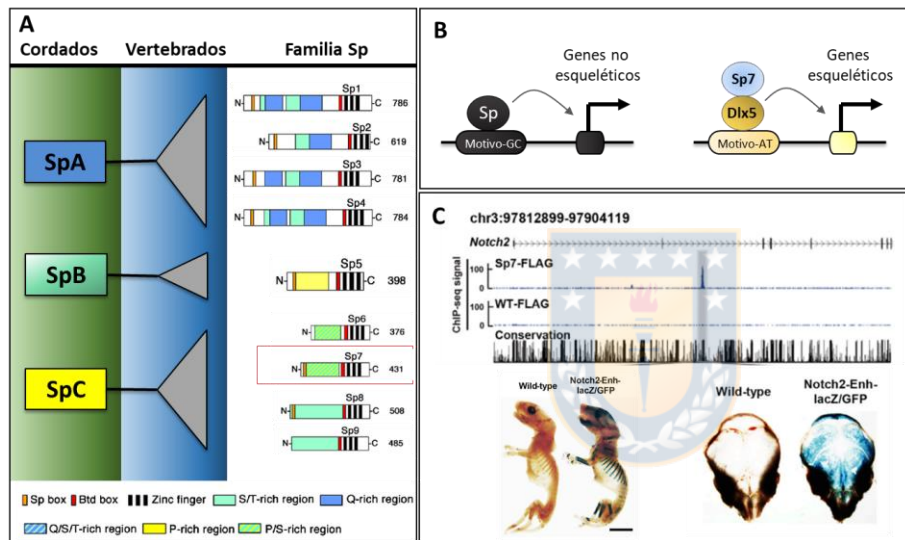
#### 1.4.3.2 *Sp7* es un co-factor de *Dlx5*, este módulo genético *Sp7/Dlx5* es específico de elementos regulatorios esqueléticos

Un reciente estudio mostró que *Sp7* de vertebrados **presentan tres mutaciones**, cuando son comparadas con sus ortólogos en cordados, ubicadas en los dominios alfa-hélice de cada dedo de zinc [123, 128]. Sorprendentemente, alineamientos con múltiples especies revelan que estas 3 mutaciones **fueron adquiridas en el ancestro de los gnatóstomos**, dado que están presentes en tiburón elefante, peces teleósteos y mamíferos, pero no en SpC de *Branchiostoma*, ni en los clados Sp1-4 y Sp5, tampoco dentro de su propio clado (Sp6-9) [128]. Por tanto, esto sugiere que la emergencia de *Sp7* coincide con la aparición del programa de mineralización.

Por otra parte, utilizando ensayos de reportero y EMSA se demostró que dichas mutaciones imposibilitan a *Sp7* para unirse sobre los motivos ricos en GC [128]. De hecho, versiones mutantes de *Sp7* que no poseen estas mutaciones recuperan su capacidad de unión a motivo-GC [128]. Por lo tanto, si *Sp7* no puede unirse al ADN entonces debe actuar como co-factor. Efectivamente, un ChIP-seq contra la proteína *Sp7* en osteoblastos de ratón identificó que los sitios de unión están

**Comentado [L4]:** falta indicar de qué especie o grupo de especies es el *Sp7* que presenta las 3 mutaciones y en relación a qué se presentan estas 3 mutaciones. O bien si se refiere a comparación con otros factores *Sp*

correlacionados y centrados sobre sitios de unión de Dlx5, enriquecidos en secuencias AT (Figura 5B) [128]. Además, se demostró que Sp7 interactúa a través de su dominio de unión al ADN con Dlx5 [128], esto sugiere que Sp7 evolucionó en un co-factor de dlx5 en gnatóstomos. Además, los sitios de unión Sp7/Dlx5 fueron analizados en transgénicos de ratón, recapitulando la expresión sobre elementos esqueléticos (Figura 5B) [128]. **No obstante, este estudio no consideró la unión de Sp7/Dlx5 sobre regiones genómicas asociadas a la red regulatoria común entre hueso y dentina, y además, este modelo evolutivo es apoyado solo en ratón por lo que es necesario validarlo en otras especies de vertebrados.**



**Figura 5.** *Sp7 pertenece a la familia Sp y es co-factor de Dlx5 regulando MCR esqueléticos.* A) A la izquierda se muestra la organización filogenética de la familia Sp en cordados representados por los ortólogos SpA, SpB y SpC y su respectiva expansión en vertebrados y en consecuencia generando 3 clados: Sp1-4 (SpA), Sp5 (SpB) y Sp6-9 (SpC). A la derecha, se muestran organizados en columnas a los distintos miembros de la familia Sp y los dominios estructurales son indicados por diferentes colores y su respectiva leyenda explicativa ubicada abajo. Adaptado de [119]. B) Modelo explicativo de la acción de Sp7/Dlx5 en la regulación del programa de mineralización en elementos esqueléticos. Adaptada de [128]. C) Región genómica de Notch2 de ratón muestra sitio de interacción de Sp7 sobre un MCR intrónico. Ratones reporteros Notch2-MCR LacZ/GFP exhibe recapitulación de actividad en elementos esqueléticos.

### 1.5 Modelos animales para entender la evolución de tejidos mineralizados

### 1.5.1 La rana africana: *Xenopus tropicalis*,

En los últimos años, los modelos animales no-mamíferos (i.e. peces y anfibios), han sido relevantes para el estudio sobre procesos evolutivos y patológico [129-131]. En particular, los anfibios, *Xenopus tropicalis* y *Xenopus laevis*, han sido ampliamente utilizados para estudiar la formación de hueso y de dientes a nivel celular y molecular [8, 52, 53, 132-136]. A nivel celular, el desarrollo externo de larvas de *Xenopus* durante su metamorfosis es ideal para estudiar el desarrollo de estructuras mineralizadas. Primero, dado que el programa de formación de esqueleto produce estrictamente esqueleto cartilaginoso en renacuajos hasta el estadio 53NF. Posteriormente, se inicia el proceso de mineralización en renacuajos postmetamórficos (54-60NF), donde podemos encontrar la formación de tejidos mineralizados como hueso frontoparietal (calvaria), fémur y dientes en estadios bien definidos del desarrollo embrionario [8, 52]. Por otra parte, a nivel molecular, el genoma de *Xenopus tropicalis* se caracteriza por tener un tamaño de alrededor de 1.7Gpb distribuidos en 10 cromosomas, siendo poseedor de más de 20.000 genes codificantes para proteínas, incluyendo ortólogos de al menos 1.700 genes para enfermedades humanas [137]. Donde, más de un tercio del genoma consiste en elementos transponibles, con una inusual prevalencia de transposones de ADN [137, 138]. Además existe un enriquecimiento de elementos no codificados que están conservados en tetrápodos [137]. Conjuntamente, las técnicas de transgénesis son estables, y están bien definidas [139, 140].

En nuestro laboratorio se realizó ChIP-seq contra las marcas epigenéticas H3K4me1, H3K4me3, H3K27ac, y H3K27me3 en osteoblastos nativos de calvaria mineralizada acoplado con experimentos de RNA-seq en mesénquima osteogénico y hueso [141]. Se detectó que los genes más expresados en hueso poseen promotores asociados a marcas epigenéticas activas, mientras que los genes reprimidos son coligados a promotores con marcas represoras, validando el experimento [141]. Utilizando esta base de datos, observamos que existen numerosos MCR asociados a genes que son expresados tanto en osteoblastos y odontoblastos, sin embargo se desconoce si los factores de transcripción Sp7 y Dlx5 se unen a estos MCR.

### 1.5.2 El tiburón elefante: *Callorhynchus milii*

Los condriictios están agrupados en dos principales linajes, los Holocéfalos (quimeras) y elasmobranquios (tiburón y rayas), que divergieron hace unos 420 millones de años [142]. Son considerados como condriictios basales o sea la especie más cercana al ancestro de los condriictios. Comparados con los Elasmobranquios, las características únicas de los Holocéfalos incluyen una simple branquia, un arco hioides completo, fusión de la mandíbula superior al cráneo y placas dentales hipermineralizadas no reemplazables [143]. La especie *Callorhynchus milii* o el tiburón elefante presenta uno de los genomas evolucionantes más lentos y relativamente pequeños de alrededor de 1.0Gpb [144]. La secuenciación de su genoma ha revelado que ha retenido un mayor número de genes del ancestro de los vertebrados que los osteictios [145]. Además, se descubrió que entre el tiburón elefante y los mamíferos contienen miles de elementos no codificantes

**Comentado [L5]:** el "que" en esta posición obedece a una comparación, implicando que la palabra "alto" se cambie por "mayor" o "más alto"

conservados (ECR putativos), una mayor cantidad que cuando se comparan con peces teleósteos [146]. Estos hallazgos sugieren que los genomas de peces teleósteos han evolucionado más rápido comparado con el tiburón elefante, y el tiburón elefante puede ser utilizado como un grupo externo para entender la evolución de los genomas de vertebrados.

A pesar de no contar con hueso endocondral, *C. milii* posee dientes, denticulos dérmicos, espinas de las aletas y cartílago calcificado, indicando que posee la capacidad de mineralizar tejidos. Venkatesh *et al* [144] a través de un análisis de sintenia en vertebrados propone que la pérdida del linaje óseo y por tanto la osificación endocondral del endoesqueleto de los condrictios puede estar relacionado con la ausencia del grupo de genes *SCPP* (*SPP1*, *MEPE*, *IBSP*, *DMP1* y *DSPP*) en la región intergénica entre los genes *Pkd2* y *Sparcl1*, observada en el genoma de condrictios *C. milii*, *Leucoraja erinacea* y *Scyliorhinus canicula*, así también en el genoma de ciclóstomos (vertebrados agnato). Proponemos que la presencia de tejidos mineralizados en condrictios puede deberse a la **conservación del programa de mineralización remanente**, representado por el **módulo Sp7/Dlx5**.

#### 1.5.3 El anfibio lanceta: *Branchiostoma lanceolatum*.

Los anfibios poseen una forma rudimentaria de tejido conectivo basado en una matriz de colágeno, se ha propuesto que sobre la base de este precursor de colágeno, los nuevos genes de mineralización fueron co-optados a una RRG ancestral mesodérmico que produjo los tejidos conectivos y de soporte, lo que consecutivamente, permitió la emergencia de los tejidos esqueléticos altamente mineralizados en vertebrados basales [147]. Las dos rondas de duplicación de genoma completo pudieron haber facilitado la co-opción de genes de factores de transcripción críticos que permitió la innovación de cartílago, hueso y diente. Bajo este escenario proponemos que *SpC* y *Dll* pueden estar coexpresados en *Branchiostoma* representando un programa genético antiguo. Sin embargo, se desconoce el patrón de expresión de *SpC* durante el desarrollo embrionario de *Branchiostoma*.

Por otra parte, se ha descrito que después de las duplicaciones de genoma completo, al comparar los genomas y regulomas entre *Branchiostoma* y vertebrados, en estos últimos, más del 80% de las familias de los genes ampliamente expresados con múltiples parálogos derivados, producto de las duplicaciones del genoma completo, tienen miembros que restringieron su expresión ancestral y experimentaron **especialización** en lugar de **subfuncionalización** [148]. Paradójicamente, los parálogos que restringieron su expresión aumentaron la complejidad de sus paisajes reguladores [148]. Bajo este escenario proponemos que **SpC puede actuar como un factor de transcripción per se**, uniéndose al ADN de manera independiente del ortólogo de Dlx5, Dll.

#### 1.5.4 Ensayos de expresión de heterólogos

Determinar la función endógena de un gen en especies que no son modelos animales es una limitante para realizar estudios comparativos de la expresión génica para construir hipótesis



evolutivas, frente a esta dificultad una solución aproximativa es usar la expresión de heterólogos en especies modelos genéticamente manejables. Los ensayos de expresión de heterólogos consiste en introducir la secuencia de una región codificante de una especie dentro del contexto genómico de una especie diferente [149]. Este tipo de ensayos permite evaluar la expresión compartida, e incluso el control del desarrollo compartido por **módulos genéticos homólogos**. Por ejemplo, se identificó una región regulatoria del gen *GDF6* que está asociada al tamaño del caparazón óseo del pez espinoso [150]. Esta región está conservada en el locus de *GDF6* en chimpancés y otros mamíferos pero no en humanos. El ensayo de heterólogos consistió en introducir el **MCR de chimpancé** en el genoma del ratón y este MCR dirigió la expresión en los dígitos de las extremidades posteriores durante el desarrollo embrionario [150]. Otro ejemplo yace en las proteínas Ubx, en *Drosophila* promueve la identidad abdominal y actúa reprimiendo el desarrollo de extremidades en el abdomen mientras que en *Artemia* hipotéticamente promueve la identidad abdominal pero no reprime el desarrollo de patas [151]. Para evaluar su función, el ensayo de heterólogos consistió en expresar **la Ubx de Artemia** en *Drosophila* y fue capaz de promover la identidad abdominal sin reprimir el desarrollo de las patas. Sin embargo, al eliminar la región C-terminal de Ubx de *Artemia* confirió con la capacidad de reprimir el desarrollo de patas recapitulando la función de Ubx de *Drosophila* [151]. En estos ejemplos podemos notar que introduciendo MCRs o marcos de lectura completos de especies extranjeras en el genoma de la especie anfitrión pueden recapitular su función y **así evaluar la relación homóloga entre estas dos especies**.



## 1.6 Hipótesis y objetivos

Dado que a la fecha, no existen líneas celulares de odontoblastos de especies no-mamíferos, una alternativa abordada aquí es utilizar el cultivo primario de osteoblastos de anfibios y evaluar mediante ensayos heterólogos, la capacidad de unirse de Sp7 de Condrictios y SpC de Branchiostoma sobre MCR esqueléticos de Osteíctios que están asociados a genes co-expresados en hueso y dentina. De este modo, la presente tesis doctoral apunta a generar la primera evidencia molecular relacionada con la adquisición de la red regulatoria génica común entre hueso y dentina en vertebrados, y así resolver la problemática de la homología de hueso y dentina.

### **Nuestra pregunta central es:**

“¿Compartirán osteoblastos y odontoblastos una red regulatoria génica que involucra a la pareja regulatoria Sp7/Dlx5, reflejando así el origen evolutivo común de estos tejidos mineralizados?”

Para responder esta pregunta nos planteamos la siguiente **hipótesis:**

“Los homólogos de Sp7 y Dlx5 de gnatóstomos se caracterizan por una específica co-expresión en osteoblastos y odontoblastos, así también presentan co-unión a módulos cis-regulatorios sobre genes pertenecientes a la red regulatoria génica común a ambos tipos celulares”.

### **Objetivo general:**

Determinar la conservación evolutiva de la pareja regulatoria Sp7/Dlx5, a nivel de su co-expresión, y de su capacidad para unirse a módulos cis-regulatorios de genes expresados en osteoblastos y odontoblastos.

### Objetivos específicos:

- 1- Evaluar el grado de co-expresión de homólogos de *Sp7* y *Dlx5* en larvas de Branchiostoma y en elementos esqueléticos de Condrictios y Osteíctios
- 2- Determinar si los homólogos de Sp7 de Branchiostoma, Condrictios y Osteíctios son capaces de co-unirse con Dlx5 a módulos cis-regulatorios de genes expresados tanto en osteoblastos como en odontoblastos.

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1. Bioterio, y preparación de los tejidos

El comité de ética de la Universidad de Concepción aprobó todo procedimiento experimental que se realizó en este estudio, los cuales fueron realizados siguiendo las normas establecidas en el manual de bioseguridad y bioética de la Comisión Nacional de Investigación Científica y Tecnológica (CONICYT, Gobierno de Chile).

Los anfibios adultos de *Xenopus tropicalis* (*Xt*) fueron mantenidos en la Universidad de Concepción siguiendo protocolos estándar para esta especie. Los embriones y renacuajos en estadio de metamorfosis fueron obtenidos mediante apareamiento natural y artificial. Los estadios de desarrollo fueron definidos de acuerdo al trabajo de Nieuwkoop and Faber [152, 153]. Los embriones fueron obtenidos después de cada apareamiento y fijados directamente en MEMFA para su posterior procesamiento. Mientras que los tejidos de los renacuajos fueron obtenidos siguiendo el siguiente protocolo. Primero, fueron anestesiados en Metanosulfonato de tricaina 200mg/ml (Sigma–Aldrich, St. Louis, MO, USA), considerado un potente y efectivo anestésico para estos procedimientos [154]. Segundo, diseccionados en PBS 0.6x o MMR1x, y los tejidos obtenidos dejados en medio HSB 0.6x (Invitrogen, Paisley, UK) [136]. Por último, los tejidos fueron fijados en PFA 4% para procedimientos histológicos e HIS, congelados en nitrógeno líquido para la obtención de ADN o ARN, o procesados directamente para la obtención de cultivo primario de osteoblastos o mesénquima.

### 2.2. Diseño de partidores y plásmidos

#### 2.2.1. Identificación de Marcos de lectura de factores de transcripción

Los marcos de lectura (ML) completo de *H3f3b*, *Tbp*, *Ctcf*, *Sp7* y *Dlx5* de *Xt* fueron identificados mediante nuestros datos de RNA-seq [141]. Luego, las secuencias fueron descargadas de Xenbase (<http://www.xenbase.org>), utilizando el genoma versión 4.1 como referencia y analizadas mediante alineamientos con el algoritmo MAFFT (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/mafft/>) con sus respectivos ortólogos en vertebrados. Seguidamente, los ML fueron flanqueados mediante partidores (Tabla 2) para su amplificación con extremos romos con la polimerasa de alta fidelidad KOD (Calbiochem), para su posterior clonamiento en vectores de expresión para HT-ChAPmentación. En particular, los ML de *Sp7* y *Dlx5* también fueron clonados en el vector pBS para la transcripción de ARN *in vitro* para HIS. Por otra parte, el ML de GFP (Tabla 2) fue amplificado a partir de un vector de expresión previamente clonado en nuestro laboratorio. Todos los plásmidos fueron secuenciados en el centro de secuenciación automática de ADN de la Pontificia Universidad Católica de Chile (<http://pregrado.bio.uc.cl/instalaciones/centro-de-secuenciacion-automatizada-de-adn/>)

Gen	Partidores	Secuencia (5'-3')	Longitud del amplicón (pb)
H3	H3f3b-F	AAAAAATGGCTCGTACAAAGCAAAGCTG	413
	H3f3b-R	CCTTAAGCACGCTCGCCACG	
GFP	GFP-F	AAAAAATGGAGCTGTTACCCGGGGTG	709
	GFP-R	CCCTTGACAGCTCGTCCATGC	
TBP	TBP-F	ATGGATCAAAACAACAGTAT	894
	TBP-R	TTACGTTGTTTTCTGAAGC	
CTCF	CTCF-F	ATGGAAAGTGAAATGGCGG	2205
	CTCF-R	TCACCGGTCCATCATGCTC	
Sp7	Sp7-F	AAAAAATGGCTTCTCCCATGCTAGA	1301
	Sp7-R	CCTATTCTAACAACCTCCTT	
Dlx5	Dlx5-F	AAAAAATGACAGGAGTCTATGAGCG	874
	Dlx5-R	CCGTAGAGAGTCCCTGATGCCA	

**Tabla 2.** Partidores para clonamiento de ML de H3, GFP, TBP, CTCF, Sp7 y Dlx5 de *Xenopus tropicalis*.

2.2.2. Plásmido pBLRP contiene ML de Sp7 de *Callorhinchus milli* o SpC de *Branchiostoma floridae*

Se diseñó el vector pBLRP con tal de que los ML de Sp7 de *Callorhinchus milli* y SpC de *Branchiostoma floridae* estuvieran flanqueados por sitios de restricción PmeI (Figura 6). De este modo, se puede retirar el ML e incorporar otro ML de Factores de transcripción amplificadas en romo. Este vector pBluescript modificado, contiene los sitios de partidores M13, regiones promotoras T7 y T3 para transcripción *in vitro* de ARN, secuencias de recombinación attB1 y attB2 para clonamiento Gateway, río arriba del ML la secuencia Kozak para vertebrados [155], el sitio de inicio de traducción y río abajo del ML una etiqueta BLRP que codifica para una secuencia de aminoácidos que es susceptible a biotinilación mediante la enzima BirA [79, 82-84]. Si la etiqueta BLRP está en 5' o 3' fue nombrada como BLRP-N terminal y BLRP-C terminal, respectivamente. Por ende, permite la identificación de factores de transcripción mediante la afinidad biotina-estreptavidina. Los vectores fueron sintetizados por la compañía **Biomatik** (<https://www.biomatik.com/services/gene-synthesis.html>).

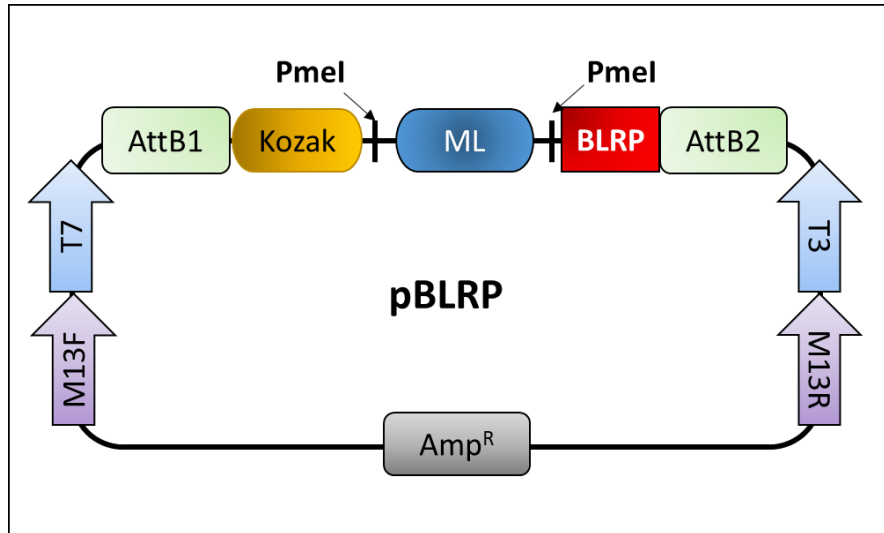


Figura 6 Esquema del plásmido pBLRP.



### 2.3. PCR: Amplificación de fragmentos de ADN

#### 2.3.1. Generación de ADNc a partir de tejidos óseos mediante RT-PCR

A partir de los tejidos óseos, mesénquima y calvaria de renacuajos en estadio 51NF y 59NF, respectivamente, se obtuvo el ARN mediante homogeneización en Trizol (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), y posterior precipitación siguiendo las instrucciones del fabricante. Seguidamente, las reacciones de transcripción reversa se realizaron en un volumen total de 20µl con: 1µg de ARN, 5µM de oligo-dT, 0.5µM de dNTPs, 0.5µl de RNAsin (Promega) y 0.8µl de transcriptasa reversa M-MLV (Promega, Madison, WI, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante. El cDNA obtenido fue cuantificado con el kit Qubit Broad Range dsDNA Assay (Thermo Fisher), luego fue almacenado a -80°C para la amplificación de ML.

#### 2.3.2. Amplificación de ADNc mediante PCR de alta fidelidad

Para la obtención de ML en romo, se utilizó 0.5µl de ADNc de tejido óseo por reacción de PCR con la polimerasa de alta-fidelidad KOD (Calbiochem, SanDiego, CA, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante. Seis fragmentos de ADN fueron amplificados (Tabla 2). Seguidamente, los amplicones fueron purificados mediante el kit Wizard SV Gel and PCR clean-up System (Promega, Madison,

USA), siguiendo las instrucciones del fabricante. Luego, el ADN purificado fue cuantificado mediante el kit Qubit Broad Range DNA Assay (Thermo Fisher) y almacenado a  $-80^{\circ}\text{C}$  para su posterior uso en reacciones de ligación.

## 2.4. Generación de bacterias competentes

### 2.4.1. Bacterias Calcio-competentes

Las bacterias calcio-competentes fueron preparadas inoculando una colonia de bacteria DH5 $\alpha$  en 25ml de medio LB e incubado por 8 h a  $37^{\circ}\text{C}$ . Luego, 3ml de bacterias fueron inoculados en 250ml de medio LB, 20mM  $\text{MgSO}_4$  y 20mM glucosa e incubado a  $22^{\circ}\text{C}$  con agitación suave hasta una  $\text{OD}_{600} = 0.55 - 0.6$ . Una vez alcanzada la densidad óptica el matraz fue sumergido en agua con hielo por 10 min, y centrifugado a 5000 rpm a  $4^{\circ}\text{C}$  por 15 min, el sobrenadante fue descartado. El pellet fue resuspendido en 80 ml de Solución Amortiguadora de Transformación Inoue (SATI, 10mM PIPES pH 6.7, 15mM  $\text{CaCl}_2$ , 250mM KCl, y 55mM  $\text{MnCl}_2$ ), y centrifugado por 10 min a 4000 rpm a  $4^{\circ}\text{C}$ , el sobrenadante fue descartado. Luego, el pellet fue resuspendido en 20ml de SATI, y se añadió 2.25ml de DMSO, e incubado en hielo por 10 min. Finalmente, las bacterias calcio-competentes fueron alicuotadas en 300 $\mu\text{l}$ , congelados en hielo seco, y almacenadas a  $-80^{\circ}\text{C}$  para su posterior uso.

### 2.4.2. Bacterias Electro-competentes

Las bacterias electro-competentes fueron preparadas inoculando una colonia de bacteria DH5 $\alpha$  en 25ml de medio LB e incubado por 8 h a  $37^{\circ}\text{C}$ . Luego, 3ml de bacterias fueron inoculados en 250ml de medio LB, 20mM  $\text{MgSO}_4$  y 20mM glucosa e incubado a  $22^{\circ}\text{C}$  con agitación suave hasta un  $\text{OD}_{600} = 0.55 - 0.6$ . Una vez alcanzada la densidad óptica el matraz fue sumergido en agua con hielo por 10 min, y centrifugado a 5000 rpm a  $4^{\circ}\text{C}$  por 15 min, el sobrenadante fue descartado. El pellet fue resuspendido en 200ml de  $\text{H}_2\text{O}$  fría y filtrada y centrifugado por 5min a 5000 rpm a  $4^{\circ}\text{C}$ , el sobrenadante fue descartado. Se repitió este paso 2 veces. Luego, el pellet fue resuspendido en 100ml de Glicerol 10% y centrifugado por 5 min a 5000 rpm a  $4^{\circ}\text{C}$ . Finalmente, las bacterias electro-competentes fueron resuspendidas en 2ml de Glicerol 10% y alicuotadas en 40 $\mu\text{l}$ , congelados en hielo seco, y almacenados a  $-80^{\circ}\text{C}$  para su posterior uso.

## 2.5. Clonación molecular

### 2.5.1. Clonación mediante ligación

Los amplicones de los ML de *H3f3b*, *GFP*, *Sp7* y *Dlx5* de *Xt* fueron ligados al vector de expresión pBLRP-C, mientras que los ML de TBP y CTCF al vector pBLRP-N. La ligación fue realizada mediante ADN ligasa T4 (New England Biolabs, County Road, Ipswich, USA), en un volumen total de 20µl, e incubado a 16°C por un mínimo de 4h o toda la noche. Al día siguiente, se procedió a inactivar la ligasa T4 incubando a 80°C por 5 min, luego el ligando fue precipitado usando pellet paint NF co-precipitant (Sigma-Aldrich), siguiendo las instrucciones del fabricante. Finalmente, el pellet fue resuspendido en 8.7µl de Agua libre de nucleasas, 1µl de Buffer B (Invitrogen) y 0.3ul de PmeI (Mssl, Invitrogen), e incubado a 37°C por 1 hora, este paso fue para digerir los vectores religados. La ligación puede ser almacenada a -80°C para su posterior uso, sin embargo es preferible su uso inmediato.

### 2.5.2. Transformación bacteriana

#### 2.5.2.1. Usando golpe térmico

A partir de las reacciones de ligación se utilizaron 3,5µl, los cuáles fueron incubados en 50µl de bacterias DH5α calcio-competentes por 10 min en hielo. Luego, las bacterias fueron sometidas a un golpe térmico de 42°C por 30 segundos, y consiguientemente incubadas en hielo por 2 min. Después, fueron añadidos 100µl de medio SOC, e incubadas por 45 min a 37°C con agitación suave. Finalmente, 100µl del inoculo fueron sembrados en placas LB/Agar conteniendo 100µg/ml de ampicilina y 50µg/ml de X-gal, e incubados a 37°C por toda la noche.

#### 2.5.2.2. Usando golpe eléctrico

A partir de las reacciones de ligación se utilizaron 1µl, los cuáles fueron incubados en 40µl de bacterias DH5α electro-competentes por 1 minuto en hielo. Luego, las bacterias fueron transferidas a una cubeta de 20mm para someterlas a un golpe eléctrico definido por el electroporador (BioRad). Consiguientemente, se añadió 1ml de medio LB, fueron resuspendidas y transferidas a tubo eppendorf de 1.5ml, e incubadas por 60 min a 37°C con agitación suave. Finalmente, 100µl del inoculo fueron sembrados en placas LB/Agar conteniendo 100µg/ml de ampicilina y 50µg/ml de X-gal, e incubados a 37°C por toda la noche.

#### 2.5.2.3. Selección de colonias y PCR colonia

Una vez que la transformación sucedió, ya sea mediante golpe térmico u eléctrico, al día siguiente, se seleccionaron las colonias blancas de las azules y analizadas mediante PCR de colonia, usando la polimerasa Go-Taq Green (Promega), siguiendo las instrucciones del fabricante, en combinación

con partidores específicos para determinar la presencia del inserto en el vector, y su respectiva orientación frente a los promotores T3 o T7. Posteriormente, las colonias positivas con el plásmido identificado fueron cultivadas en 5ml de medio LB con 100µg/ml de ampicilina, e incubadas a 37°C con agitación 200 rpm.

#### 2.5.3. Purificación de plásmidos

Para el análisis de rutina, los plásmidos fueron extraídos mediante el kit Wizard Plus SV Minipreps DNA purification system (Promega, Madison, USA), y analizados mediante ensayos de enzimas de restricción (indicado en 2.5.4). Una vez corroborada la naturaleza de los plásmidos y para obtener templados para reacción de transcripción in vitro, 100µl de bacteria que contienen los plásmidos pBLRP o pBS fueron inoculados en 100ml de medio LB con 100µg/ml de ampicilina e incubados a 37°C con agitación 200 rpm por 16-20 h. Finalmente, los plásmidos fueron extraídos mediante el kit PureYield Plasmid Midiprep System (Promega, Madison, USA) y cuantificados mediante el kit Qubit Broad Range DNA Assay (Thermo Fisher), y almacenado a -20°C para su posterior uso.

#### 2.5.4. Digestiones analíticas mediante enzimas de restricción

Las digestiones analíticas se realizaron digiriendo 100-300ng de ADN, en una solución de buffer para enzimas de restricción 1x, BSA 1x, y 2 UI de enzimas en 10µl de reacción. Las incubaciones de digestión se realizaron siguiendo las instrucciones del fabricante, por un tiempo mínimo de 60 min. Finalmente, las digestiones fueron analizadas mediante electroforesis indicada en 2.5.5

#### 2.5.5. Electroforesis en geles de agarosa

Los productos de PCR y digestiones, fueron visualizados en geles de agarosa al 1% en buffer TAE 1x (Tris-acetato 40mM y EDTA 1mM), teñidos con Bromuro de Etidio 0.1µg/ml. Se utilizó el buffer de carga 6x que contenía glicerol 30%, azul de bromofenol 0.5% en buffer TE (Tris-HCl 10mM, EDTA 1mM a pH 8). Se utilizaron 0.5µg de marcador de tamaños moleculares 2-Log (BioLabs), en 11µl totales en buffer de carga 1x, como estándar de peso molecular el cual abarca tamaños de ADN entre 0.25-10kpb. Los productos de PCR y de digestiones fueron sometidos a un campo eléctrico de 90V por 40 min, sumergidos en buffer TAE1x en una cámara de electroforesis. Los fragmentos de ADN fueron visualizados mediante transiluminador de luz ultravioleta acoplado a un equipo de fotodocumentación de geles (Vilber Lourmat), para la captura de imágenes.

#### 2.6. Reacción de transcripción con UTP-DIG



### 2.6.1. Linearización de plásmidos

Los plásmidos pBLRP o pBS fueron linearizados a través de reacción de restricción, utilizando 10 UI de enzima, y 10µg de ADN en 50µl de reacción, e incubados a 37°C por toda la noche. Una vez linearizados se añadieron 1/10 de volumen de acetato de sodio 3M pH 5.5, y el doble de volumen de etanol 100%, fueron mezclados y precipitados a -20°C por toda la noche. Una vez precipitado, el ADN fue centrifugado a 14.000xg por 20 min a 4°C, el sobrenadante fue removido y el pellet fue lavado suavemente con 0.3ml de etanol 70%. La muestra fue nuevamente centrifugada a 14.000xg por 10 min a 4°C. El sobrenadante fue descartado, y los tubos secados a TA por 10-30 min. Una vez seco el pellet de ADN fue resuspendido en 10µl de Agua-DEPC, y guardado a -80°C para su posterior uso en reacción de transcripción.

### 2.6.2. Reacción de transcripción y purificación de sondas ARN-Dig mediante precipitación con LiCl<sub>2</sub>

Los plásmidos linearizados pBLRP y pBS, fueron utilizados como molde para sintetizar sondas de ARN-Dig sentido y antisentido. La reacción de transcripción se realizó usando la Polimerasa de ARN T3 o T7, dependiendo del sentido de síntesis, y siguiendo las instrucciones del fabricante. Después, fueron añadidos 6 µl de Agua-DEPC, 2µl de DNasa I (Roche) y 2µl de buffer de DNAsal (Roche), e incubado a 37°C por 90 min.

Las sondas de ARN-Dig obtenidas fueron precipitadas agregando 1 µl EDTA 0.5M, 2.5 µl LiCl 4M, mezclar y añadir 75 µl de EtOH100% frío. Luego se dejó toda la noche a -20°C. El precipitado fue centrifugado 14.000xg por 20 min a 4°C, se debe observar el pellet. Luego, el sobrenadante es descartado y el pellet lavado con 300µl de etanol 70% frío. La centrifugación fue repetida, y el sobrenadante descartado. El pellet fue secado a TA por 30 min. Una vez secado el pellet este fue resuspendido en 15µl de agua DEPC, y cuantificado mediante el kit Qubit Broad Range RNA Assay (Thermo Fisher). Un total de 100ng de ARN-dig fue utilizado para electroforesis en gel de agarosa 1% para corroborar su estabilidad estructural. Finalmente, las sondas ARN-Dig fueron almacenadas a -80°C para su posterior uso en HIS.

## 2.7. Hibridación *in situ*

### 2.7.1. HIS en cortes embebidos en parafina en tejidos mineralizados de *Xenopus tropicalis* y *Callorhincus milii*

Las muestras fijadas de patas traseras (58NF) y dientes (59 NF) fueron descalcificadas por 3 h en solución MORSE (Citrato de Sodio 10% y Acido Fórmico 22.5%) con agitación suave. Similarmente, para las muestras de placa dental de *Callorhincus milii* (estadio 34). Las muestras fueron incluidas

en parafina y seccionadas en 7  $\mu\text{m}$  usando micrótopo Microm HM 325 (Thermo Scientific). Los cortes fueron montados sobre portaobjetos Superfrost Plus (Fisher, Pittsburgh, PA, USA) a 60°C por toda la noche. Durante el primer día, las muestras fueron desparafinadas en 2 lavados con Xilol, luego fueron hidratados progresivamente en soluciones decrecientes de Etanol: Etanol 100%, Etanol 95%/PBS 5%, Etanol 75%/PBS 25%, Etanol 50%/PBS 50%, Etanol 25%/PBS 75% y PBS 100%, y consecutivamente tratados con Proteínasa K (10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) a 37°C por 30 min para facilitar el ingreso de las sondas ARN-Dig. Este paso es crítico, y requiere de optimización, ya que un débil tratamiento dificulta la penetración de las sondas al ARN blanco y un tratamiento fuerte torna lábiles a los tejidos ante los posteriores lavados, degradándolos histológicamente. Luego, los tejidos fueron tratados con Trietanolamina (0.1M, pH 8), con anhídrido acético 0.25% para evitar la unión de la sonda ARN-Dig sobre el portaobjetos, y/o el tejido. Después las muestras fueron preincubadas por 2-3 h en solución de Hibridación (Formamida 50%, Roche Blocking reagent 0.4g, SSC5x, tórula de ARN 1mg/ml, Heparina 100ug/ml, Tween 20 1%, CHAPS 0.1%, EDTA 10mM pH 8), el cual fue reemplazada por solución de hibridación con 1ng/ $\mu\text{l}$  de sonda ARN-Dig, e incubada a 60°C por toda la noche. Las muestras fueron incorporadas dentro de una cámara húmeda y oscura para prevenir la evaporación.

Al segundo día, los portaobjetos fueron sumergidos en SSC4X CHAPS 0.1% a 60°C y lavados en SSC2X CHAPS 0.1%/ Formamida 50% por 30 min a 60°C. Luego fueron lavados en solución TNE (Tris 10 mM pH 7.5, NaCl 500 mM, EDTA 1 mM) y tratados con RNasa A (20  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) por 30 min a 37°C, para eliminar los excesos de sondas ARN-Dig sin hibridar. Lavados posteriores fueron realizados con SSC 0.2X CHAPS 0.1% a 60°C y Buffer 1 (Tris pH 7.5 100 mM, NaCl 150 mM) para estabilizar el híbrido RNA-RNA. Las muestras fueron bloqueadas con Buffer 1 + Suero de cabra 20% por 1 h a temperatura ambiente, luego fueron incubadas con anticuerpo anti-DIG-AP (Roche) 1:2000 en buffer 1 + suero de cabra 20% a 4°C por toda la noche dentro de la cámara húmeda.

Al tercer día, las muestras fueron lavadas (4 veces), en Buffer 1 más Tween 0.05% por 10 min a temperatura ambiente para eliminar el exceso de anticuerpo, y luego fueron sumergidos (2 veces), en solución de fosfatasa alcalina (Tris 100mM pH 9.5, NaCl 100mM, MgCl<sub>2</sub> 50mM, Tween 0.1%). Después la solución fue reemplazada por una solución colorante saturada de NBT/BCIP e incubada a 25°C. Dependiendo de la abundancia de ARN blanco la reacción puede demorar entre 30min a 48 h. Cuando fue apropiado la reacción fue detenida lavando las muestras en PBS por 10 min a temperatura ambiente (3 veces). Después, fueron fijados en MEMFA (MOPS 100mM, EGTA 2mM, MgSO<sub>4</sub> 1mM, Formaldehído 3.7%) por 1 h a temperatura ambiente para inactivar la fosfatasa alcalina. Las muestras fueron deshidratadas progresivamente en soluciones crecientes de etanol: Etanol 25%, Etanol 50%, Etanol 75% y 2 lavados de Etanol 100% por 5 min, 4 lavados en Xilol por 5 min y finalmente montados en Entellan (Merck).

### 2.7.2. HIS en embrión completo de *Branchiostoma lanceolatum*

Los embriones de *Branchiostoma lanceolatum* en los estadios gástrula, néurula y larva, fueron lavados 3 veces con NaPBS 0.1%Tween (0.9% NaCl, 20mM PBS a pH 7.4) por 5 min, luego fijados con PFA4%/NaPBS por 30min a TA. Consiguientemente, los embriones fueron tratados con una serie de lavados con Trietanolamina (TEA, 0.1M, pH 8): primero por 1 minuto, segundo por 5 min, tercero TEA+0.25% anhídrido acético por 5 min y finalmente TEA+0.50% anhídrido acético por 5 min. Inmediatamente, los embriones fueron lavados 2 veces con NaPBS por 5 min. Luego, fueron tratados mediante una serie de buffer de hibridación (BH, 50% formamida, 5X SSC, 100µg/mL heparin, 5mM EDTA, 1X Solución de Denhardt, 1mg/mL total RNA, 0,1% Tween 20X) previamente calentado a 60°C: primero incubación con 100µl BH por 1 minuto, segundo incubación con 200µl BH por 3-6 h. Finalmente, incubación con 200µl BH+sonda de ARN-dig (1ng/ µl) por toda la noche. Todas las incubaciones fueron realizadas a 60°C.

Al día siguiente, los embriones fueron lavados 4 veces con WS1 (50% Formamida, 5x SSC, 1%SDS) a 60°C, a distintos tiempos: 5 min, 5 min, 15min y 15 min. Luego, fueron lavados con WS2 (50% Formamida, 2x SSC, 1%SDS) a 60°C por 5 min, después fue enfriado a TA por 10 min, y lavados con WS2 por 15min a TA con agitación. Prontamente, se realizaron lavados con WS3 (2x SSC, 0.1%Tween), por 1 minuto a TA, 5 min a TA y con agitación, luego fueron tratados con 200µl de solución de RNAsaA (2µl RNAsaA 10mg/ml, 1µl RNAsaT1 10U/µl, en 1ml WS3) e incubados a 37°C por 20 min. Seguidamente, los embriones fueron lavados dos veces con WS3 por 20min a TA y con agitación, luego lavados con WS4 (0.2x SSC, 0.1%Tween) por 5 min a TA y con agitación. Finalmente, los embriones fueron lavados con WS5 (NaPBT, 2mg/ml BSA) por 5min a TA y con agitación, seguido por WS5+10% Suero de cabra e incubado a TA y con agitación por al menos 1 hora. Luego cambiar por anticuerpo Anti-DIG (Roche) 1:3000 en WS5 + suero de cabra 10% e incubar a 4°C por toda la noche.

Al tercer día, los embriones fueron lavados 4 veces por 20 min con NaPBT a TA con agitación. Luego fueron incubados en solución de fosfatasa alcalina menos (0.1M Tris-HCl pH 9.6, 0.1M NaCl, 0.1%Tween) sin MgCl<sub>2</sub> por 10min a TA, luego fueron reemplazados por solución de fosfatasa alcalina más (+50mM MgCl<sub>2</sub>), y se dejó incubando por 10min a TA y con agitación, fueron lavados por al menos 2 veces. La solución fue cambiada por 250µl de BMPurple (Roche) filtrado a 45µm. El revelado se mantuvo en oscuridad hasta que la señal fuera lo suficientemente intensa, ello implicó dejarlo por varios días a TA, cuando la solución de revelado se tornó rosado se cambió por solución fresca. Cuando la señal fue lo suficientemente buena, se realizaron dos lavados de 10 min con solución de fosfatasa alcalina menos y luego dos lavados con NaPBT por 10min. Luego, reemplazado por PFA4% en NaPBS, por 30min a TA sin agitación. Finalmente, lavados dos veces con NaPBT y reemplazado por glicerol 100% para su guardado a 4°C y posterior adquisición de imágenes.

## 2.8. Análisis Histológicos

### 2.8.1. Tinción Hematoxilina-Cromotropo

Los cortes obtenidos de tejidos mineralizados fueron tratados con Xilol, 3 lavados, el primero de 10 min y los dos restantes de 5 min para remover la parafina. Luego, las muestras fueron hidratadas en una serie de soluciones decrecientes de etanol: 100%, 96%, 75%, 50%, 25% de Etanol. Cada lavado se realizó por 5 min. Seguidamente, las muestras fueron sumergidas en agua destilada por 1 min y teñidas en Hematoxilina de Harris (Newpath) por 1 minuto. Luego, se removió el exceso de tinte mediante agua corriente por 10 min. Consiguientemente, las muestras fueron sumergidas en 50%, 70% y 80% de Etanol por 3 min cada uno para luego teñirlas con cromotropo 2R (Sigma), luego las muestras fueron lavadas cuatro veces en Etanol 96% para remover el exceso de tinte, cada lavado fue de 1 minuto. Finalmente, dos lavados con Etanol 100% de 5 min cada uno, cuatro lavados con Xilol de 5 min cada uno y montaje con resina Entellan (Merck).

### 2.8.2. Tinción de Von-kossa

Para realizar este tipo de tinción el procedimiento histológico se realizó tradicionalmente, con la excepción del procedimiento de descalcificación por MORSE. Se utilizó el kit de tinción Von-kossa (Diapath) siguiendo las instrucciones del fabricante. Es un método de visualización de iones de calcio en cortes histológicos donde las sales de calcio son intercambiados por sales de plata y utilizando luz UV permite la reducción a plata metálica negra.

### 2.8.3. Tinción Tricrómico de Masson

Para realizar este tipo de tinción el procedimiento histológico se realizó tradicionalmente. Se utilizó el kit de tinción Tricrómico de Masson (Diapath) siguiendo las instrucciones del fabricante. Resumidamente, emplea tres colorantes: hematoxilina, fucsina y verde-luz. Útil para diferenciar fibras de colágeno en el tejido conectivo.

## 2.9. Tecnología de clonamiento Gateway

### 2.9.1. Vectores Entry-FT obtenidos por reacciones Gateway BP

Las reacciones BP fueron realizadas en 10 $\mu$ l, con 50 femtomoles de vector pBLRP-FT, y 50 femtomoles de pDonor221 p1-p2, usando 2 $\mu$ l de Buffer BP, y 2 $\mu$ l de clonasa BP (Invitrogen). La reacción de recombinación fue incubada por 4 h a 25°C seguido de un tratamiento de Proteínasa K por 10 min a 37°C.

El vector pDonor221 p1-p2 posee un casete génico conteniendo el gen suicida *ccdB*, y el gen de resistencia a cloranfenicol *CmR*. Estos casetes están flanqueados por los sitios de recombinación attP1 y attP2, y el *backbone* de este plásmido contiene el gen de resistencia a Kanamicina (Figura 7). La transformación de los vectores Entry-FT fue realizada según el punto 2.5.2, pero sembrando las bacterias sobre placas con medio LB-agar con 50µg/ml de Kanamicina

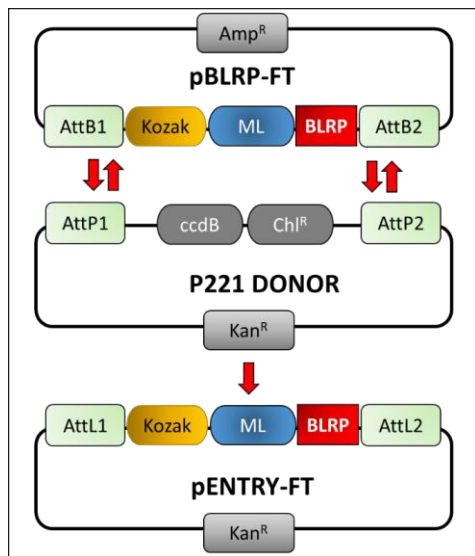


Figura 7. Esquema de reacción Gateway BP para obtener vectores pENTRY-FT.

La recombinación realizada por la clonasa BP modifica los casetes génicos de los vectores pBLRP-FT y pDonor221 p1-p2 y mediante la selección con Kanamicina permite obtener la región de interés flanqueada por los sitios de recombinación attL1 y attL2 en el nuevo plásmido ENTRY-FT (Figura 7). Al día siguiente, se efectuó PCR colonia, indicado en 2.5.2.3 para identificar la presencia del FT. Las colonias identificadas fueron cultivadas en 5ml de medio LB con 50µg/ml de Kanamicina por 20 h para su posterior extracción, purificación, cuantificación y análisis de enzimas de restricción. Una vez que los plásmidos fueron identificados se almacenaron a -20°C para su posterior uso en reacciones de recombinación Gateway LR.

### 2.9.2. Construcción del vector CMV:BirA-Cherry/CMV:[R1-orf-R2]

El vector pCS2-CAGG:BirA-Cherry (Figura 8A) fue digerido con las enzimas de restricción Ascl y FseI para liberar el linealizado **CAGG:BirA-Cherry** (Figura 8A). Luego, fue ligado al linealizado CMV:GFP, previamente linealizado por Ascl y FseI. Producto de esta ligación se obtuvo el plásmido

CAGG:BiA-Cherry-i-CMV:GFP (Figura 8A). Segundo, este nuevo vector fue recombinado con la clonasa BP para intercambiar el reportero GFP por la caseta génica *ccdB/Clo<sup>R</sup>*. Finalmente, se obtuvo el vector pDestino o CAGG:BiA-Cherry-i-CMV:[R1-*ccdB/CmR-R2*] (Figura 8B), de este modo, los ML de distintos factores de transcripción en vectores ENTRY-FT pueden ingresar al plásmido pDestino mediante recombinación Gateway con la clonasa LR.

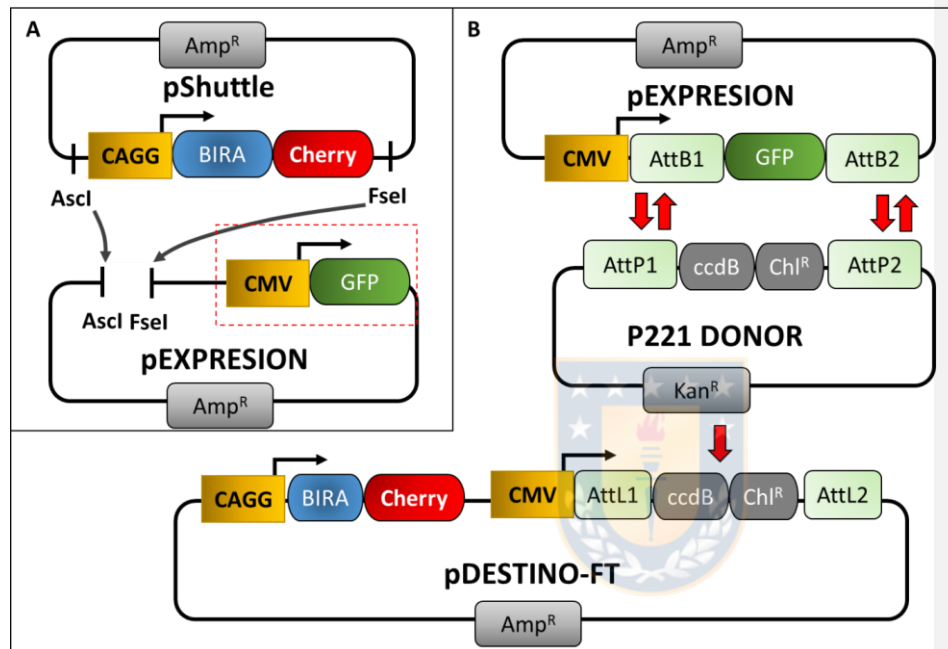


Figura 8. Esquema de construcción del vector pDestino-FT.

### 2.9.3. Generación de vectores de expresión de factores de transcripción biotinilables mediante reacción de recombinación Gateway LR

Las reacciones de recombinación LR se efectuaron en 10µl totales, usando 75ng del vector ENTRY-FT, y 75ng del vector Destino-ORF en 2µl de Buffer LR y 2µl de Clonasa LR (Invitrogen) (Figura 9). La reacción se incubó por 2 h a 25°C seguido del tratamiento con Proteínasa K por 10 min a 37°C. La transformación fue realizada mediante golpe eléctrico, siguiendo el punto 2.5.2.2. Después se realizó PCR de colonias para identificar la presencia de los FT en el vector Destino-Orf y estas fueron cultivadas en 5ml de medio LB con ampicilina a 37°C y a 200 rpm toda la noche. Al día siguiente los plásmidos fueron purificados mediante el kit Qiagen Plasmid Midi (Qiagen), siguiendo las instrucciones del fabricante. Seguidamente, cuantificados mediante espectrofotómetro nanodrop

(Quawell, facilitado por la Dra. Amparo Uribe) y analizados mediante ensayos de restricción (Según 2.5.4). El plásmido fue guardado a -20°C para su posterior uso en electroporación sobre cultivo primario de osteoblastos.

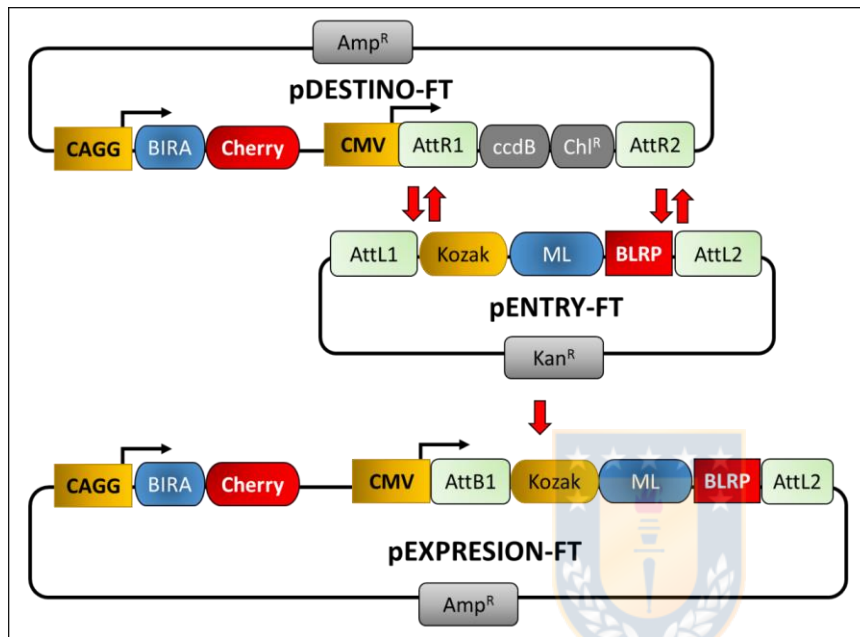


Figura 9. Esquema de reacción de recombinación Gateway LR.

#### 2.10. Cultivo primario de osteoblastos a partir de calvarias de *Xenopus tropicalis*

Previamente a la disección, el material de disección fue esterilizado mediante Cloruro de Benzoxonio 0.1% (Alcolex®). Un mínimo de 5 renacuajos entre los estadios 58-62NF fueron llevados a un acuario con medio fresco, anestesiados, y lavados en medio de disección (PBS0.6x con 2 gotas de polividona). Este procedimiento es para disminuir la carga bacteriana y fúngica que pueden contener naturalmente los renacuajos, de este modo aumentar el éxito del cultivo primario. Los renacuajos fueron sacrificados, y sus huesos frontoparietales, o calvarias, fueron diseccionados y recolectados en tubos de 2ml conteniendo 500µl de medio HBSS 0.6x (Hyclone) con 1% Penicilina/Estreptomina (P/E) (Hyclone). Cada tubo puede contener un máximo de 10 calvarias. Seguidamente, las calvarias fueron tratadas con 200µl de colagenasa P (Roche) al 0.1% en HBSS 0.6x 1% P/S por 40 min a TA con agitación suave. Luego, el sobrenadante fue eliminado y las calvarias fueron tratadas con 200µl de Tripsina 0.125% y colagenasa P 0.1% en HBSS 0.6x 1% P/S por 10 min a TA con agitación suave.

Los dos tratamientos anteriores fueron aplicados para eliminar células pigmentadas, cristales de hidroxapatita y eritrocitos. Posteriormente, las calvarias fueron tratadas mediante 3-4 series de 200µl de Tripsina 0.25%, y colagenasa P 0.1% en HBSS 0.6x 1% P/S por 15 min a TA con agitación suave. Después de cada tratamiento los osteoblastos fueron recolectados en 5ml de medio L15 0.6X (Gibco) con 10% SBF, 1% P/S, 1% L-Glu, 25ug/ml de Gentamicina y 0.25ug/ml Fungizona en un tubo falcon de 15ml para inactivar la tripsina. Las células fueron centrifugadas a 200xg por 5 min, resuspendidas en 2ml de medio L15 0.6x suplementado con 10% SBF, 1% L-Glu y 1%P/E y estas fueron cuantificadas utilizando el hemicitometro (Neubauer). Un total de  $7 \times 10^4$  osteoblastos fueron sembrados en placas de 35mm e incubados a 28°C para su expansión y posterior electroporación (2.11.2).

## 2.11. Transfección en células HEK293 y electroporación en cultivo primario de osteoblastos

### 2.11.1. Transfección mediante Lipofectamina en la línea celular HEK293

HEK293 es una línea celular derivada del tejido renal de embriones humanos. Estas células fueron utilizadas para **evaluar la expresión de vectores biotinilables** debido a su alta eficiencia de transfección por Lipofectamina (Invitrogen). Las células fueron mantenidas en medio de crecimiento DMEM 1x (Gibco), que consiste en una solución de DMEM 1x suplementado con SFB 10% (HyClone), L-Glutamina 1% (HyClone) y P/E 1% (HyClone). Dependiendo del porcentaje de confluencia (entre 80 a 95%), las células fueron expandidas a nuevas placas de 100mm utilizando tripsina/EDTA 0.25%.

El día previo a la transfección, se sembró  $1.2 \times 10^6$  células por placa de 60mm en 4ml de medio de crecimiento DMEM, e incubado a 37°C por 24 h. Al día siguiente, fue realizada la transfección mediante Lipofectamina (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se utilizó un volumen total de 1.2ml de medio DMEM 1x, sin suero ni antibiótico, con 4µg de plásmido y 50µl de lipofectamina. La transfección se realizó por 4 h a 37°C y el medio fue reemplazado por 4ml de medio de crecimiento DMEM y fue incubado por 24 h a 37°C para posteriores análisis de Western blot (2.13).

### 2.11.2. Electroporación en Cultivo primario de osteoblastos mediante el sistema Neon.

Una vez expandidas hasta el pasaje 3 y alcanzado el 90-95% de confluencia, se tomaron a lo menos dos placas p100, considerando una cantidad de  $\sim 4 \times 10^6$  células, se retiró el medio de crecimiento y se lavaron dos veces con PBS0.6x por 5 min cada uno. Este paso permite la dilución del calcio que estabiliza las uniones célula-célula y célula-matriz. Luego, los osteoblastos fueron despegados con 1ml tripsina/EDTA 0.25% (Invitrogen) y se incubó a 28°C por 3 min. Seguidamente, fue neutralizado



con 3ml de L15 0.6x con 10% Suero bovino fetal. Posteriormente, el número de células fue cuantificado utilizando hemicitómetro (Neubauer). Se centrifugó a 300xg por 3 min a TA. Luego, se descartó el sobrenadante y el pellet de células fue resuspendido con Buffer R (Invitrogen) mezclado con 15µg de ADN, considerando 100µl totales de la mezcla por cada  $1 \times 10^6$  células. Se tomaron 100µl del mix de células/DNA/Buffer con pipeta Neon (Invitrogen) y se insertó en estación de electroporación Neon (Invitrogen). Se utilizaron los siguientes parámetros para electroporar: 1700V, 20ms, 1 pulso. Inmediatamente después de cada electroporación, las células fueron resuspendidas en 500µl de medio de recuperación (L150.6x, Suero fetal bovino 10%, Glutamax 1%) en tubos eppendorf de 1.5ml y fueron incubadas por 10 min a TA. Luego, fueron sembradas  $2 \times 10^5$  células sobre placas p35, destinadas a citometría (2.14.2),  $1 \times 10^5$  para análisis de fluorescencia por afinidad (2.12), y más de  $2 \times 10^6$  células en placas p100 para HT-Chapmentación (2.16). Todas las células fueron incubadas a 28°C por 4 h en medio de recuperación. Finalmente, el medio de recuperación fue reemplazado por medio de crecimiento (L15 0.6x, Suero Bovino Fetal 10%, Glutamax 1%, P/S 1%) y se dejó incubando por un mínimo de 16 h a 28°C para los análisis anteriormente mencionados.

#### 2.12. Fluorescencia por afinidad

Para adherir los osteoblastos electroporados sobre cubreobjetos redondos (16mm) estos fueron tratados con polilisina 0.005% (Sigma) por un mínimo de 1 h a 37°C dentro de placa de 24 pocillos (Nunc). Luego, fueron sembrados  $1 \times 10^5$  de osteoblastos electroporados e incubados a 28°C por un mínimo de 16 h. Al día siguiente, los osteoblastos fueron lavados 3 veces con PBS0.6x y fijados con formaldehído libre de metanol al 4% por 5 min a TA. Seguidamente, fueron lavados tres veces con PBS1x y permeabilizados con Tritón 0.1%/PBS1x por 15 min. Posteriormente, fueron lavados tres veces con PBS1x y bloqueados con BSA 1%/PBS1x toda la noche a 4°C. Al día siguiente, fueron lavados tres veces con PBS1x e incubados con 1:500 de Streptavidin conjugado con Alexa 647 (ThermoFisher) y 1:100 DAPI (ThermoFisher) por 2 h a TA. Finalmente, fueron lavados 5 veces con PBS1x y montados sobre portaobjetos utilizando DAKO (Agilent) para ser observados bajo microscopio confocal espectral LSM780 Zeiss (CMA-Biobío).

#### 2.13. Western blot contra proteínas biotiniladas sobreexpresadas en HEK293

##### 2.13.1 Extracción de proteínas a partir de HEK293 Lipotransfectadas

Después de transfectar las células HEK293 (2.11.1), se lavaron 2 veces con 4ml PBS1x y se añadieron 400µl de tripsina/EDTA0.25% (Gibco) e incubados por 3 min a 37°C para despegar las células. Luego, se agregaron 2ml de DMEM/10%SBF para neutralizar y las células fueron despegadas suavemente mediante resuspensión. Inmediatamente, fueron transferidas a tubo falcon

de 15ml y centrifugadas a 500xg por 5 min. Se descartó el sobrenadante y el pellet fue resuspendido en 200µl de PBS1x/ cocktail de inhibidor de proteasas 1x y transferidos a tubo eppendorf de 1.5ml, en este punto es posible almacenar a -80°C. Seguidamente, las células fueron lisadas mediante sonicación aplicando 4 pulsos de 7 segundos a 70% de amplitud sobre hielo. Posteriormente, fueron centrifugadas a 14,000xg por 10min a 4°C. A continuación, el sobrenadante fue recolectado y transferido a un tubo eppendorf de 1.5ml, en este punto también se puede almacenar a -80°C el extracto de proteínas. Las proteínas fueron cuantificadas utilizando el método de Bradford a través del kit RC/DC protein assay kit (BioRAD) siguiendo las instrucciones del fabricante.

### 2.13.2 Western blotting utilizando Streptavidina conjugada con Horseradish

Una vez cuantificadas los extractos de proteínas, se utilizaron entre 10 a 60µg de proteína total con buffer de carga. Previo a su introducción al gel de SDS-PAGE 10% las muestras fueron calentadas a 95°C por 5 min. Se utilizaron 10µl de standard de proteínas pre teñidas (Thermo) como marcador de peso molecular. Las muestras fueron sometidas a un campo electroforético de 200V por 1 hora, utilizando el sistema de montaje para Western Blot BioRad (facilitado por el Dr. Juan Pablo Henríquez) en buffer de electroforesis (Tris-Glicina 1x, SDS 0.1 %). La transferencia de las proteínas se realizó sobre membrana PVDF/Nitrocelulosa (Whatman) en buffer de transferencia a 90V a 4°C por 90 min. Seguidamente, la membrana de transferencia fue enjuagada con agua destilada, después lavada tres veces en TBST1x por 5 min cada uno, seguido de dos lavados con solución de bloqueo (TBST1x, BSA 5%) por 5 min cada uno, a continuación fue incubado en solución de bloqueo por dos h sobre un agitador, finalmente la membrana fue incubada con 1:2500 de Streptavidin-HRP (Sigma) por 50 min. Inmediatamente, la membrana fue lavada 5 veces con solución de bloqueo por 5 min cada uno, seguido de 5 lavados con TBST1x por 5 min cada uno. Inmediatamente, la membrana fue revelada añadiendo 1ml del kit Western Lighting Plus ECL (Pierce) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las imágenes fueron adquiridas en un fotodocumentador (facilitado por Dr. Juan Pablo Henríquez)

## 2.14. Citometría de flujo

### 2.14.1. Preparación de células HEK293 y osteoblastos electroporados para citometría de flujo

Las células HEK293 transfectadas mediante Lipofectamina en placas de 35mm, fueron lavadas 2 veces con 1ml de PBS 1x. Seguidamente, las células fueron removidas de la superficie con 200µl de Tripsina/EDTA 0.25% e incubados a 37°C por 3 min. Para inactivar la tripsina se añadieron 800µl de medio de crecimiento DMEM y las células fueron disgregadas mediante resuspensión suave, luego fueron transferidas a un tubo de 1.5ml y se cuantificó el número total de células mediante

hemicitometro (Neubauer), después se centrifugó por 5 min a 100xg. Consiguientemente, se descartó el sobrenadante, y las células fueron resuspendidas en 2ml de PBS 1x, y nuevamente fueron centrifugadas a 200xg por 5 min. Por último, las células fueron dejadas a una concentración celular de  $1 \times 10^6$  células/ml, en un volumen mínimo de 500 $\mu$ l de PBS 1x para cuantificar la fluorescencia mediante FACS.

Similarmente, los osteoblastos electroporados en placas de 35mm fueron lavados 3 veces con PBS0.6x por 5 min cada uno. Luego, los osteoblastos fueron separados de la superficie con 500 $\mu$ l de Tripsina/EDTA 0.25% precalentado a 37°C e incubados con las células a 28°C por 3 min. Para inactivar la tripsina se añadieron 2ml de medio de crecimiento L15 y las células se disgregaron suavemente mediante resuspensión suave, seguidamente se transfirieron a tubos con fondo redondo de 5ml, se tomó una alícuota de 10 $\mu$ l para la cuantificación de la densidad celular mediante hemicitometro (Neubauer), luego se centrifugó a 300xg por 3 min. Se descartó el sobrenadante y el pellet fue lavado 2 veces con PBS0.6x + 2mM EDTA. Finalmente, una concentración de  $1 \times 10^6$  células/ml, en un volumen mínimo de 300 $\mu$ l de PBS 0.6x, fueron utilizados para evaluar la fluorescencia en el citómetro BD LSRFortessa X-20 (facilitado por la Dra. María Inés Barría) o para obtener la población de osteoblastos electroporados mediante Citómetro de flujo Cell Sorter BD FACSAria III (disponible en el CMA-BioBio)



## 2.15. ATAC-seq

### 2.15.1 Reacción de tagmentación

Los osteoblastos se obtuvieron según los pasos indicados en 2.10. Se utilizaron  $5 \times 10^4$  células y fueron centrifugados a 500xg por 5 min a 4°C. Utilizar más o menos células puede generar un sesgo en la secuenciación. Se descartó el sobrenadante y se lavó en 50 $\mu$ l de PBS0.6x enfriado en hielo. Se centrifugó a 500xg por 5 min a 4°C. Se descartó el sobrenadante y se añadió 50 $\mu$ l de Buffer de lisis (10mM Tris-HCl pH 7.4, 10mM NaCl, 3mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1% IGEPAL CA 630) frío y pipetear 10 veces suavemente. Mediante esta suave lisis permite obtener núcleos íntegros. Luego, se centrifugó a 500xg por 10min a 4°C. Se descartó el sobrenadante e inmediatamente se realizó la reacción de transposición añadiendo al pellet 20 $\mu$ l de agua libre de nucleasas, 25 $\mu$ l de Buffer de Transposición TD buffer y 0.5 $\mu$ l de Tn5 (Nextera DNA library Prep Kit). Se mezcló suavemente y se incubó a 37°C por 30min. La reacción de tagmentación consiste en que la transposasa hiperactiva Tn5 fragmenta el ADN libre y lo etiqueta (tag), con tal de tagmentar regiones libres de histonas, asociadas a promotores y regiones regulatorias en un contexto celular determinado (Figura 4C). Finalmente la reacción de tagmentación se purificó usando el kit Qiagen MinElute PCR purification, siguiendo las

instrucciones del fabricante. Se eluyó el ADN transposado en 10µl de Buffer de elución (Qiagen). En este punto es posible almacenar el ADN transposado a -80°C.

### 2.15.2 Amplificación de ADN transposado

Los 10µl del ADN transposado fueron mezclados según los reactivos indicados en la tabla 3 y amplificados usando la polimerasa del kit Nextera DNA library Prep (Illumina). En particular, se utilizaron los partidores con código de barras Ad1\_noMX y Ad2.1-2.4 [85], estos partidores hibridan con la región tagmentada por la Tn5 y poseen una secuencia con “código de barra” (barcode) que permite su posterior identificación dentro de la línea de secuenciación (Tabla 4).

Reactivos	Volumen
PCR primer Ad1_noMX (10µM)	2.5µl
PCR Primer 2 (Barcode) (10µM)	2.5µl
NPM (Nextera PCR Master mix)	7.5µl
Agua libre de nucleasas	2.5µl
ADN transposado	10µl
<b>Volumen total</b>	<b>25µl</b>

Tabla 3 Reactivos utilizados para amplificar el ADN transposado



Se utilizó el siguiente programa de amplificación:

- 1) 72°C, 5 min
- 2) 98°C, 30 segundos
- 3) 98°C, 10 segundos
- 4) 98°C, 10 segundos
- 5) 72°C, 1 minuto
- 6) Repetir pasos 3-5, **13 ciclos**
- 7) Mantener a 4°C

Finalmente, la librería de ADN transposado fue purificado con el kit Qiagen MinElute PCR purification (Qiagen), siguiendo las instrucciones del fabricante. Para la remoción de los dímeros de partidores contaminantes se utilizaron AMPure beads (Agencourt, Beckman Coulter) a una razón de 1:1 según las indicaciones del fabricante. Seguidamente, la librería fue cuantificada usando Qubit dsDNA HS assay kit (Invitrogen). Finalmente, se verificó la librería mediante electroforesis en gel de agarosa 2%, cargando 10% de la librería amplificada, a 70V por 35 min, así también fue analizado mediante

Bioanalyzer TapeStation 2220 (Agilent).

Primers Nextera	Secuencia
Ad1_noMX :	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTCGTCGGCAGCGTCAGATGTG
Ad2.1_TAAGGCGA	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATTCGCCTTAGTCTCGTGGGCTCGGAGATGT
Ad2.2_CGTACTAG	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATCTAGTACGGTCTCGTGGGCTCGGAGATGT
Ad2.3_AGGCAGAA	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATTTCTGCCTGTCTCGTGGGCTCGGAGATGT
Ad2.4_TCCTGAGC	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATGCTCAGGAGTCTCGTGGGCTCGGAGATGT

Tabla 4. Secuencia de Primers Nextera utilizadas para generar las distintas librerías

### 2.15.3 Análisis informáticos sobre librería de ADN transposado

#### 2.15.3.1 Secuenciación de librerías

Las librerías de ATAC-seq fueron enviadas al laboratorio del Dr. Salvatore Spicuglia, Marsella, Francia, quien facilitó su secuenciador Illumina HiSeq 2500 con 50 bp paired-end reads (lecturas pareadas). Se obtuvieron alrededor de 70 millones de secuencias (reads) por muestra, los tamaños de los reads fueron 50bp permitiendo cubrir eficientemente el genoma de *Xenopus tropicalis*.

#### 2.15.3.2 Procesamiento de datos

Los datos de secuenciación fueron entregados en formato fastq. El análisis global preliminar se realizó utilizando el software de libre acceso para el control de calidad de datos de secuenciación masiva FastQC (versión 0.11.9) (<https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>). Nuestro flujo de trabajo se realizó sobre la plataforma python realizando los script correspondientes a cada proceso. Primero, una vez analizado los parámetros de calidad dadas por FastQC [156], eliminamos los extremos 5' y 3' de las secuencias mediante el software Trimmomatic [157], eliminando los primeros 15bp ubicados en 5' correspondiente a la secuencia de los adaptadores de los partidores; y removiendo los últimos 5bp, ubicados en 3', correspondientes a secuencias de baja calidad. Obtuvimos lecturas (reads) de tamaño de 56bp, conservando la calidad de secuenciación mayor a 28. Segundo, después del ajuste de los reads se evaluó la calidad de nuestros datos mediante FastQC. Tercero, todos los reads fueron mapeados sobre el genoma 4.1 de *Xenopus tropicalis* [137] utilizando el programa bowtie2 [158] usando los parámetro por defecto. Cuarto, los datos generados fueron visualizados mediante Generic Genome Browser (versión 2.42) [159], una herramienta que es parte de la plataforma Generic Model Organismo (GMOD), una base de datos de programas de libre acceso para gestionar, visualizar, almacenar y difundir datos genómicos. Los reads fueron alineados al genoma de referencia por lo tanto permitió ser comparado con nuestros

datos de RNA-seq de Calvaria y tejido mesenquimático, así también comparar con las bases de datos de Chip-seq sobre marcas de histonas [141].

2.16. Precipitación por afinidad de la cromatina y secuenciación de alto rendimiento utilizando tecnología de transposas hiperactivada Tn5 (HT-CHAPmentacion)

#### 2.16.1 Entrecruzamiento con formaldehído al 1%

Una vez obtenida la población de osteoblastos GFP<sup>+</sup> (punto 2.14.1) fueron centrifugados a 300xg por 5 min a TA. Luego, el pellet fue resuspendido en 150µl de PBS0.6x y fueron fijadas al 1% de formaldehído añadiendo 10µl de Formaldehído al 16% libre de metanol (ThermoScientific) y se incubó por 10 min a TA. Seguidamente, se detuvo la fijación añadiendo 8.42µl de Glicina 2.5M e incubando a TA por 5 min con agitación suave. Inmediatamente, fueron centrifugados a 500xg por 3 min a 4°C, luego se removió el sobrenadante y el pellet fue lavado con 200µl de PBS1x con 1x Cocktail Anti-proteasas (Roche). Finalmente, se centrifugó a 2000xg por 10 min a 4°C y se removió el sobrenadante. En este punto es posible guardar el pellet de células a -80°C por un máximo de 1 semana.

#### 2.16.2 Extracción de núcleos mediante Sonicación (NEXSON)

El pellet de células fue resuspendido en 130µl de Buffer de lisis LF (5mM PIPES pH8, 85mM KCl, 0.5% IGEPAL, 1x cocktail antiproteasa libre de EDTA) [160]. La mezcla fue transferida a microtubos AFA (Covaris) de 130µl para Lisis celular mediante el ultrasonicador COVARIS M220 (facilitado por el Dr. Cristian Gallardo). Se utilizaron los siguientes parámetros: PIP: 75W, Duty cycle=2%, Cycles per Burst=200, Temperature (bath) = 7°C, por un tiempo de tratamiento de 5 min. Mediante este tratamiento suave de ultrasonicación combinado con detergente no-iónico facilita la lisis celular para la extracción de núcleos de osteoblastos. Después, la mezcla se transfirió a tubo eppendorf de 1.5ml.

Para estandarizar la lisis celular por NEXSON en osteoblastos primarios evaluamos el número de núcleos aislados a distintos tiempos de tratamientos. Para ello, tomamos 10µl de alícuota a distintos tiempos 0, 2.5 y 5 min. Luego las alícuotas fueron centrifugadas a 1000xg por 10 min a TA, el sobrenadante eliminado y los núcleos fueron resuspendidos en 20µl de PBS1x con DAPI e incubados en oscuridad por 20 min a TA para teñir los núcleos aislados. Finalmente, se añadieron 180µl de PBS1x y centrifugados a 1000xg por 5 min a TA. El pellet fue resuspendido en 15µl de DAKO (Agilent) y montados sobre portaobjetos para su análisis en microscopia confocal espectral LSM780 Zeiss (CMA-BioBío).

### 2.16.3 Fragmentación de la cromatina

Los núcleos aislados fueron resuspendidos en 130µl de Buffer de Fragmentación (10mM Tris-HCl pH 8.0, 0.25%SDS, 2mM EDTA, 1x cocktail antiproteasa). La mezcla fue transferida a microtubos AFA (Covaris) de 130µl para fragmentar la cromatina mediante el ultrasonicador COVARIS M220 (facilitado por el Dr. Cristian Gallardo). Se utilizaron los siguientes parámetros: PIP: 75W, Duty cycle=10%, Cycles per Burst=200, Temperature (bath) = 7°C, por un tiempo de tratamiento de 3 min, para obtener fragmentos de cromatina entre los rangos de 200-700bp para generar la librería de HT-Chapmentación. Después, la mezcla se transfirió a tubo eppendorf de 1.5ml y el lisado fue equilibrado con 195µl de buffer de equilibrio (10mM Tris-HCl pH 8.0, 233 mM NaCl, 1.66% TritonX-100, 0.166% DOX, 1 mM EDTA, 1x cocktail de anti-proteasas) [89]. Finalmente, el lisado fue centrifugado a 14.000xg por 10 min a 4°C y el sobrenadante fue transferido a un tubo nuevo.

La estandarización de los tiempos de tratamientos de la sonicación para fragmentar la cromatina se realizó con un total de  $2 \times 10^5$  células y después del tratamiento mediante NEXSON fueron sonicadas a 3, 4 y 5 min. Luego, el sonicado fue transferido a tubos eppendorf de 1.5ml, centrifugado a 14.000xg por 10 min a 4°C y transferido a tubo eppendorf de 1.5ml nuevo. Se mezcló con 10µl de Proteínasa K (10mg/ml) y se incubó a 65°C O/N para realizar el desentrecruzamiento. Al día siguiente, se añadieron 2µl de RNAsa A e incubados a 37°C por 30 min. Para recuperar el ADN se utilizó el kit Wizard SV Gel and PCR clean-up System (Promega, Madison, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante. Finalmente, el ADN recuperado fue cuantificado utilizando nanodrop (Quawell, facilitado por la Dra. Amparo Uribe) y analizado mediante electroforesis digital a través de Bioanalyzer TapeStation 2220 (Agilent, facilitado por la Dra. Sofía Valenzuela) con el chip D1000 ScreenTape (Agilent) para análisis de ADN, siguiendo las instrucciones del fabricante.

### 2.16.4 Precipitación de la cromatina por afinidad biotina-estreptavidina

El 90% del volumen obtenido de la fragmentación de la cromatina fue mezclado con 10µl de Dynabeads M280 (Invitrogen), 4µl de cocktail anti-proteasas 50x, 1µl de glicógeno (20mg/ml) y se llevó a 200µl con Buffer RIPA-LS (10mM Tris-HCl pH 8.0, 140mM NaCl, 1mM EDTA pH 8.0, 0.1%SDS, 0.1% Na-Deoxycholate, 1% Triton x100) y fue incubado a 4°C O/N en un rotador. El 10% del volumen del sonicado fue reservado para el input. Una vez finalizada la incubación se utilizó un rack magnético por 2 min para precipitar el complejo biotina-estreptavidina. Se retiró el sobrenadante y el precipitado fue lavado con 150µl de la siguiente serie de buffer de lavados: 2 lavados con buffer RIPA-LS, 2 lavados con buffer RIPA-HS (10mM Tris-HCl pH 8.0, 500mM NaCl, 1mM EDTA pH 8.0, 0.1%SDS, 0.1% Na-Deoxycholate, 1% Triton x100), 2 lavados con buffer RIPA-LiCl (10mM Tris-HCl pH 8.0, 250mM LiCl, 1mM EDTA pH 8.0, 0.5% NP-40, 0.5% Na-Deoxycholate) y 2 lavados con TE1x (10mM Tris-HCl pH 8.0, 1mM EDTA pH 8.0). Finalmente, se elimina el sobrenadante y el precipitado es preparado para la reacción de tagmentación.

### 2.16.5 Reacción de tagmentación

Se añadieron sobre el precipitado 10µl de agua libre de nucleasas y 10µl de buffer Tagmentación (Illumina). Por otra parte, sobre el input se añadieron 1µl de 50mM MgCl<sub>2</sub> por cada 5µl de input y se agregaron 10µl de buffer de tagmentación (Illumina). En ambos casos fueron resuspendidos suavemente y transferidos a tubos de PCR. Seguidamente, se añadieron 0.5µl de Tn5 (Illumina) y fue incubado en el termociclador a 37°C por 10 min. Para detener la reacción de tagmentación se añadieron 150µl de Buffer RIPA-LS y se dejó incubando en hielo por 5 min. Finalmente, fueron lavados 2 veces con buffer RIPA-LS y 1 lavado con Buffer TE1x sobre el rack magnético.

### 2.16.6 Preparación de la librería para secuenciación masiva

La librería y el input fueron diluidos en 24.5µl de agua libre de nucleasas y se mezclaron con los reactivos indicados en la tabla 5.

Reactivos	Volumen
PCR primer Ad1_noMX (25µM)	0.25µl
PCR Primer 2 (Barcode) (25µM)	0.25µl
Illumina PCR Master mix	25µl
ADN precipitado	24.5 µl
<b>Volumen total</b>	<b>50µl</b>



Tabla 5. Reactivos utilizados para amplificar librería de HT-Chapmentación

Se utilizó el siguiente programa de amplificación:

- 1) 72°C, 5 min (extensión de adaptadores)
- 2) 95°C, 5 min (desentrecruzamiento)
- 3) 98°C, 10 segundos
- 4) 63°C, 30 segundos
- 5) 72°C, 3 min
- 6) Repetir pasos 3-5, **13 ciclos**
- 7) Mantener a 10°C

Después de la amplificación, las librerías fueron purificadas usando Agencourt AmPureXP beads (Beckman Coulter) a una razón de 1:1 para eliminar los partidores. La concentración de ADN fue medido con el kit Qubit dsDNA HS Kit (Invitrogen) y analizado mediante Bioanalyzer TapeStation 2220 (Agilent).





### 3. RESULTADOS

#### 3.1. Expresión esquelética del módulo regulatorio Sp7/Dlx5

##### 3.1.1 Búsqueda de genes parálogos de la familia SP en el genoma de *Xenopus tropicalis*

Nuestro primer paso fue determinar las ubicaciones genómicas de la familia Sp en el genoma de referencia de *Xenopus tropicalis* versión 4.1. Para obtenerlas consultamos nuestra base de datos de RNA-Pet, y las anotaciones genómicas proporcionadas por Xenbase. Las referencias genómicas de genes parálogos de Sp fueron encontradas (Tabla 6).

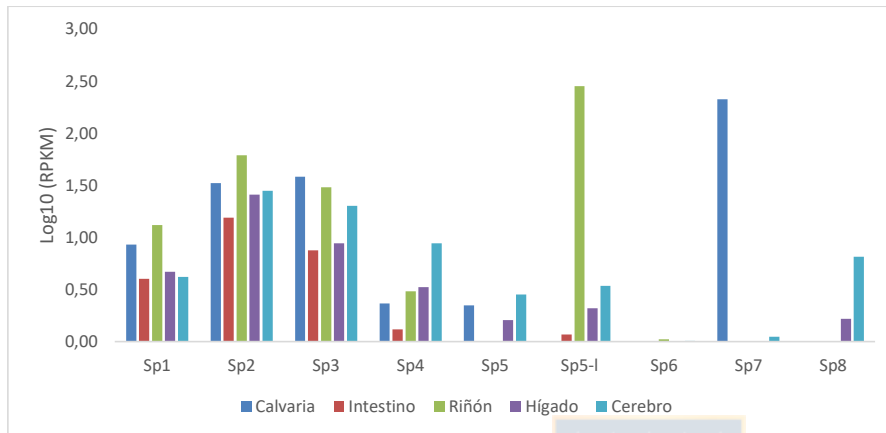
Clado	Gen	Ubicación Genómica
Sp1-4	<i>Sp1</i>	scaffold_226:979,760..992,339
	<i>Sp2</i>	scaffold_334:93,583..104,588
	<i>Sp3</i>	scaffold_105:898,779..924,227
	<i>Sp4</i>	scaffold_52:462,558..474,630
Sp5	<i>Sp5</i>	scaffold_105:2,310,128..2,313,613
	<i>Sp5-l</i>	scaffold_67:471,501..474,796
Sp6-9	<i>Sp6</i>	scaffold_334:21,910..22,257
	<i>Sp7</i>	scaffold_226:1,075,324..1,080,563
	<i>Sp8</i>	scaffold_52:725,902..729,112
	<i>Sp9</i>	scaffold_105:743,834..748,368

Tabla 6. Referencias genómicas de las unidades de transcripción de los miembros de la familia SP de *Xenopus tropicalis*. Son indicadas las posiciones genómicas de genes SP en el genoma de referencia de *X. tropicalis* 4.1.

Una vez halladas las posiciones genómicas de los parálogos Sp, comparamos los niveles relativos de expresión de cada gen utilizando RNA-seq en calvaria (NF57-60), previamente obtenidos [141]. También incluimos los tejidos: intestino, riñón, hígado y cerebro [161].

La expresión es ubicua para los miembros Sp1, Sp2, Sp3 y Sp4 en los tejidos analizados (Figura 10), este tipo de expresión es propia de este clado Sp1-4 [162]. Por otra parte, la expresión de Sp5 y Sp5-l son bajas en los tejidos analizados (Figura 10) a excepción de Sp5-l que está fuertemente expresado en Riñón (Figura 10). En particular, en el clado Sp6-9, Sp6 está bajamente expresado en los tejidos analizados (Figura 10), mientras que Sp7 está específica y fuertemente expresado en calvaria (Figura 10). Este resultado sugiere que Sp7 es el único miembro expresado fuertemente en tejido óseo dentro del clado Sp6-9 en *Xenopus tropicalis* (Figura 10). Por otra parte, Sp8 está

expresado en cerebro y en menor grado en el hígado (Figura 10). Nuestros datos de RNA-pet no ubicaron a Sp9.



**Figura 10. Niveles relativos de expresión de genes de los miembros de la familia SP en distintos tejidos de *Xenopus tropicalis*.** El Gráfico de barras representa los niveles de expresión medidos en Log<sub>10</sub> RPKM y determinados por RNA-seq para Sp1-Sp8 en Calvaria, Intestino, Riñón, Hígado y Cerebro [141, 161].

### 3.1.2 Alineamiento de secuencia de aminoácidos de los miembros del clado Sp6-Sp9

Una vez determinadas las ubicaciones genómicas y niveles relativos de expresión en *Xenopus tropicalis*, nos preguntamos sobre el nivel de conservación entre los ortólogos de la familia SP en gnatóstomos. En el alineamiento global podemos observar que existen tres regiones muy conservadas, con un umbral de puntaje de entropía mayor a 0.75, estas regiones son: caja Sp, caja Btd y los tres dedos de zinc (Figura 11A). Centramos nuestros análisis sobre los dedos de zinc, regiones de reconocimiento y de unión al ADN [123]. Luego, buscamos diferencias entre los parálogos de la familia Sp en *Xenopus tropicalis* y encontramos que Sp7 posee tres mutaciones en cada dedo de zinc, asociado a la región alfa-hélice (Figura 11B).

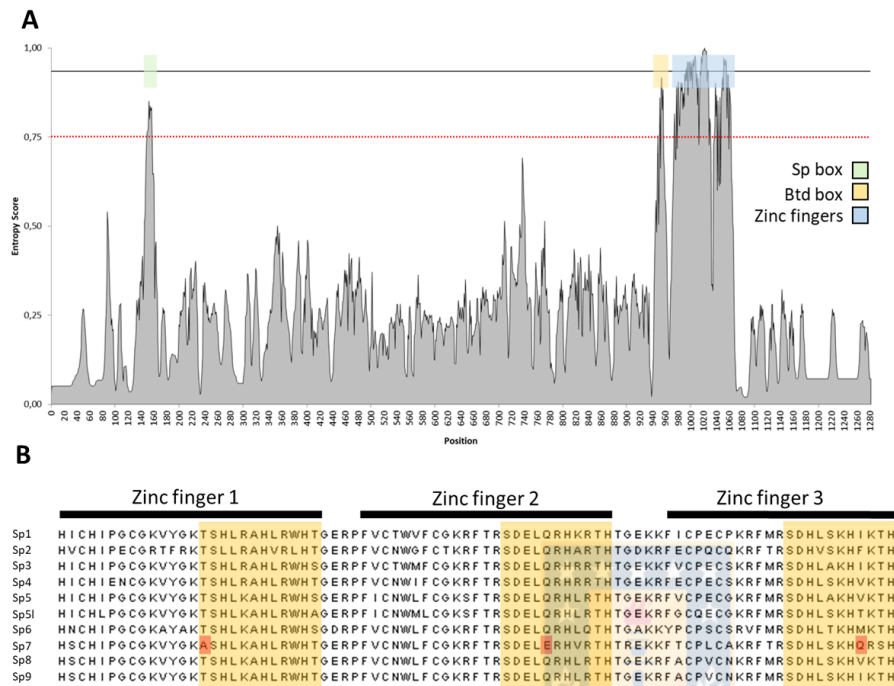


Figura 11. Alineamiento muestra regiones conservadas de aminoácidos entre los ortólogos de la familia SP en gnatóstomos. A) Gráfico que muestra el puntaje de entropía asociado a la posición del alineamiento global entre los ortólogos en gnatóstomos de la familia SP. Línea roja discontinua representa el umbral considerado como altamente conservado. B) Alineamiento de las regiones de dedos de zinc entre parálogos de la familia SP en *Xenopus tropicalis*. Región amarilla indica conservación de aminoácidos asociados a alfa-hélice, aminoácidos resaltados en rojo muestra mutaciones únicas de Sp7.

### 3.1.3 Análisis filogenético de la familia SP en vertebrados

Por otra parte, nos preguntamos cuándo surgió Sp7 en los vertebrados, para ello construimos un árbol filogenético (Figura Anexo 1). En el cladograma observamos 3 clados bien definidos, Sp1-4, Sp5 y Sp6-9 que surgen a partir de gnatóstomos (vertebrados con mandíbula) (Figura Anexo 1). Cabe destacar que tanto Sp6 y Sp7 no están presentes en agnatos (vertebrados sin mandíbula) (Figura Anexo 1). Esto sugiere que el subgrupo Sp6 y Sp7 es una novedad evolutiva de gnatóstomos. Nótese que Sp7 está presente en condriictios (Figura Anexo 1), esto sugiere que Sp7 cumple un rol en odóntodos. Por otra parte, tanto Sp8 y Sp9 poseen un ortólogo en agnatos, sugiriendo que este subclado surgió antes del subclado Sp6-7 (Figura Anexo 1). Con respecto a los ortólogos en Branchiostoma, SpA está relacionado con el subclado de gnatóstomos Sp1-4, SpB con Sp5 y SpC

se relaciona con los parálogos Sp6, Sp7, Sp8 y Sp9 en gnatóstomos (Figura Anexo 1). Esto implica que SpC es ortólogo directo del clado Sp6-9.

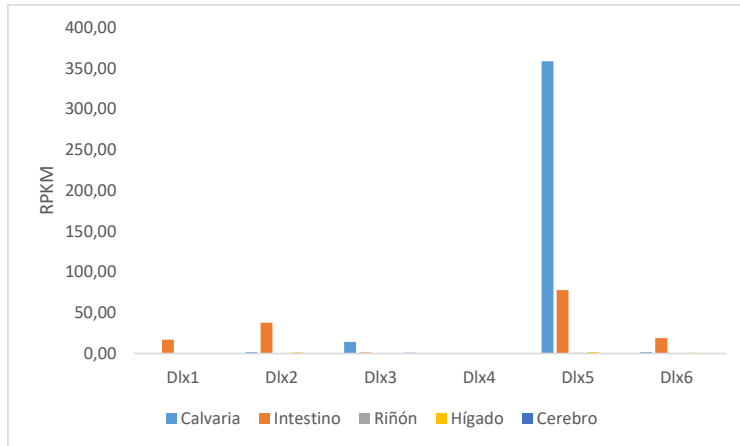
#### 3.1.4. Análisis de la expresión de la familia Dlx en *Xenopus tropicalis*

Determinamos las ubicaciones genómicas de la familia Dlx en el genoma de referencia de *Xenopus tropicalis* versión 4.1, utilizando los datos de RNA-Pet [161], y las anotaciones genómicas proporcionadas por Xenbase. Las referencias genómicas de genes parálogos de DLX fueron encontradas e indicadas enTabla 7.

Clado	Genes	Ubicación Genómica
Dlx1-2	Dlx1	scaffold_105:1,693,985..1,698,511
	Dlx2	scaffold_105:1,675,893..1,679,352
Dlx3-4	Dlx3	scaffold_165:2,180,158..2,185,078
	Dlx4	scaffold_165:2,143,007..2,160,541
Dlx5-6	Dlx5	scaffold_400:446,173..451,039
	Dlx6	scaffold_400:432,849..436,979

Tabla 7. **Referencias genómicas de las unidades de transcripción de los miembros de la familia SP de *Xenopus tropicalis*.** Son indicadas las posiciones genómicas de genes DLX en el genoma de referencia de *X. tropicalis* 4.1

Una vez identificada la posición genómica de los parálogos DLX, comparamos los niveles relativos de expresión de cada gen, análisis similar a los genes SP. Según nuestros datos la familia DLX está bajamente expresada en los tejidos analizados (Figura 12). Sin embargo, destacamos la presencia de transcrito de Dlx1, Dlx2, Dlx5 y Dlx6 en Intestino (Figura 12), y la expresión de Dlx3 y Dlx5 en calvaria (Figura 12). La abundancia de transcritos de *Dlx5* es 25 veces mayor que de *Dlx3*. En particular, son muy bajos los valores de RPKM para Dlx4 en los tejidos analizados (Figura 12). Dado a la alta presencia de transcrito de Dlx5 en hueso, centramos nuestros análisis de hibridación in situ sobre este gen.



**Figura 12. Niveles relativos de expresión de genes de los miembros de la familia DLX en distintos tejidos de *Xenopus tropicalis*.** El gráfico de barras representa los niveles de expresión medidos en RPKM y determinados por RNA-seq para Dlx1-Dlx6 en Calvaria, Intestino, Riñón, Hígado y Cerebro [141, 161].

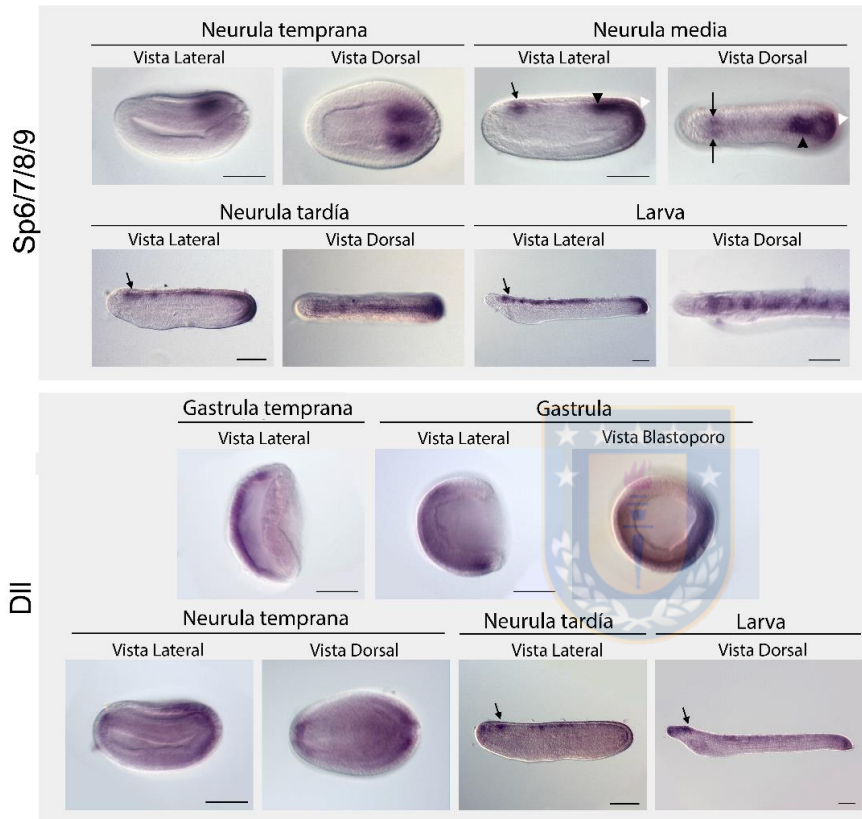
### 3.1.5. Patrón de expresión espacio-temporal del módulo regulatorio *Sp7/Dlx5* en Cordados

#### 3.1.5.1 Coexpresión de *SP/DLL* durante el desarrollo embrionario de *Branchiostoma lanceolatum*

Analizamos los patrones de expresión de *SPC* (o *Sp6/7/8/9*) y *Dll* mediante hibridación *in situ in toto* sobre embriones fijados de anfibio o pez lanceta (*Branchiostoma lanceolatum*) en diferentes estadios del desarrollo. La expresión de *SpC* primero fue detectada en néurula temprana en dos parches posteriores correspondientes al lado lateral de la placa neural posterior. Luego, en néurula media la expresión fue detectada en el tubo neural posterior (Figura 13, cabeza de flecha negra), en la epidermis posterior (Figura 13, cabeza de flecha blanca) y en dos parches laterales en la vesícula cerebral (Figura 13, flecha negra). En los estadios de néurula tardía y larva, transcritos de *SpC* fueron detectados en la vesícula cerebral, tubo neural y epidermis en el extremo más posterior (Figura 13). A pesar de la detección en todo el tubo neural, la intensidad de la señal no fue homogénea y parece seguir un patrón segmentado (Figura 13, ver lado dorsal de larva).

La expresión de *Dll* es similar a lo descrito en *Branchiostoma floridae* [163]. Ciertamente, la expresión de *Dll* primero fue detectada durante el inicio de la gastrulación, en la región que después formará el ectodermo (Figura 13). Durante el estadio de gastrulación, la expresión está restringida en la presunta epidermis (Figura 13). En el estadio de néurula tardía y larva, los transcritos de *Dll* fueron detectados en la epidermis, vesícula cerebral, en algunas neuronas ubicadas en el tercio medio del

tubo neural, y en la pared posterior de la bisagra cordoneural a nivel del brote de cola (Figura 13). En estos estadios, todas las células neuronales expresaron *Dll* y *SpC*.



**Figura 13. Los genes *SpC* (*Sp6/7/8/9*) y *Dll* están coexpresados en estructuras neuronales durante el desarrollo embrionario de *Branchiostoma lanceolatum*. La expresión de *Sp6/7/8/9* y *Dll* fue analizada mediante hibridación *in situ in toto*. La región anterior está orientada hacia la izquierda para la vista lateral y dorsal, y orientada hacia arriba en la vista blastoporo. Las flechas indican expresión en vesícula cerebral. Las cabezas de flechas negras y blancas indican la expresión en el tubo neural posterior y en la epidermis posterior, respectivamente. Barra de escala 50µm.**

### 3.1.5.1 Coexpresión de *Sp7/Dlx5* en odontoblastos de dentina trabecular de *Callorhynchus milii*

Para obtener una perspectiva general de la histología de la mandíbula inferior de *Callorhynchus milii* realizamos una tinción con Hematoxilina-cromotrope (Figura 14). Podemos identificar la placa dental ubicado dorsalmente del cartílago de Meckel (Figura 14 A). Dentro de la placa dental, identificamos la dentina trabecular rodeada por odontoblastos (Figura 14 A', cabeza de flecha negra). Al borde de la dentina encontramos el esmalte rodeado por los ameloblastos (Figura 14 A').

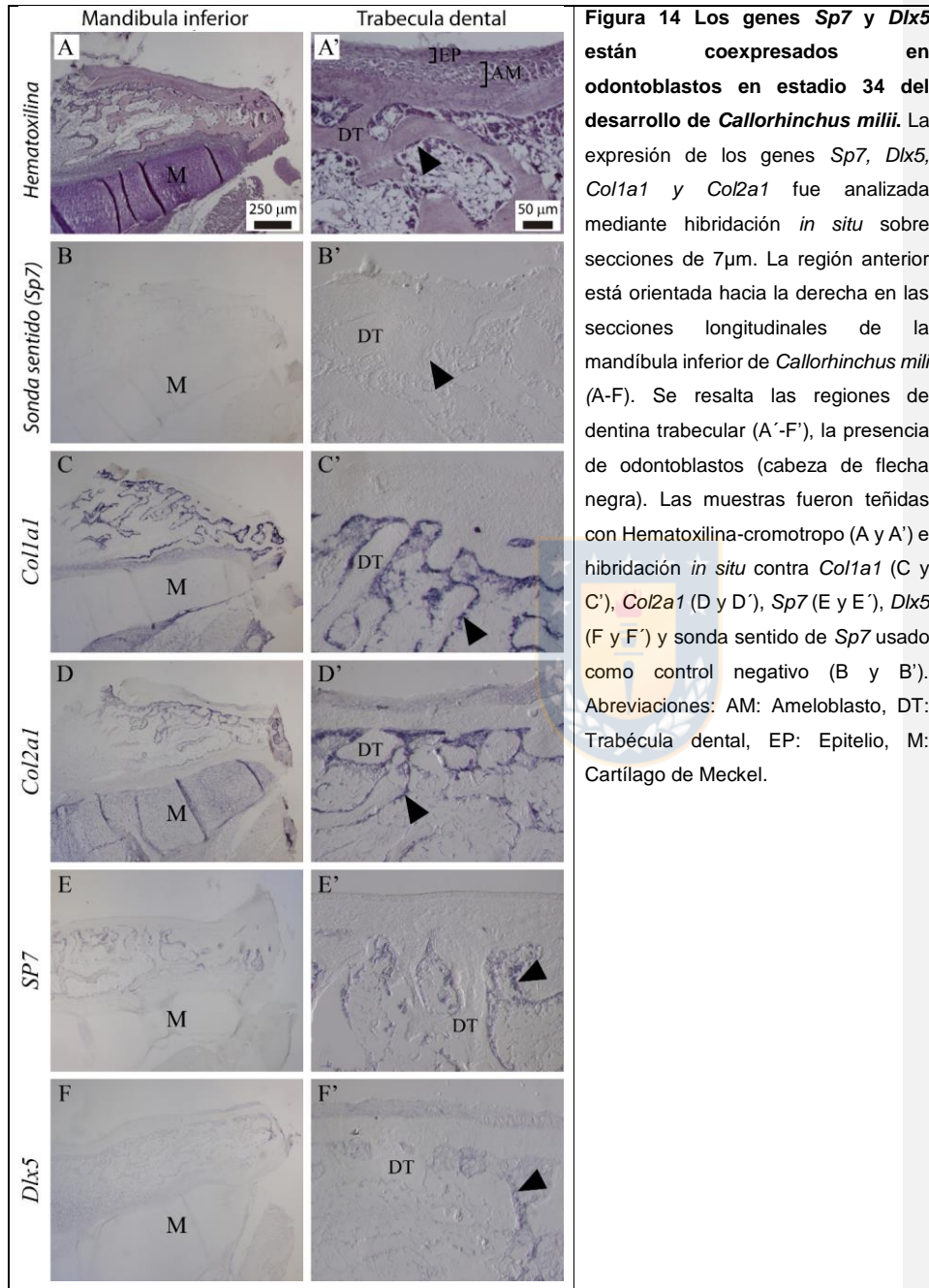
A través de análisis de tinción tricrómica de Masson de la dentina trabecular (Figura 15 A) podemos identificar dos regiones: región orgánica, ubicada en las trabéculas y estar teñida de azul (Figura 15 B) y región mineral, ubicada en el extremo anterior y estar teñida de rojo (Figura 15 C). La región orgánica se caracteriza por poseer menos hidroxapatita (Figura 15 D) y las fibras de colágeno están desorganizadas dentro de la trabécula (Figura 15 E). Por otra parte, la región mineralizada está concentrada en hidroxapatita (Figura 15 D) y las fibras de colágeno están organizadas de manera laminar formando zonas concéntricas (Figura 15 F).

Analizamos la presencia de transcrito de *Sp7* y *Dlx5* mediante HIS en cortes histológicos de la mandíbula inferior del tiburón elefante (*Callorhynchus milii*) en el estadio 34 del desarrollo [143]. Antes que todo, utilizamos como control experimental las sondas para *col1a1* y *col2a1*, conocidos por ser marcadores de odontoblastos [52] y cartílago [8] en vertebrados, respectivamente. Los transcritos de *col1a1* están fuertemente presentes en odontoblastos (Figura 14 C'), y en pericondrio del cartílago de Meckel (Figura 14 C). Sorprendentemente, encontramos transcritos de *col2a1* en odontoblastos (Figura 14 D'), esto sugiere que su presencia puede ser un remanente de una red regulatoria primitiva entre cartílago y odontoblastos [3, 35, 43, 99, 164-166]. También encontramos transcritos de *col2a1* en condrocitos del cartílago de Meckel (Figura 14 D). Estos resultados muestran la factibilidad de hacer HIS en cortes de mandíbula de tiburón elefante.

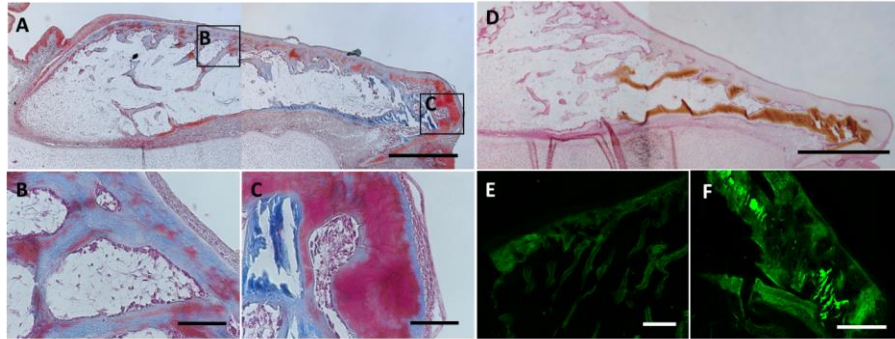
Los transcritos de *Sp7* están presentes en odontoblastos, a lo largo de la placa dentaria (Figura 14 E, E'), mientras que *Dlx5* está presente en odontoblastos pero en la región mineral de la placa dentaria (Figura 14, F, F'). En suma, *Sp7/Dlx5* están coexpresados en odontoblastos en dentina trabecular de la región más mineralizada.

Comentado [L6]: A través de





**Figura 14** Los genes *Sp7* y *Dlx5* están coexpresados en odontoblastos en estadio 34 del desarrollo de *Callorhinchus milii*. La expresión de los genes *Sp7*, *Dlx5*, *Col1a1* y *Col2a1* fue analizada mediante hibridación *in situ* sobre secciones de 7μm. La región anterior está orientada hacia la derecha en las secciones longitudinales de la mandíbula inferior de *Callorhinchus milii* (A-F). Se resalta las regiones de dentina trabecular (A'-F'), la presencia de odontoblastos (cabeza de flecha negra). Las muestras fueron teñidas con Hematoxilina-cromotrope (A y A') e hibridación *in situ* contra *Col1a1* (C y C'), *Col2a1* (D y D'), *Sp7* (E y E'), *Dlx5* (F y F') y sonda sentido de *Sp7* usado como control negativo (B y B'). Abreviaciones: AM: Ameloblasto, DT: Trabécula dental, EP: Epitelio, M: Cartílago de Meckel.



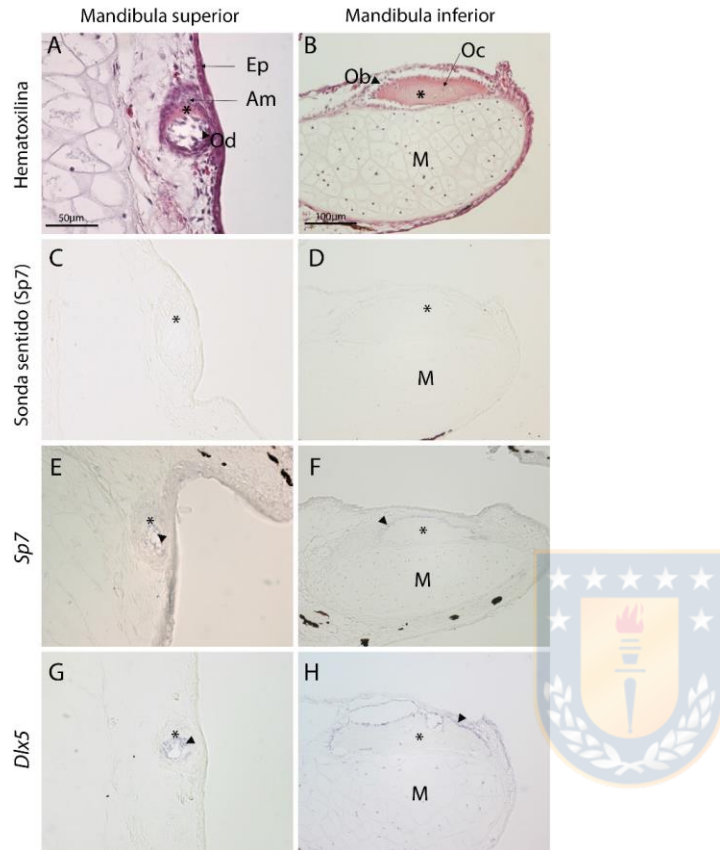
**Figura 15. Análisis histológicos de la placa dental de *Callorhynchus milii* en estado de eclosión.** A) Corte histológico de placa dental teñido con tricrómico de masson, barra de escala 500μm. Magnificación de región orgánica (B) y mineral (C), barras de escala: 50 μm. D) Análisis con tinción de Von Kossa, flechas indican región mineralizada, barra de escala 500 μm. Imágenes de segunda armónica de colágeno para la región orgánica (E) y mineral (F), barra de escala, 200 μm.

### 3.1.5.3 Coexpresión de *Sp7/Dlx5* en osteoblastos y odontoblastos de *Xenopus tropicalis*

Analizamos la presencia de transcrito de *Sp7* y *Dlx5* mediante HIS en cortes histológicos de la mandíbula superior e inferior de la rana africana (*Xenopus tropicalis*) en el estadio 59 del desarrollo [152]. En este estadio, en la mandíbula superior podemos encontrar el diente en desarrollo con dentina y esmalte mineralizados y las células que lo forman, odontoblastos y ameloblastos, respectivamente, antes de brotar del epitelio oral (Figura 16 A). Observamos la presencia de transcritos de *Sp7* y *Dlx5* en odontoblastos (Figura 16 E y G).

Por otra parte, en la mandíbula inferior podemos encontrar el hueso maxilar mineralizado, con presencia de osteoblastos y osteocitos, así también condrocitos en el cartílago de Meckel (Figura 16 B). Los transcritos de *Sp7* y *Dlx5* están presentes en osteoblastos que rodean el hueso maxilar (Figura 16 F y H). También observamos que *Dlx5* está expresado en condrocitos (Figura 16 H).

En resumen, observamos que los transcritos de los factores de transcripción *Sp7* y *Dlx5* están coexpresados en odontoblastos y osteoblastos de *Xenopus tropicalis* (Figura 16). Sugiriendo que este módulo regulatorio cumple una función en los procesos de mineralización.



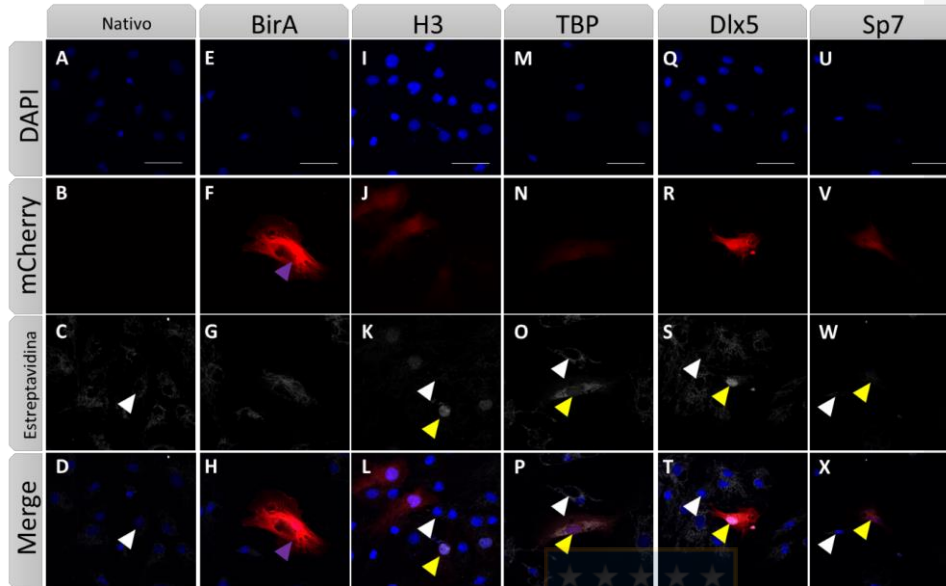
**Figura 16** Los genes *Sp7* y *Dlx5* están coexpresados en osteoblastos y odontoblastos en *Xenopus tropicalis*. La expresión de los genes *Sp7* y *Dlx5* fue analizada mediante hibridación in situ sobre secciones de 7µm. La región anterior está orientada hacia arriba en las secciones longitudinales de la mandíbula superior de *Xenopus* (A, C, E, G), y hacia la derecha en las secciones de la mandíbula inferior (B, D, F, H). Las muestras fueron teñidas con Hematoxilina-cromotrolo (A-B) e hibridación in situ contra *Sp7* (E, F), *Dlx5* (G, H) y sonda sentido de *Sp7* usado como control negativo (B, C). Las cabezas de flecha indican la detección de señal en osteoblastos y odontoblastos. Abreviaciones: AM: Ameloblasto, EP: Epitelio, M: Cartílago de Meckel, Ob: Osteoblastos, Oc: Osteocitos, Od: Odontoblastos. Asteriscos indican región mineralizada, dentina (A, C, E, G) y hueso (B, D, F, H).

### 3.2 Co-unión de Sp7/Dlx5 a enhancer esqueléticos

#### 3.2.1 Detección de proteínas biotiniladas en cultivo primario de osteoblastos de *Xenopus tropicalis*

Detectar proteínas con anticuerpos ofrece muchas ventajas, pero al mismo tiempo requiere de estandarización para cada proteína, y por lo mismo es difícil implementar en *Xenopus* donde hay mucho menos anticuerpos disponibles que en mamíferos. En cambio, aunque la detección de proteína sobre-expresada mediante una etiqueta molecular puede parecer artificial, ofrece la ventaja de emplear un único protocolo, y de poder comparar proteínas de diferentes especies en un mismo sistema biológico. Por lo tanto, para determinar la co-unión de ortólogos de Sp7 en el contexto de la cromatina de osteoblastos de *Xenopus tropicalis*, decidimos establecer el sistema biotina-estreptavidina para detectar la unión de proteínas en el ADN de manera independiente de anticuerpos.

Para ello, diseñamos vectores de expresión donde los factores de transcripción están recombinados con la etiqueta BLRP que son susceptibles a biotinilación por la enzima BirA (Figura 17). Luego, fueron introducidos en osteoblastos mediante electroporación y la expresión de estas proteínas etiquetadas con BLRP fue detectada mediante ensayos de fluorescencia por afinidad con estreptavidina (Figura 17). Como control utilizamos osteoblastos sin electroporar (Figura 17 A-D) y se pudo detectar biotina endógena a nivel citoplasmático pero no nuclear en osteoblastos (Figura 17 C). Esto corresponde a carboxilasas y biotina presente en las mitocondrias. Como control de electroporación utilizamos el vector de expresión CMV: BirA-Cherry pero sin la caseta génica con el factor de transcripción etiquetada (Figura 17 E-H), podemos notar que los osteoblastos mCherry-positivos que incorporaron el vector (Figura 17 F) no presentan señal de biotina a nivel nuclear (Figura 17 G). Como control positivo de señal nuclear en nuestros ensayos etiquetamos a H3 con BLRP (Figura 17 I-L) y lo detectamos fuertemente en el núcleo en comparación con la señal basal endógena (Figura 17 K). Debido a que H3 no es un factor de transcripción, utilizamos a TBP como control positivo de factor de transcripción (Figura 17 M-P), ya que su expresión es constante [167]. Detectamos señal nuclear de TBP pero dicha señal fue bastante más débil que la señal citoplasmática (Figura 17 O). Esto nos indica que el TBP esta siendo regulado a nivel traduccional, generando dos poblaciones moleculares de TBP, unos libres en el citoplasma y otros exportados al núcleo. Detectamos señal nuclear en los ensayos con Dlx5 (Figura 17 Q-T) y Sp7 (Figura 17 U-X) de *Xenopus tropicalis*. La señal de Dlx5 está fuertemente presente en el núcleo (Figura 17 S) mientras que Sp7xt está débilmente presente en el núcleo (Figura 17 W). Estos resultados nos indican que a pesar de que ambos factores de transcripción están siendo sobreexpresados, a nivel de regulación Sp7 está fuertemente restringido, posiblemente mediante mecanismos de degradación o de localización subcelular. En suma, nuestros ensayos demuestran la capacidad para detectar proteínas biotiniladas sobreexpresadas en cultivo primario de osteoblastos de *Xenopus tropicalis*.



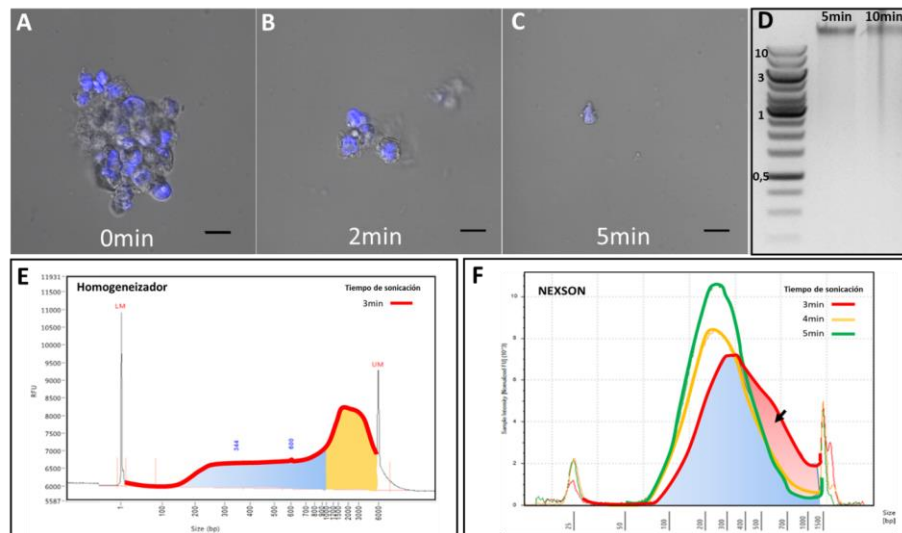
**Figura 17. Detección de Factores de transcripción biotinilados por BirA mediante fluorescencia por afinidad en cultivo primario de osteoblastos de *Xenopus tropicalis*.** Son mostrados osteoblastos sin electroporar (A-D) y electroporados por BirA:Cherry (E-H), BirA:Cherry-H3:blrp (I-L), BirA:Cherry-TBP:blrp (M-P), BirA:Cherry-Dlx5:blrp (N-T) y BirA:Cherry-Sp7xt:blrp (U-X). Los núcleos de los osteoblastos fueron teñidos con DAPI (A, E, I, M, Q, U), se utilizó el reportero fluorescente Cherry como control de incorporación del vector de expresión (B, F, J, N, R, V), la detección de proteínas biotiniladas por BirA mediante estreptavidina conjugada con Alexa 670 (C, G, K, O, S, W). La combinación de los canales se muestra en D, H, L, P, T y X. La señal citoplasmática detectada por la estreptavidina en osteoblastos que no incorporaron el vector de expresión se indica con cabeza de flecha blanca, la expresión de cherry sin factor de transcripción biotinilado se indica con cabeza de flecha morado y la co-localización de proteínas biotiniladas en el núcleo se indica con cabeza de flecha amarilla. Barra de escala: 25µm

### 3.2.2 Preparación de la cromatina usando ultrasonificación

Una vez establecida la funcionalidad del sistema biotina-streptavidina, nuestro siguiente objetivo fue optimizar los pasos de lisis celular y extracción de núcleos. Para ello utilizamos el método NEXSON [160], método que no depende de tratamientos químicos ni homogeneización mecánica para extraer núcleos de células fijadas, sino que utiliza ultrasonido para lisar la membrana celular. NEXSON involucra dos pasos, resuspensión del pellet celular en un buffer compatible con la extracción nuclear seguido de sonicación moderada para aislar los núcleos de células fijadas. Cabe señalar que el poder de sonicación utilizados para NEXSON son muchos más bajos comparados con la sonicación de la cromatina (ver 2.16.3 en materiales y métodos). La progresión de la extracción del núcleo fue

controlada por inspección visual de pequeñas alícuotas de las muestras usando DAPI y microscopio con contraste de fases (Figura 18 A-C). Determinamos que a los 5 min de tratamiento la mayoría de los núcleos están aislados (Figura 18 C), cuando son comparados con el control (Figura 18 A). Además, analizamos la integridad de la cromatina a los 5 y 10 min de tratamiento para determinar si los parámetros de ultrasonificación afectan la calidad de la cromatina. Corroboramos que los tiempos de tratamientos no alteran la integridad de la cromatina (Figura 18 D), por lo tanto, lisar los osteoblastos fijados por 5 min con el método NEXSON es suficiente para extraer núcleos con cromatina íntegra.

El siguiente paso fue determinar las condiciones de sonicación para fragmentar la cromatina, para ChIP-seq es necesario obtener fragmentos de ADN desde 100 a 800bp. Comparamos, los métodos de extracción de núcleos, por un lado homogeneización mecánica (Figura 18 E) y por el otro NEXSON (Figura 18 F). Podemos notar que utilizando el método de homogeneización mecánica y posterior sonicación de la cromatina obtuvimos cerca del 5% de ADN entre el rango de 100 a 1000bp (Figura 18 E), imposibilitando la siguiente fase de precipitación. Además, el método no es robusto dado a que de 6 réplicas solo 1 fragmentó completamente la cromatina entre el rango requerido (datos no mostrados). Utilizando NEXSON y luego un tratamiento de 3, 4 y 5 min de sonicación de la cromatina obtuvimos fragmentos entre el rango de 100 a 800bp (Figura 18 F). Observamos que a los 3 min de sonicación la mayoría del ADN está concentrado en los 300bp y posee una mayor abundancia de fragmentos de ADN entre los rangos de 300 a 800bp comparados con los otros tiempos de tratamientos (Figura 18 F). Los tiempos de tratamientos de 4 y 5 min, los fragmentos de ADN se concentran entre los rangos de 100bp y 300bp, esto nos indica que en estos tiempos la cromatina se sonica más allá de lo necesario. En suma, corroboramos que después de extraer núcleos de osteoblastos con NEXSON a los 5 min seguido de un tratamiento de sonicación intenso por 3 min, se puede obtener fragmentos de ADN entre 100 y 800bp para análisis de ChIP-seq.



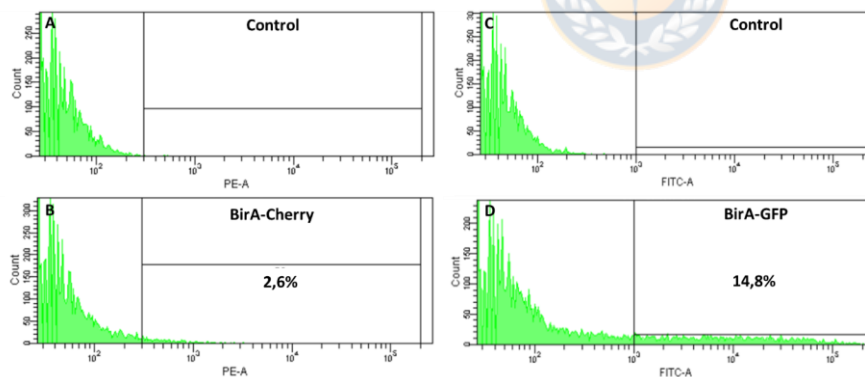
**Figura 18** Lisis celular mediante NEXSON en osteoblastos primarios de *Xenopus tropicalis* permite la correcta fragmentación de la cromatina para su precipitación. Aislamiento de núcleos mediante NEXSON sobre osteoblastos fijados a los 0 min (A), 2 min (B) y 5 min (C). Imágenes muestran la combinación entre los canales DAPI y de contraste de interferencia diferencial. Escala de barra indica 100 $\mu$ m. D) Control de calidad de la integridad de la cromatina después de aplicar NEXSON por 5 y 10 min. Cromatina desentrecruzada y purificada fueron cargados sobre geles de agarosa 1%. E) Distribución de tamaño de la cromatina de osteoblastos tratados con lisis celular usando Homogeneizador Dounce y tiempo de ultrasonicación de 3 min para fragmentar la cromatina. Área sombreada en azul indica rango entre 100-1000bp, y área sombreada en amarillo entre 1000-6000bp. F) Distribución de tamaño de la cromatina de osteoblastos tratados con NEXSON por 5 min. La cromatina fue fragmentada usando COVARIS a 3 min (línea roja), 4 min (línea amarilla) y 5 min (línea verde). Área sombreada en azul indica rango entre 100-1000bp, y región sombreada en rojo indica la diferencia entre los tratamientos aplicados.

### 3.2.3 Clasificación de células (Cell sorting)

Para realizar el ChIP-seq y analizar una población de células que sobreexpresan el factor de transcripción biotinilado es necesario purificarlo. Dado a que nuestra eficiencia de electroporación en cultivo primario de osteoblastos de *Xenopus tropicalis* está en los rangos del 7-10% (Figura Anexo 2), aproximadamente el 90% de la cromatina de nuestras muestras no son representativas del contexto regulatorio. Por lo tanto, para obtener una población homogénea de osteoblastos electroporados utilizamos la técnica de clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS, Fluorescence-activated cell sorting por sus siglas en inglés). Nuestro primer paso consistió en modificar el reportero Cherry a GFP de nuestros vectores de expresión debido a que el reportero

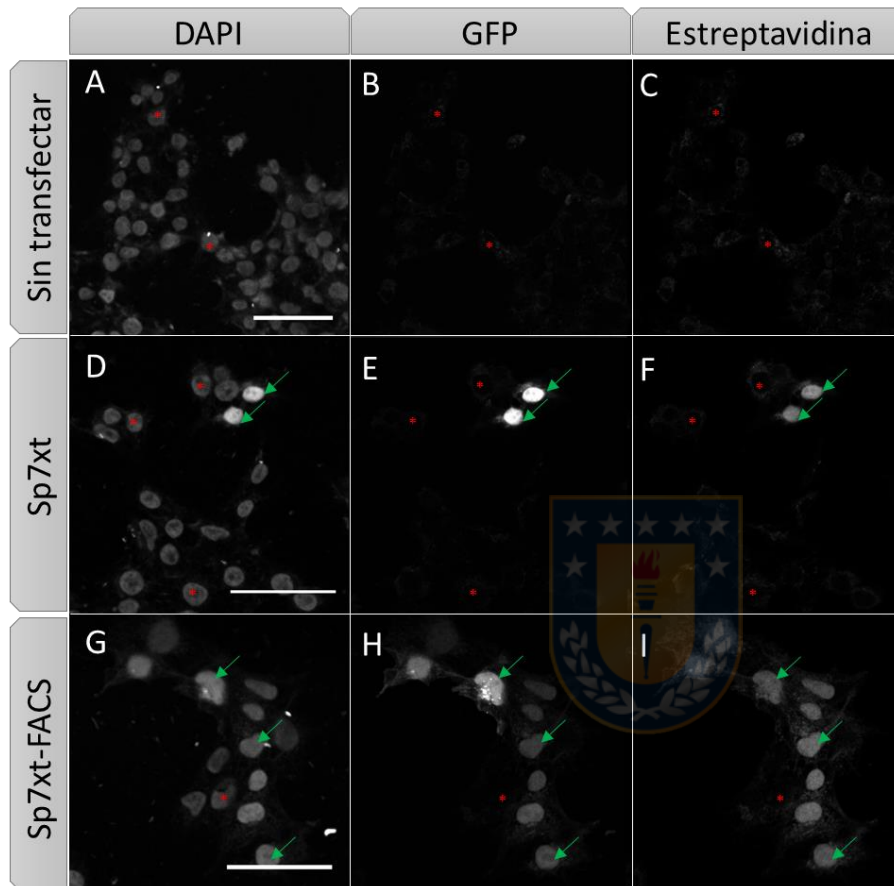
Cherry mostró baja eficiencia de purificación cuando fueron analizadas en HEK293 (Figura 19 A-B). La baja eficiencia se debe a que el equipo no cuenta con el filtro apropiado para detectar eficientemente la fluorescencia Cherry, Cherry posee rango de excitación/emisión de 587/610 y el filtro adecuado es 610/20, esto explica el bajo porcentaje de recuperación. Nuestro segundo paso fue analizar si FACS es capaz de clasificar células GFP<sup>+</sup>, y ciertamente detectó y logró separar el 14.8% de la población inicial en células HEK293 (Figura 19 C-D).

Luego, nos planteamos si las células GFP<sup>+</sup> sobreexpresan el factor de transcripción Sp7xt biotinilado (Figura 20). Observamos el ruido citoplasmático de la estreptavidina en las células sin transfectar (Figura 20 C), producto de la presencia de biotina y carboxilasas. Comparando las células transfectadas no clasificadas (Figura 20 D-F) y clasificadas (Figura 20 G-I) podemos notar que en estas últimas la mayoría de las células sobreexpresan el factor de transcripción Sp7xt biotinilado (Figura 20 I). Nuestros resultados indican que es viable usar FACS en nuestro flujo de trabajo para obtener una población purificada de células que sobreexpresan el factor de transcripción biotinilado. Finalmente, realizamos nuestro ensayo FACS en osteoblastos primarios de *Xenopus tropicalis* para los factores de transcripción TBP, Dlx5, Sp7Xt y Sp7Cm (Figura 21). Reportamos que los porcentajes de purificación de osteoblastos electroporados son menores a los porcentajes de células HEK293 transfectadas. Sin embargo, en cada ensayo fuimos capaces de purificar alrededor de 12,000 osteoblastos, el mínimo requerido para realizar Chipmentación de alto rendimiento.

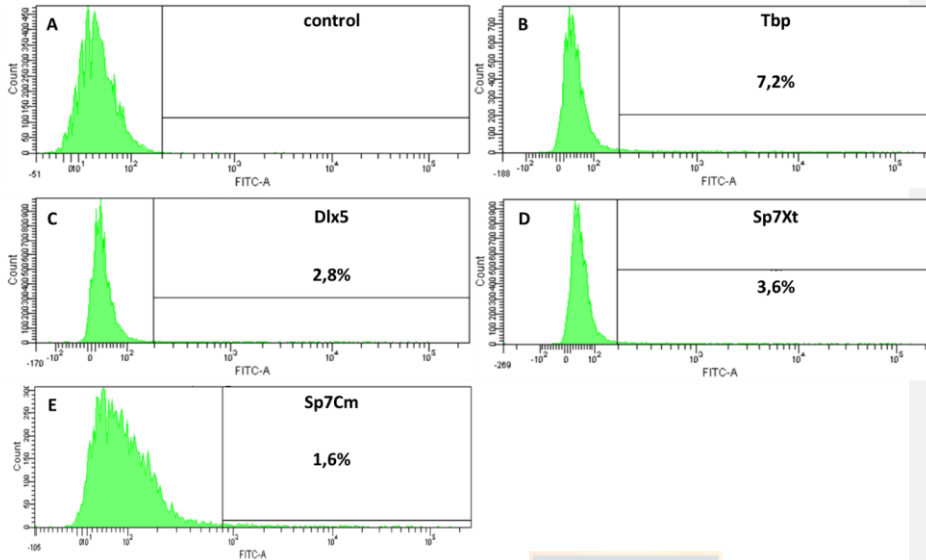


**Figura 19. Ensayo FACS para evaluar reporteros de vector de expresión BirA en línea celular HEK293.** Son representados 10,000 eventos en histograma de fluorescencia en los canales PE-A (A-B) y FITC-A (C-D), en células sin transfectar (A y C) y transfectadas con los vectores de expresión BirA-Cherry (B) y BirA-GFP (D). Son indicados los porcentajes de células purificados por FACS.





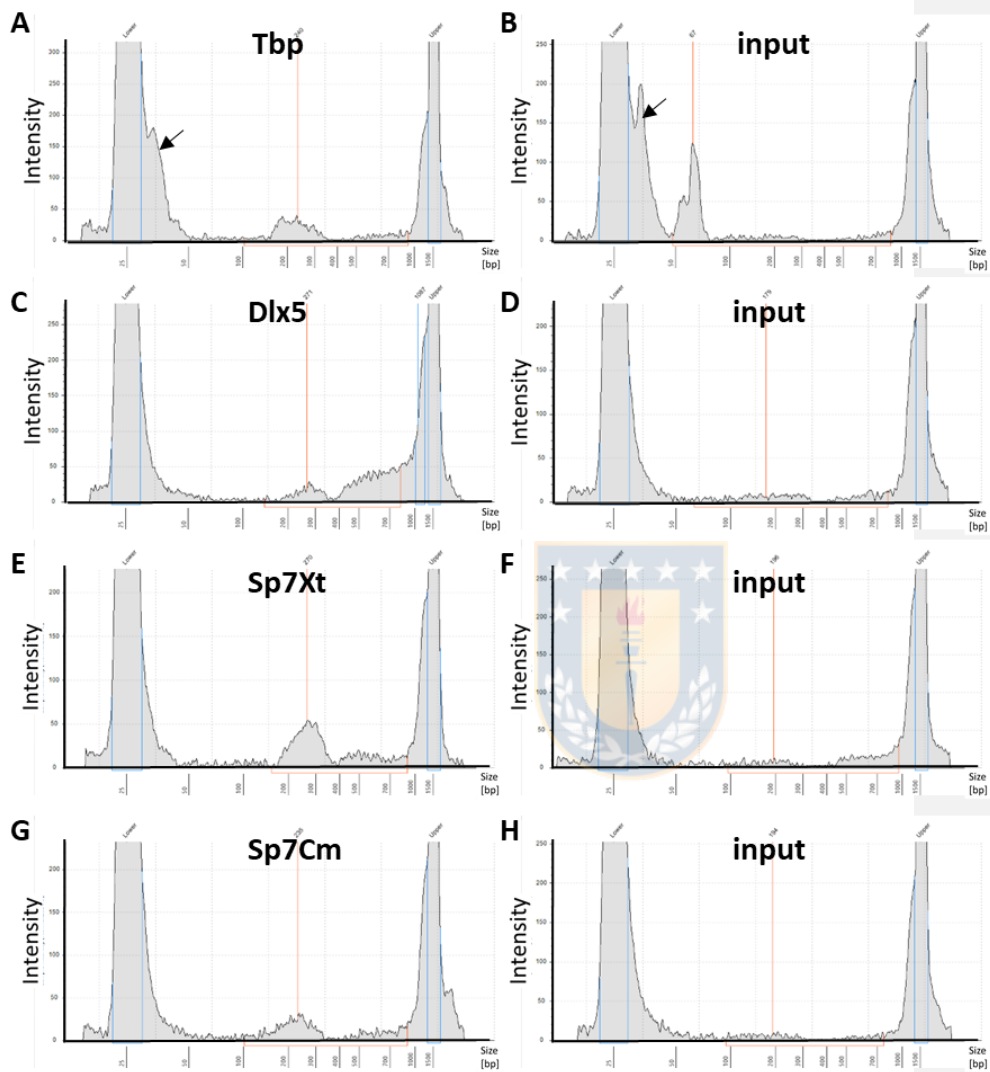
**Figura 20. Ensayo de fluorescencia por afinidad en línea celular HEK293 que sobreexpresa el factor de transcripción Sp7 de *Xenopus tropicalis* y clasificados por FACS.** Son mostradas la fluorescencia para DAPI (A, D y G), GFP (B, E y H) y estreptavidina conjugada con Alexa 670 (C, F y I) en la línea celular HEK293 sin transfectar (A-C) y transfectadas con CAGG:BirA-GFP\_CMV:Sp7xt-blrp sin FACS (D-F) y con FACS (G-I). Los asteriscos rojos indican células sin transfectar y flechas verdes células que expresan Bir:GFP y poseen Sp7xt biotinilado. Barra de escala: 50µm.



**Figura 21. Ensayo FACS para evaluar reporteros de vector de expresión BirA en osteoblastos primarios de *Xenopus tropicalis*.** Son representados 10,000 eventos en histograma de fluorescencia en el canal FITC-A en osteoblastos sin transfectar (A) y en osteoblastos transfectados con los vectores de expresión BirA-GFP-TBP-blrp (B), Dlx5-blrp (C), Sp7Xt (D) y Sp7Cm(E). Son indicados los porcentajes de osteoblastos purificados por FACS.

### 3.2.4 Generación de librería HT-CM

Ya establecidas las condiciones de electroporación (Figura 17), el reportero a usar para clasificar los osteoblastos mediante FACS (Figura 21), el método para extraer núcleos mediante NEXSON (Figura 18 A-D) y los parámetros de ultrasonificación de la cromatina mediante COVARIS (Figura 18F), se procedió a precipitar la cromatina con estreptavidina conjugada a cuentas magnéticas, lavar el ADN y someterla a reacción de PCR para desentrecruzar y a la vez amplificar las librerías. Luego, aplicamos cuentas AmPure X para eliminar los partidores, ya que son contaminantes en el proceso de secuenciación. Como ejemplo mostramos un Electroferograma de TBP sin tratamiento de purificación donde se observa un alto pico de un tamaño aproximado a los 50bp (Figura 22 A-B). Los rangos generados para cada librería están entre 150 y 400bp (Figura 22), y la cantidad de ADN generado promedio es de 1.2ng. En los "input" no fue posible visualizar su patrón electroforético (Figura 22), debido a que representan el 10% del material crudo utilizado para precipitar o sea la cantidad de ADN de 1000 células aproximadamente. Estos resultados muestran que fuimos capaces de generar librerías de ChIP-seq con tan solo 10,000 osteoblastos electroporados. La siguiente etapa consta en la secuenciación masiva de estas librerías.

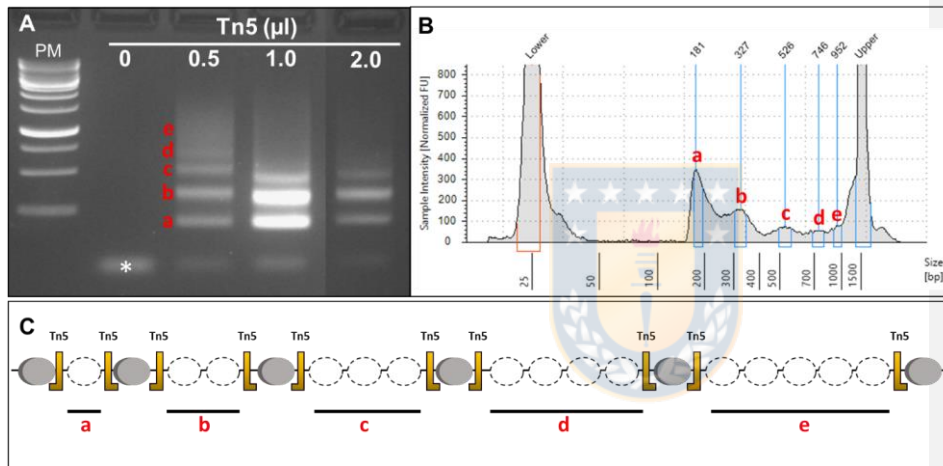


**Figura 22. Librerías de ChAPmentación de alto rendimiento generados a partir de 10,000 osteoblastos electroporados de *Xenopus tropicalis* con vectores de expresión BirA. Electroferogramas de librerías de cromatina precipitada de TBP(A), Dlx5 (C), Sp7 de *Xenopus tropicalis* (E) y Sp7 de *Callorhincus milii* (F), con sus respectivos "input" (B, D, F y H). Las flechas indican presencia de partidores (A y B), el resto de los factores de transcripción (C-H) fueron tratados con cuentas AmPureX para la eliminación de partidores y posterior secuenciación.**

### 3.2.5 ATAC-seq

#### 3.2.5.1 Generación de librería para ATAC-seq

Para determinar las regiones abiertas de cromatina de osteoblastos nativos de *Xenopus tropicalis*, estandarizamos la cantidad de Transposasa Tn5 necesarios para obtener los patrones mono-di-tri-tetra y penta nucleosomales (Figura 23 A). Determinamos que añadiendo una cantidad de 0.5µl de transposasa Tn5 es necesario para obtener el patrón esperado (Figura 23 A). Cantidades mayores de transposasa generan un efecto negativo en la generación de la librería, dada a la pérdida de fragmentos tetra y pentanucleosomales (Figura 23A). Corroboramos que los patrones nucleosomales son aproximadamente múltiplos entre sí (Figura 23B y C).



**Figura 23. Generación de librería de ADN transposado para ATAC-seq de osteoblastos nativos de calvarias de *Xenopus tropicalis*.** A) Gel de electroforesis que muestra los tamaños de los fragmentos amplificados de la librería de ATAC-seq generados a distintos volúmenes de Tn5 (0µl, 0.5µl, 1.0µl y 2.0µl). Obsérvese los distintos patrones nucleosomales indicados en a, b, c, d y e. En asterisco se indica la posición de los partidores. B) Electroferograma generado por Bioanalyzer, se observan las intensidades relativas de los nucleosomas (a, b, c, d y e) y el tamaño de los fragmentos amplificados de la librería de ATAC-seq. Lower y Upper indican los marcadores de referencia del Bioanalyzer. C) Modelo explicativo de los fragmentos obtenidos por la transposasa Tn5 analizados en A y B que corresponden a las regiones libres de cromosomas (círculo blanco con líneas discontinuas) que poseen un tamaño mono, di, tri, tetra y penta nucleosomal (a, b, c, d, y e, respectivamente).

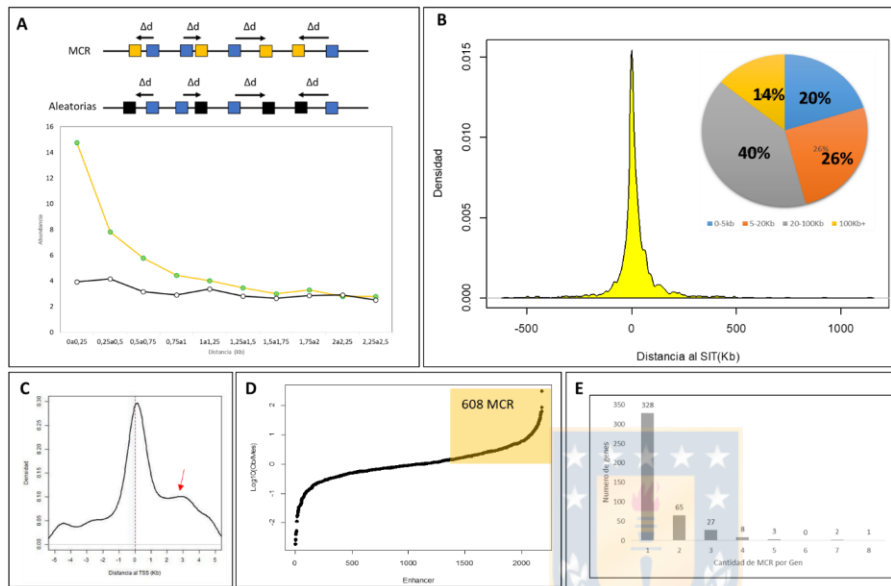
### 3.2.5.2 Análisis de las regiones abiertas de la cromatina de osteoblastos de *Xenopus tropicalis*

Para identificar los MCR putativos en osteoblastos combinamos las bases de datos de ChIP-seq contra H3K27ac/H3K4me1, previamente disponibles en nuestro laboratorio, con los datos generados del ATAC-seq de osteoblastos (Figura 24). Un importante requisito para la actividad de un MCR es la formación de una región libre de nucleosomas, rodeado por marcas de histonas H3K4me1/H3K27ac, por tanto la identificación de una región libre de nucleosomas adyacente a las marcas de histonas de H3K4me1/H3K27ac, es un buen indicador de MCR activos [168]. Por lo tanto, medimos la distancia entre la señal de ChIP-seq y de ATAC-seq y fueron comparadas con las distancias entre la señal de ChIP-seq y aleatoria (Figura 24A, panel superior). Este análisis indica que las regiones libres detectadas por ATAC-seq son más frecuentes entre 0-1Kb comparadas con las regiones más distales y por el azar (Figura 24A, panel inferior). Esto nos indica que el ATAC-seq detectó regiones libres de nucleosomas asociados a marcas de MCR putativos, y que su cercanía no es producto del azar.

Para caracterizar la ubicación de los MCR putativos con respecto al gen más cercano, medimos la distancia entre los MCR putativos y el SIT del gen más cercano (Figura 24B). Se ha determinado que los MCR proximales son aquellos que están ubicados a menos de 5Kb de su SIT, mientras que los MCR distales aquellos que están más allá de 5Kb de su SIT [73]. Identificamos que el 20% de nuestros MCR putativos son proximales. Cabe señalar que los MCR distales los clasificamos en 3 categorías dependiendo de su distancia: entre 5-20Kb, entre 20-100Kb y mayor a 100Kb, la abundancia fue respectivamente a 26%, 40% y 14% (Figura 24B). Dentro de los MCR putativos, identificamos que el MCR más distal fue de 1.13Mb correspondiente al gen *khdrbs3* (KH domain containing, RNA binding, signal transduction associated 3). Con respecto a los MCR proximales, evaluamos en detalle la posición de los MCR putativos con respecto a su SIT (Figura 24C). Encontramos que existe un enriquecimiento a +2kb y +3kb de su SIT con respecto a los MCR ubicados río arriba (Figura 24C). Esto nos indica que en la arquitectura de un gen en el contexto nativo de osteoblastos de *Xenopus tropicalis* hay más regiones abiertas, asociadas a MCR, ubicadas río abajo del gen.

Una vez identificados y caracterizados los MCR putativos de osteoblastos en contexto nativo, evaluamos los MCR que están asociados a genes que aumentan su expresión durante la formación de hueso. Para ello, contrastamos nuestra base de datos de ATAC-seq con RNA-seq y analizamos la razón de los niveles de expresión (RPKM) entre osteoblastos y mesénquima (Figura 24D). Identificamos 608 MCR que están asociados a 386 genes que como mínimo duplican su expresión durante la diferenciación de mesénquima a osteoblastos (Figura 24D). Dentro de este grupo de genes, caracterizamos la cantidad de MCR por cada gen e identificamos que 328 genes poseen 1 solo MCR, 65 genes 2 MCR, 27 genes poseen 3 MCR, 8 genes poseen 4 MCR, 3 genes poseen

5MCR, 2 genes poseen 7 MCR y un gen posee 8 MCR (Figura 24E). El gen Smad7 posee 8 MCR putativos y durante la diferenciación su nivel de expresión aumenta cerca de 5 veces (Data no mostrada).



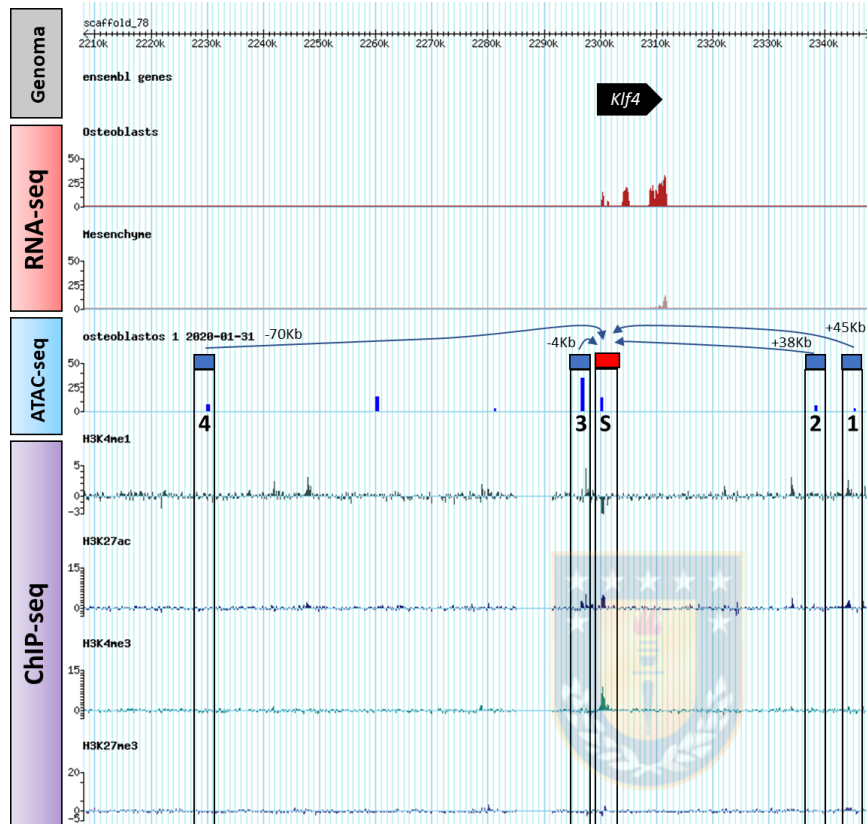
**Figura 24. Identificación de MCR putativos en genes sobreexpresados en osteoblastos de *Xenopus tropicalis*.** A) Panel superior, estrategia para la evaluación de enriquecimiento de regiones de ATAC-seq (cuadrado amarillo) en la cercanía de MCR putativos determinados por CHIP-seq (cuadrado azul) contrastados con regiones genómicas azarosas (cuadrado negro). Panel inferior, Gráfico de líneas que muestra la relación entre distancia medidas entre marcas de CHIP-seq y ATAC-seq (línea amarilla) y CHIP-seq y regiones azarosas (línea negra). B) Gráfico de densidad de las distancias con respecto al SIT de los 2696 MCR putativos. Gráfico de torta representa la distribución de las distancias en 4 categorías: 0-5Kb (azul), 5-20Kb (naranja), 20-100Kb (Gris), mayor a 100Kb (Amarillo). C) Gráfico de densidad de las distancias con respecto al SIT de MCR putativos proximales. Flecha roja indica abundancia de picos de ATAC-seq. Línea discontinua roja, indica posición 0Kb. D) Análisis comparativo entre los MCR putativos y la razón en logaritmo de 10 entre RPKM de osteoblastos y RPKM de mesénquima- Cuadro amarillo indica los MCR putativos asociados a un incremento de la expresión mayor a dos veces. E) Gráfico de barra que indica la cantidad de MCR putativos por gen y el número de genes asociados.

### 3.2.5.3 Identificación de MCR putativos asociados a genes coexpresados en osteoblastos y odontoblastos.

Para identificar los genes que son relevantes durante la diferenciación ósea, realizamos un ranking (de mayor a menor) considerando la diferencia de expresión entre osteoblastos y mesénquima para los 386 genes (Tabla Anexo 1). Dentro de esta lista destacamos los siguientes genes: *lox*, *dpt*, *phex*, *fam20c*, *sp7*, *panx3*, *klf4*, *col5a1*, *ankh* y *cdh11* (Tabla Anexo 1). En particular, *Klf4* es conocido por regular la osteogénesis [169, 170], y promover la dentinogénesis [171, 172]. Identificamos 4 MCR putativos por la correlación pico-valle-pico entre las marcas de histonas H3K4m1/H3K27ac y las regiones abiertas de ATAC-seq (Figura 25). Así también, identificamos el SIT de *Klf4* asociado al enriquecimiento de las marcas de histonas H3K4me3/H3K27ac y región abierta de ATAC-seq (Figura 25). Podemos indicar que de las regiones regulatorias analizadas poseen nula o baja marca represiva, H3K27me3 (Figura 25).

Para evaluar si los MCR poseen sitios de unión para Dlx o Sp, es decir motivos ricos en AT y GC, respectivamente. Realizamos un análisis de motivos utilizando la base de datos JASPAR[173] y encontramos que los MCR 2 y 3 asociados al gen *Klf4* están enriquecidos con motivos AT (Tabla Anexo 2). Esto sugiere que estos MCR pueden estar controlados por Dlx en un contexto de mineralización.





**Figura 25. Arquitectura regulatoria de *Kif4*.** El locus de *Kif4* (Flecha negra) es indicado sobre una región genómica de 140Kb en el genoma de *Xenopus tropicalis* (v4.1). Son mostrados los niveles relativos de expresión génica de *Kif4* mediante perfiles de RNA-seq de calvaria NF59 (osteoblastos) y tejido mesenquimal NF 52. Perfil de ATAC-seq indican regiones abiertas en contexto nativo de calvaria. Son indicados los MCR putativos (cuadros azules), que podrían interactuar (flechas) con el Sitio de Inicio de Transcripción (cuadrado rojo) de *Kif4*. Los números indican las distancias relativas con respecto al SIT de *Kif4*. Son mostrados los perfiles de CHIP-seq contra las marcas de histonas: H3K4me1, H3K27ac, H3K4me3 y H3K27me3. Los cuadros negros indican las regiones regulatorias: MCR y SIT de *Kif4*.



## 4. DISCUSIÓN

### 4.1. Los factores de transcripción Sp6 y Sp7 son una novedad evolutiva de los Gnatóstomos

Antes de la emergencia de los vertebrados la familia Sp ya contaba con 3 parálogos denominados SpA, SpB y SpC [120]. En el ancestro de los vertebrados, y producto de las dos rondas de duplicación completa del genoma, la multiplicación y divergencia de los parálogos generó a los 10 miembros de la familia Sp en vertebrados. Nuestros resultados apuntan que el subclado Sp1/2/3/4 presenta una expresión ubicua en los tejidos analizados (Figura 10). Una posible explicación de su ubicuidad es que estos factores de transcripción se unen a la secuencia de reconocimiento de los promotores, como caja-GC sobre promotores con o sin caja TATA, perteneciendo al complejo de transcripción basal de varios genes [162]. Esto es coherente ya que su ausencia genera severos defectos del desarrollo o letalidad [162]. Con respecto al subclado Sp5/5L, tanto Sp5 y Sp5-L están expresados en mesodermo y ectodermo [174-177], consistente con nuestros datos de RNA-seq (Figura 10). El factor de transcripción Sp5-L es conocido por ser un mediador de la vía de señalización FGF en el patronamiento anteroposterior del neuroectodermo [175] y la vía de señalización FGF es esencial para la formación temprana de nefrones en *Xenopus laevis* y, bajo este contexto, se encontró que Sp5L (o Sp2) está sobre-expresado [178], por lo cual está relacionado con nuestros datos de RNA-seq (Figura 10).

Con respecto al clado Sp6/7/8/9, observamos que Sp6 (o *Epiprofin*) no está presente en los tejidos analizados (Figura 10), debido a que Sp6 está expresado principalmente en ameloblastos [179]. Su ausencia genera defectos en la morfogénesis dental, específicamente en el esmalte dental [180, 181]. Además, Sp6 participa en el desarrollo y patronamiento dorsal-ventral de las extremidades [182, 183] y está presente en el neuroporo posterior durante el desarrollo [184]. Podemos indicar que Sp6 está expresado restringidamente a nivel espacio-temporal durante el desarrollo de los vertebrados, por tal motivo no identificamos transcritos en nuestros datos de RNA-seq. Sería interesante evaluar la presencia de Sp6 mediante RT-qPCR, extrayendo ARN total de la mandíbula superior de *Xenopus tropicalis* en estadio 59NF del desarrollo, o mediante hibridación in situ en cortes de mandíbula.

El factor de transcripción Sp7 (u *Osterix*), está documentada su expresión en osteoblastos tanto en mamíferos como en peces teleosteos [60, 126, 185]. Determinamos la expresión de Sp7 en osteoblastos de *Xenopus tropicalis* (Figura 16E). Esto sugiere que Sp7 es un gen reclutado para la RRG de mineralización ósea, y está conservado en Osteíctios. Además, encontramos que Sp7 está expresado en odontoblastos en *Xenopus tropicalis* (Figura 16E) y sorprendentemente distribuido en todos los odontoblastos de la placa dental de *Callorhinchus milii* (Figura 14E-E'). Estos resultados indican que Sp7 también fue reclutado para la RRG de mineralización dental. Estos resultados nos muestran que en el ancestro de los gnatóstomos Sp7 fue reclutado a un programa común entre

hueso y dentina. Según nuestros análisis filogenéticos Sp6 y Sp7 están cercanamente relacionados (Figura Anexo 1) y no poseen ortólogos definidos con los ciclóstomos, esto apunta que Sp6 y Sp7 son una novedad evolutiva en gnatóstomos, esenciales para formar tejidos mineralizados como esmalte y dentina/hueso, respectivamente.

#### 4.2. Los factores de transcripción Sp8 y Sp9 conservan la expresión de su ortólogo SpC de Branchiostoma

Mientras los factores de transcripción Sp6 y Sp7 están expresados en tejidos mineralizados, Sp8 y Sp9 están presentes en el Sistema Nervioso Central de los vertebrados [162]. Ambos son requeridos para la diferenciación de neuronas del bulbo olfatorio [186], formación de neuronas espinosas en la eminencia lateral media [187] y durante las fases tempranas del desarrollo de extremidades [162, 188]. En particular, Sp8 es un regulador de la diferenciación de las interneuronas del bulbo olfatorio [189], controla el patronamiento del mesencéfalo [190] y su ausencia genera defectos en el cierre del neuroporo [191], mientras que Sp9 es requerido para la diferenciación de neuronas del estriatopalidial [192]. La expresión de Sp8 y Sp9 en tejido neuronal está bien conservada en osteíctios [188]. Esta rama del subclado, cuenta con ortólogos en ciclóstomos (Figura Anexo 1), donde Sp8/9 está expresado en el telencéfalo de *Lethenteron japonicum* [193]. En *Branchiostoma*, mostramos que los transcritos de SpC están presentes durante la formación de la epidermis, tubo neural y vesícula cerebral (Figura 13). Estos resultados muestran que los ortólogos de vertebrados Sp8 y Sp9 conservan la expresión ancestral de cordados en tejido neuronal, es decir Sp8 y Sp9 restringieron su expresión ancestral y experimentaron **especialización** [148].

#### 4.3 Los miembros de la familia Dlx conservan la expresión ancestral de Dll

En vertebrados, los seis miembros de la familia Dlx son expresados en patrones restringidos espacial y temporalmente durante el desarrollo embrionario: se ubican en el primordio craneofacial, regiones distales de los apéndices, en el sistema nervioso central y en tejidos esqueléticos [194]. Debido a su expresión restringida, explica la baja presencia de transcritos de los miembros Dlx en *Xenopus tropicalis* (Figura 12).

Los parálogos de Dlx en vertebrados provienen de un solo ortólogo en cordados que es Dll [195]. Según nuestros análisis en *Branchiostoma lanceolatum*, Dll está expresado en epidermis, vesícula cerebral, en algunas neuronas del tubo neural y en la bisagra cordoneural del brote de cola (Figura 13), similar a lo descrito en *B. floridae* [163]. Estos resultados reflejan la conservación ancestral de los miembros Dlx, ya que los seis genes están expresados en células específicas derivadas de la cresta neural durante su migración o después de la migración [196].

#### 4.4 Co-expresión de genes Sp/Dlx en metazoa

En el linaje de vertebrados, las duplicaciones de genoma completo han diversificado más del 80% de las familias de los genes ampliamente expresados con múltiples parálogos derivados [148], sin embargo no se ha considerado la historia evolutiva cuando convergen funcionalmente dos familias.

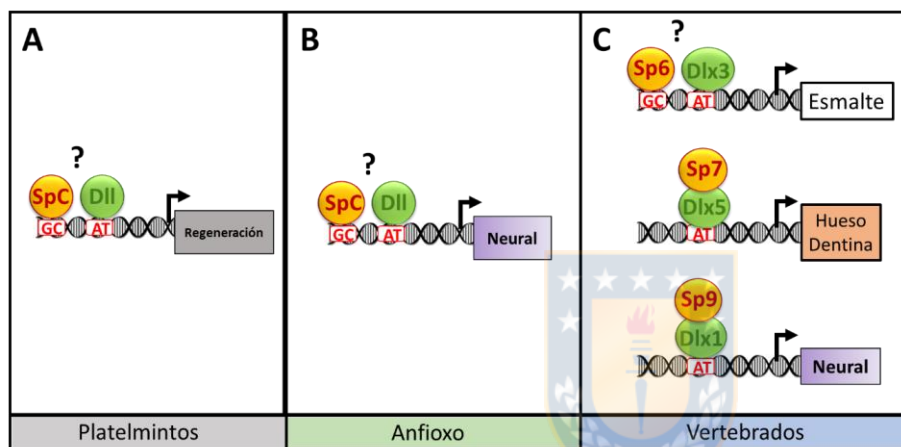
En este caso, las familias de factores de transcripción Sp y Dlx nos revelan un antiguo programa en metazoa. En particular, la vesícula cerebral se ha homologado con el cerebro anterior (forebrain) de los vertebrados [163, 197], conteniendo neuronas glutamatérgicas en la región más anterior y células fotorreceptoras [198]. Mostramos que el ortólogo Dll está co-expresado con SpC en vesícula cerebral de *Branchiostoma lanceolatum* (Figura 15). El módulo Sp/Dlx está conservada en vertebrados, dado a que en ciclóstomos, se ha identificado que Sp8/9 y DlxA están co-expresados en la región ventral del telencéfalo de *Lethenteron japonicum* [193]. ii) Se ha descrito que tanto Sp8 y Dlx5/6 están co-expresados en la eminencia ganglionica lateral, que es conocida como una fuente de neuronas de proyección estratial e interneuronas del bulbo olfatorio en mamíferos [189]. Así también, encontramos en el destino neuronal la presencia de los factores de transcripción Dlx1 y Dlx2 [199]. Por otra parte, estudios recientes han mostrado que el factor de transcripción Sp9 está co-interactuando con Dlx1 sobre motivos ricos en AT [187], similar a los observado con Sp7/Dlx5 en osteoblastos [128]. Por otra parte, el módulo **Smed-Dlx y Smed-Sp6-9** son expresados en estadios tempranos durante la especificación de la copa pigmentaria y son requeridos para la regeneración de la copa óptica (zona no fotorreceptiva) de la planaria *Schmidtea mediterránea* [200]. En suma, proponemos que el **módulo regulatorio Sp/Dll es un programa antiguo** proveniente desde el urbilateria, el ancestro de todos los animales bilateria (Figura 26A), filo de animales que divergió **hace 834 millones de años** [201], participando en la diferenciación de células pigmentadas. Luego, en el ancestro de los cordados fue co-optado a la RRG de diferenciación neuronal y que en vertebrados los ortólogos Sp8/Dlx5/6 y Sp9/Dlx1 conservan su expresión ancestral (Figura 26B) y experimentaron especialización.

#### 4.5 Co-opción del módulo Sp7/Dlx5 en el ancestro de los gnatóstomos

En vertebrados, los miembros de la familia Dlx están expresados a lo largo del linaje de osteoblastos [62] y odontoblastos [29]. Los factores de transcripción Dlx3 y Dlx5 son importantes para la formación de hueso y dentina [61-63, 97, 101, 108, 111-113, 196, 202, 203]. Nuestros resultados muestran que Dlx5 es el transcrito que domina durante la osteogénesis de *Xenopus tropicalis* (Figura 12), similar a lo observado en mamíferos [128]. Mostramos que Dlx5 está presente en condrocitos, osteoblastos y odontoblastos de *Xenopus tropicalis* (Figura 16G-H), concordante a lo observado en mamíferos. Mientras que en condricios está presente en células mesenquimáticas y en odontoblastos en *C. milii* (Figura 14F-F'), similar a lo descrito en el tiburón *Scyliorhinus canicula* [29]. Ante este escenario, asumimos que Dlx5 en condricios conservan el estado de expresión ancestral en gnatóstomos.

Nuestro análisis muestran que Sp7 y Dlx5 están co-expresados en odontoblastos de la región hipermineralizada de la trabécula dental de *C. milii* (Figura 14E'-F'). Este resultado ilumina el entendimiento sobre la historia evolutiva de Sp7, dado a que Sp7 es conocido principalmente como el factor de transcripción maestro en la formación de hueso en vertebrados, no obstante está

presente en la mineralización de dentina de condriictios, precisamente en organismos que no generan hueso. Además, según nuestros análisis Sp7 surgió en el ancestro de los gnatóstomos. Esto nos indica que el módulo Sp7/Dlx5 fue co-optado al programa de mineralización de hidroxiapatita en el ancestro de los gnatóstomos [128] como una novedad evolutiva, en contraposición de su subclado hermano Sp8-9, y aunque hubo pérdida para formar hueso en condriictios la capacidad de mineralizar no se perdió ya que Sp7/Dlx5 se conservó en odontoblastos en el ancestro de los condriictios. Esto nos indica que tanto dentina y hueso son homólogos a través de la conservación del módulo Sp7/Dlx5 (Figura 26C).



**Figura 26. Modelo evolutivo del módulo regulatorio sp/dll en metazoos.** A) El módulo regulatorio Smed-Sp6-9 (SpC)/ Smed-Dlx (Dll) regulan genes asociados a regeneración de la copa óptica en planarias. Falta determinar si SpC es co-factor de Dll. B) El módulo SpC y Dll regulan genes asociados a tejido neural en Anfioxos. Falta determinar si SpC es co-factor de Dll. C) En vertebrados, después de la duplicación genómica y expansión de las familias Sp y Dlx, el módulo Sp6/Dlx3 fue reclutado al programa de formación de esmalte. Falta determinar si Sp6 y Dlx3 interactúan. El módulo Sp9/Dlx1 conserva la función ancestral y están co-unidos a motivos AT. El módulo Sp7/Dlx5 fue reclutado en el ancestro de los gnatóstomos en el programa de mineralización de hueso y dentina. Ambos están co-unidos a motivos AT.

#### 4.6 Expresión de Col1a1 y Col2a1 en placa dental de *Callorhinchus milii* da luces sobre el origen de hueso, dentina y cartílago

Los colágenos fibrilares son las proteínas más abundantes de hueso y dentina, en especial colágeno tipo I, mientras que el cartílago es abundante en colágeno Tipo II [8]. En *Branchiostomas*, la red regulatoria génica durante la regeneración de cirrios orales involucra genes del desarrollo esquelético en vertebrados [6]. Están expresados los ortólogos *FCol1*, *FCol2* y *SPARC*, así también sus factores de transcripción reguladores *SoxE* (*Sox9*) y *Runx* (*Runx2*) [6]. Proponemos que SpC y

DII pueden estar participando durante la regeneración de cirrios orales, perteneciendo al programa ancestral de elementos esqueléticos.

Producto de las duplicaciones del genoma completo en el ancestro de los vertebrados emergieron los colágenos fibrilares específicos, ya sea para cartilago (Tipo II) o hueso/dentina (Tipo I) [204]. No obstante, observamos la expresión de *Col1a1* y *Col2a1* en odontoblastos de *C. milii* (Figura 14C-D') participando en tejidos hipermineralizados de hidroxapatita (Figura 15). Observación similar encontrada en elementos esqueléticos calcificados en el tiburón *Scyliorhinus canicula* [8]. Esto sugiere que la presencia de *Col2a1* en la RRG de mineralización de condriictios puede ser un vestigio de la RRG del ancestro de los vertebrados, y que la especificidad de la expresión de los colágenos fibrilares pudo definirse a lo largo del linaje de los osteictios, ya que previamente determinamos que *Col1a1/Col2a1* están expresados en osteoblastos de *Xenopus tropicalis* [8].

#### 4.7 ATAC-seq revela arquitectura regulatoria de genes que participan en la mineralización

El ensayo de ATAC-seq es una técnica alternativa al DNase-seq para detectar regiones libres de nucleosomas [85] y por ende facilita la detección de regiones regulatorias funcionales en un contexto biológico nativo. A pesar de ser una técnica con un flujo de trabajo rápido, hay que considerar aspectos técnicos como: i) la obtención de células individuales, ii) optimización de la cantidad de Tn5, iii) pureza de la librería de ADN transposado generado. En este contexto, el cultivo primario de osteoblastos de *Xenopus tropicalis* está bien establecido [136]. El paso crucial fue estandarizar la cantidad de Tn5, dado a que un tratamiento excesivo, tagmenta regiones tetra y penta-nucleosomales generando librerías de baja complejidad y riqueza de secuencias (Figura 23). La secuenciación de librerías sobretransposadas perjudica la calidad de mapeo [205]. Con respecto a la pureza de la librería de ADNt, es importante la eliminación de los partidores previo a la secuenciación, dado a que estos alterarán la secuenciación y por tanto disminuye la complejidad de la librería. En nuestro caso, el uso de cuentas AmPureX facilitó la eliminación de los partidores (data no mostrada). Por lo tanto la calidad de nuestra secuenciación fue la adecuada.

Nuestros análisis determinaron que las regiones libre de nucleosomas están próximas a las regiones enriquecidas por marcas de H3K4me1/H3K27ac, marcas canónicas de MCR activos (Figura 24A). Se ha observado que los MCR activos poseen el patrón pico-valle-pico, donde cada pico están los nucleosomas con las marcas epigenéticas y en el valle la región libre de nucleosomas, región libre donde los factores de transcripción pueden unirse sobre los MCR [168]. Sobre este contexto, es razonable que la mayor abundancia de picos de ATAC-seq se encuentren a una distancia inferior a 250bp (Figura 24A). Además, las distancias de los MCR putativos con respecto a sus SIT posee una proporción similar a la reportada en humanos (Figura 24B) [71]. El 54% de los MCR distales están

ubicados más allá de los 20Kb con respecto a su SIT (Figura 24B), estos MCR putativos están en un contexto nativo de osteoblastos, regulando la mineralización ósea. Cabe señalar que el ChIP-seq contra Sp7 en osteoblastos de ratón detectó una mayor proporción de unión a MCR ubicados a una distancia superior a 50Kb (Hojo et al. Figura 2A, [128]). Por lo tanto, es probable que la distribución genómica de unión de Sp7 en osteoblastos de *Xenopus tropicalis* esté conservada. Por otra parte, al analizar la distribución de MCR proximales encontramos un enriquecimiento en +2Kb y +3Kb (Figura 24C), probablemente estos MCR proximales estén ubicados en los intrones. Se ha observado que los intrones pueden estimular la expresión génica en una diversidad de organismos, que incluye a los mamíferos, nematodos, insectos, hongos y plantas [206]. Esto sugiere que los intrones pueden jugar un rol conservado a nivel evolutivo en la regulación génica en eucariontes. De hecho se han discutido seis distintos roles que argumentan su participación activa en la evolución de un gen, a nombrar: i) fuente de RNA no codificante, ii) transportadores de ECR, iii) actores en splicing alternativo, iv) potenciadores del entrecruzamiento meiótico, v) sustrato para arrastre de exones, vi) señales para el exporte de ARNm desde el núcleo [207].

Los MCR putativos asociados a genes que aumentan su transcripción en la transición desde mesénquima a osteoblastos (Figura 24D) corresponden a genes que es sabida su participación durante la diferenciación a osteoblastos y en la mineralización ósea (Tabla anexo 1). Es decir, nuestros análisis y complementación entre los datos de ChIP-seq, ATAC-seq y RNA-seq se corresponden consistentemente. Cabe notar que los genes *lox*, *dpt*, *phex*, *fam20c*, *sp7*, *panx3*, *klf4*, *col5a1*, *ankh* y *cdh11* (Tabla Anexo 1) además de participar en procesos osteogénicos, también participan durante la dentinogénesis [208-214]. Dado al particular rol del factor de transcripción Klf4 en regular la osteogénesis [169, 170] y promover la dentinogénesis [171, 172], analizamos los MCR asociados al requerimiento de este gen en osteoblastos (Figura 25), según nuestros análisis es altamente probable que el modulo regulatorio Sp7/Dlx5 se esté uniendo a los MCR 2 y 3 (Figura 25, Tabla 2 anexo). Por lo tanto, podemos indicar que validar ya sea la co-unión de Sp7 y Dlx5 sobre los MCR 2 o 3 y la funcionalidad mediante reporteros, podríamos corroborar nuestra hipótesis de trabajo.

## 5. CONCLUSIÓN

Según los análisis expuestos en esta tesis podemos concluir que el módulo regulatorio Sp7/Dlx5 surgió en el ancestro de los gnatóstomos. Bajo este contexto, los condriictios presentan un programa de mineralización de dentina que es homólogo a la mineralización ósea de osteóctios, representados por la co-expresión de *Sp7/Dlx5* y *Col1a1*. Podemos indicar que la expresión de *Col2a1* en odontoblastos de la trabécula dental de *C. milii* es un vestigio de la red regulatoria génica común de mineralización. En gnatóstomos, Sp6 y Sp7 son novedades evolutivas que fueron reclutados a los programas de mineralización, esmalte y hueso/dentina, respectivamente, en el ancestro de los gnatóstomos. Mientras que Sp8 y Sp9, conservaron la expresión de su ortólogo ancestral SpC de cordados, representados por la expresión neural en *B. floridae*.

El sistema biotina-estreptavidina fue exitosamente implementada en cultivo primario de osteoblastos de *Xenopus tropicalis* para realizar HT-CM independiente de anticuerpos. El ATAC-seq en osteoblastos fue bien estandarizada y reveló las regiones libres de nucleosomas asociadas a MCR óseos. Encontramos un conjunto de genes que están coexpresados en osteoblastos y odontoblastos e identificamos los MCR asociados a su control transcripcional. Análisis de secuenciación y mapeo de las librerías de HT-CM de Sp7 de *X. tropicalis*, Sp7 de *C. milii* y SpC de *B. floridae* nos revelarán si los MCR están conservados a nivel evolutivo y de este modo corroborar, desde la perspectiva de la red regulatoria génica, la homología entre hueso y dentina.

## 6. PERSPECTIVAS

### 6.1 Patrón de expresión de la familia Sp

Para dilucidar la historia evolutiva del reclutamiento de los miembros Sp6, Sp8 y Sp9 en *X. tropicalis* y *C. milii* es necesario realizar hibridación in situ en las mismas regiones analizadas en esta tesis. Esperamos encontrar que Sp6 esté expresado en ameloblastos y Sp8/Sp9 expresados en tejido neural. Además, también sería interesante analizar la coexpresión de Sp7 y Dlx3, dado a que la familia Dlx posee función redundante. Por tanto, estos nuevos análisis podrían descifrar el patronamiento de expresión de la familia Sp y Dlx, dado a que Dlx es un factor de transcripción homeótico, la especificidad funcional del patronamiento puede estar relacionado con la co-expresión de los miembros Sp. Esta última afirmación es sustentada dado a que la co-expresión Sp7/Dlx5 en trabécula dental de *C. milii* está asociado a regiones hipermineralizadas (Figura 15-16)

### 6.2 Nueva hipótesis ancestral del módulo Sp/Dll en cordados

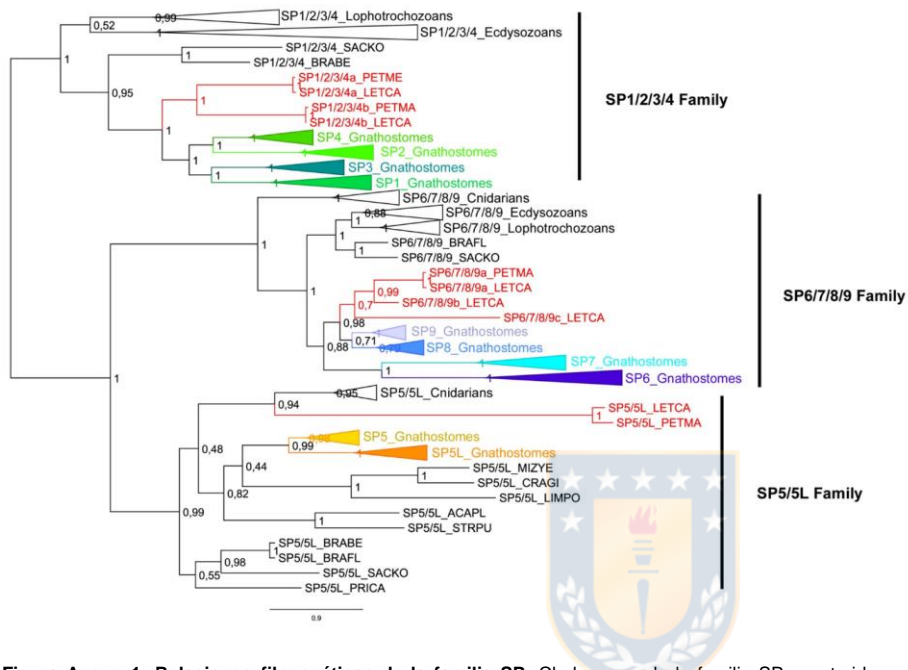
En cefalocordados, los cirrios orales poseen cartílago inmaduro que expresan col1/col2 (). En un contexto de regeneración los cirrios orales recapitulan el conjunto de genes asociados a elementos esqueléticos, es decir la expresión de Col1, Col2, SPARC, SoxE, Runx [6]. Por lo tanto, ensayos de regeneración de cirrios orales con los genes SpC y Dll podrían revelar la conservación evolutiva en el programa de regeneración de elementos esqueléticos. En este caso, la co-expresión de SpC/Dll durante la regeneración nos informaría sobre la función redundante del módulo SpC/Dll tanto en la formación de tejidos neuronales como en regeneración.

### 6.3 Secuenciación de librerías de HT-CM y análisis funcional de MCR

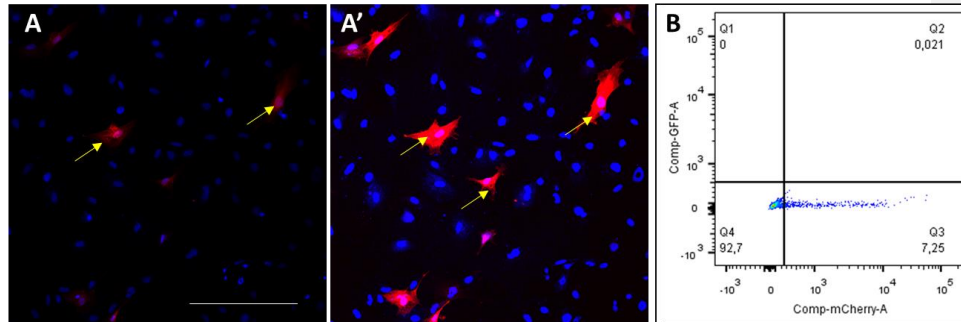
Impera la secuenciación de nuestras librerías de HT-CM de Dlx5Xt, Sp7Xt, Sp7Cm y SpCBf para determinar la co-uni3n a MCR esqueléticos/odontogénicos en *Xenopus tropicalis*. Esperamos que Dlx5 y Sp7 presenten un patr3n de co-uni3n similar a lo descrito en rat3n [128]. Para corroborar nuestra hipótesis evolutiva los picos del HT-CM de Sp7Cm cabr3a esperar que est3n correlacionados con los picos del HT-CM de Sp7Xt y, a su vez, no est3n correlacionados con los de SpCBf. Es decir, Sp7 de condri3ctios interactúe con los MCR esqueléticos de *Xenopus tropicalis*. Mientras que SpC se una a regiones ricas en motivos GC, similar a Sp1. La evaluaci3n funcional de los MCR putativos osteogénicos/odontogénicos se realizar3 a trav3s de transg3nesis en *Xenopus tropicalis*, y en consecuencia la expresi3n del gen reportero en osteoblastos y odontoblastos ser3a una fuerte evidencia a favor de la homología entre hueso y dentina.



7. ANEXOS



**Figura Anexo 1: Relaciones filogenéticas de la familia SP.** Cladograma de la familia SP construido por inferencia bayesiana. Los tres clados conteniendo las subfamilias SP1/2/3/4, SP5/5L y SP6/7/8/9 son indicados al lado derecho. Los genes homólogos en agnatos son resaltados en rojos, mientras que los nueve miembros de la familia SP en gnatóstomos son representados por nodos colapsados coloreados. Las probabilidades *a posteriori* de cada nodo están indicadas



**Figura Anexo 2. Electroporación del vector de expresión TBP biotilable en cultivo primario de osteoblastos de *Xenopus tropicalis*.** Están indicados los osteoblastos que incorporaron el vector de expresión (flecha amarilla) CAGG:mCherry-CMV:TBP-BLRP. Imagen adquirida en confocal espectral (A), foto sobreexposta (B). Análisis de citometría de flujo muestra la distribución de fluorescencia de los osteoblastos electroporados por el vector de expresión CAGG:mCherry-CMV:TBP-BLRP sobre dos componentes :mCherry y GFP. Nótese la división de cuatro cuadrantes (Q1-Q4) y su porcentaje de distribución.



Ranking	Simbolo	Nombre del gen	Posicion genoma	Hebra	MCR/gen
1	<i>lox</i>	lysyl oxidase	scaffold_7:3665789..3687829	+	3
2	<i>nr4a2</i>	nuclear receptor subfamily 4 group A member 2	scaffold_51:3147218..3156322	+	2
3	<i>ptgs2</i>	prostaglandin-endoperoxide synthase 2	scaffold_69:1990154..1994686	-	1
4	<i>adamts4</i>	ADAM metalloproteinase with thrombospondin type 1 motif 4	scaffold_989:102140..115419	-	1
5	<i>dpt</i>	dermatopontin	scaffold_169:1511021..1536296	-	1
6	<i>slc7a3</i>	solute carrier family 7 (cationic amino acid transporter, y+ system), member 3	scaffold_117:411497..430511	-	2
7	<i>smpd3</i>	sphingomyelin phosphodiesterase 3, neutral membrane (neutral sphingomyelinase II)	scaffold_534:189089..331883	+	2
8	<i>igfbp5</i>	insulin-like growth factor binding protein 5	scaffold_446:933182..950452	+	1
9	<i>nfkbia</i>	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha	scaffold_145:739007..741870	+	1
10	<i>klf10</i>	Kruppel-like factor 10	scaffold_3:1187481..1204032	-	1
11	<i>phex</i>	phosphate regulating endopeptidase homolog, X-linked	scaffold_184:731905..1041271	+	2
12	<i>rgs4</i>	regulator of G-protein signaling 4	scaffold_85:1301801..1311724	-	1
13	<i>lmna</i>	lamin A/C	scaffold_1266:51784..102115	-	3
14	<i>tgf1</i>	TGFB-induced factor homeobox 1	scaffold_337:1159201..1172386	-	1
15	<i>slc38a2</i>	solute carrier family 38, member 2	scaffold_36:381815..396184	+	1
16	<i>pim1</i>	pim-1 oncogene	scaffold_44:1207800..1218107	+	1
17	<i>trib1</i>	tribbles homolog 1	scaffold_395:450766..460257	+	1
18	<i>fam20c</i>	family with sequence similarity 20, member C	scaffold_14:847851..958384	-	2
19	<i>sp7</i>	specific protein 7	scaffold_226:1078107..1080563	+	1
20	<i>panx3</i>	pannexin 3	scaffold_548:103263..122944	-	1
21	<i>klf4</i>	Kruppel-like factor 4	scaffold_78:2300144..2308836	+	4
22	<i>sgms2</i>	sphingomyelin synthase 2	scaffold_594:87288..123400	-	1
23	<i>slc2a1</i>	solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 1	scaffold_3050:3714..11353	-	1
24	<i>zfp3611</i>	zinc finger protein 36, C3H type-like 1	scaffold_166:1227857..1232276	+	3
25	<i>pde4b</i>	phosphodiesterase 4B, cAMP-specific	scaffold_4:6276097..6465823	+	1
26	<i>prrx2</i>	paired related homeobox 2	scaffold_671:491339..502149	+	1
27	<i>vasn</i>	vasorin	scaffold_27:1981553..1993452	+	2
28	<i>nov (ccn3)</i>	cellular communication network factor 3	scaffold_330:884420..887655	-	1
29	<i>Smad7</i>	SMAD family member 7	scaffold_217:1464640..1488426	+	8
30	<i>egr2</i>	early growth response 2 (Krox-20 homolog)	scaffold_500:9029..12118	+	1
31	<i>slit3</i>	slit homolog 3	scaffold_338:214522..541715	-	4
32	<i>col5a1</i>	collagen, type V, alpha 1	scaffold_137:946231..1085231	+	2
33	<i>thb2</i>	thrombospondin 2	scaffold_2:6080887..6145945	-	3
34	<i>tnfrsf21</i>	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 21	scaffold_180:2004094..2049221	-	1
35	<i>plcd1</i>	phospholipase C, delta 1	scaffold_333:183181..239719	+	1
36	<i>tcn1</i>	reticulocalbin 1, EF-hand calcium binding domain	scaffold_399:746635..761237	+	1
37	<i>ankh</i>	ANKH inorganic pyrophosphate transport regulator	scaffold_46:676365..751143	-	3
38	<i>trib2</i>	tribbles homolog 2	scaffold_489:493482..512074	+	1
39	<i>mef2c</i>	MADS box transcription enhancer factor 2, polypeptide C (myocyte enhancer factor 2C)	scaffold_76:2668631..2841691	-	2
40	<i>hes1</i>	hairy and enhancer of split 1	scaffold_245:70493..71667	-	1
41	<i>adamts17</i>	ADAM metalloproteinase with thrombospondin type 1 motif 17	scaffold_463:581974..721873	+	1

42	<i>csmp1</i>	cysteine-serine-rich nuclear protein 1	scaffold_28:524257..536130	+	5
43	<i>slc39a13</i>	solute carrier family 39 (zinc transporter), member 13	scaffold_907:205203..218877	+	1
44	<i>fosl2</i>	FOS-like antigen 2	scaffold_372:585339..609111	-	1
45	<i>cdh11</i>	cadherin 11, type 2, OB-cadherin (osteoblast)	scaffold_66:592549..662126	-	1
46	<i>dnajb9</i>	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily B, member 9	scaffold_36:2178980..2183998	+	1
47	<i>sema3d</i>	sema domain, immunoglobulin domain (Ig), short basic domain, secreted, (semaphorin) 3D	scaffold_138:1533332..1617330	+	1
48	<i>ano5</i>	anoctamin 5	scaffold_74:1000167..1026653	+	1
49	<i>sdc3</i>	syndecan 3	scaffold_411:65138..113396	-	1
50	<i>plekhf1</i>	pleckstrin homology domain containing, family F (with FYVE domain) member 1	scaffold_863:45976..58278	-	1
51	<i>slc29a2</i>	solute carrier family 29 (nucleoside transporters), member 2	scaffold_474:317856..340348	-	1
52	<i>dab2</i>	disabled homolog 2, mitogen-responsive phosphoprotein	scaffold_418:856657..925331	+	1
53	<i>krt18</i>	keratin 18	scaffold_446:839..14054	+	1
54	<i>fn3</i>	fibrillin 3	scaffold_555:225029..322251	-	1
55	<i>clnd1</i>	claudin domain containing 1	scaffold_5:5135115..5166369	-	1
56	<i>rassf10</i>	Ras association (RalGDS/AF-6) domain family (N- terminal) member 10	scaffold_1730:11488..11841	+	1
57	<i>supt3h</i>	suppressor of Ty 3 homolog	scaffold_328:973240..1226956	+	1
58	<i>emilin2</i>	elastin microfibril interfacier 2	scaffold_420:861982..911296	+	1
59	<i>crhbp</i>	corticotropin releasing hormone binding protein	scaffold_679:467705..481510	+	1
60	<i>cilp2</i>	cartilage intermediate layer protein 2	scaffold_202:1373554..1402347	+	1
61	<i>osmr</i>	oncostatin M receptor	scaffold_350:896760..1030853	+	1
62	<i>siah2</i>	seven in absentia homolog 2	scaffold_262:65539..69873	+	1
63	<i>cyp26b1</i>	cytochrome P450, family 26, subfamily B, polypeptide 1	scaffold_368:634867..650288	+	1
64	<i>ankrd28</i>	ankyrin repeat domain 28	scaffold_34:3733884..3813026	-	1
65	<i>yes1</i>	v-yes-1 Yamaguchi sarcoma viral oncogene homolog 1	scaffold_420:5006..87558	-	1
66	<i>ostm1</i>	osteopetrosis associated transmembrane protein 1	scaffold_269:1231719..1240253	-	1
67	<i>ptprg</i>	protein tyrosine phosphatase, receptor type, G	scaffold_126:29806..298879	-	1
68	<i>nfix</i>	nuclear factor I/X (CCAAT-binding transcription factor)	scaffold_448:418635..474422	-	1
69	<i>adamstl4</i>	ADAMTS-like 4	scaffold_151:1341093..1446928	+	1
70	<i>adam12</i>	ADAM metallopeptidase domain 12	scaffold_32:3589410..3945823	+	1
71	<i>erf</i>	Ets2 repressor factor	scaffold_209:1421490..1448820	+	1
72	<i>uncb5</i>	unc-5 homolog B	scaffold_428:29434..142434	-	1
73	<i>tmem100</i>	transmembrane protein 100	scaffold_317:888587..901037	+	1
74	<i>cldn5</i>	claudin 5 (transmembrane protein deleted in velocardiofacial syndrome)	scaffold_12:3172653..3207033	+	1
75	<i>epha2</i>	EPH receptor A2	scaffold_1302:19983..31405	+	2
76	<i>eya2</i>	eyes absent homolog 2	scaffold_48:2115479..2215020	-	2
77	<i>hyal1</i>	hyaluronoglucosaminidase 1	scaffold_159:1400274..1403081	+	1
78	<i>sec24a</i>	SEC24 family, member A	scaffold_177:1220223..1250655	-	1
79	<i>tgfb2</i>	transforming growth factor, beta receptor 2	scaffold_801:156264..205642	+	1
80	<i>kdm6b</i>	lysine (K)-specific demethylase 6B	scaffold_1278:55725..101581	-	4
81	<i>cd97</i>	CD97 molecule	scaffold_149:1693345..1717492	+	1
82	<i>cdon</i>	cdon homolog	scaffold_548:385588..528546	-	1
83	<i>fbxl14</i>	F-box and leucine-rich repeat protein 14	scaffold_341:744786..826530	-	2

84	<i>fat1</i>	FAT tumor suppressor homolog 1	scaffold_678:206719..334118	-	1
85	<i>net1</i>	neuroepithelial cell transforming 1	scaffold_11:3217765..3241372	+	1
86	<i>efna5</i>	ephrin-A5	scaffold_152:1869780..2122895	+	1
87	<i>dusp9</i>	dual specificity phosphatase 9	scaffold_154:1066579..1089590	+	1
88	<i>hey1</i>	hairly/enhancer-of-split related with YRPW motif 1	scaffold_225:857971..861729	-	1
89	<i>mtss1.2</i>	metastasis suppressor 1, gene 2	scaffold_954:90549..126935	+	3
90	<i>vegfa</i>	vascular endothelial growth factor A	scaffold_1332:24301..70097	+	4
91	<i>rara</i>	retinoic acid receptor, alpha	scaffold_582:118716..168546	-	1
92	<i>kiaa1274</i>	KIAA1274	scaffold_204:574200..694866	+	1
93	<i>fndc3b</i>	fibronectin type III domain containing 3B	scaffold_3:4906265..5071152	+	1
94	<i>irak2</i>	interleukin-1 receptor-associated kinase 2	scaffold_196:1479123..1501159	+	1
95	<i>ednra</i>	endothelin receptor type A	scaffold_424:64731..112973	-	1
96	<i>foxo3</i>	forkhead box O3	scaffold_269:1472713..1556807	+	1
97	<i>tmem110</i>	transmembrane protein 110	scaffold_88:1841031..1853456	-	1
98	<i>stx5</i>	syntaxin 5	scaffold_782:109414..121841	-	2
99	<i>frmd4</i>	FERM domain containing 4B	scaffold_630:455863..601364	-	1
100	<i>inhba</i>	inhibin subunit beta A	scaffold_57:603344..619546	+	2

**Tabla Anexo 1. Lista de genes fuertemente regulados durante diferenciación ósea.** Lista de los primeros 100 genes ordenados según la diferencia de expresión entre osteoblastos y mesénquima. Están indicados el ranking, símbolo y nombre del gen, ubicación en el genoma de *Xenopus tropicalis* versión 4.1, el sentido de transcripción y cantidad MCR detectados con ATAC-seq y ChIP-seq. Están indicados en amarillo los genes que también son expresados en odontoblastos.

MCR-Kif4	Model ID	Model name	Score	Relative score	Start	End	Strand	predicted site sequence
MCR1	MA0079.3	SP1	11.038	0.920011357988833	85	95	-1	GCTCCGCCTCA
	MA0079.3	SP1	11.471	0.925458993704335	411	421	-1	CCCCCTCCTTC
	MA0079.3	SP1	11.471	0.925458993704335	506	516	-1	CCCCCTCCTTC
MCR2	MA0747.1	SP8	12.542	0.915145852736858	26	37	-1	ACCACTCCCAT
	MA0746.1	SP3	11.037	0.921704765994792	27	37	-1	ACCACTCCCAT
	MA0879.1	Dlx1	8.100	0.910508136518205	50	59	-1	CTAAATTAGT
	MA0879.1	Dlx1	7.900	0.905446937264089	50	59	1	ACTAATTAG
	MA0879.1	Dlx1	7.712	0.90068940996522	60	69	1	AGAAATTA
	MA0885.1	Dlx2	7.441	0.911378041965634	61	68	1	GAAATTAA
	MA0880.1	Dlx3	7.414	0.906588191841489	61	68	1	GAAATTAA
	MA0881.1	Dlx4	7.231	0.903031903200792	61	68	1	GAAATTAA
MCR3	MA0079.3	SP1	15.647	0.97799785455407	73	83	1	GCCCCACCCCC
	MA0746.1	SP3	12.356	0.947680524798097	73	83	1	GCCCCACCCCC
	MA0885.1	Dlx2	10.962	0.995751905503647	322	329	-1	GCAATTAC
	MA0880.1	Dlx3	10.290	0.994850481335806	322	329	-1	GCAATTAC
	MA0881.1	Dlx4	10.691	0.997429346323978	322	329	-1	GCAATTAC
	MA0882.1	DLX6	10.602	0.988686576597025	322	329	-1	GCAATTAC
	MA0879.1	Dlx1	9.028	0.933992101057303	590	599	-1	GCAAATTATG
	MA0879.1	Dlx1	9.137	0.936750454650796	590	599	1	CATAATTGTC
	MA0885.1	Dlx2	7.028	0.901481306481056	591	598	-1	CAAATTAT
	MA0880.1	Dlx3	7.419	0.906741638102779	591	598	-1	CAAATTAT
MA0881.1	Dlx4	7.293	0.904723418077566	591	598	-1	CAAATTAT	
MA0882.1	DLX6	7.402	0.905712000432431	591	598	-1	CAAATTAT	
MCR4	MA0079.3	SP1	9.866	0.905266256236943	94	104	-1	GCACCACCCCC
	MA0879.1	Dlx1	7.956	0.906864073055242	447	456	1	taaaattaat

**Tabla Anexo 2. Análisis de motivos en los 4 MCR del gen *Kif4*.** Son indicadas las salidas del análisis de motivos del software JASPAR, usando como umbral 90% de identidad. Las matrices utilizadas fueron para los motivos relacionados a Sp y Dlx.

## 8. REFERENCIAS

1. Hickman, C., & Roberts, L. Keen. S.; Larson, A.; IAnson, H. y Eisenhour, D, *Principios integrales de zoología*. Editorial McGraw, Interamericana, 2009. **14**.
2. Yong, L.W. and J.-K. Yu, *Tracing the evolutionary origin of vertebrate skeletal tissues: insights from cephalochordate amphioxus*. *Curr Opin Genet Dev*, 2016. **39**: p. 55-62.
3. Gomez-Picos, P. and B.F. Eames, *On the evolutionary relationship between chondrocytes and osteoblasts*. *Front Genet*, 2015. **6**: p. 297.
4. Donoghue, P.C.J. and I.J. Sansom, *Origin and early evolution of vertebrate skeletonization*. *Microscopy Research and Technique*, 2002. **59**(5): p. 352-372.
5. Jandzik, D., et al., *Evolution of the new vertebrate head by co-option of an ancient chordate skeletal tissue*. *Nature*, 2014. **518**(7540): p. 534-537.
6. Kaneto, S. and H. Wada, *Regeneration of amphioxus oral cirri and its skeletal rods: implications for the origin of the vertebrate skeleton*. *J Exp Zool B Mol Dev Evol*, 2011. **316**(6): p. 409-17.
7. Tarazona, O.A., et al., *The genetic program for cartilage development has deep homology within Bilateria*. *Nature*, 2016. **533**(7601): p. 86-89.
8. Enault, S., et al., *Molecular footprinting of skeletal tissues in the catshark *Scyliorhinus canicula* and the clawed frog *Xenopus tropicalis* identifies conserved and derived features of vertebrate calcification*. *Front Genet*, 2015. **6**: p. 283.
9. Hirasawa, T., Y. Oisi, and S. Kuratani, *Palaeospondylus as a primitive hagfish*. *Zoological Lett*, 2016. **2**(1): p. 20.
10. Janvier, P. and M. Arsenaault, *Calcification of early vertebrate cartilage*. *Nature*, 2002. **417**(6889): p. 609.
11. Johanson, Z., et al., *No bones about it: an enigmatic Devonian fossil reveals a new skeletal framework--a potential role of loss of gene regulation*. *Semin Cell Dev Biol*, 2010. **21**(4): p. 414-23.
12. Johanson, Z., et al., *Ontogenetic development of an exceptionally preserved Devonian cartilaginous skeleton*. *J Exp Zool B Mol Dev Evol*, 2012. **318**(1): p. 50-8.
13. Murdock, D.J., et al., *The origin of conodonts and of vertebrate mineralized skeletons*. *Nature*, 2013. **502**(7472): p. 546-9.
14. Donoghue, P.C.J., I.J. Sansom, and J.P. Downs, *Early evolution of vertebrate skeletal tissues and cellular interactions, and the canalization of skeletal development*. *Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution*, 2006. **306B**(3): p. 278-294.
15. Keating, J.N., C.L. Marquart, and P.C. Donoghue, *Histology of the heterostracan dermal skeleton: insight into the origin of the vertebrate mineralised skeleton*. *Journal of morphology*, 2015. **276**(6): p. 657-680.
16. Fraser, G.J., et al., *The odontode explosion: the origin of tooth-like structures in vertebrates*. *Bioessays*, 2010. **32**(9): p. 808-17.
17. Donoghue, P.C., P.L. Forey, and R.J. Aldridge, *Conodont affinity and chordate phylogeny*. *Biological Reviews*, 2000. **75**(2): p. 191-251.
18. Donoghue, P.C., *Growth and patterning in the conodont skeleton*. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 1998. **353**(1368): p. 633-666.
19. Smith, M.M., I.J. Sansom, and M.P. Smith, *VERTEBRATE MINERALIZED TISSUES*. *Modern Geology*, 1996. **20**: p. 303-319.

20. Suttner, T.J. and E. Kido, *Euconodont hard tissue: preservation patterns of the basal body*. Palaeontology, 2020.
21. Sansom, I.J., P.C.J. Donoghue, and G. Albanesi, *Histology and affinity of the earliest armoured vertebrate*. Biology Letters, 2005. **1**(4): p. 446-449.
22. Keating, J.N., et al., *The nature of aspidin and the evolutionary origin of bone*. Nature ecology & evolution, 2018. **2**(9): p. 1501-1506.
23. Lemierre, A. and D. Germain, *A new mineralized tissue in the early vertebrate Astraspis*. Journal of anatomy, 2019. **235**(6): p. 1105-1113.
24. Downs, J.P. and P.C. Donoghue, *Skeletal histology of Bothriolepis canadensis (Placodermi, Antiarchi) and evolution of the skeleton at the origin of jawed vertebrates*. J Morphol, 2009. **270**(11): p. 1364-80.
25. Zhu, M., et al., *A Silurian maxillate placoderm illuminates jaw evolution*. Science, 2016. **354**(6310): p. 334-336.
26. Giles, S., M. Rucklin, and P.C. Donoghue, *Histology of "placoderm" dermal skeletons: Implications for the nature of the ancestral gnathostome*. J Morphol, 2013. **274**(6): p. 627-44.
27. Smith, M.M. and Z. Johanson, *Separate evolutionary origins of teeth from evidence in fossil jawed vertebrates*. Science, 2003. **299**(5610): p. 1235-1236.
28. Rucklin, M., et al., *Development of teeth and jaws in the earliest jawed vertebrates*. Nature, 2012. **491**(7426): p. 748-751.
29. Debais-Thibaud, M., et al., *The homology of odontodes in gnathostomes: insights from Dlx gene expression in the dogfish, Scyliorhinus canicula*. BMC Evolutionary Biology, 2011. **11**(1): p. 307.
30. Izu, Y., et al., *Type XII collagen regulates osteoblast polarity and communication during bone formation*. The Journal of cell biology, 2011. **193**(6): p. 1115-1130.
31. Liu, L., et al., *High capacity Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange activity in mineralizing osteoblasts*. Journal of cellular physiology, 2011. **226**(6): p. 1702-1712.
32. Noble, B.S., *The osteocyte lineage*. Arch Biochem Biophys, 2008. **473**(2): p. 106-111.
33. Bellido, T., *Osteocyte-driven bone remodeling*. Calcif Tissue Int, 2014. **94**(1): p. 25-34.
34. Nakashima, K. and B. de Crombrughe, *Transcriptional mechanisms in osteoblast differentiation and bone formation*. Trends in Genetics, 2003. **19**(8): p. 458-466.
35. Hartmann, C., *Transcriptional networks controlling skeletal development*. Curr Opin Genet Dev, 2009. **19**(5): p. 437-443.
36. Arana-Chavez, V.E. and L.F. Massa, *Odontoblasts: the cells forming and maintaining dentine*. The international journal of biochemistry & cell biology, 2004. **36**(8): p. 1367-1373.
37. Magloire, H., et al., *Odontoblast: a mechano-sensory cell*. Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution, 2009. **312**(5): p. 416-424.
38. Kawashima, N. and T. Okiji, *Odontoblasts: Specialized hard-tissue-forming cells in the dentin-pulp complex*. Congenital anomalies, 2016. **56**(4): p. 144-153.
39. Cobourne, M.T. and P.T. Sharpe, *Tooth and jaw: molecular mechanisms of patterning in the first branchial arch*. Archives of Oral Biology, 2003. **48**(1): p. 1-14.
40. Thesleff, I., *Epithelial-mesenchymal signalling regulating tooth morphogenesis*. Journal of cell science, 2003. **116**(9): p. 1647-1648.
41. Fritz, A., et al., *A Single Chance to Contact Multiple Targets: Distinct Osteocyte Morphotypes Shed Light on the Cellular Mechanism Ensuring the Robust Formation of Osteocytic Networks*. J Exp Zool B Mol Dev Evol, 2016. **326**(5): p. 280-9.



42. Khatibi Shahidi, M., et al., *Three-dimensional Imaging Reveals New Compartments and Structural Adaptations in Odontoblasts*. J Dent Res, 2015. **94**(7): p. 945-54.
43. Kazhila, C.C., *Teeth are bones: Signature genes and molecules that underwrite odontogenesis*. Journal of Medical Genetics and Genomics, 2012. **4**(2).
44. Lu, Y., et al., *DMP1-targeted Cre expression in odontoblasts and osteocytes*. Journal of dental research, 2007. **86**(4): p. 320-325.
45. Lu, Y., et al., *Rescue of odontogenesis in Dmp1-deficient mice by targeted re-expression of DMP1 reveals roles for DMP1 in early odontogenesis and dentin apposition in vivo*. Dev Biol, 2007. **303**(1): p. 191-201.
46. Jerome Rossert, H.E., and Benoit de Crombrughe, *Separate cis-acting DNA Elements of the Mouse Pro- $\alpha$ 1(I) Collagen Promoter Direct Expression of Reporter Genes to Different Type I Collagen-producing Cells in Transgenic Mice*. The Journal of Cell Biology, 1995. **129**(5): p. 1421-1432.
47. Lukinmaa, P.-L., et al., *Expression of Type I Collagen Pro- $\alpha$ 2 Chain mRNA in Adult Human Permanent Teeth as Revealed by in situ Hybridization*. Journal of dental research, 1992. **71**(1): p. 36-42.
48. Andrikopoulos, K., et al., *Localization of Pro- $\alpha$ 2 (V) Collagen Transcripts in the Tissues of the Developing Mouse Embryo*. Dev Dyn, 1992. **196**: p. 113-120.
49. Yoshioka, H., et al., *Developmental Pattern of Expression of the Mouse  $\alpha$ 1 (XI) Collagen Gene (Col11a1)*. Developmental Dynamics, 1995. **204**: p. 41-47.
50. Kim, T.H., et al., *Osterix regulates tooth root formation in a site-specific manner*. J Dent Res, 2015. **94**(3): p. 430-8.
51. Qin, C., et al., *Dentin Sialoprotein in Bone and Dentin Sialophosphoprotein Gene Expressed by Osteoblasts*. Connective Tissue Research, 2009. **44**(1): p. 179-183.
52. Enault, S., et al., *Evolution of dental tissue mineralization: an analysis of the jawed vertebrate SPARC and SPARC-L families*. BMC Evol Biol, 2018. **18**(1): p. 127.
53. Espinoza, J., et al., *Two families of Xenopus tropicalis skeletal genes display well-conserved expression patterns with mammals in spite of their highly divergent regulatory regions*. Evol Dev, 2010. **12**(6): p. 541-51.
54. Gullard, A., et al., *MEPE Localization in the Craniofacial Complex and Function in Tooth Dentin Formation*. Journal of Histochemistry & Cytochemistry, 2016. **64**(4): p. 224-236.
55. MacDougall, M., J. Dong, and A.C. Acevedo, *Molecular basis of human dentin diseases*. Am J Med Genet A, 2006. **140**(23): p. 2536-46.
56. Aioub, M., et al., *Msx2<sup>-/-</sup> transgenic mice develop compound amelogenesis imperfecta, dentinogenesis imperfecta and periodontal osteopetrosis*. Bone, 2007. **41**(5): p. 851-9.
57. Matsubara, T., et al., *BMP2 regulates Osterix through Msx2 and Runx2 during osteoblast differentiation*. J Biol Chem, 2008. **283**(43): p. 29119-25.
58. Bouwman, P., et al., *Transcription factor Sp3 is essential for post-natal survival and late tooth development*. The EMBO journal, 2000. **19**(4): p. 655-661.
59. Göllner, H., et al., *Impaired ossification in mice lacking the transcription factor Sp3*. Mechanisms of development, 2001. **106**(1-2): p. 77-83.
60. Nakashima, K., et al., *The Novel Zinc Finger-Containing Transcription Factor Osterix Is Required for Osteoblast Differentiation and Bone Formation* Cell, 2002. **108**: p. 17-29.
61. Duverger, O., et al., *Neural crest deletion of Dlx3 leads to major dentin defects through down-regulation of Dspp*. J Biol Chem, 2012. **287**(15): p. 12230-40.
62. Li, H., et al., *Expression and function of Dlx genes in the osteoblast lineage*. Developmental Biology, 2008. **316**(2): p. 458-470.

63. Acampora, D., et al., *Craniofacial, vestibular and bone defects in mice lacking the Distal-less-related gene Dlx5*. *Development*, 1999. **126**(17): p. 3795-3809.
64. Widbillier, M., et al., *Isolation of primary odontoblasts: Expectations and limitations*. *Aust Endod J*, 2019. **45**(3): p. 378-387.
65. Otto, F., et al., *Cbfa1, a candidate gene for cleidocranial dysplasia syndrome, is essential for osteoblast differentiation and bone development*. *Cell*, 1997. **89**(5): p. 765-771.
66. D'Souza, R.N., et al., *Cbfa1 is required for epithelial-mesenchymal interactions regulating tooth development in mice*. *Development*, 1999. **126**(13): p. 2911-2920.
67. Hardison, R.C. and J. Taylor, *Genomic approaches towards finding cis-regulatory modules in animals*. *Nat Rev Genet*, 2012. **13**(7): p. 469-83.
68. Zaidi, H.A., D.T. Auble, and S. Bekiranov, *RNA synthesis is associated with multiple TBP-chromatin binding events*. *Scientific reports*, 2017. **7**: p. 39631.
69. Haberle, V., et al., *Two independent transcription initiation codes overlap on vertebrate core promoters*. *Nature*, 2014. **507**(7492): p. 381-5.
70. Barolo, S., *Shadow enhancers: frequently asked questions about distributed cis-regulatory information and enhancer redundancy*. *Bioessays*, 2012. **34**(2): p. 135-41.
71. Buecker, C. and J. Wysocka, *Enhancers as information integration hubs in development: lessons from genomics*. *Trends in Genetics*, 2012. **28**(6): p. 276-284.
72. Bonn, S. and E.E. Furlong, *cis-Regulatory networks during development: a view of Drosophila*. *Curr Opin Genet Dev*, 2008. **18**(6): p. 513-20.
73. Shlyueva, D., G. Stampfel, and A. Stark, *Transcriptional enhancers: from properties to genome-wide predictions*. *Nat Rev Genet*, 2014. **15**(4): p. 272-86.
74. Cheng, J., et al., *A Role for H3K4 Monomethylation in Gene Repression and Partitioning of Chromatin Readers*. *Mol Cell*, 2014. **53**(6): p. 979-92.
75. Visel, A., et al., *ChIP-seq accurately predicts tissue-specific activity of enhancers*. *Nature*, 2009. **457**(7231): p. 854-858.
76. Visel, A., E.M. Rubin, and L.A. Pennacchio, *Genomic views of distant-acting enhancers*. *Nature*, 2009. **461**(7261): p. 199-205.
77. Shen, Y., et al., *A map of the cis-regulatory sequences in the mouse genome*. *Nature*, 2012. **488**(7409): p. 116-120.
78. Nelson, A.C. and F.C. Wardle, *Conserved non-coding elements and cis regulation: actions speak louder than words*. *Development*, 2013. **140**(7): p. 1385-1395.
79. Soleimani, V.D., et al., *Chromatin tandem affinity purification sequencing*. *Nat Protoc*, 2013. **8**(8): p. 1525-34.
80. Kolodziej, K.E., et al., *Optimal use of tandem biotin and V5 tags in ChIP assays*. *BMC Mol Biol*, 2009. **10**: p. 6.
81. de Boer, E., et al., *Efficient biotinylation and single-step purification of tagged transcription factors in mammalian cells and transgenic mice*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003. **100**(13): p. 7480-5.
82. van Werven, F.J. and H.T. Timmers, *The use of biotin tagging in Saccharomyces cerevisiae improves the sensitivity of chromatin immunoprecipitation*. *Nucleic Acids Res*, 2006. **34**(4): p. e33.
83. Kim, J., et al., *Use of in vivo biotinylation to study protein-protein and protein-DNA interactions in mouse embryonic stem cells*. *Nature Protocols*, 2009. **4**(4): p. 506-517.
84. Fairhead, M. and M. Howarth, *Site-specific biotinylation of purified proteins using BirA*. *Methods Mol Biol*, 2015. **1266**: p. 171-84.
85. Buenrostro, J.D., et al., *ATAC-seq: A Method for Assaying Chromatin Accessibility Genome-Wide*. *Curr Protoc Mol Biol*, 2015. **109**: p. 21 29 1-9.

86. Gómez-Marín, C., et al., *Evolutionary comparison reveals that diverging CTCF sites are signatures of ancestral topological associating domains borders*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2015. **112**(24): p. 7542-7547.
87. McKinnon, P., et al., *Discovery of Transcription Factors and Regulatory Regions Driving In Vivo Tumor Development by ATAC-seq and FAIRE-seq Open Chromatin Profiling*. PLOS Genetics, 2015. **11**(2): p. e1004994.
88. Corces, M.R., et al., *Lineage-specific and single-cell chromatin accessibility charts human hematopoiesis and leukemia evolution*. Nat Genet, 2016. **48**(10): p. 1193-203.
89. Schmidl, C., et al., *ChIPmentation: fast, robust, low-input ChIP-seq for histones and transcription factors*. Nat Methods, 2015. **12**(10): p. 963-965.
90. Gustafsson, C., et al., *High-throughput ChIPmentation: freely scalable, single day ChIPseq data generation from very low cell-numbers*. BMC Genomics, 2019. **20**(1): p. 59.
91. Olson, E.N., *Gene regulatory networks in the evolution and development of the heart*. Science, 2006. **313**(5795): p. 1922-1927.
92. Teichmann, S.A. and M.M. Babu, *Gene regulatory network growth by duplication*. Nat Genet, 2004. **36**(5): p. 492-6.
93. Yu, J.K., *The evolutionary origin of the vertebrate neural crest and its developmental gene regulatory network—insights from amphioxus*. Zoology (Jena), 2010. **113**(1): p. 1-9.
94. Marie, P.J., *Transcription factors controlling osteoblastogenesis*. Arch Biochem Biophys, 2008. **473**(2): p. 98-105.
95. Nishio, Y., et al., *Runx2-mediated regulation of the zinc finger Osterix/Sp7 gene*. Gene, 2006. **372**: p. 62-70.
96. Lee, M.-H., et al., *BMP-2-induced Osterix expression is mediated by Dlx5 but is independent of Runx2*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2003. **309**(3): p. 689-694.
97. Tadic, T., et al., *Overexpression of Dlx5 in chicken calvarial cells accelerates osteoblastic differentiation*. Journal of bone and mineral research, 2002. **17**(6): p. 1008-1014.
98. Ryoo, H.-M., M.-H. Lee, and Y.-J. Kim, *Critical molecular switches involved in BMP-2-induced osteogenic differentiation of mesenchymal cells*. Gene, 2006. **366**(1): p. 51-57.
99. Fraser, G.J., et al., *An ancient gene network is co-opted for teeth on old and new jaws*. PLoS biology, 2009. **7**(2).
100. Michon, F., *Tooth evolution and dental defects: from genetic regulation network to micro-RNA fine-tuning*. Birth Defects Res A Clin Mol Teratol, 2011. **91**(8): p. 763-9.
101. Yang, G., et al., *BMP-2 induced Dspp transcription is mediated by Dlx3/Osx signaling pathway in odontoblasts*. Sci Rep, 2017. **7**(1): p. 10775.
102. Komori, T., et al., *Targeted disruption of Cbfa1 results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts*. Cell, 1997. **89**(5): p. 755-764.
103. Aberg, T., et al., *Runx2 mediates FGF signaling from epithelium to mesenchyme during tooth morphogenesis*. Dev Biol, 2004. **270**(1): p. 76-93.
104. Clarke, J.C., et al., *Specificity protein 7 is not essential for tooth morphogenesis*. Connect Tissue Res, 2014. **55 Suppl 1**: p. 88-91.
105. Zhang, H., et al., *Essential role of osterix for tooth root but not crown dentin formation*. J Bone Miner Res, 2015. **30**(4): p. 742-6.
106. Chen, S., et al., *Runx2, osx, and dspp in tooth development*. J Dent Res, 2009. **88**(10): p. 904-9.
107. Cho, Y.-D., et al., *The canonical BMP signaling pathway plays a crucial part in stimulation of dentin sialophosphoprotein expression by BMP-2*. Journal of Biological Chemistry, 2010. **285**(47): p. 36369-36376.

108. Yang, H., et al., *Distal-less homeobox 5 promotes the osteo-/dentinogenic differentiation potential of stem cells from apical papilla by activating histone demethylase KDM4B through a positive feedback mechanism*. *Exp Cell Res*, 2019. **374**(1): p. 221-230.
109. Zhao, G.Q., et al., *rDlx, a novel distal-less-like homeoprotein is expressed in developing cartilages and discrete neuronal tissues*. *Dev Biol*, 1994. **164**: p. 37-51.
110. Borday-Birraux, V., et al., *Expression of Dlx genes during the development of the zebrafish pharyngeal dentition: evolutionary implications*. *Evolution & development*, 2006. **8**(2): p. 130-141.
111. Davideau, J.-L., et al., *Comparative study of MSX-2, DLX-5, and DLX-7 gene expression during early human tooth development*. *Pediatric research*, 1999. **46**(6): p. 650-650.
112. Morsczeck, C., *Gene Expression of runx2, Osterix, c-fos, DLX-3, DLX-5, and MSX-2 in Dental Follicle Cells during Osteogenic Differentiation In Vitro*. *Calcif Tissue Int*, 2006. **78**(2): p. 98-102.
113. Beverdam, A., et al., *Jaw transformation with gain of symmetry after Dlx5/Dlx6 inactivation: mirror of the past? genesis*, 2002. **34**(4): p. 221-7.
114. Zhong, Z., et al., *Targeted disruption of sp7 and myostatin with CRISPR-Cas9 results in severe bone defects and more muscular cells in common carp*. *Sci Rep*, 2016. **6**: p. 22953.
115. DeLaurier, A., et al., *Zebrafish sp7:EGFP: A transgenic for studying otic vesicle formation, skeletogenesis, and bone regeneration*. *genesis*, 2010. **48**(8): p. 505-511.
116. Yu, T., et al., *A vertebrate-specific and essential role for osterix in osteogenesis revealed by gene knockout in the teleost medaka*. *Development*, 2017. **144**(2): p. 265-271.
117. Zhou, X., et al., *Multiple functions of Osterix are required for bone growth and homeostasis in postnatal mice*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2010. **107**(29): p. 12919-12924.
118. Miura, S., K. Hanaoka, and S. Togashi, *Skeletogenesis in Xenopus tropicalis: characteristic bone development in an anuran amphibian*. *Bone*, 2008. **43**(5): p. 901-9.
119. Schaeper, N.D., N.-M. Prpic, and E.A. Wimmer, *A clustered set of three Sp-family genes is ancestral in the Metazoa: evidence from sequence analysis, protein domain structure, developmental expression patterns and chromosomal location*. *BMC Evolutionary Biology*, 2010. **10**(1): p. 88.
120. Presnell, J.S., C.E. Schnitzler, and W.E. Browne, *KLF/SP Transcription Factor Family Evolution: Expansion, Diversification, and Innovation in Eukaryotes*. *Genome Biology and Evolution*, 2015. **7**(8): p. 2289-2309.
121. Simakov, O., et al., *Deeply conserved synteny resolves early events in vertebrate evolution*. *Nat Ecol Evol*, 2020.
122. Kadonaga, J.T., et al., *Isolation of cDNA encoding transcription factor Sp1 and functional analysis of the DNA binding domain*. *Cell*, 1987. **51**(6): p. 1079-90.
123. Oka, S., et al., *NMR structure of transcription factor Sp1 DNA binding domain*. *Biochemistry*, 2004. **43**(51): p. 16027-35.
124. Copenhaver, G.P., et al., *Zinc Finger Independent Genome-Wide Binding of Sp2 Potentiates Recruitment of Histone-Fold Protein Nf-y Distinguishing It from Sp1 and Sp3*. *PLOS Genetics*, 2015. **11**(3): p. e1005102.
125. Zhao, C. and A. Meng, *Sp1-like transcription factors are regulators of embryonic development in vertebrates*. *Development, growth & differentiation*, 2005. **47**(4): p. 201-211.
126. Renn, J. and C. Winkler, *Osterix-mCherry transgenic medaka for in vivo imaging of bone formation*. *Developmental Dynamics*, 2009. **238**(1): p. 241-248.

127. Strecker, S., et al., *Generation and characterization of Osterix-Cherry reporter mice*. *genesis*, 2013. **51**(4): p. 246-258.
128. Hojo, H., et al., *Sp7/Osterix Is Restricted to Bone-Forming Vertebrates where It Acts as a Dlx Co-factor in Osteoblast Specification*. *Developmental Cell*, 2016. **37**(3): p. 238-253.
129. Harland, R.M. and R.M. Grainger, *Xenopus research: metamorphosed by genetics and genomics*. *Trends in Genetics*, 2011. **27**(12): p. 507-515.
130. Schlegel, A. and D.Y.R. Stainier., *Lessons from "Lower" Organisms: What Worms, Flies, and Zebrafish Can Teach Us about Human Energy Metabolism*. *PLoS Genet*, 2007. **3**(11): p. 2037-2048.
131. Lieschke, G.J. and P.D. Currie, *Animal models of human disease: zebrafish swim into view*. *Nature Reviews Genetics*, 2007. **8**(5): p. 353-367.
132. Kawasaki, K., *The SCPP gene repertoire in bony vertebrates and graded differences in mineralized tissues*. *Dev Genes Evol*, 2009. **219**(3): p. 147-57.
133. Kerney, R., B.K. Hall, and J. Hanken, *Regulatory elements of Xenopus col2a1 drive cartilaginous gene expression in transgenic frogs*. *Int J Dev Biol*, 2010. **54**(1): p. 141-50.
134. Marcellini, S., et al., *Evolution of the interaction between Runx2 and VDR, two transcription factors involved in osteoblastogenesis*. *BMC Evol Biol*, 2010. **10**: p. 78.
135. Aldea, D., et al., *Evolution of the vertebrate bone matrix: An expression analysis of the network forming collagen paralogues in amphibian osteoblasts*. *Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution*, 2013. **320**(6): p. 375-384.
136. Bertin, A., et al., *Cellular and molecular characterization of a novel primary osteoblast culture from the vertebrate model organism Xenopus tropicalis*. *Histochem Cell Biol*, 2015. **143**: p. 431-442.
137. Hellsten, U., et al., *The Genome of the Western Clawed Frog Xenopus tropicalis*. *Science*, 2010. **328**(5978): p. 633-636.
138. Pollet, N.a.A.M., *Insights from Xenopus Genomes, in Vertebrate Genomes*. J. Volf, Editor. Karger: Basel. p. 138-53., 2006.
139. Chesneau, A., et al., *Transgenesis procedures in Xenopus*. *Biology of the Cell*, 2008. **100**(9): p. 503-529.
140. Loots, G.G., et al., *Interrogating transcriptional regulatory sequences in Tol2-mediated Xenopus transgenics*. *PLoS One*, 2013. **8**(7): p. e68548.
141. Hanna, P., *Control transcripcional óseo y repeticiones genómicas en Xenopus tropicalis: un análisis por RNA-seq y ChIP-seq in vivo*. Tesis de Doctorado en Ciencias Biológicas. Universidad de Concepción. Facultad de Ciencias Biológicas. Dirección de Postgrado., 2014.
142. Inoue, J.G., et al., *Evolutionary Origin and Phylogeny of the Modern Holocephalans (Chondrichthyes: Chimaeriformes): A Mitogenomic Perspective*. *Molecular Biology and Evolution*, 2010. **27**(11): p. 2576-2586.
143. Didier, D., E. Leclair, and D. Vanbuskirk, *Embryonic Staging and External FEatures of Development of the Chimaeroid Fish, Callorhinchus milii (Holocephali, Callorhinchidae)*. *Journal of Morphology*, 1998. **236**: p. 25-47.
144. Venkatesh, B., et al., *Elephant shark genome provides unique insights into gnathostome evolution*. *Nature*, 2014. **505**(7482): p. 174-9.
145. Venkatesh, B., et al., *Survey sequencing and comparative analysis of the elephant shark (Callorhinchus milii) genome*. *PLoS Biol*, 2007. **5**(4): p. e101.
146. Wang, J., et al., *Large number of ultraconserved elements were already present in the jawed vertebrate ancestor*. *Mol Biol Evol*, 2009. **26**(3): p. 487-90.

147. Yong, L.W. and J.K. Yu, *Tracing the evolutionary origin of vertebrate skeletal tissues: insights from cephalochordate amphioxus*. *Curr Opin Genet Dev*, 2016. **39**: p. 55-62.
148. Marlétaz, F., et al., *Amphioxus functional genomics and the origins of vertebrate gene regulation*. *Nature*, 2018. **564**(7734): p. 64-70.
149. Kramer, E.M., *A stranger in a strange land: the utility and interpretation of heterologous expression*. *Front Plant Sci*, 2015. **6**: p. 734.
150. Indjeian, V.B., et al., *Evolving New Skeletal Traits by cis-Regulatory Changes in Bone Morphogenetic Proteins*. *Cell*, 2016. **164**(1-2): p. 45-56.
151. Ronshaugen, M., N. McGinnis, and W. McGinnis, *Hox protein mutation and macroevolution of the insect body plan*. *Nature*, 2002. **415**(6874): p. 914-917.
152. Nieuwkoop, P.D., & Faber, J., *Normal table of Xenopus laevis (Daudin). A systematical and chronological survey of the development from the fertilized egg till the end of metamorphosis*. . *Normal table of Xenopus laevis (Daudin). A systematical and chronological survey of the development from the fertilized egg till the end of metamorphosis*. , 1956: p. pp. 243pp.
153. Trueb, L. and J. Hanken, *Skeletal Development in Xenopus laevis (Anura: Pipidae)*. *Journal of Morphology*, 1992. **214**: p. 1-14.
154. Ramlochansingh, C., et al., *Efficacy of tricaine methanesulfonate (MS-222) as an anesthetic agent for blocking sensory-motor responses in Xenopus laevis tadpoles*. *PLoS One*, 2014. **9**(7): p. e101606.
155. Roure, A., et al., *A multicassette Gateway vector set for high throughput and comparative analyses in ciona and vertebrate embryos*. *PLoS One*, 2007. **2**(9): p. e916.
156. Andrews, S., *FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data*. 2010. 2017.
157. Bolger, A.M., M. Lohse, and B. Usadel, *Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data*. *Bioinformatics*, 2014. **30**(15): p. 2114-2120.
158. Langmead, B. and S.L. Salzberg, *Fast gapped-read alignment with Bowtie 2*. *Nature methods*, 2012. **9**(4): p. 357.
159. Donlin, M.J., *Using the generic genome browser (GBrowse)*. *Current Protocols in Bioinformatics*, 2009. **28**(1): p. 9.9. 1-9.9. 25.
160. Arrigoni, L., et al., *Standardizing chromatin research: a simple and universal method for ChIP-seq*. *Nucleic Acids Research*, 2016. **44**(7): p. e67-e67.
161. Buisine, N., et al., *Xenopus tropicalis Genome Re-Scaffolding and Re-Annotation Reach the Resolution Required for In Vivo ChIA-PET Analysis*. *PLoS One*, 2015. **10**(9): p. e0137526.
162. Chengtian Zhao, a.A.M., *Sp1-like transcription factors are regulators of embryonic development in vertebrates*. *Develop. Growth Differ.*, 2005. **47**: p. 201–211.
163. Holland, N.D., et al., *Sequence and developmental expression of Amphidil, an amphioxus Distal-less gene transcribed in the ectoderm, epidermis and nervous system: insights into evolution of craniate forebrain and neural crest*. *Development*, 1996. **122**(9): p. 2911-2920.
164. Hecht, J., et al., *Evolution of a core gene network for skeletogenesis in chordates*. *PLoS Genet*, 2008. **4**(3): p. e1000025.
165. Fisher, S. and T. Franz-Odenaal, *Evolution of the bone gene regulatory network*. *Curr Opin Genet Dev*, 2012. **22**(4): p. 390-7.
166. Cervantes-Diaz, F., P. Contreras, and S. Marcellini, *Evolutionary origin of endochondral ossification: the transdifferentiation hypothesis*. *Development Genes and Evolution*, 2016: p. 1-7.
167. Veenstra, G.J., D.L. Weeks, and A.P. Wolffe, *Distinct roles for TBP and TBP-like factor in early embryonic gene transcription in Xenopus*. *Science*, 2000. **290**(5500): p. 2312-5.

168. Pundhir, S., et al., *Peak-valley-peak pattern of histone modifications delineates active regulatory elements and their directionality*. *Nucleic Acids Res*, 2016. **44**(9): p. 4037-51.
169. Takeuchi, Y., et al., *Kruppel-Like Factor 4 represses osteoblast differentiation via ciliary Hedgehog signaling*. *Exp Cell Res*, 2018. **371**(2): p. 417-425.
170. Kim, J.H., et al., *Kruppel-like factor 4 attenuates osteoblast formation, function, and cross talk with osteoclasts*. *J Cell Biol*, 2014. **204**(6): p. 1063-74.
171. Lin, H., et al., *KLF4 promotes the odontoblastic differentiation of human dental pulp cells*. *J Endod*, 2011. **37**(7): p. 948-54.
172. Tao, H., et al., *Klf4 Promotes Dentinogenesis and Odontoblastic Differentiation via Modulation of TGF-beta Signaling Pathway and Interaction With Histone Acetylation*. *J Bone Miner Res*, 2019. **34**(8): p. 1502-1516.
173. Mathelier, A., et al., *JASPAR 2016: a major expansion and update of the open-access database of transcription factor binding profiles*. *Nucleic Acids Research*, 2016. **44**(D1): p. D110-D115.
174. Treichel, D., M.-B. Becker, and P. Gruss, *The novel transcription factor gene Sp5 exhibits a dynamic and highly restricted expression pattern during mouse embryogenesis*. *Mechanisms of Development*, 2001. **101**(1-2): p. 175-179.
175. Sun, Z., et al., *Sp5l is a mediator of Fgf signals in anteroposterior patterning of the neuroectoderm in zebrafish embryo*. *Dev Dyn*, 2006. **235**(11): p. 2999-3006.
176. Thorpe, C.J., *Wnt/-catenin regulation of the Sp1-related transcription factor sp5l promotes tail development in zebrafish*. *Development*, 2005. **132**(8): p. 1763-1772.
177. Weidinger, G., et al., *The Sp1-related transcription factors sp5 and sp5-like act downstream of Wnt/beta-catenin signaling in mesoderm and neuroectoderm patterning*. *Curr Biol*, 2005. **15**(6): p. 489-500.
178. Urban, A.E., et al., *FGF is essential for both condensation and mesenchymal-epithelial transition stages of pronephric kidney tubule development*. *Dev Biol*, 2006. **297**(1): p. 103-17.
179. Ruspita, I., et al., *Sp6 downregulation of follistatin gene expression in ameloblasts*. *The Journal of Medical Investigation*, 2008. **55**(1,2): p. 87-98.
180. Nakamura, T., et al., *Transcription factor epiprofin is essential for tooth morphogenesis by regulating epithelial cell fate and tooth number*. *J Biol Chem*, 2008. **283**(8): p. 4825-33.
181. Nakamura, T., et al., *Epiprofin Regulates Enamel Formation and Tooth Morphogenesis by Controlling Epithelial-Mesenchymal Interactions During Tooth Development*. *J Bone Miner Res*, 2017. **32**(3): p. 601-610.
182. Talamillo, A., et al., *Role of Epiprofin, a zinc-finger transcription factor, in limb development*. *Dev Biol*, 2010. **337**(2): p. 363-74.
183. Haro, E., et al., *Sp6 and Sp8 transcription factors control AER formation and dorsal-ventral patterning in limb development*. *PLoS Genet*, 2014. **10**(8): p. e1004468.
184. Nakamura, T., et al., *The Kruppel-like factor epiprofin is expressed by epithelium of developing teeth, hair follicles, and limb buds and promotes cell proliferation*. *J Biol Chem*, 2004. **279**(1): p. 626-34.
185. Hammond, C.L. and E. Moro, *Using transgenic reporters to visualize bone and cartilage signaling during development in vivo*. *Frontiers in Endocrinology*, 2012. **3**.
186. Li, J., et al., *Transcription Factors Sp8 and Sp9 Coordinately Regulate Olfactory Bulb Interneuron Development*. *Cereb Cortex*, 2018. **28**(9): p. 3278-3294.
187. Xu, Z., et al., *SP8 and SP9 coordinately promote D2-type medium spiny neuron production by activating Six3 expression*. *Development*, 2018. **145**(14).

188. Kawakami, Y., et al., *Sp8 and Sp9, two closely related buttonhead-like transcription factors, regulate Fgf8 expression and limb outgrowth in vertebrate embryos*. *Development*, 2004. **131**(19): p. 4763-74.
189. Waclaw, R.R., et al., *The zinc finger transcription factor Sp8 regulates the generation and diversity of olfactory bulb interneurons*. *Neuron*, 2006. **49**(4): p. 503-16.
190. Griesel, G., et al., *Sp8 controls the anteroposterior patterning at the midbrain-hindbrain border*. *Development*, 2006. **133**(9): p. 1779-87.
191. Bell, S.M., et al., *Sp8 is crucial for limb outgrowth and neuropore closure*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003. **100**(21): p. 12195-200.
192. Zhang, Q., et al., *The Zinc Finger Transcription Factor Sp9 Is Required for the Development of Striatopallidal Projection Neurons*. *Cell Rep*, 2016. **16**(5): p. 1431-1444.
193. Sugahara, F., et al., *Involvement of Hedgehog and FGF signalling in the lamprey telencephalon: evolution of regionalization and dorsoventral patterning of the vertebrate forebrain*. *Development*, 2011. **138**(6): p. 1217-26.
194. Merlo, G.R., et al., *Multiple functions of Dlx genes*. *International Journal of Developmental Biology*, 2004. **44**(6): p. 619-626.
195. Stock, D.W., et al., *The evolution of the vertebrate Dlx gene family*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996. **93**(20): p. 10858-63.
196. Depew, M.J., T. Lufkin, and J.L. Rubenstein, *Specification of jaw subdivisions by Dlx genes*. *Science*, 2002. **298**(5592): p. 381-385.
197. Albuixech-Crespo, B., et al., *Origin and evolution of the chordate central nervous system: insights from amphioxus genoarchitecture*. *Int J Dev Biol*, 2017. **61**(10-11-12): p. 655-664.
198. Candiani, S., et al., *A neurochemical map of the developing amphioxus nervous system*. *BMC Neurosci*, 2012. **13**: p. 59.
199. Brill, M.S., et al., *A dlx2- and pax6-dependent transcriptional code for periglomerular neuron specification in the adult olfactory bulb*. *J Neurosci*, 2008. **28**(25): p. 6439-52.
200. Lapan, S.W. and P.W. Reddien, *dlx and sp6-9 Control optic cup regeneration in a prototypic eye*. *PLoS Genet*, 2011. **7**(8): p. e1002226.
201. Littlewood, D.T. and A. Waeschenbach, *Evolution: a turn up for the worms*. *Curr Biol*, 2015. **25**(11): p. R457-60.
202. Samee, N., et al., *Dlx5, a positive regulator of osteoblastogenesis, is essential for osteoblast-osteoclast coupling*. *The American journal of pathology*, 2008. **173**(3): p. 773-780.
203. Samee, N., et al., *Increased bone resorption and osteopenia in Dlx5 heterozygous mice*. *J Cell Biochem*, 2009. **107**(5): p. 865-872.
204. Wada, H., et al., *Molecular evolution of fibrillar collagen in chordates, with implications for the evolution of vertebrate skeletons and chordate phylogeny*. *Evol Dev*, 2006. **8**(4): p. 370-377.
205. Ou, J., et al., *ATACseqQC: a Bioconductor package for post-alignment quality assessment of ATAC-seq data*. *BMC Genomics*, 2018. **19**(1): p. 169.
206. Rose, A., *Intron-mediated regulation of gene expression, in Nuclear pre-mRNA processing in plants*. 2008, Springer. p. 277-290.
207. Fedorova, L., *Introns in gene evolution*. *Genetica*, 2003. **118**(2/3): p. 123-131.
208. Nowwarote, N., et al., *Basic fibroblast growth factor regulates phosphate/pyrophosphate regulatory genes in stem cells isolated from human exfoliated deciduous teeth*. *Stem cell research & therapy*, 2018. **9**(1): p. 1-14.
209. Wu, Y., et al., *Gene expression profiles of the incisor pulp tissue during fluorosis*. *International Endodontic Journal*, 2010. **43**(8): p. 629-636.



210. Wang, X., et al., *Expression of FAM20C in the osteogenesis and odontogenesis of mouse*. Journal of Histochemistry & Cytochemistry, 2010. **58**(11): p. 957-967.
211. Kim, E.-C., H.-J. Lee, and Y. Kim, *Lysyl Oxidase and the Lysyl Oxidase-like Protein Modulate Odontoblastic Differentiation of Human Dental Pulp Cells*. Journal of Endodontics, 2012. **38**(6): p. 769-773.
212. Iwamoto, T., et al., *Pannexin 3 regulates proliferation and differentiation of odontoblasts via its hemichannel activities*. PLoS One, 2017. **12**(5): p. e0177557.
213. Bleicher, F., et al., *New genes involved in odontoblast differentiation*. Advances in dental research, 2001. **15**(1): p. 30-33.
214. Eckhardt, A., et al., *Proteomic analysis of human tooth pulp: proteomics of human tooth*. J Endod, 2014. **40**(12): p. 1961-6.

