

03021



---

---

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA

Expresión del ectodominio del receptor tipo III del TGF-  $\beta$  murino, en el sistema baculoviral

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
LICENCIADO EN INVESTIGACIÓN

BIOMÉDICA BÁSICA

P R E S E N T A :

ADVERQUEYDI ZÚÑIGA TOALÁ



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## INDICE DE CONTENIDO

	Página
INDICE DE FIGURAS	iv
ABREVIATURAS	iv
RESUMEN	vi
<b>I. INTRODUCCION</b>	1
I.1 TGF- $\beta$	2
I.2 Estructura del TGF- $\beta$	3
I.3 Receptor del TGF- $\beta$	3
I.4 Receptores tipo I y tipo II:	4
I.5 Receptores tipo III	6
I.6 Las SMADS	9
I.7 Sistema baculoviral	12
I.7.2 Ciclo de vida del virus	12
I.7.3 El sistema de expresión en Baculovirus	13
<b>II. OBJETIVOS</b>	14
II.1 Objetivo general	14
II.2 Objetivos Particulares	14
<b>III. ESTRATEGIA GENERAL</b>	15
<b>IV. RESULTADOS</b>	17
IV.1 Modificaciones en el extremo 5 y 3 del UTR	17
IV.2 Generación de un sitio de restricción Eag I por PCR en pCII-U	25
IV.3 Introducción de una cola de His al cDNA seguida de un codón de terminación para la formación de una proteína soluble	28
IV.4 Expresión transitoria del betaglicano de membrana (pCII-UE) y soluble (pCII-Sol) en células COS-1	30

IV.5 Subclonación de la forma soluble del betaglicano en pBlueBac4	32
IV.6 Obtención de placas recombinantes de Baculovirus	33
IV.7 Obtención de proteína recombinante partiendo de un stock de bajo título	33
<b>V. DISCUSION DE RESULTADOS</b>	<b>35</b>
<b>VI. CONCLUSIONES</b>	<b>36</b>
<b>VII. MATERIAL Y METODOS</b>	<b>37</b>
VII.1 Los métodos para extraer DNA	37
VII.1.2 Mini-preparaciones, kit comercial	37
VII.1.3 Maxi-preparaciones, Kit comercial(QIAGEN)	38
VII.2 Electroforesis del DNA	39
VII.2.1 Preparación del gel de agarosa al 1%	39
VII.3 Purificación del DNA	39
VII.3.1 Purificación del DNA, apartir de una banda en gel de agarosa. QIAEX II	40
VII.3.2 Purificación del DNA, por fenol / cloroformo	40
VII.4 Digestión con enzimas de restricción	41
VII.5 Desfosforilación del vector	41
VII.6 Ligación	42
VII.7 Mutación puntual, generación de un sitio Eag I	44
VII.8 Fosforilación de los oligos de doble cadena con la polinucleótido kinasa (PNK)	44
VII.8.1 Ligación de los oligos de doble cadena al cDNA	45
VII.9 Transformación de bacterias competentes <i>E. coli</i> de la cepa DH5 $\alpha$	45
VII.10 Iodinación del TGF- $\beta$ (Método de Cloramina T)	45
VII.11 Transfección Transitoria de células COS-1 (DEAE-Dextran)	46
VII.12 Marcado por afinidad	47
VII.12.1 Marcado por afinidad de proteína expresada en membrana	47
VII.12.2 Marcado por afinidad de proteína expresada en solución	47
VII.13 Geles de poliacrilamida-SDS	47
VII.14 Métodos usados con los baculovirus	48
VII.14.1 Transfección de células <i>Sf9</i>	48
VII.14.2 Ensayo de placas	49
VII.14.3 Western Blot	50
VII.14.4 Tinción de plata	50
VII.14.5 Purificación de la proteína recombinante que tiene una cola de 8 residuos de Histidina (8X-His)	51
VII.15 Medios de cultivo	51
VII.15.1 Medios Líquidos	51
VII.15.1.1 Medio Luria-Bertani(LB)	52
VII.15.1.2 Medio Terrific Broth(TB)	52
VII.15.1.3 Medio Sólido	52
VII.16 Medios Usados en Baculovirus	52
VII.17 Buffers	53
VII.17.1 Buffer TAE 50X	53
VII.17.2 Buffer para proteína 5X	53



## INDICE DE FIGURAS

		Página
Figura	1 Modelo de listones del TGF- $\beta$ 2	3
Figura	2 Mecanismo de transducciones de señales del TGF- $\beta$	5
Figura	3 Características estructurales del Betaglicano	6
Figura	4 Estructura del betaglicano y la endogлина	8
Figura	5 Dominio de las Smad y su función	9
Figura	6 Representación de las familia de proteínas Smad	10
Figura	7 Esquema general	16
Figura	8 Vectores usados en las subclonaciones	17
Figura	9 Representación esquemática de la subclonación del betaglicano al pBluescript KS II – en el sitio EcoR I	18
Figura	10 Patrón de restricción de CII-2	18
Figura	11 Representación de reducción de dos a un solo sitio AvrII	19
Figura	12 Patrón de restricción con Avr II	19
Figura	13 Representación de la eliminación de gran parte del extremo 3 UTR	20
Figura	14 Representación de los sitios Not I	21
Figura	15 Patrón de digestión con Not I	21
Figura	16 Representación de la eliminación de sitios Eag I	22
Figura	17 Patrón de digestión con NaeI	22
Figura	18 Representación de cambio de vector	23
Figura	19 Patrón de restricción con EcoR I- Hind	23
Figura	20 pGEM-3Z	24
Figura	21 Patrón de digestión con EcoR I – Hind III de pGEM-3Z	24
Figura	22 Localización de primer y sitios de restricción en el cDNA	26
Figura	23 Mutación puntual	26
Figura	24 Amplificación de PL7-MN7	26
Figura	25 Representación de la mutación puntual	27
Figura	26 Generando la mutación puntual	27
Figura	27 Construcción del betaglicano murino, en su forma soluble	28
Figura	28 Representación de la introducción de la cola de Histidinas	29
Figura	29 Marcado por afinidad de la forma membranal del betaglicano	30
Figura	30 Marcado por afinidad de la forma soluble del betaglicano	31
Figura	31 Western Blot de Betaglicano de membrana y soluble	31
Figura	32 Subclonación del betaglicano soluble en el vector de transferencia pBlueBac4	32
Figura	33 Western Blot de la proteína después de la cromatografía	33
Figura	34 Subclonación	42

## ABREVIATURAS

aa	Aminoácidos
ActRII	Receptor tipo II de activina
bFGF	Factor de crecimiento de fibroblastos básico
BG	Betaglicano
BMPs	Proteínas Morfogénicas de Hueso
COS-1	Línea celular de riñón de mono.
cDNA	Acido Desoxi-Ribonucleico complementario(complementary Desoxy Ribonucleic Acid)
CBP300	Proteína de unión a CRE
DNA	Desoxy Ribonucleic Acid
DSS	Disuccimidil-suberato
DTT	Ditiotreitol
GAGs	Glicosaminoglicanos
GDF	Factores de crecimiento y diferenciación
GS dominio	Dominio rico en glicinas-serinas del receptor tipo I del TGF- $\beta$
MH2	Homología a Mad2
Mad	Mother against decapentaplegic(dpp)
NGF	Factor de crecimiento neural
ORF	Fragmento abierto de lectura
pb	pares de base
pBKS –	Vector de clonación(pBluescript KS -)
PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
pGEM-3Z	Vector de clonación
pCMV5	Vector de expresión para transfección transitoria en células COS-1
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PMSF	Fluoruro de Fenilmetilsulfonil
SARA	Smad anchor for receptor activation
SDS	Dodecilsulfato de sodio
SFB	Suero fetal bovino
Ski	protooncogen, Sloan Kettering Institute
SnoN	protooncogen, Gen N novedoso relacionado a ski
Smurf1	Factor que regula la ubiquitinación de las Smad
TEMED	N, N, N, N, -tetrametiletilendiamina
TGIF	Factor que inacciona con la secuencia TG
Tris	Tris(hidroximetil)aminometano
TR $\beta$ R-I	Receptor tipo I del TGF- $\beta$
TR $\beta$ R-II	Receptor tipo II del TGF- $\beta$
TGF- $\beta$	Transforming Growth Factor Beta
UTR	Regiones no traducidas (untranslated region)

## RESUMEN

Expresión del ectodominio del receptor tipo III del TGF- $\beta$  murino, en el sistema baculoviral

El TGF- $\beta$  (Transforming Growth Factor Type- $\beta$ ) es una citocina implicada en varias funciones como desarrollo embrionario, reparación tisular y la respuesta inmune. Esta citocina transmite su señal a través de los receptores tipo I y II. El betaglicano o receptor tipo III del TGF- $\beta$ , es un proteoglicano que regula la unión del TGF- $\beta$  al receptor tipo I y II. El Betaglicano se encuentra en dos formas: anclada a la membrana celular, y de forma soluble (en suero y matriz extracelular). Ambas formas unen TGF- $\beta$  con alta afinidad, la membranal facilita la unión del TGF- $\beta$  a los receptores de señalización (receptores tipo I y II) funcionando como agonista y la soluble secuestra al TGF- $\beta$  de sus receptores de señalización actuando como antagonista.

Con el objetivo de producir al Betaglicano Soluble Recombinante Murino en el sistema baculoviral para una futura administración de la proteína soluble en modelos experimentales murinos y eliminar el posible efecto neutralizante que tendrían los anticuerpos que el ratón producirían contra el betaglicano soluble de rata, se creó apartir del cDNA silvestre el betaglicano soluble murino. El primer paso fue eliminar sitios de restricción que acortaron los extremos 5' y 3' UTR. El siguiente paso fue generar un sitio de restricción único (Eag I) por medio de una mutación puntual antes de la región transmembranal del betaglicano. Este sitio de restricción permitió introducirle un oligonucleótido de cadena doble que codifica para 8 residuos de Histidinas seguido de un codón de terminación, esto permitirá producir a la proteína de forma soluble y poderla purificar en sefarosa quelante. La expresión de las construcciones que producen la proteína soluble y la forma membranal del receptor (con la mutación Eag I) fueron analizadas su expresión por un ensayo funcional (marcado por afinidad) en células COS-1 (sistema de expresión de mamíferos). El cDNA que codifica para la proteína soluble fue subclonado en un vector viral de transferencia para su posterior transfección en baculovirus, y obtención de baculovirus recombinantes. A través de diluciones del stock viral fueron seleccionadas placas recombinantes aisladas. Apartir de estas placas, se produjo un virus de mayor título en células Sf9 que se utilizó para infectar células H5. La proteína recombinante producida en células H5 produjo un rendimiento de 250 ng por cada 100 mL de medio de cultivo.

En conclusión, es posible expresar el betaglicano soluble murino en baculovirus, pero la potencial producción está limitada por el bajo rendimiento del receptor soluble en cantidades suficientes para experimentar en animales.



# I. INTRODUCCIÓN

Ninguna célula vive aislada ya que responde a estímulos de su ambiente. El fenómeno en el que una célula influye en la conducta de otras células existió en el mundo de los organismos unicelulares, mucho antes de que aparecieran los organismos multicelulares. En los organismos multicelulares, la sobrevivencia depende de la comunicación entre las células que coordinan el crecimiento, diferenciación y el metabolismo de una multitud de células en diferentes tejidos y órganos. La comunicación celular les permite saber el estado del organismo completo y para que la comunicación exista, la evolución ha desarrollado moléculas de señalización celular, que son producidas por las mismas células para comunicarse entre ellas [1].

El mensaje producido por una célula, tiene efecto únicamente en células que tienen receptores específicos para recibir la señal. Entre las moléculas de señalización se encuentran a las proteínas, péptidos pequeños, aminoácidos, nucleótidos, esteroides, retinoides, derivados de ácidos grasos y gases solubles como el óxido nítrico. Las moléculas de señalización pueden actuar a distancias cortas o largas, tener un efecto rápido o lento. El mensaje al llegar a la célula blanco, puede pasar a través de la membrana celular (moléculas liposolubles) y unirse directamente con receptores intracelulares o pueden unirse a un receptor específico encontrado en la membrana celular [1].

En el campo de la comunicación intercelular se ha desarrollado el concepto de TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES, siendo este un proceso que convierte una señal extracelular en una respuesta celular específica [2].

Se identificó a un factor con la capacidad de provocar un fenotipo de células transformadas en cultivos de fibroblastos, de allí que a este factor se le denominara TGF- $\beta$  (factor de crecimiento transformante tipo-beta). Este mismo factor se encontró que estaba implicado en funciones de proliferación, diferenciación, morfogénesis e inmunosupresión. Posteriormente se comprobó que el TGF- $\beta$  no causa transformación oncogénica en condiciones fisiológicas [2].

## I.1 TGF- $\beta$

El TGF- $\beta$  es el prototipo de una superfamilia de factores de crecimiento, diferenciación y morfogénesis. En esta superfamilia se encuentra a las Activinas, Inhibinas, BMP (proteínas morfogénicas de hueso), GDF (Factor de crecimiento y diferenciación), Nodal, Dorsalina, Hormona Antimüllerina, estos miembros están relacionados estructuralmente con el TGF- $\beta$  [3].

Los factores relacionados al TGF- $\beta$  y esta misma citocina (cualquiera de las proteínas pequeñas secretada que se unen a receptores de superficie celular de ciertas células y que disparan su diferenciación o proliferación) están ampliamente distribuidos en todos los organismos desde la mosca de fruta hasta el humano con grado de conservación muy alto entre estos miembros [3, 4].

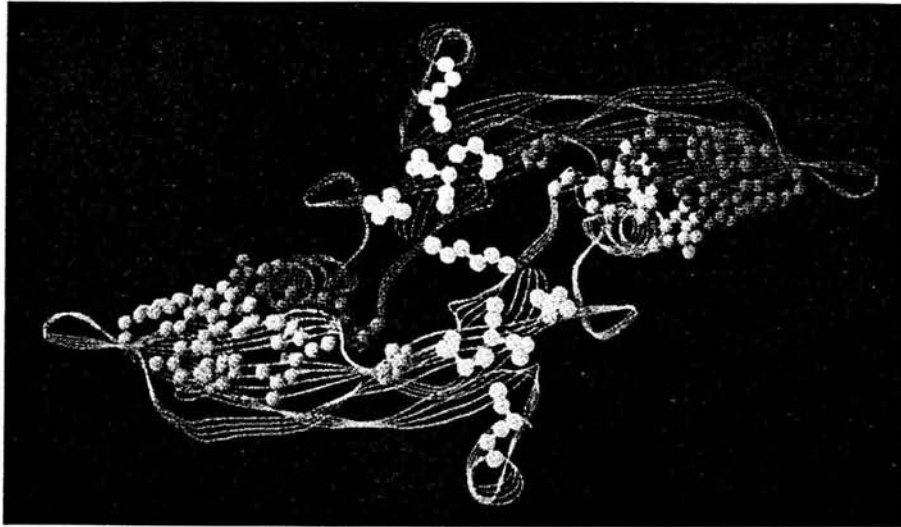
La familia del TGF- $\beta$  tiene 3 miembros o isoformas, TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2, TGF- $\beta$ 3 en vertebrados y un cuarto miembro, el TGF- $\beta$ 5 descrito en *Xenopus*. El TGF- $\beta$ 4 descrito en pollo es un homólogo del TGF- $\beta$ 1 de vertebrados, los cuales comparten entre el 60 % y 80 % de identidad en su secuencia de aminoácidos [5, 6]. Cada una de las tres isoformas en vertebrados está codificada por un gen con una localización cromosómica diferente, en el humano es la siguiente, el TGF- $\beta$ 1 en 19q13, TGF- $\beta$ 2 en 1q41 y el TGF- $\beta$ 3 en 14q24. Todas las isoformas del TGF- $\beta$  se sintetizan como precursores diméricos, que se secretan al medio extracelular como formas inactivas, donde maduran convirtiéndose en activas biológicamente [7, 8].

El TGF- $\beta$ 1 fue inicialmente caracterizado por su capacidad de inducir crecimiento de las células de riñón de rata normal independientemente de una superficie sólida de soporte, aunque su efecto en muchos tipos celulares es antimitogénico [9].

El TGF- $\beta$ 1 es un fuerte inhibidor de crecimiento para muchos tipos de células, incluyendo epitelios y endotelios, normales y transformados; este efecto también es observado en fibroblastos, células neuronales, células linfoides y hematopoiéticas [10, 11]. Se han identificado tres proteínas de superficie celular que unen TGF- $\beta$  con alta afinidad, llamados receptores tipo I, II y III, que se han encontrado al incubar las células con TGF- $\beta$ 1- $I^{125}$ . El ligando radiomarcado se entrecruza covalentemente con los receptores, y se analizan los complejos marcados en geles de poliacrilamida [12, 13, 14].

## I.2 ESTRUCTURA DEL TGF- $\beta$

El TGF- $\beta$  bioactivo es un homodímero de dos polipéptidos de 112 aminoácidos unidos por un puente disulfuro. La estructura cristalográfica del TGF- $\beta$ 2 reveló que seis de las nueve cisteínas encontradas en cada monómero, forman una estructura central rígida, conocida como el nudo de cistinas [15]. Esta estructura está formada por un anillo de ocho aminoácidos cerrados por dos puentes disulfuro y atravesados por un tercer puente. De este nudo de cistinas se extienden cuatro hojas beta antiparalelas y una alfa hélice [16, 17]. Una séptima cisteína forma un puente disulfuro con la cisteína correspondiente en el otro monómero. Los monómeros están orientados en forma antiparalela uno del otro y la cara interna de las hojas beta de uno de los monómeros forma interacciones hidrofóbicas con la alfa hélice del otro. A diferencia de los otros miembros de la familia, los TGF- $\beta$ s y las Activinas contienen una región amino terminal con dos cisteínas. En el TGF- $\beta$ 2 esta región forma una pequeña alfa hélice que se encuentra unida a la primera hoja beta por un puente disulfuro entre estas dos cisteínas (figura 1). Las características tridimensionales del TGF- $\beta$ 2 son altamente compartidas por los miembros de la familia. El factor de crecimiento neuronal (NGF) y el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) son dos factores diméricos que no tienen una secuencia similar al TGF- $\beta$ , sin embargo también tienen un nudo de cistinas [15], indicando que este motivo es altamente conservado a través de la evolución, probablemente por que le confiere estabilidad a estas proteínas extracelulares [18].



**Figura 1. Modelo de listones del TGF- $\beta$ 2.** Las dos subunidades del TGF- $\beta$ 2 están representadas en azul y amarillo. La estructura revela que seis de las nueve cisteínas que se encuentran en cada monómero forman una estructura central rígida conocida como “nudo de cistinas”, esta estructura está formada por un anillo de ocho aminoácidos cerrados por dos puentes disulfuro y atravesados por un tercer puente, las cisteínas están representadas en color blanco. De este nudo de cistinas se extienden cuatro hojas beta antiparalelas y una alfa hélice. Una séptima cisteína forma un puente disulfuro con su correspondiente cisteína en el otro monómero. Los monómeros están orientados en forma antiparalela uno del otro y la cara interna de las hojas beta en uno de los monómeros forma interacciones hidrofóbicas con la alfa hélice del otro monómero. Tomado de [16].

### I.3 RECEPTORES DEL TGF- $\beta$

La mayoría de las células eucariontes expresan en su membrana receptores que unen TGF- $\beta$ . Entre las proteínas que unen TGF- $\beta$  se encuentran los receptores de señalización (receptores tipo I y tipo II), necesarios para la transmisión de la señal del TGF- $\beta$ ; Y los “receptores accesorios” (receptores tipo III, betaglicano y endogлина), que modulan el acceso del ligando a los receptores, pero son dispensables para la transmisión de la señal del TGF- $\beta$  [19, 20, 21].

Los receptores I y II pueden distinguir entre las isoformas del TGF- $\beta$ , ellos unen TGF- $\beta$ 1 y TGF- $\beta$ 3 mejor que TGF- $\beta$ 2, esto es de mayor relevancia en células que no expresan betaglicano o su expresión es muy baja, como mioblastos y células endoteliales [4].

## I.4 RECEPTORES TIPO I Y TIPO II:

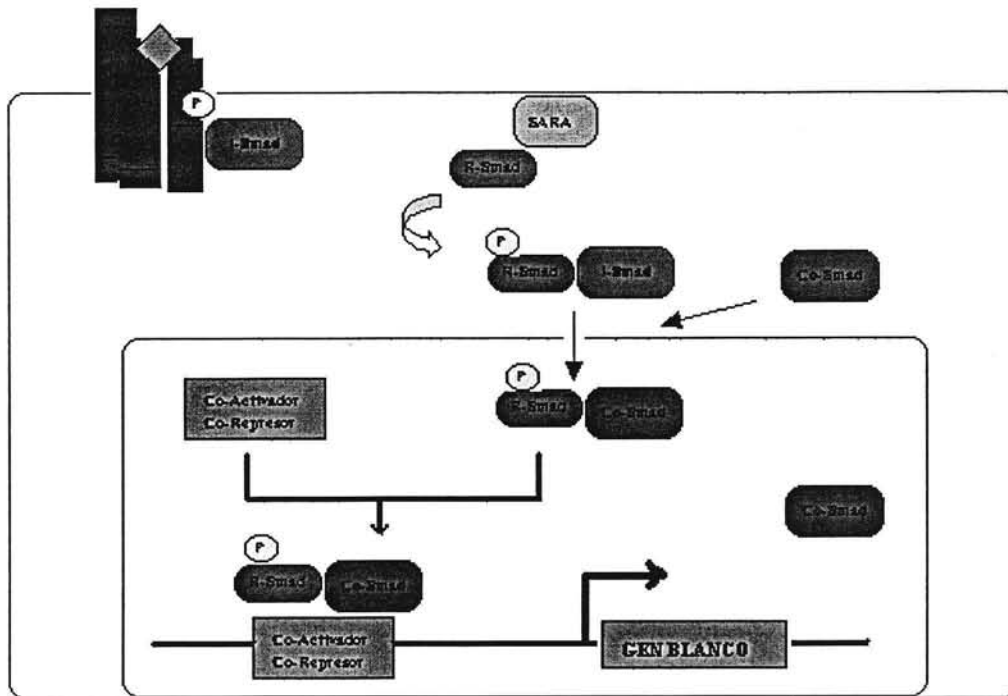
El receptor tipo I (T $\beta$ RI) es una glicoproteína de 53 kDa, con una región extracelular corta, que une al ligando, una región transmembranal hidrofóbica, y un dominio cinasa de serinas y treoninas en su parte intracelular. El T $\beta$ RI requiere del T $\beta$ RII para unir TGF- $\beta$  y el T $\beta$ RII necesita del T $\beta$ RI para señalar [19, 22].

Una característica única de los receptores tipo I es una región altamente conservada, llamada región GS, por su alto contenido de residuos de glicina y serina, este dominio es blanco para la cinasa del receptor tipo II. Después de ser fosforilado el T $\beta$ RI en esta región, la cinasa de este receptor se activa [23]. Posterior a la región GS, existe una secuencia consenso de Leu-Pro, que es el lugar donde se une la proteína FKBP12, que actúa como regulador negativo del T $\beta$ RI [24].

El receptor tipo II (T $\beta$ RII) es una glicoproteína de 75-85 kDa, con una región extracelular corta, que une al TGF- $\beta$ , una región transmembranal hidrofóbica, y un dominio cinasa de serinas y treoninas en su parte intracelular [15]. El T $\beta$ RII es una cinasa activa constitutivamente. En presencia del TGF- $\beta$ , el T $\beta$ RII recluta y fosforila a la región GS del T $\beta$ RI activando su dominio cinasa. Este complejo, señala a través de la vía canónica del TGF- $\beta$  pues activa la cinasa del T $\beta$ RI [20].

Los receptores I y II poseen afinidad intrínseca entre ellos, pero su asociación en condiciones fisiológicas solo se presenta por la unión del ligando. La señalización del TGF- $\beta$  se produce con la unión de este ligando al heterotetrámero del receptor I y II, siendo el TGF- $\beta$  la molécula que estabiliza este complejo [25].

La cinasa del T $\beta$ RI fosforila a sus sustratos fisiológicos, las proteínas Smad, que sirven como segundos mensajeros en la vía de transducción de señal del TGF- $\beta$  (figura 2) [20, 25].

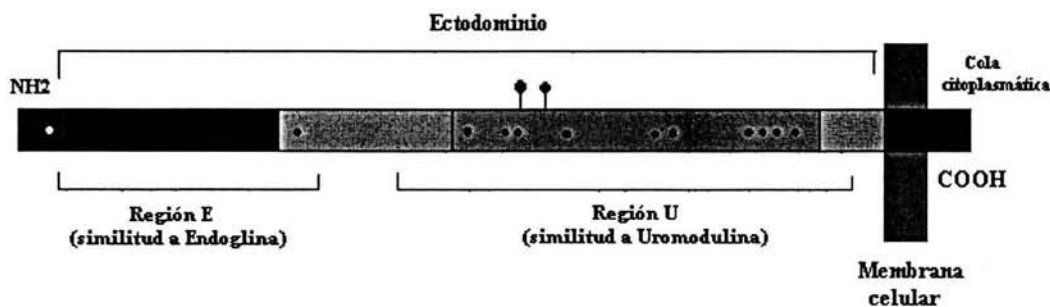


**Figura 2. Mecanismo de transducción de señal del TGF- $\beta$ .** La unión del TGF- $\beta$  a los receptores tipo I y II produce la formación de un complejo heterotetramérico, y fosforilación del T $\beta$ RI por el T $\beta$ RII. Una vez activado, el receptor tipo I fosforila a las R-Smad, permitiendo su asociación con la Co-Smad, y su posterior translocación al núcleo. En el núcleo, el complejo de Smad se asocia con proteínas co-activadoras o co-represoras, uniéndose a regiones específicas para genes blanco que responden al TGF- $\beta$ , activando y/o reprimiendo la transcripción. La proteína SARA presenta las R-Smad al receptor tipo I; las I-Smad, son proteínas que inhiben la señal del TGF- $\beta$ . Modificado de [20].

## I.5 RECEPTOR TIPO III

El betaglicano fue la primera proteína en ser identificada que unía TGF- $\beta$ . De ahí que se supuso que era el receptor natural del TGF- $\beta$ , además de su relativa abundancia en fibroblastos 3T3 y de una correlación entre la potencia biológica de la citocina y la alta afinidad del betaglicano para las diversas isoformas de TGF- $\beta$  [12, 26]. La clonación del betaglicano de rata reportó una secuencia primaria de 853 aminoácidos que al parecer existe como homodímero con unión no-covalentemente y que facilita la unión del TGF- $\beta$  al receptor tipo II, formando un complejo betaglicano/TGF- $\beta$ /T $\beta$ RII [27, 28, 29]. Aunque en el tejido óseo se ha encontrado una forma alternativa del receptor tipo II, que une con alta afinidad al TGF- $\beta$ 2, sin necesidad de que el betaglicano le presente la citocina al T $\beta$ RII [30, 31]. Los receptores tipo I y II son los únicos necesarios para la transducción de la señal del TGF- $\beta$ . El betaglicano, puede actuar como modulador dual de acceso del TGF- $\beta$  a los receptores de señalización, ya que la forma anclada a la membrana funciona como presentadora del TGF- $\beta$  a los receptores de señalización y la forma soluble actúa secuestrando al TGF- $\beta$  e impidiendo la señalización [32, 33].

El betaglicano es un proteoglicano anclado a la membrana que une TGF- $\beta$  vía su proteína medular (“core protein”), tiene cadenas de heparan y condroitin sulfato (figura 3). Las cadenas de heparan sulfato unen bFGF, aunque hasta la fecha se desconoce si tiene alguna relevancia fisiológica [27].



**Figura 3. Características estructurales del Betaglicano.** La proteína medular del Betaglicano de rata es un polipéptido de 853 aminoácidos. Este polipéptido contiene un péptido señal (caja negra), un dominio extracelular grande, una región transmembranal corta y una pequeña cola citoplasmática rica en serinas y treoninas. La región transmembranal y la cola citosólica tienen una alta homología a la proteína Endoglina. El dominio NH<sub>2</sub>-terminal tiene homología de secuencia a la proteína endoglina, dominio E (color azul); la mitad yuxtamembranal de la parte extracelular tiene homología a la proteína Uromodulina, dominio U (color naranja). El betaglicano tiene sitios de unión de GAGs (círculos verdes) y cisteínas altamente conservadas en la superfamilia del TGF- $\beta$  (puntos negros).

El betaglicano se ha clonado en varias especies como pollo, cerdo, rata, ratón y humano [34], su estructura primaria reveló un diseño modular, en su porción extracelular, tiene dos sitios de homología, uno con la proteína endoglina en su extremo amino terminal y otra con la proteína uromodulina, GP-2 y con los receptores espermáticos Zp2 y Zp3 en la parte carboxilo terminal de la región extracelular, un solo pase transmembranal y un dominio intracelular pequeño con un alto contenido en serinas y treoninas sin ningún motivo de señalización aparente, aunque su región transmembranal y cola citoplasmática tiene una alta homología a la proteína Endoglina [28, 29]. El betaglicano migra como una banda amplia en gel SDS-PAGE con un peso molecular de 280-330 kD, con una aportación de 200 kD de las cadenas de GAG y 10 kD de azúcares unidos en N-aminoácidos (asparaginas) de la región medular del betaglicano. Las cadenas GAG del betaglicano son cadenas de heparan y condroitin sulfato. Las cadenas de GAG no son necesarias para la expresión del betaglicano en la superficie celular para unir TGF- $\beta$  [27, 35].

El betaglicano se le ha implicado en la formación de los cojinetes de las válvulas del corazón de pollo [36], también se ha encontrado que une inhibina con alta afinidad y lo presenta al receptor tipo II de Activina, a través del dominio similar a uromodulina impidiendo reclutar al receptor tipo I de Activina [37, 38]. También se ha encontrado que la expresión del betaglicano se induce durante la diferenciación de mioblastos C2C12 a miotubos en el ratón [39].

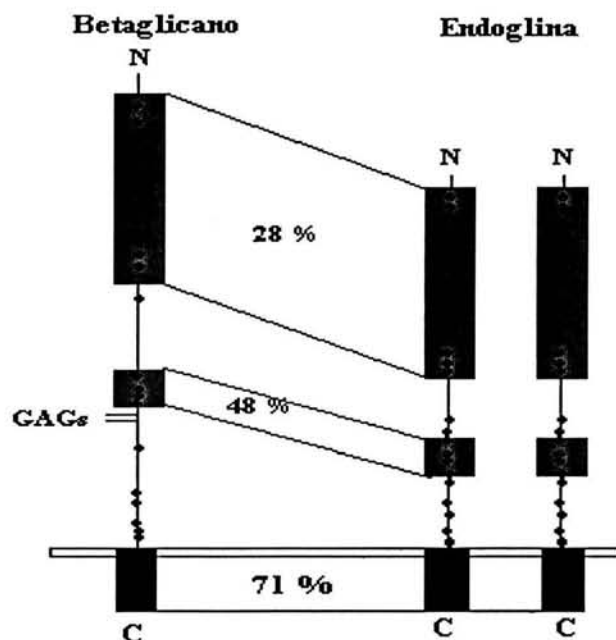
La cola citoplasmática está formada por 43 residuos, con alto contenido de serinas-treoninas sin ningún motivo de señalización aparente, y además de estar muy altamente conservado en todas las especies en las que se ha encontrado betaglicano. Se ha reportado la fosforilación de este dominio citoplasmático por la cinasa del T $\beta$ RII [40], y más recientemente, se encontró que la  $\beta$ -Arrestina 2 que se une a receptores de siete dominios transmembranales regulando la señalización e internalización de estos receptores, también lo hace con la forma fosforilada del betaglicano. La unión de la  $\beta$ -Arrestina 2 al betaglicano se produce por la fosforilación del dominio intracelular del betaglicano por la cinasa del T $\beta$ RII [41]. Este acontecimiento empieza a esclarecer la función de este dominio del betaglicano, aunque una región proteica pequeña (dominio intracelular) con un alto contenido en serinas-treoninas muy altamente conservado a través de la evolución, probablemente este involucrado en otras funciones no descritas aún. Recientemente se hizo el knockout del betaglicano, los ratones obtenidos (T $\beta$ RIII<sup>-/-</sup>) son inviables, teniendo defectos del desarrollo en hígado y corazón. Fibroblastos obtenidos de estos ratones responden pobremente al TGF- $\beta$ 2 [42]. Todas estas evidencias sugieren que el betaglicano no es un simple receptor accesorio, ya que está involucrado en una gran cantidad de funciones en el organismo vivo.

El otro receptor accesorio del TGF- $\beta$  es la endoglina, una glicoproteína transmembranal homodimérica compuesta por dos subunidades unidas por puentes de disulfuro, aunque no es un proteoglicano. En los humanos se expresa en altos niveles en las células endoteliales vasculares y en el sincitiotrofoblasto de la placenta [21, 43]. Se ha encontrado la expresión temporal de la endoglina durante el desarrollo del corazón [44]. Otros linajes que lo expresan son células linfoides y pre-eritroides [43].

La endoglina es el gen blanco que causa un problema autosomal dominante conocida como Telangiectasia Hemorrágica Hereditaria Tipo I [45].

La endoglina une con alta afinidad TGF- $\beta$ 1 y TGF- $\beta$ 3 pero no TGF- $\beta$ 2 [13], la endoglina sola no puede unir TGF- $\beta$  y requiere de la coexpresión del receptor T $\beta$ RII para unir TGF- $\beta$ 1 y TGF- $\beta$ 3. También une Activina A, BMP2 y BMP7 en presencia de los receptores I y II de los ligandos en cuestión [46].

La endoglina y el betaglicano presentan una similitud de homología del 71 % en sus regiones transmembranales y citosólica (figura 4). Sin embargo también se ha encontrado una forma alternativa de la Endoglina humana que carece de los últimos 33 aminoácidos de su cola citosólica [47, 48].



**Figura 4. Estructura del betaglicano y la endoglina.** Esquema de las regiones de mayor similitud entre la secuencia del betaglicano (853 aa) y la endoglina (633 aa). La región de mayor similitud corresponde a la región transmembrana y citoplasmática (cuadros negros). Existen dos regiones de menor similitud situadas en el ectodominio de las proteínas (cuadros azules). Los números indican el porcentaje de similitud de secuencia de aminoácidos entre las regiones del betaglicano y la endoglina. Los puntos indican la posición de los residuos de cisteínas. Se indica también los sitios de anclaje de glicosaminoglicanos (GAGs) en el betaglicano. Modificado de [47]



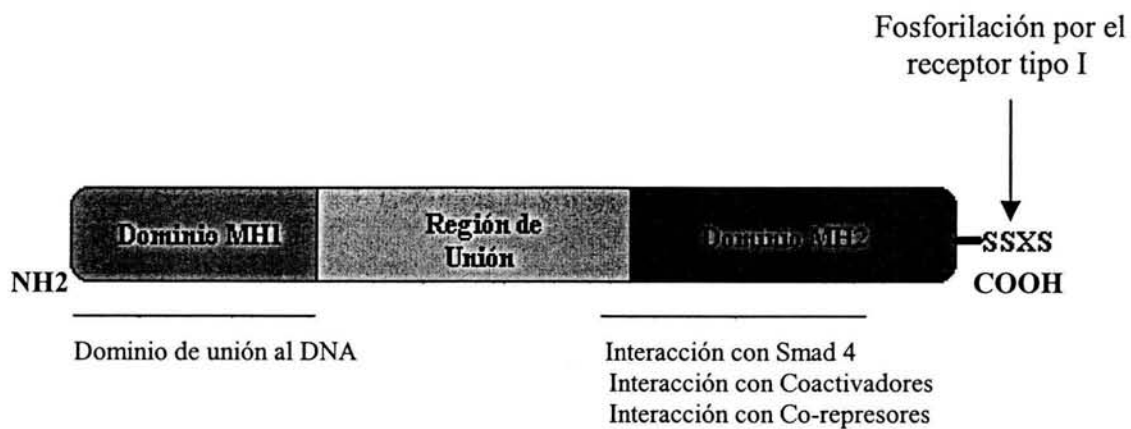
Una de las características de la endoglina humana es que contiene una secuencia RGD que potencialmente esta involucrada en adhesión celular, aunque en la endoglina murina no se encontró la secuencia RGD [49,50].

La inactivación genética en el ratón para el gen de la endoglina es letal apartir del día 10 a 10.5 post-coito, por problemas vasculares y cardiacos [51, 52].

## I.6 LAS SMAD

Los miembros prototipo de la familia de las Smad, MAD y SMA, fueron inicialmente descritas en *Drosophila* y *C. elegans*. Las proteínas Smad llamadas así, por la contracción del nombre de los genes de los invertebrados. Las proteínas SMAD juegan una función crítica en la transducción de las señales de la superfamilia del TGF- $\beta$  de la superficie celular hasta el núcleo [53, 54].

Las Smad tienen dos dominios altamente conservado, el dominio MH1 (amino terminal, que tiene actividad de unión al DNA) y el dominio MH2 (carboxilo terminal, con la capacidad de interactuar con otras proteínas), además de tener una región poco conservada que une estos dos dominios (figura 5) [55].



**Figura 5. Dominio de las Smad y su función.** En el estado basal, las Smad forman homooligómeros y permanecen en un estado inactivo a través de la interacción entre los dominios MH1 y MH2. La R-Smad interaccionan con el receptor I activado, a través de su dominio MH2 y es activado por la fosforilación de la cinasa del receptor I en el motivo SSXS, localizado en el extremo carboxilo terminal. En el estado activo las Smad se asocian con la Smad4 y con proteínas que se unen al DNA a través de su dominio MH2. El dominio MH1 en algunas Smad participa en la unión al DNA en secuencias CAGAC. Modificado de [20].

Existen tres clases de Smad: las R-Smad, son reguladas por el receptor; una única Co-Smad ó Smad común; y las I-Smad ó Smad inhibitorias. Cada una de las cuales tienen diferentes funciones. Las R-Smad son fosforiladas específicamente por la familia de receptores tipo I del TGF- $\beta$  en el motivo SSXS de su dominio MH2. Los sustratos del receptor cinasa tipo I son altamente específicos. El receptor tipo I de activina y del TGF- $\beta$  activan a las Smad2 y Smad3 (figura 6); mientras que el receptor I de BMPs activan a las Smad1, Smad5 y Smad8. La interacción específica entre Receptor-Smad está mediada por el asa L3 del dominio MH2 de las Smad y el asa L45 del dominio cinasa del receptor tipo I [55, 56].

R-Smad (SSXS)	Co-Smad	I-Smad
Smad 1   Smad 5   BMP Smad 8	Smad 4 Smad 4 $\beta$ /Smad 10	Smad 6 Smad 7
Smad 2   Smad 3   TGF- $\beta$ /Activinas		

**Figura 6. Representación de la familia de proteínas Smad.** Se indica a que subgrupo pertenecen las Smad y que vías son activadas. La Smad 10 también conocida como Smad 4 $\beta$  es estructuralmente similar a la Smad 4 (65 % de identidad), únicamente encontrada en *Xenopus*. Modificado de [55].

La activación de la vía de las Smad ocurre cuando la cinasa del receptor tipo I fosforilada (activa), se asocia con el dominio MH2 de las R-Smad que es presentado por la proteína de nombre SARA ( las Smad 2 y Smad 3), fosforilándola en el motivo SSXS, cabe señalar que la Smad4 carece de la secuencia SSXS [57, 58]. La fosforilación ocasiona la disociación de la R-Smad del receptor tipo I, favoreciendo la formación de complejos entre las distintas R-Smad y la única Smad4, este complejo favorece la traslocación hacia el núcleo; existe mucha controversia en cuanto al número de Smad que forman el complejo hetero-oligomérico [59, 60].

En el núcleo, las Smad funcionan regulando la respuesta transcripcional positiva o negativamente, a través de co-activadores o co-represores. Ciertos complejos R-Smad y Co-Smad tienen actividad de unión al DNA en los elementos de respuestas a Smad que tiene la secuencia específica CAGAC, a través de su dominio MH1. La unión de los complejos Smad al DNA es de baja especificidad y de baja afinidad, aunque esta unión es suficiente para la activación transcripcional de genes específicos, sin embargo la asociación con otros factores de transcripción les permita mayor especificidad y una afinidad más grande por el DNA. El complejo Smad en el núcleo puede activar la transcripción al reclutar a co-activadores como CBP/P300 y MSG1 [61, 62], o pueden reclutar a corepresores como TGIF, Ski, SnoN, los cuales reclutan deacetilasas de histonas [63, 64, 65]. Esto muestra que las Smad pueden regular la transcripción positiva o negativamente de genes específicos en respuesta a la señal de proteínas de la familia del TGF- $\beta$  [62].

Las I-Smad son formas truncadas en la parte carboxilo terminal, esto impide su fosforilación por el T $\beta$ RI, su función es bloquear la vía de señalización, ya sea formando complejos estables con los receptores activados e impidiendo que las R-Smad puedan interactuar con los receptores tipo I, y de esta forma inhiber la señalización. Dentro de las Smad inhibitoras encontramos a la Smad6, Smad7, las cuales inhiben la vía de TGF- $\beta$  y de las BMPs. En el caso de la Smad6 se une a la Smad1 fosforilada, inhibiendo la señalización por BMPs. La Smad7 tiene localización nuclear, cuando el receptor está en presencia del ligando sale del núcleo y se va al citoplasma donde interactúa con el receptor. La ubiquitinación mediada por el proteosoma, es un mecanismo que controla una gran cantidad de procesos celulares al seleccionar proteínas específicas para la degradación. La ubiquitinación de las proteínas Smad está dado por la E3 ligasa (llamada Smurf1) que une moléculas de ubiquitina a la Smad7 en ciertos residuos de lisina, marcándolas para posteriormente ser degradadas por el proteosoma [66, 67].

## I.7 SISTEMA BACULOVIRAL

Los baculovirus han surgido como un sistema muy útil para la producción de proteínas recombinantes de células eucariontes. El sistema basado en baculovirus realiza varias de las modificaciones postraduccionales, procesamiento y sistemas de transporte proteico presentes en células de eucariontes superiores. El sistema de expresión de baculovirus utiliza virus independiente de otros virus coadyuvantes que pueden ser propagados a altos títulos en células de insecto adaptadas para el crecimiento de cultivos en suspensión, teniendo la posibilidad de obtener cantidades de proteína recombinante con relativa facilidad [68, 69, 70].

El sistema de insecto mantiene a la proteína que sobreproduce en una forma soluble, esto elimina el problema de las proteínas insolubles producidas en bacterias.

El genoma viral de baculovirus es grande (88 a 200 kpb), esto permite la introducción de grandes fragmentos de DNA [71].

### I.7.2 CICLO DE VIDA DEL VIRUS:

El sistema de expresión baculoviral utiliza un virus lítico conocido como virus polyhedrosis nuclear *Autographa californica*. Este virus pertenece a la familia de *Baculoviridae*. Es un virus de DNA de cadena doble, con una cápside proteica que infecta a artrópodos. El ciclo de vida del virus esta dividido en varias fases: muy temprana, temprana, tardía y muy tardía. Los virus entran a la célula por endocitosis adsortiva y se desplaza al núcleo donde su DNA es liberado. La replicación del DNA empieza 6 h después de la infección. Cuando termina la replicación, el virus dirige su ensamblaje en el núcleo de las células infectadas. Dos tipos de progenie viral son producidos durante el ciclo de vida del virus: partículas virales extracelulares (nonoccluded viruses) durante la fase tardía y partículas virales derivadas de polihedra (occluded viruses), durante la fase muy tardía de la infección. Los virus extracelulares son liberados de las células por gemación, 12 h después de la infección y es producida a escala logarítmica hasta 20 h después de la infección, luego, la producción decae súbitamente. Los virus derivados de polihedrina aparecen en el núcleo 18 h post-infección y se acumulan hasta 72 h después de la infección o hasta que exita lisis celular. Las partículas virales ocluidas están dentro de un complejo viral proteínico llamado polihedrina en el núcleo de la célula infectada. La proteína polihedrina (29 kD) es el principal componente proteico de los cuerpos de oclusión [68].

La proteína polihedrina tiene una función importantísima en la propagación y sobrevivencia del virus en la naturaleza debido a que los virus tienen un ciclo lítico y matan rápidamente a sus hospederos después de la infección. La proteína polihedrina secuestra y de esta forma protege, cientos de partículas virales de la inactivación proteolítica por el tejido hospedero descompuesto. Los virus son transmitidos cuando complejos de la proteína polihedrina son ingeridos en la alimentación contaminada por un nuevo hospedero. La proteína polihedrina se disuelve en un ambiente alcalino del intestino del nuevo hospedero y los virus ocluidos son liberados. Los virus infectan las células epiteliales del intestino y su replicación genera nuevos virus. Los virus no ocluidos son producidos y liberados de las células del intestino infectado. Los virus recién formados se expanden por todos los tejidos del nuevo hospedero, para una nueva infección [68].

### I.7.3 EL SISTEMA DE EXPRESIÓN EN BACULOVIRUS:

Este sistema aprovecha las ventajas de la proteína polihedrina:

- 1) Se expresa en altos niveles en células infectadas, ya que constituye más de la mitad de la proteína final del ciclo infeccioso,
- 2) No es esencial para la infección o replicación del virus, ya que los virus recombinantes no requieren ninguna función co-adyuvante,
- 3) Los virus que carecen del gen de polihedrina tienen una morfología en la placa de lisis distinta de las que lo tienen.

Los baculovirus recombinantes son generados al reemplazar el gen de polihedrina con un gen extraño a través de recombinación homóloga. Este sistema, utiliza la diferencia de la morfología de placas, en el virus recombinante.

Para producir un virus recombinante, el gen por expresar es clonado en un vector de transferencia (pBlueBac4). Los vectores de transferencia tienen una región promotora, seguida de sitios de restricción donde se introducirá el gen de interés. Cuando se encuentra en el vector de expresión, el gen es flanqueado en sus extremos 5' y 3' por secuencias específicas virales. El vector recombinante es transfectado con el DNA viral silvestre en células de insecto *Sf9* (*Spodoptera frugiperda*). En los eventos de recombinación homóloga, el gen extraño es insertado dentro del genoma viral y el gen de polihedrina es eliminado. Los virus recombinantes carecen del gen de polihedrina y en su lugar contiene el gen de interés, cuya expresión está bajo el control del promotor de la polihedrina. La recombinación homóloga entre el virus silvestre y recombinantes tienen una baja frecuencia (0.2 % al 5 %), para mejorar el procedimiento de recombinación, se lineariza el DNA baculoviral silvestre antes de la transfección, esto aumenta la proporción de virus recombinantes hasta aproximadamente 30 % [72]. El DNA linearizado elimina una porción en el extremo 5' del ORF 1629 que está río abajo del gen de polihedrina, esto origina que un 85-99 % de virus obtenidos por co-transfección con el vector plasmídico que complementa a la delección, exprese el gen heterólogo [73].

Apartir de la co-transfección se obtiene un stock viral, con una mezcla de virus recombinantes y no recombinantes. Es necesaria la purificación de los virus recombinantes [74].

Ahora los sistemas de baculovirus expresan el gen Lac Z en los virus recombinantes, esto permite visualizar placas de lisis azules al agregarles x-gal. Se observa placas de lisis azules, cuando se tienen virus recombinantes y placas de lisis transparentes, cuando no se ha generado virus recombinantes.

Sobre la glicosilación de la proteína en células de insecto, se ha encontrado que la N-glicosilación de vertebrados, también se lleva a cabo en las células de insecto. Con pocas excepciones los N-oligoazúcares de glicoproteínas derivadas de las células de insecto son de tipo alta-manosa y no son procesados los oligosacáridos de tipo complejo que tienen fucosa, galactosa y ácido siálico. La O-glicosilación se ha reportado en células *Sf9* [74, 75].

## II.OBJETIVOS

### II.1 Objetivo General:

El objetivo de este trabajo es producir el ectodominio del betaglicano murino (receptor soluble) en el sistema de expresión baculoviral. Cantidades altas de la proteína soluble recombinante serán de mucha utilidad para la realización de experimentos *in vivo*. La administración del betaglicano soluble murino en ratones transgénicos o en modelos de ratones diabéticos eliminaría el efecto antigénico y una posible disminución del efecto protector que tendría la proteína homóloga de rata.

### II.2 Objetivos Particulares:

- Realizar las modificaciones al cDNA en los extremos 5' y 3' UTRs
- Introducir una cola de His (8 residuos) seguida de un codón de terminación, justo antes de la región transmembrana de la proteína para poder purificarla por columnas quelantes.
- Expresar el ectodominio del Betaglicano de forma transitoria en células COS-1 (sistema de expresión en mamíferos) y hacer el ensayo funcional de la proteína (marcado por afinidad)
- Generar Baculovirus recombinantes que expresen el ectodominio del Betaglicano.
- Purificar la proteína por una columna quelante de afinidad.

### III. ESTRATEGIA GENERAL

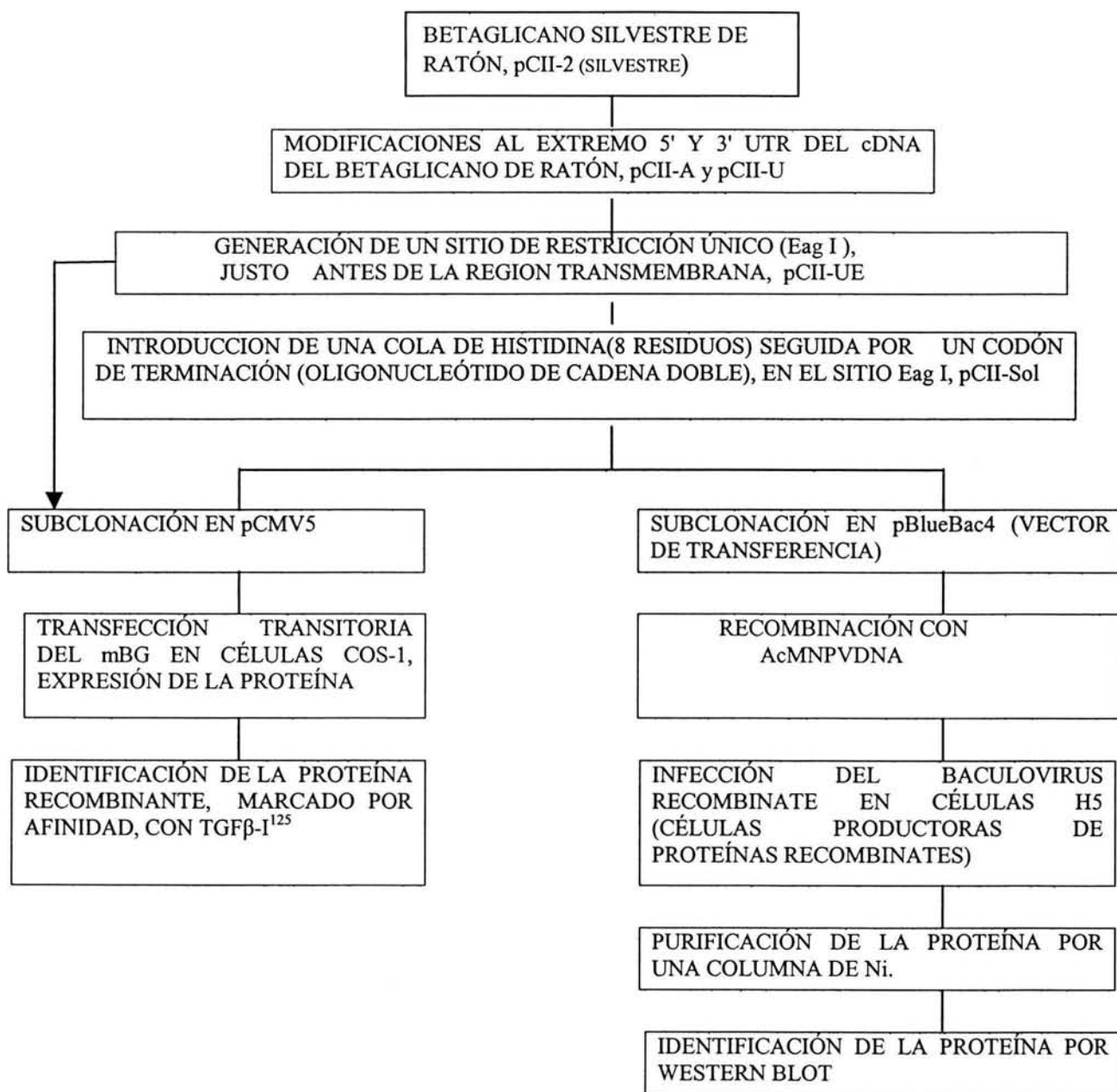
Para alcanzar el objetivo de este trabajo fue necesario modificar el cDNA silvestre del betaglicano murino. Como primer paso, se realizaron modificaciones en los extremos 5' y 3' UTR del cDNA, después se generó una mutación puntual (Generación de un sitio de restricción Eag I único) dos residuos antes de la secuencia que codifica a la región transmembranal de la proteína. El sitio de restricción a su vez, permitió la introducción de un oligonucleótido de cadena doble que codifica para 8 residuos de Histidina, seguida de un codón de terminación, para que después se pudiera obtener la proteína recombinante en el sistema de expresión de Baculovirus.

El cDNA en el cual se hicieron las modificaciones se obtuvo de una biblioteca de cDNA de corazón de ratón [34]. Al cDNA se le eliminó en la región 5' UTR los sitios de restricción Not I, Eag I; estos mismos sitios fueron eliminados en la región 3' UTR. Se redujo de dos sitios Avr II a un solo sitio justo al final del marco abierto de lectura. Se generó una mutación puntual, haciendo una transversión de T a G en la base 2573 del cDNA del betaglicano ( esto dejó intacto los primeros 780 residuos del ectodominio). El aminoácido 781 que en el cDNA silvestre codifica para una Leu fue mutado a His, generando una cola de 8 residuos de H, seguida por un codón de terminación, esto generará una proteína soluble, cuando el mRNA del betaglicano sea traducido.

Después de hacer las modificaciones del 5' y 3' UTR y de la introducción de la cola de His (8X) con el codón de terminación, esta construcción se subclonó en pCMV5 para corroborar la expresión de la proteína en células COS-1. La proteína recombinante fue reconocida por medio del anticuerpo 822 (anticuerpo policlonal de conejo), contra el ectodominio del betaglicano de rata (rBG), que también reconoce el ectodominio del betaglicano de ratón (la homología con la secuencia primaria del mBG versus rBG es del 94.3%). El cDNA con las modificaciones en el extremo 5' y 3' UTR pero en el paso previo a la introducción de la cola de His, también fue subclonado en pCMV5 y su expresión fue analizada con el anticuerpo 822 ( forma transmembranal).

El cDNA con la cola de His (8X) seguida por el codón de terminación se subclonó en pBlueBac4 (vector de transferencia, para el sistema baculoviral). El cDNA tiene los sitios EcoR I-Hind III en sus extremos 5' y 3' UTR y pBlueBac4 tiene sitios EcoR I-Hind III en su región de clonación múltiple.

Se hizo la transfección en células de insecto *Sf9* con el vector Bac-N-Blue y el plásmido de transferencia recombinante en cajas de plástico de 60 mm de diámetro, se incubó a 27 ° C por 72 h, se recolectó el medio condicionado, que contiene a los baculovirus recombinantes. Para detectar los virus recombinantes, se procedió a la purificación por medio de un ensayo en placas con diluciones seriadas desde  $10^{-1}$  hasta  $10^{-5}$ , las placas recombinantes se aislaron y se amplificaron en células *Sf9*, este virus amplificado permitió la infección de células de insecto H5, para producir el betaglicano soluble recombinante a partir de un virus de bajo título. Las células de insecto H5 producen la proteína y la liberan al medio extracelular. El medio condicionado con la proteína recombinante se adsorbe en una columna de sefarosa quelante cargada con Ni, éste une a los residuos de His de la proteína recombinante. La proteína recombinante es eluida por medio de un gradiente de imidazol y colectada en fracciones de 1 mL. Las fracciones se analizaron por Western Blot.



**Figura 7. Esquema general.** Representación de todos los pasos a seguir en el siguiente trabajo.



## IV. RESULTADOS

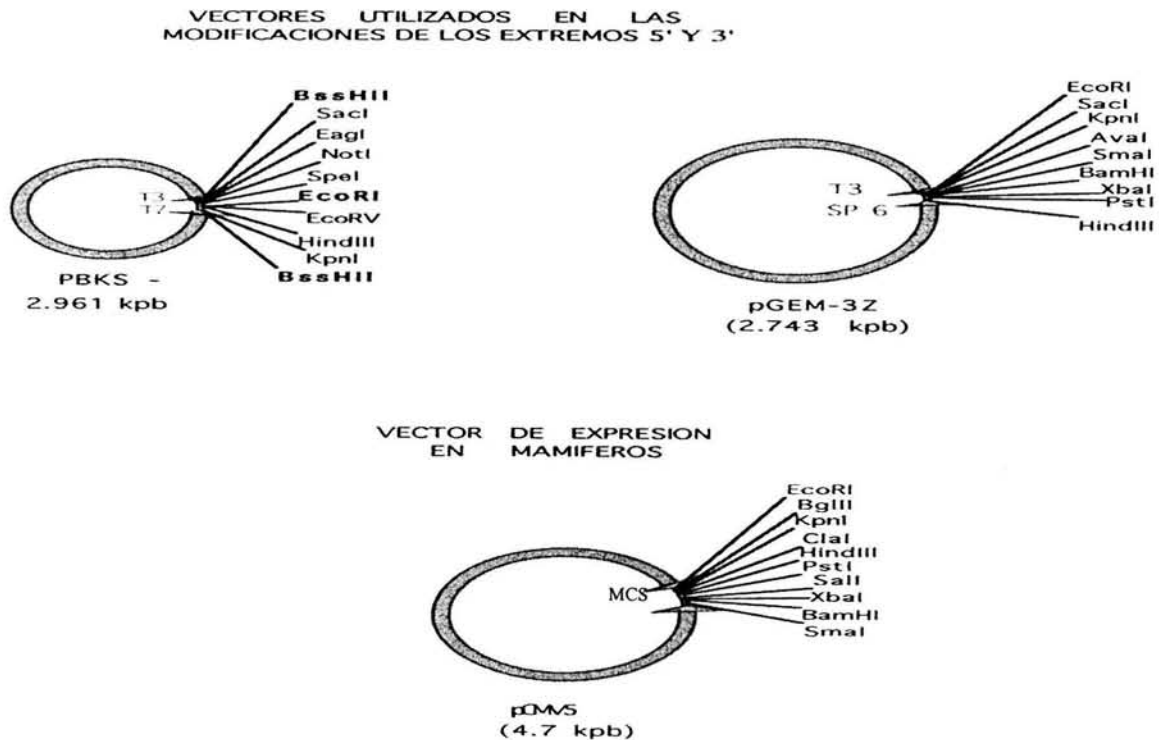
El cDNA silvestre del betaglicano fue obtenido de una biblioteca de cDNA de corazón de ratón y se le llamó pCII-2. El inserto obtenido es de 3977 pb, y contiene el extremo 5' y 3' UTR, y todo el marco abierto de lectura del betaglicano de ratón [35].

### IV.1 Modificaciones en el extremo 5' y 3' del UTR

Se hicieron las modificaciones en los extremos 5' y 3' UTR del pCII-2 para eliminar sitios de restricción que permitiera la posterior manipulación en la región cercana a la membrana.

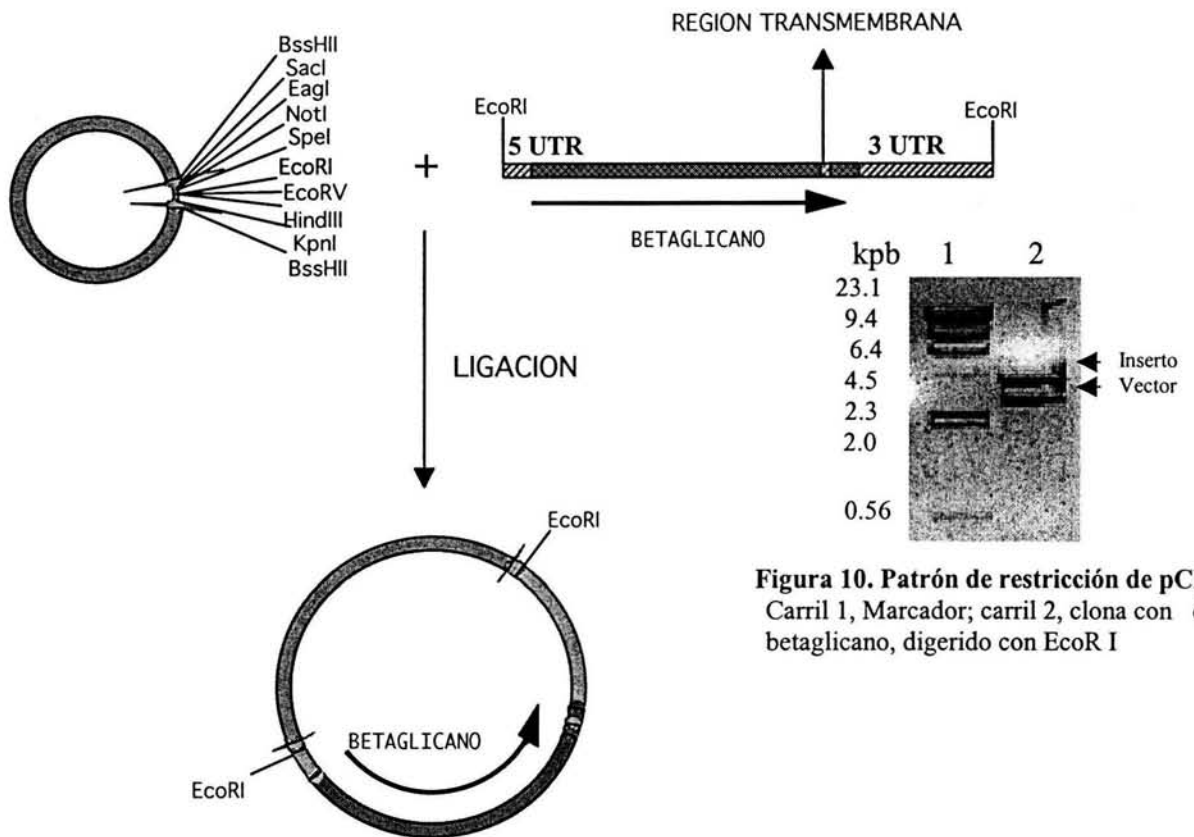
Por medio del programa Gene Construction Kit™ se representa gráficamente las modificaciones en el cDNA.

Todas las modificaciones que se le hicieron al cDNA del betaglicano de ratón, fueron corroboradas, mediante secuenciación nucleotídica en la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular.



**Figura 8. Vectores utilizados en las subclonaciones.** La parte superior de la figura se muestra los vectores que se utilizaron en las modificaciones al cDNA en los extremo 5' y 3' del UTR. En la parte inferior se enseña al vector utilizado para la expresión transitoria de la proteína en células COS-1. MCS: Multiple Cloning Sites. pBluescript II KS está en la orientación negativa, Stratagene. PGEM-3Z, Promega.

El betaglicano de ratón obtenido de la biblioteca de cDNA de corazón de ratón, se subclonó en el vector pBluescript KS -, en el sitio EcoR I (Figura 9). El cDNA que se obtuvo fue un fragmento de 3977 pb asignándole el nombre de pCII-2 [35]. Cuando se hace la digestión con EcoR I, se libera al betaglicano (figura 10).



**Figura 10. Patrón de restricción de pCII-2.** Carril 1, Marcador; carril 2, clona con él betaglicano, digerido con EcoR I

**Figura 9. Representación esquemática de la subclonación del betaglicano al pBluescript KS II – en el sitio EcoR I.** La figura de arriba, trata de ejemplificar la subclonación del cDNA del betaglicano en el vector, produciendo la clona pCII-2. El betaglicano tiene marcado sus extremos 5' y 3' de color café, el ORF está de color azul y la región transmembrana está representada de color magenta. El vector es de color rojo. Este código de colores fue aplicado para todas las demás figuras.

El siguiente paso fue, la reducción de dos sitios de restricción Avr II a un sitio único, creando el pCII-A (figura 11). Los dos sitios de restricción están uno justo en donde termina el ORF y el otro 26 pb río arriba del primero. La restricción con Avr II (figura 12), eliminará un fragmento de aproximadamente 26 pb, esto tiene el objetivo de dejar un sitio de restricción único, para una posterior manipulación. Esta modificación no afecta el ORF, solo reduce en 26 pb el 3' UTR.

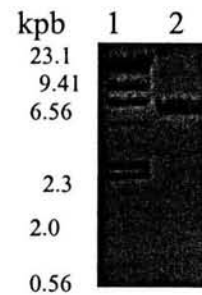
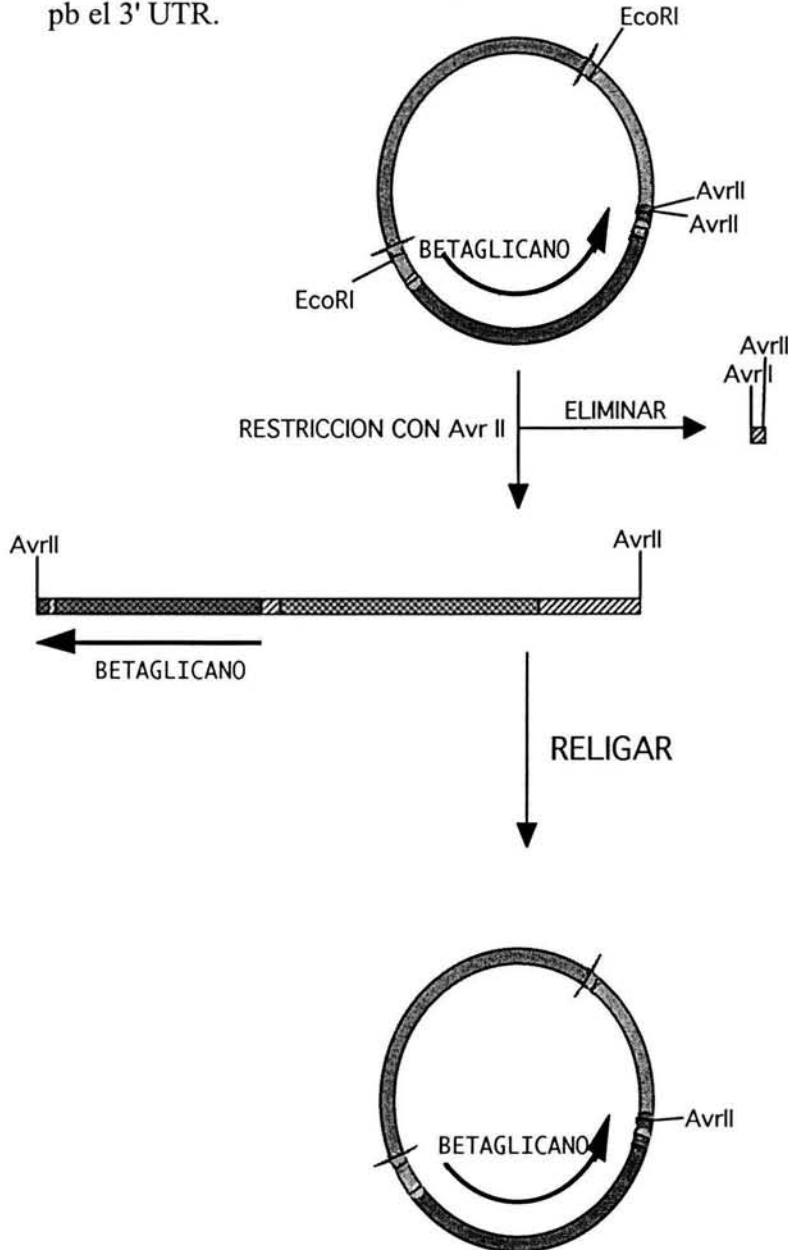
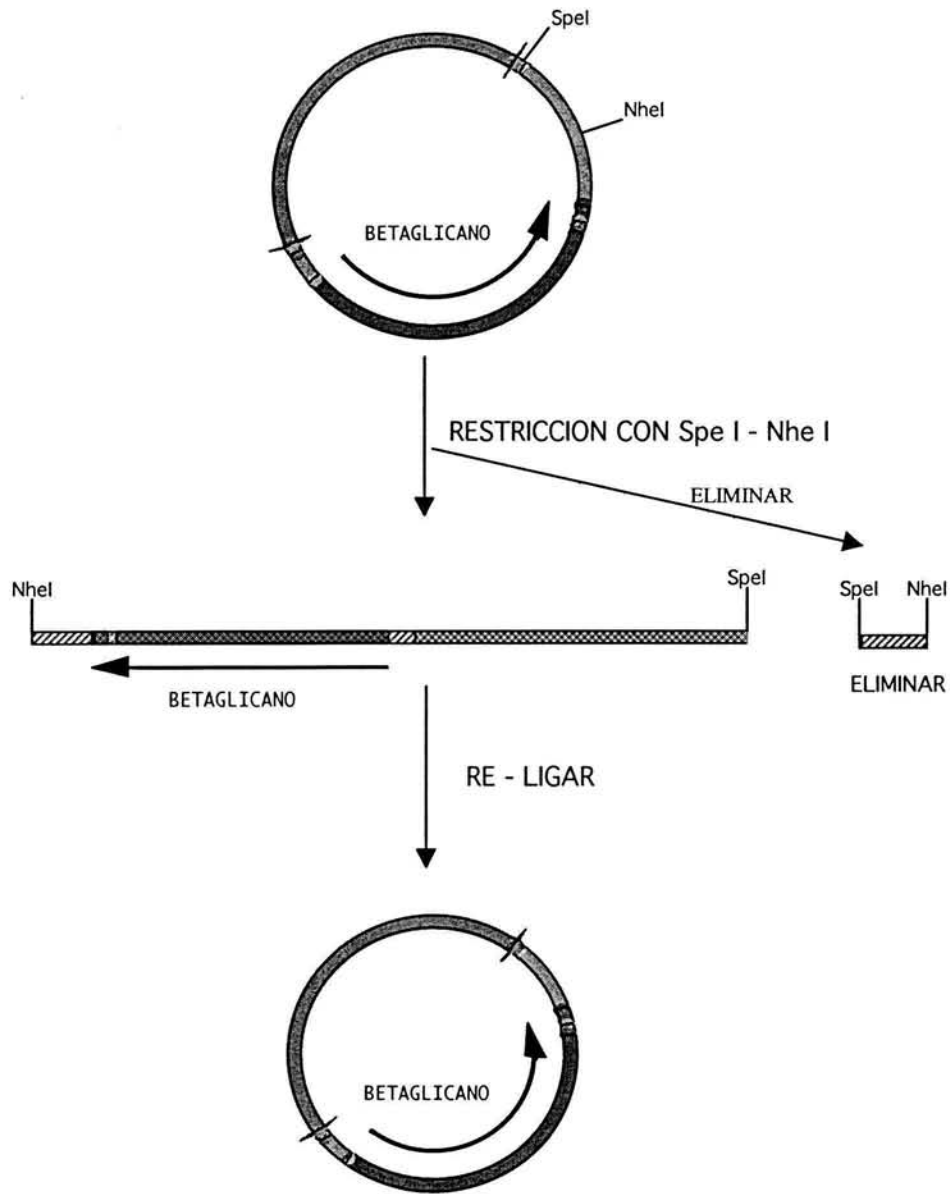


Figura 12. Patrón de restricción de pCII-A con Avr II. carril 1, Marcador; carril 2, clona que tiene al BG, con restricción Avr II

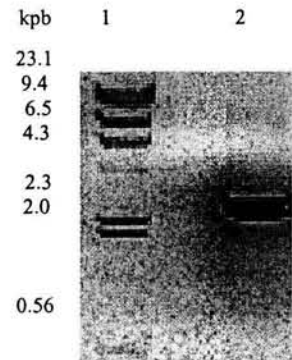
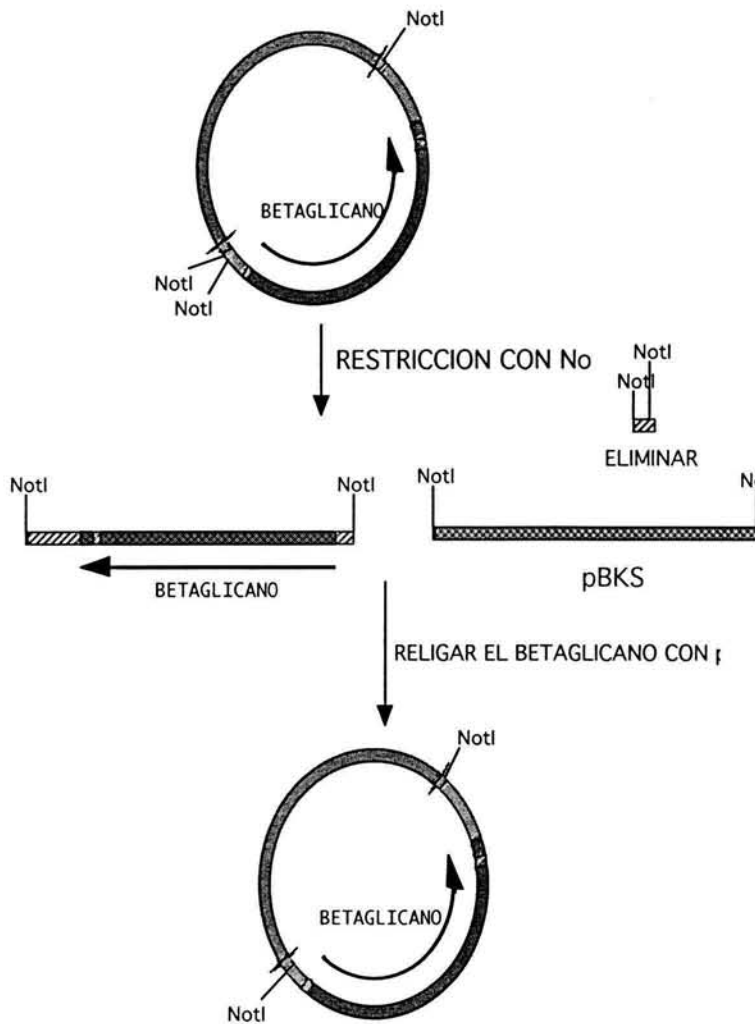
**Figura 11. Representación de la reducción a un sitio único AvrII.** El cDNA tenía dos sitios Avr II (2780 y 2806), como primer paso se digirió con Avr II y posterior ligación. Esto permitió reducir de dos sitios Avr II a solamente uno, esto está representado en la parte inferior de la figura.

La tercera modificación en el cDNA, fue la reducción de gran parte del extremo 3' UTR, creando el PCII-UE. Se hizo una doble digestión con SpeI – Nhe I, liberando un fragmento entre estos dos sitios, que tiene gran parte del extremo 3' UTR (figura 13). El propósito de esta modificación fue eliminar sitios de restricción en el extremo 3' sin alterar el ORF del betaglicano.



**Figura 13. Representación de la eliminación de gran parte del extremo 3' UTR.** El vector tiene un sitio Spe I y el cDNA tenía un sitio Nhe I (3335, 3' UTR). Después de la doble digestión, se realizó la ligación (Spe I-Nhe I, extremos compatibles). Esta modificación permitió eliminar sitios de restricciones en el extremo 3' UTR. Después de la ligación se pierde ambos sitios, Spe I y Nhe I.

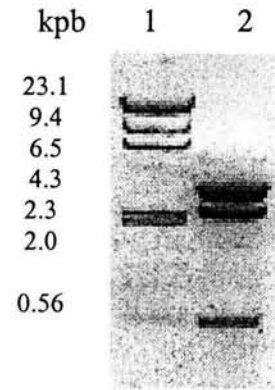
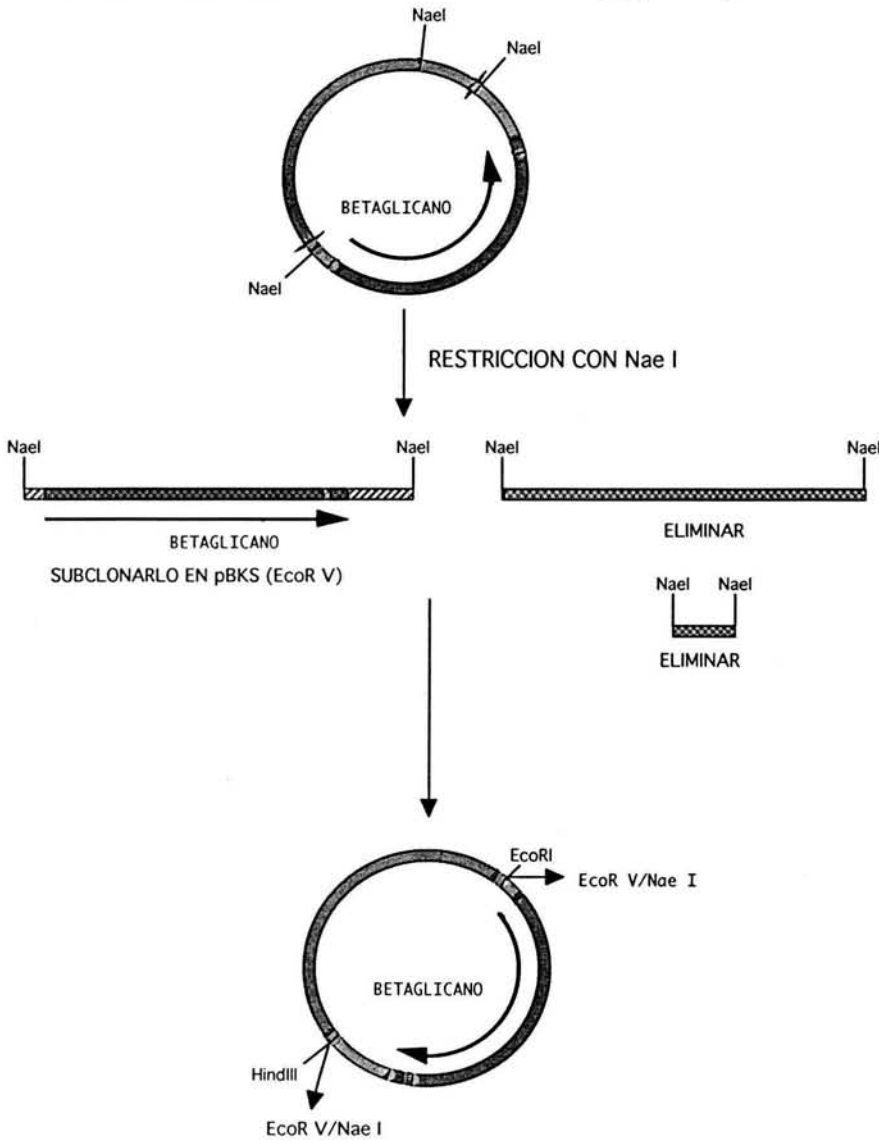
Como paso siguiente se digirió con Not I, esto liberó un fragmento muy pequeño, que se encuentra en el extremo 5' UTR, que comprende entre los dos sitios Not I que tiene el cDNA, no se alteró el marco abierto de lectura. Existe un tercer sitio que está en la región de clonación múltiple en el vector (figura 14). Este paso eliminó un sitio Not I en el extremo 5' UTR (figura 15). El objetivo fue reducir de dos sitios Not I que tiene el 5' UTR del betaglicano a un sitio único, esto generó el plásmido pCII-N.



**Figura 15. Patrón de digestión de pCII-N con Not I.** Se presenta a la clona después de la digestión con Not I, y religación. carril 1, Marcador; carril 2, después de que la clona perdió un sitio Not I se rellena y ligar.

**Figura 14. Representación de los sitios Not I.** Eliminación de sitios de restricción Not I, mediante la restricción y el relleno por la polimerasa Klenow. El relleno con Klenow, permitió la eliminación de sitios Not I, pero se generaron sitios Eag I y Nae I, donde previamente habían sitios Not I.

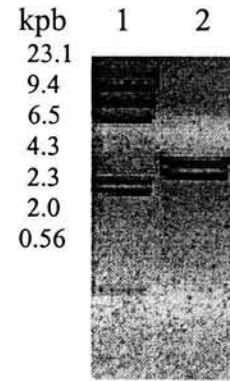
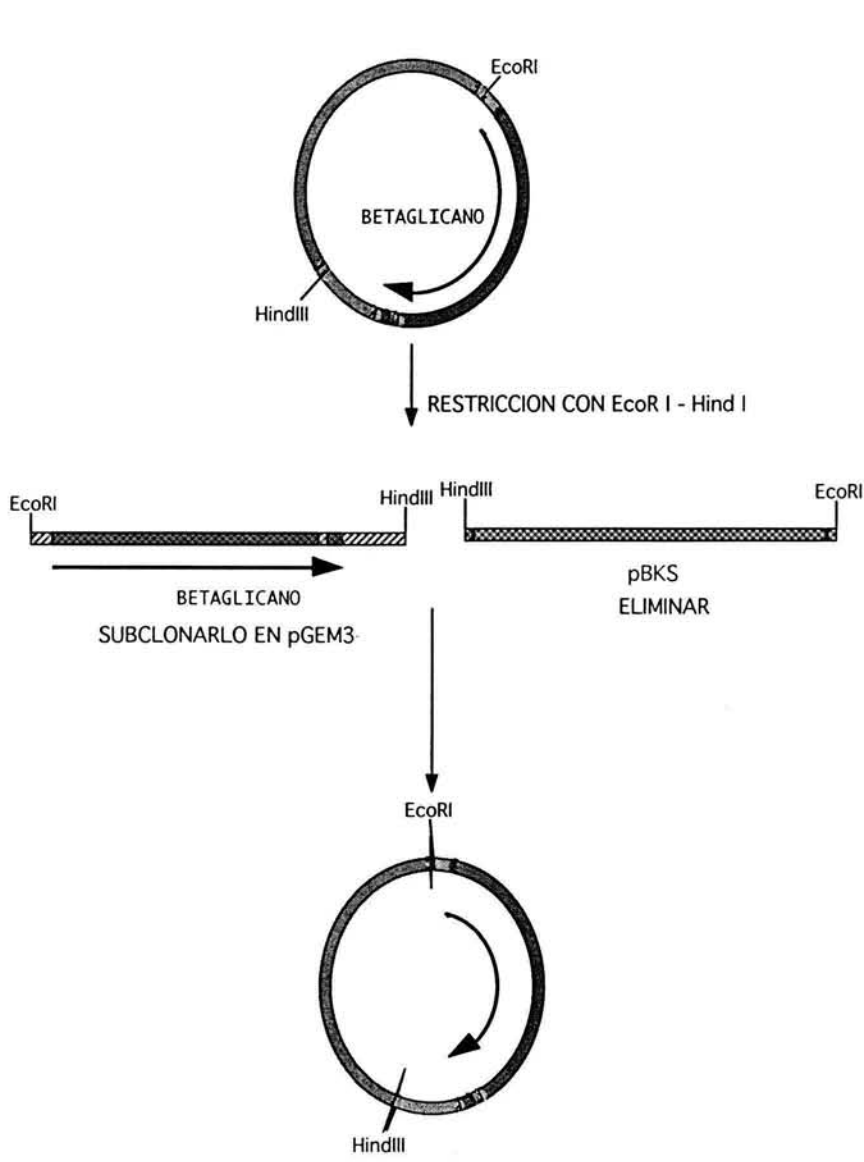
La generación de los sitios Nae I, donde previamente había sitios Not I se logró al digerir con Not I y rellenar con la polimerasa Klenow. Esto permitió digerir con Nae I, liberando al betaglicano y subclonándolo en pBKS -, pero en sitios EcoR V, generando el plásmido pCII-U. Este paso permitió eliminar los sitios Eag I, que son sitios internos de Not I, este faso fue realizado por la necesidad de eliminar todos los sitios Eag I, por que el paso antepenúltimo en las modificaciones del cDNA se generará un sitio Eag I, justo antes de la región transmembrana (figura 16). Se observa en patrón de digestión con Nae I, generando estos sitios donde antes eran sitios Not I (figura 17).



**Figura 17. Patrón de digestión de pCII-U con Nae I.** Carril 1, Marcador; carril 2, clona donde se observa la generación de sitios Nae I, se liberan 3 fragmentos, debido a que el el vector tiene un sitio Nae I. El fragmento de 3293 pb, se subclonará en EcoR V de pBKS -.

**Figura 16. Representación de la eliminación de sitios Eag I.** En los antiguos sitios Not I, la polimerasa Klenow generaron los sitios Eag I y Nae I (panel de arriba). La restricción con Nae I (extremo romo), permitió liberar al betaglicano (panel de en medio) y se subclonó en pBKS (EcoR V), y finalmente la eliminación de los sitios Eag I. El panel de abajo, muestra la orientación del betaglicano en pBKS -.

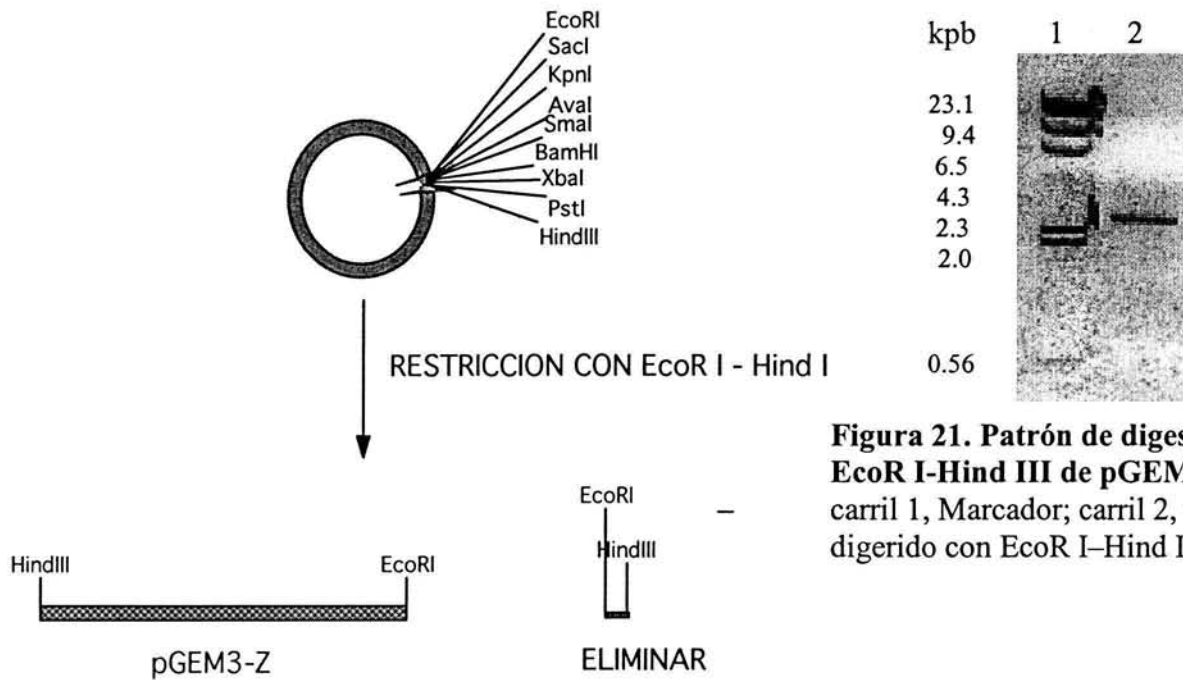
La forma como se formó el plásmido pCII-U esta representado en la figura 18. Se dirigió con EcoR I – Hind III el plásmido pCII-U liberando el inserto (figura 19), para su posterior subclonación en pGEM-3Z. Este paso fue necesario, debido a que el vector donde estaba pCII-2 tiene en su región de clonación múltiple el sitio Not I / Eag I.



**Figura 19. Patrón de restricción de pCII-U con EcoR I- Hind III.** Carril 1, Marcador; carril 2, se observa el inserto que será subclonado en pGEM-3Z.

**Figura 18. Representación de cambio de vector.** La restricción con EcoR I – Hind III, permite liberar al betaglicano de pBKS -, para posteriormente subclonarlo en pGEM-3Z (EcoR I – Hind III). Este paso, fue necesario, debido a que pBKS -, tiene un sitio Eag I en su región de clonación múltiple.

Se procedio a subclonar el inserto en pGEM-3Z (EcoR I – Hind III). En la figura 20, se representa a pGEM-3Z, con todos sus sitios de restricción en su región de clonación múltiple. En la figura 21, se muestra la digestión del vector, donde se ligará el betaglicano.



**Figura 21. Patrón de digestión con EcoR I-Hind III de pGEM-3Z.** carril 1, Marcador; carril 2, vector digerido con EcoR I-Hind III.

**Figura 20. pGEM-3Z.** El panel de arriba es el vector, pGEM-3Z. El panel de abajo es el vector con la restricción de EcoR I – Hind III, dejando extremos compatibles para la subclonación del betaglicano.



## IV.2 Generación de un sitio de restricción Eag I por PCR en pCII-U

En pGEM-3Z no existen sitios de restricción Eag I, fue el motivo principal por el cual el inserto de pCII-U se subclonó en este vector. En pGEM-3Z se generó una mutación puntual, por medio de PCR, que originará un sitio de restricción Eag I justo antes de la región que codifica para la porción transmembranal del betaglicano.

Sin afectar los primeros 780 aminoácidos del ectodominio del betaglicano se generó un sitio de restricción Eag I, muy cerca de la región transmembrana del betaglicano, este sitio de restricción permitirá la introducción de un oligonucleótido de cadena doble, que codifica para una cola de 8 residuos de His seguida por un codón de terminación que interrumpe la traducción.

Se diseñaron cuatro oligonucleótidos, dos con un cambio de base y dos más que flanquean el sitio que se mutagenizará. Los oligonucleótidos mutagenizantes AZM1 y AZM2 y los oligonucleótidos que flanquean el sitio de mutagénesis son PL7 y MN7 (ver figura 22).

Se amplificaron fragmentos por medio de PCR, con los pares de oligonucleótidos: a) PL7 - AZM2 y b) AZM1 - MN7.

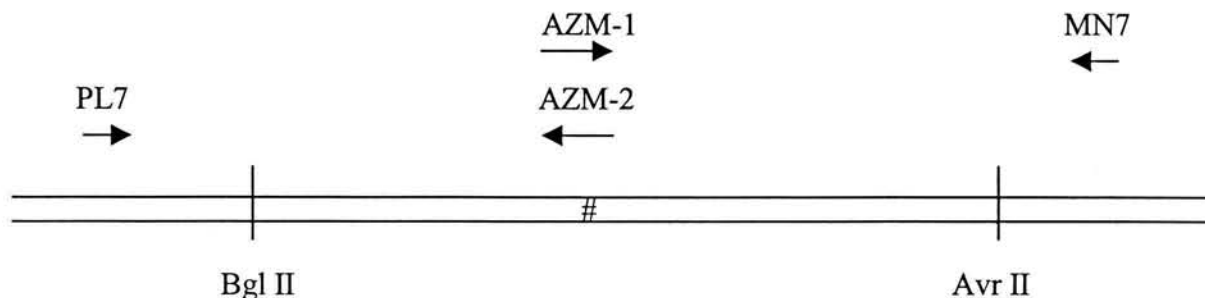
Los productos de amplificación PL7-AZM2 (537 pb) y AZM1-MN7 (402 pb), ver figura 23, servirán como templado para la amplificación comprendida entre los oligos PL7-MN7 (figura 24). Dentro del producto de amplificación PL7-MN7 se encuentran los sitios de restricción Bgl II y Avr II (figura 22), que se utilizarán para generar sitios compatibles en el cDNA. Para la reacción de PCR se utilizó el termociclador GeneAmp PCR system, Perking Elmer. La mutante se secuenció para ver la introducción de la mutación puntual y verificar que no se haya generado alguna mutación espúrea en el cDNA.

La secuencia de los 4 oligonucleótidos empleados para la mutagénesis sitio dirigida son:

AZM1	TTCCA <b>CGG CCG</b> GGACACG CTC	Tm 67.7 °C
AZM2	GAG CGTGTCC <b>CGG CCG</b> TGGAA	Tm 67.7 °C
PL7	TCCCCG GGG GTC TTC TCT GTG G	Tm 64.9 °C
MN7	GGGCCG TGG TAA GGA AGG GGT G	Tm 64.1 °C

Los oligonucleótidos AZM1-AZM2 tienen en negritas la base que es diferente al cDNA silvestre de ratón. El sitio de restricción Eag I en AZM1 y AZM2 está marcado en color turquesa

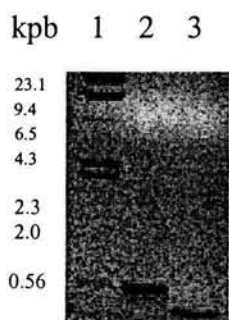
Los oligonucleótidos AZM1 y AZM2 son los que generaran el sitio de restricción Eag I, justo 2 residuos antes de la región transmembranal.



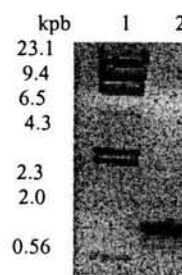
**Figura 22. Localización de los oligonucleótidos y sitios de restricción en el cDNA.** El lugar donde está marcado con #, es el sitio donde se generó la mutación puntual. Los oligonucleótidos AZM1/AZM2 son los que generarán la mutación puntual.

Se hicieron 2 PCRs utilizando los pares de oligonucleótidos PL7/AZM-2 y MN7/AZM-1. Cuando se utilizó el par de oligonucleótidos PL7 – AZM2, se obtuvo un producto de PCR de 537 pb (figura 23).

Cuando se utilizó el par de oligonucleótidos MN7 – AZM1, se obtuvo un producto de PCR de 402 pb (figura 23).



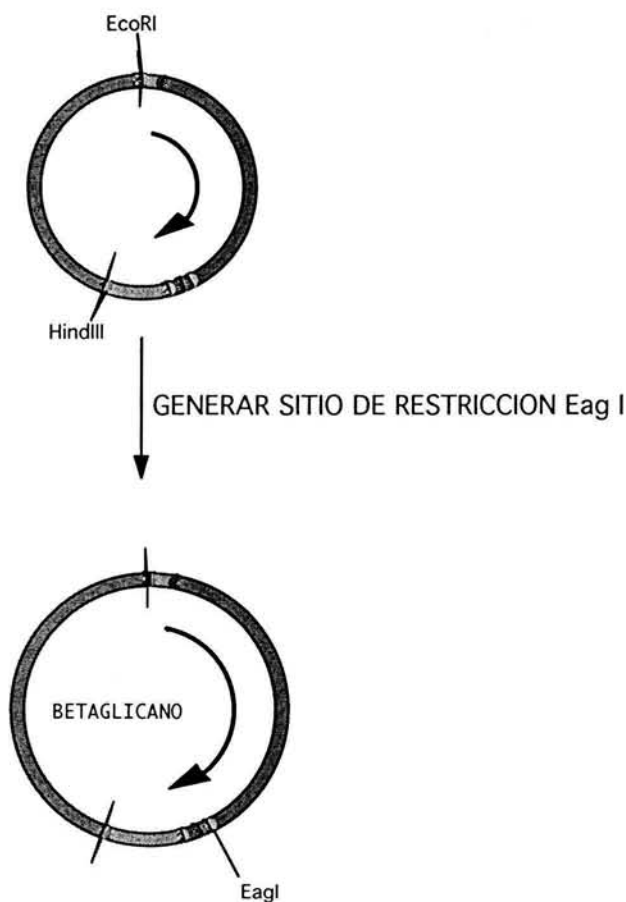
**Figura 23. Mutación puntual.** Productos de PCR en la generación de la mutación puntual. Carril 1, Marcador; carril 2, producto amplificado de PL7 - AZM2, 537pb; carril 3, producto amplificado de MN7-AZM1, 402 pb.



**Figura 24. Amplificación de PL7-MN7.** carril 1, Marcador; carril 2, producto amplificado de PL7-MN7, tomando como template a los productos del gel anterior.

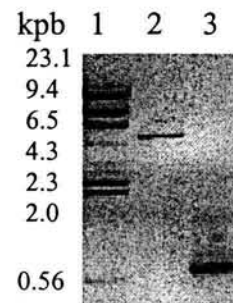
El producto de PCR amplificado de PL7 – MN7 se digirió con Bgl II - Avr II, esto generó un fragmento de 663 pb (figura 24).

Por otro lado al cDNA del betaglicano de ratón sin la mutación puntual pCII-U, se digirió con Bgl II – Avr II, liberando un fragmento de 663 pb. Este fragmento se eliminó, ligándole el fragmento de 663 pb que tiene la mutación puntual (figura 26), esto generó el pCII-UE. La representación de este objetivo está en la figura 25.



EL SITIO DE RESTRICCION Eag I SE INTRODUJO JUSTO ANTES DE LA REGION TRANSMEMBRANA

**Figura 25. Representación de la mutación puntual.** El panel superior permite ver al betaglicano con su región transmembranal (verde) en pGEM-3Z. Por medio de la PCR, se hizo una mutagénesis sitio dirigida en la base 2573, cambiando una T por G, esto originó un sitio de restricción Eag I (panel inferior). El sitio Eag I está muy próximo a la región membranal.



**Figura 26. Generando la mutación puntual.** Carril 1, Marcador; carril 2, vector que carece de 663 pb, desde Bgl II-Avr II (eliminando el fragmento por QIAGEN), carril 3, fragmento con la mutación puntual y digerido con Bgl II-Avr II.

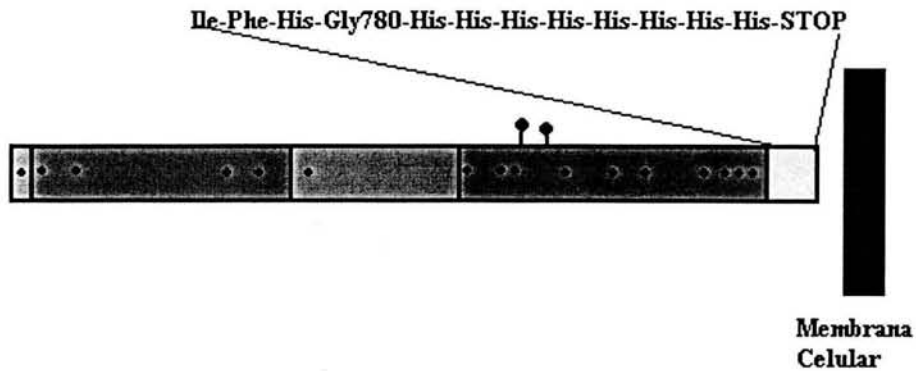
### IV.3 Introducción de una cola de His al cDNA seguida de un codón de terminación, para la formación de una proteína soluble usando pCII-UE

Para obtener el betaglicano soluble recombinante el cDNA del betaglicano de ratón fue modificado para producir una proteína que se libere al medio condicionado, para tal fin se le introdujo un codón de terminación de la traducción justo antes de la secuencia que codifica para la región transmembranal del receptor, precedido por una secuencia que codifica para 8 residuos de histina que permitirá su purificación (figura 27).

El sitio de restricción Eag I (CGGCCG), permitirá hacer la restricción y la subsecuente introducción del oligonucleótido de cadena doble, que codifica para la cola de histidina seguida de un codón de terminación:

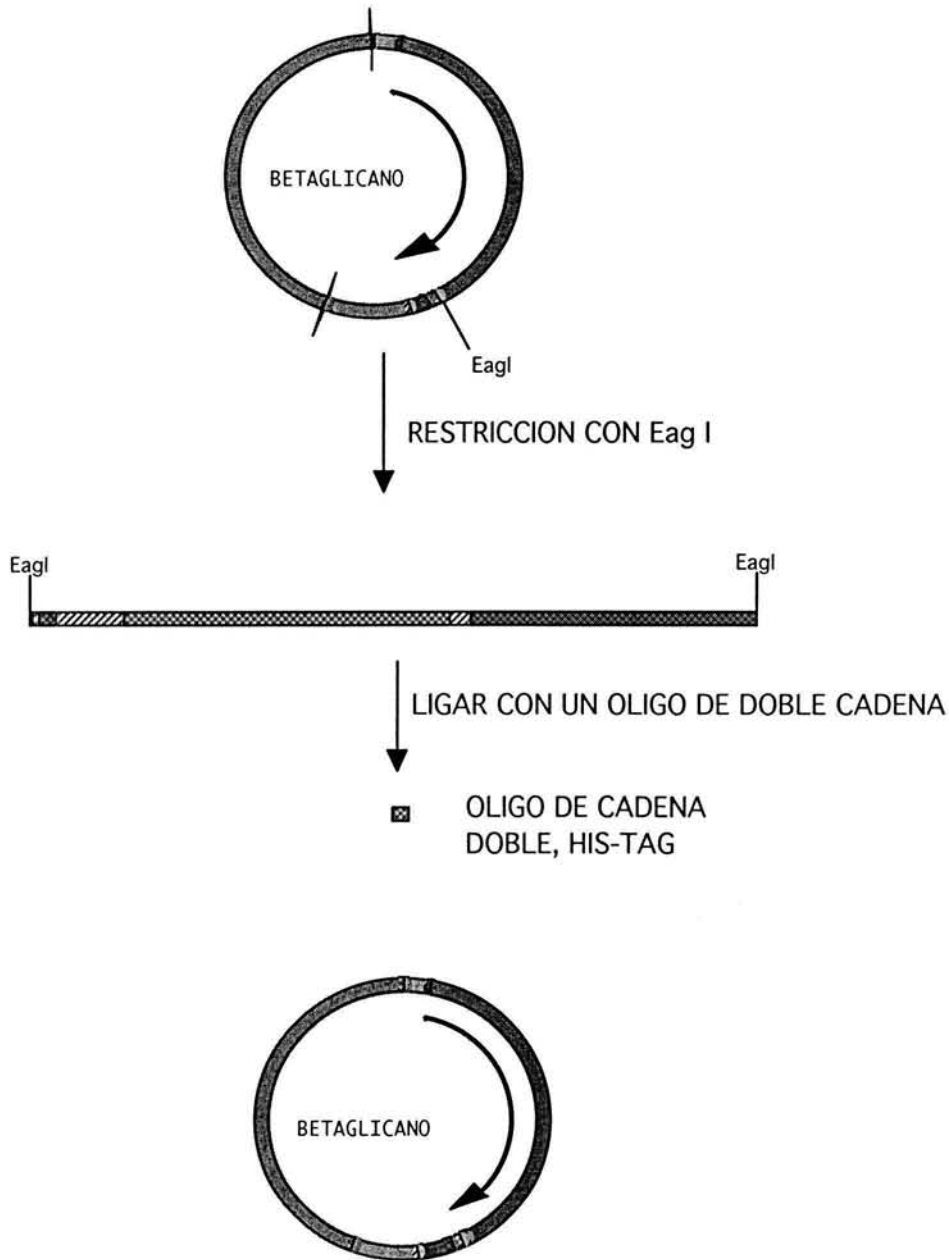
TTC CAC **CTGC CAT CACAT CACAT CACAT CACAT CACAT CACAT CACAT CACAT CACAT** GGCCG  
 F H G<sub>780</sub> H H H H H H H H H H STOP  
CODON

En color azul está marcado el oligonucleótido y en la parte de abajo está marcado la secuencia de aminoácidos en el marco de traducción. La G<sub>780</sub> esta en el betaglicano silvestre, pero la siguiente H ya no se encuentra en el betaglicano silvestre y representa la cola de 8 residuos de H, seguida del codon de terminación.



**Figura 27. Construcción del betaglicano murino, en su forma soluble.** El cDNA que codifica para el betaglicano membranal de ratón fue mutagenizado, insertándole una cola de 8 residuos de His, seguida por un codón de terminación justo antes de la región transmembranal del cDNA. Se muestra los sitios de unión de cadenas GAGs (círculos cafés), el péptido señal (región gris), la posición de los residuos de cisteínas (puntos negros). La parte amarilla representa la cola de 8 residuos de His, seguido del un codón de terminación.

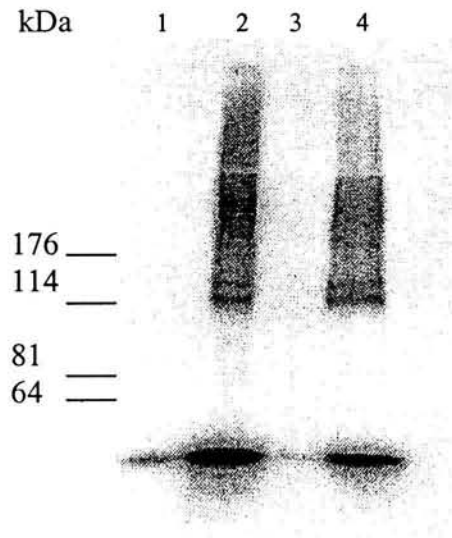
La generación del sitio de restricción Eag I, permitió hacer la restricción con la enzima (Eag I) y dejar sitios compatibles para la introducción del oligonucleótido de cadena doble, que codifica para una cola de Histidinas seguida de un codon de stop. Esto permitirá generar al receptor de forma soluble. El plásmido obtenido se denominó pCII-Sol.



**Figura 28. Representación de la introducción de la cola de Histidinas.** En la parte superior, se ejemplifica la estrategia de la introducción de un oligonucleótido de cadena doble que codifica para una cola de 8 residuos de His seguida de un triplete TAG (codón de terminación de la traducción). El oligonucleótido de cadena doble tiene en la porción 5' y 3' extremos compatibles con el cDNA del betaglicano.

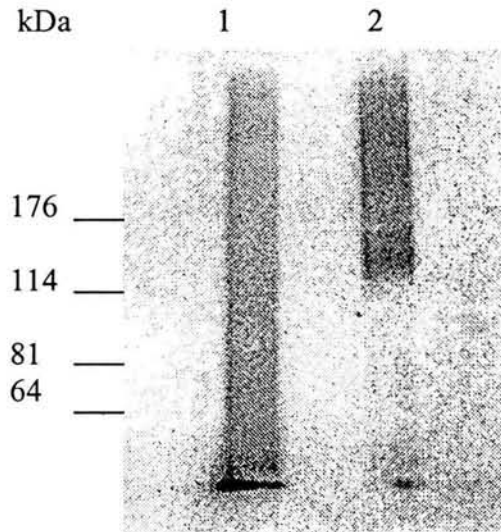
#### IV.4 Expresión transitoria del betaglicano de membrana (pCII-UE) y soluble (pCII-Sol) en células COS-1

Para ver la expresión del betaglicano, antes de pasarlo al vector de transferencia del sistema de Baculovirus, se analizó su expresión transitoria en células COS-1. Para evaluar la expresión de la proteína de forma soluble, así como la que se encuentra anclada a la membrana, se analizaron las construcciones pCII-UE y pCII-Sol en pCMV5. Ver las figuras 29 y 30.

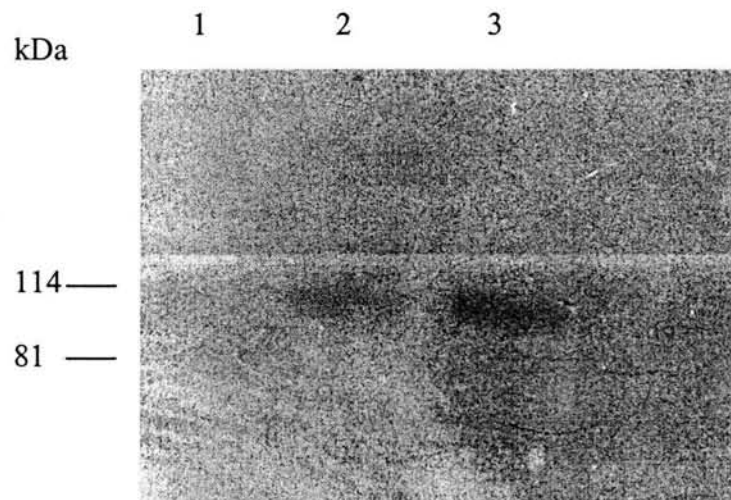


**Figura 29. Marcado por afinidad de la forma membranar del betaglicano.** La expresión transitoria del betaglicano membranar en células COS-1 fue analizada por un marcado por afinidad. Las células COS-1 fueron transfectedas en forma transitoria con el vector vacío (pCMV5, carril 1 y 3), y de pCII-UE (carril 2 y 4). Los carriles 1 y 2 son los lisados totales, sin inmunoprecipitarlos. Los carriles 3 y 4 son los lisados celulares inmunoprecipitados con el anticuerpo 822. Se corrió en un gel SDS-PAGE y se analizó en un "Phosphorimager".

La expresión del betaglicano en células COS-1 (sistema de expresión de mamíferos) se analizó por un Western Blot, tanto la forma membranar como la forma soluble del betaglicano, representado en la Figura 31. Cabe aclarar que la forma soluble es carente de los sitios de glicosilación ya que las S533A y S544A. Como se ve en la figura 31, el betaglicano soluble tiene un peso molecular aproximado de 110 kDa.



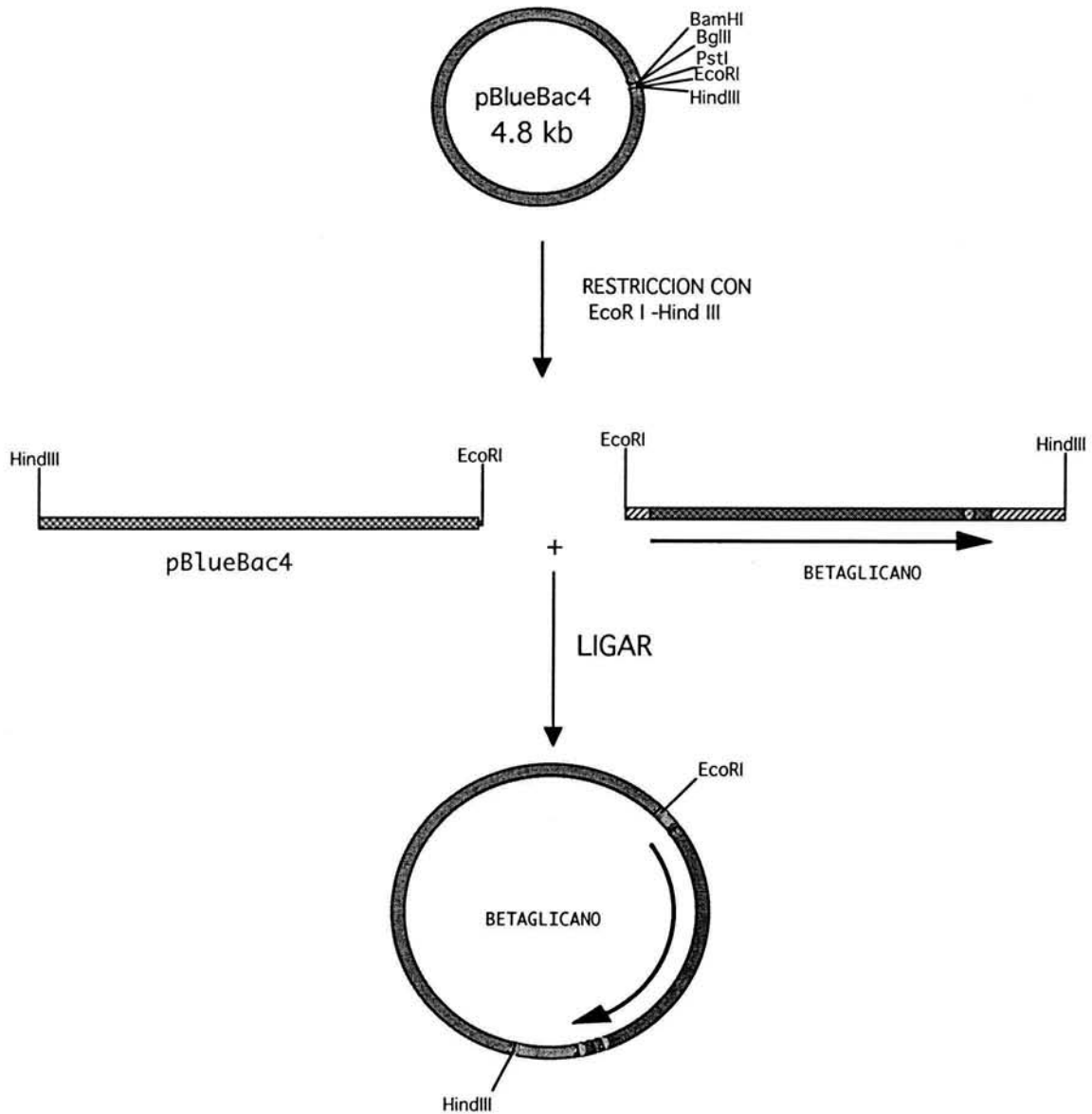
**Figura 30. Marcado por afinidad de la forma soluble del betaglicano.** La expresión transitoria del betaglicano soluble (pCII-Sol) en células COS-1 fue analizada por un marcado por afinidad. Las células COS-1 fueron transfectadas en forma transitoria con el vector vacío (pCMV5, carril 1) y con la construcción de la forma soluble (carril 2). Los medios celulares fueron inmunoprecipitados con el anticuerpo 822 y cargados en un gel SDS-PAGE y finalmente analizado en un "Phosphorimager".



**Figura 31. Western Blot de Betaglicano de membrana y soluble.** La expresión transitoria del betaglicano fue realizada en células COS-1, y analizada por Western Blot. Las células COS-1 fueron transfectadas transitoriamente con el vector vacío, pCMV5 (carril 1), la forma membranar del betaglicano, pCII-UE (carril 2) y la forma soluble del betaglicano, pCII-Sol (carril 3). Todas las muestras fueron inmunoprecipitadas con el anticuerpo 822. Se cargo en un gel desnaturizante al 8 %.

#### IV.5 Subclonación de la forma soluble del betaglicano en pBlueBac4

La construcción que producirá la forma soluble del betaglicano pCII-Sol, se necesita tenerlo de forma estable en Baculovirus. Se subclonó al betaglicano de la forma soluble en pBlueBac4, en los sitios EcoR I – Hind III. La representación esquemática de esta construcción está señalada en la figura 32.



**Fig 32. Subclonación del betaglicano soluble en el vector de transferencia pBlueBac4.** Se trata de ejemplificar como la forma soluble del betaglicano fue clonado en el vector de transferencia para su posterior introducción al vector viral de forma estable.



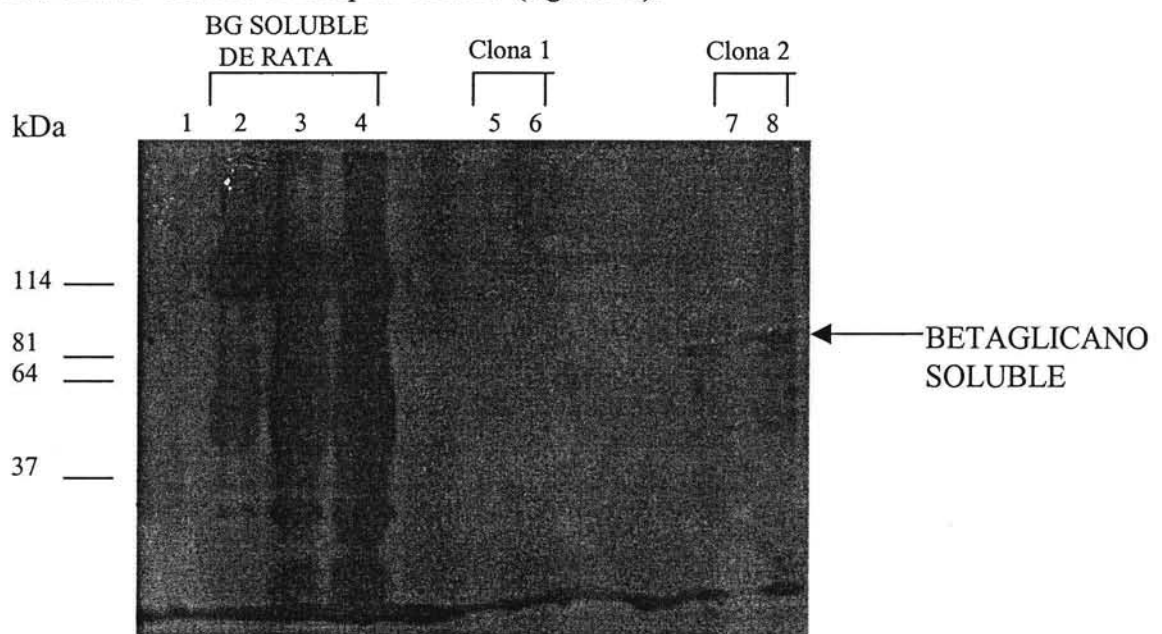
#### IV.6 Obtención de placas recombinantes de Baculovirus

Se hizo una co-transfección con el vector de transferencia que tiene la forma soluble del betaglicano y el del DNA Bac-N-Blue™ de Invitrogen en células de insecto *Sf9*. Se cosechó el medio 72 h después de la co-transfección, en este medio se encuentran los **virus recombinantes**. En el siguiente paso, fue necesario aislar placas de lisis virales, para tener una población homogénea de virus recombinantes.

Los virus recombinantes complementan con el extremo 5 del gen Lac Z encontrado en el vector de transferencia de Baculovirus (pBlueBac 4), esto permite su purificación en un medio con agarosa complementada con x-gal, revelando placas azules recombinantes.

#### IV.7 Obtención de proteína recombinante partiendo de un stock de bajo título

Se seleccionó una placa recombinante que expresa la proteína (Western Blot) con el mejor rendimiento. Esta placa fue amplificada en células *Sf9* permitiendo obtener mayor cantidad de virus recombinante, para una posterior infección de células H5 con este virus de bajo título, y de esta forma obtener el receptor soluble (figura 33).



**Figura 33. Western Blot del betaglicano después de la cromatografía.** Se amplificaron 2 placas virales recombinantes, con el mejor rendimiento, estas fueron la clona 1 y 2. carril 1, Marcador; carril 2, 3 y 4, betaglicano soluble recombinante de rata, 100, 200 y 400 ng; carril 5 y 6, representa la clona 1 con 45  $\mu$ L y 90  $\mu$ L; carril 7 y 8, es la clona 2 con 45  $\mu$ L y 90  $\mu$ L. El Western Blot se realizó con el anticuerpo 822 . Se partió de un volumen final de ambas clonas de 500  $\mu$ L.

La figura 33 muestra que la clona dos produce un mejor rendimiento del betaglicano soluble murino.

Estas 2 clonas tienen un rendimiento muy bajo comparado con el betaglicano soluble de rata. Se realizó una segunda búsqueda de clonas que mejoraran el rendimiento de las clonas previas, de un total de 144 clonas analizadas se encontró 3 clonas que aparentemente tienen un mejor rendimiento. Sin embargo el rendimiento sigue siendo muy ineficiente (90 ng, a partir de 100 mL de cultivo) comparada con el rendimiento del betaglicano soluble de rata (500  $\mu$ g, a partir de 100 mL).

## V. DISCUSION DE RESULTADOS

Debido a la importancia que tiene el receptor tipo III o betaglicano (BG) como regulador de los efectos del TGF- $\beta$  ( la forma membranal del BG presenta el TGF- $\beta$  a sus receptores de señalización transduciendo la señal y la forma soluble del BG impide que el TGF- $\beta$  se una a sus receptores de señalización), la producción de este receptor soluble en un sistema de expresión resulta indispensable para la realización de experimentos en modelos *in vivo* que aporten mayor información sobre las funciones biológicas en el organismo completo. El betaglicano soluble tiene una alta afinidad por el TGF- $\beta$  comparado contra otras proteínas que unen e inhiben al TGF- $\beta$  (decorina o el péptido asociado de latencia), esto se traduce en una mayor actividad antagonista al TGF- $\beta$ . Además, el betaglicano soluble bloquea los efectos del TGF- $\beta$  *in vivo* en un modelo de glomerulonefritis experimental y la posible administración crónica del betaglicano soluble recombinante en modelos murinos de fibrosis o diabetes en donde la expresión del TGF- $\beta$  esta incrementada, eliminaría la posibilidad de producir anticuerpos neutralizantes contra el betaglicano soluble de rata o anticuerpos anti-TGF- $\beta$ . Es por estas razones que se emprendió la tarea de producir al receptor soluble recombinante en el sistema de baculovirus, que una de sus grandes ventajas sobre otros sistemas es la de realizar muchas de las modificaciones postraduccionales que requieren las proteínas de mamíferos.

Las construcciones del betaglicano soluble y el de membrana fueron expresados transitoriamente en células COS-1, el western blot (figura 31) reveló un patrón similar al reportado [65]. Para ver la actividad funcional del betaglicano se realizó un marcado por afinidad de la forma soluble de la proteína y de la proteína anclada a la membrana celular (figura 29 y 30), esto permitió demostrar la actividad funcional del betaglicano. Demostrada la expresión y actividad biológica se procedió a clonar ambas formas de betaglicano en un vector de transferencia (pBlueBac 4), éste sirvió como vehículo para transferir el gen del betaglicano a genoma baculoviral y expresarlo de forma estable [62].

Del stock de baculovirus recombinantes se hizo un ensayo en placas para identificar baculovirus recombinantes (placas azules por la presencia del gen Lac Z y del sustrato x-gal) y virus aislados que expresen la proteína recombinante. El análisis por western blot, reveló que aproximadamente la tercera parte de las placas analizadas expresaban la proteína recombinante ( de 25 placas azules, únicamente 8 expresaban la proteína), esto probablemente se podría deber a que las otras placas azules expresen al betaglicano pero en niveles demasiado bajos que no fue posible su detección. Además, es necesario aclarar que esto es un stock de bajo título y a pesar de que se hizo una amplificación de una placa recombinante que expresó mayor cantidad de proteína y se infectó en células de insecto H5, el rendimiento fue muy bajo comparada contra otras proteínas en este sistema. Cabe aclarar que cada proteína tiene un patrón de expresión diferente en este sistema y que la mayoría de las proteínas se expresan eficientemente, existe en la literatura reportes de proteínas con bajo rendimiento [64].

Las células de insecto H5 infectadas con el baculovirus recombinantes de bajo título produjo una proteína recombinante de menor masa molecular que la que se encontramos en células COS-1, pero esta bien documentado en la literatura que la O-glicosilación lo realizan las células H5 de insecto, el patrón de glicosilación puede ser diferente que el

realizado en células de mamíferos como las células COS-1[66 ]. El Western Blot con el anticuerpo 822 ( que reconoce el ectodominio del betglicano) eliminó la posibilidad que fuera otra proteína diferente al betaglicano.

Una alternativa a nuestro bajo rendimiento de la proteína soluble sería la obtención de un stock viral de mayor título y su caracterización en células H5 para mejorar el rendimiento, pero la obtención de virus con mayor título mo es el objetivo de esta tesis.

El bajo rendimiento limita el uso de este sistema para la producción del betaglicano soluble para su uso en animales experimentales. No obstante, estas construcciones podrían cambiarse a otros sistemas de expresión virales que podrían expresar en mayor cantidad al receptor tipo III soluble.

## VI. CONCLUSIONES

- La expresión del ectodominio del betaglicano soluble en células COS-1, corresponde al peso molecular reportado.
- Se obtuvieron 3 placas recombinantes que expresan al ectodominio con mayor rendimiento, lo que permitirá generar un stock viral de alto título.
- El rendimiento de la proteína a partir de la infección con un virus de bajo título, es bajo (250 ng por cada 100 mL) cuando se compara con la producción del betaglicano soluble de rata (cuyo rendimiento es de 2.5 mg por litro en promedio).
- Las células H5 expresan al betaglicano recombinante (aproximadamente 81 kDa, Western Blot), de un peso molecular menor que el expresado en células COS-1 (aproximadamente 110 kDa, Western Blot).

## VII. MATERIAL Y MÉTODOS

### VII.1 Métodos para extraer DNA

#### VII.1.1 Mini-preparaciones, método casero.

Método utilizado para extraer DNA de plásmidos para trabajar en subclonaciones, este método produce DNA que no es útil para secuenciar o para transfectar, pero muy útil para hacer las modificaciones en el cDNA.

1. Crecer las bacterias en medio líquido ( LB ó TB) por 8 a 12 h en tubos de 50 ml (estériles) con agitación constante. Agregar ampicilina a una concentración final de 150  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .
2. Tomar de cada tubo donde las bacterias crecieron y ponerlas en un tubo eppendorf de 1.5 mL, centrifugar a 14 000 rpm por 3 min. Eliminar el sobrenadante.
3. Resuspender el pellet con 200  $\mu\text{L}$  de solución I + 0.1 mg/mL de RNAasa( Resuspender bien el pellet con la punta de la pipeta).
4. Agregar 200  $\mu\text{L}$  de solución II, invertir los tubos varias veces(aproximadamente 5-6 veces).
5. Agregar 200  $\mu\text{L}$  de solución III, invertir los tubos de 5-6 veces.
6. Centrifugar 5 min a 14 000 rpm.
7. Transferir cuidadosamente el sobrenadante a un tubo limpio; Precipitar el DNA con igual volumen de isopropanol (aprox. 500  $\mu\text{L}$ ). Centrifugar 10 min a 14 000 rpm. NOTA: Vortex por 15 seg después de agregar isopropanol.
8. Después de centrifugar, eliminar el sobrenadante (apenas se observe un pequeño pellet), agregar 1 mL de etanol 70 % (pre-enfriado) al pellet. Vortex por 30 seg, centrifugar por 10 min a 14 000 rpm.
9. Decantar el sobrenadante, quedándose con el pellet (DNA), secar con el Speed-Vac por 3 min.
10. Cuando el etanol se haya evaporado, agregar 30  $\mu\text{L}$  de agua.

Soluciones para miniprep caseras:

SOLUCION I: 50 mM tris pH 7.5, 10 mM EDTA.

SOLUCION II: 0.2 M NaOH, 0.1 % SDS.

SOLUCION III: 1.32 M Acetato de Potasio.

#### VII.1.2 Mini-preparaciones, kit comercial (Miniprep wizard<sup>R</sup> plus, promega)

Crecer las bacterias que tengan el plásmido recombinante en 2-3 ml de medio LB, durante toda la noche (12- 16 h) en agitación constante, 250 rpm .

Pasar el inóculo a un tubo eppendorf, centrifugar a 14 000 rpm durante 1 a 2 min. Eliminar el sobrenadante. El pellet que se formó, sé resuspende con 200  $\mu\text{L}$  de la solución de resuspensión celular.

Agregar 200  $\mu$ L de la solución de lisis celular a la mezcla previa, invertir el tubo varias veces. La suspensión celular se aclarará inmediatamente, después de agregar la solución de lisis celular.

Agregar 200  $\mu$ L de solución neutralizante y mezclar, invirtiendo varias veces el tubo.

Centrifugar a 14 000 rpm durante 5 min. Pasar el sobrenadante a un nuevo tubo eppendorf.

Agregar 1 ml de la “resina de purificación de DNA miniprep Wizard”, al sobrenadante que previamente se colectó.

Para cada miniprep, preparar una “minicolumna Wizard”. Colocar la extensión (mini columna) al barril de la jeringa.

Pipetear la mezcla de resina/DNA dentro del barril de la jeringa. Colocar el émbolo de la jeringa y empujar lentamente hacia la mini columna, hasta que pase toda la mezcla.

Quitar de la jeringa la mini columna, después quitar el émbolo del barril de la jeringa.

Volver a colocar la mini columna al barril de la jeringa. Pipetear 2 ml de buffer de lavado de la columna. Insertar nuevamente el émbolo al barril de la jeringa y empujar suavemente hasta pasar todo el volumen que se le agregó por la mini columna.

Remover la mini columna y el barril de la jeringa. La mini columna se colocó en un tubo de 1.5 ml limpio. Centrifugar a 14 000 rpm por 2 min, para secar la mini columna.

Transferir la mini columna a un tubo nuevo. Aplicar 50  $\mu$ L de agua o buffer TE a la mini columna y esperar por 1 min. NOTA: para plásmidos grandes ( > 10 kb), usar agua de 65-70 ° C aumenta los rendimientos.

Para eluir el DNA, centrifuge la mini columna a 14 000 rpm por 20 seg.

Remueva y elimine la mini columna. Almacene el DNA plasmídico en un tubo de micro centrifuga a 4 ° C.

### VII.1.3 Maxi-preparaciones, Kit comercial (QIAGEN)

Este método se utiliza cuando se requiere de plásmido de alta pureza para la transfección transitoria en células COS-1.

Este método se basa en la lisis alcalina seguida por la unión del plásmido a una resina de intercambio aniónico en condiciones de baja concentración de sal y un bajo pH. Se remueven proteínas, RNAs e impurezas de bajo peso molecular con soluciones moderadas en sales. Finalmente, el plásmido se eluye con una solución rica en sales y por último se eliminan las sales mediante la precipitación con isopropanol.

Picar una colonia aislada de un medio LB-sólido reciente y colocar en 2 mL de LB con antibiótico (ampicilina con una concentración final de 150  $\mu$ g/ml), incubar durante 6-8 horas a 37 ° C, en agitación constante 250 rpm.

Diluir un mL de precultivo anterior en 500 mL de LB con antibiótico, incubar toda la noche a 37 ° C, en agitación constante.

Al día siguiente pasar el cultivo a un frasco de 250 ml y centrifugar a 2 500 rpm por 15 min a 4 ° C. Eliminar el sobrenadante, resuspender el paquete celular con 10 mL totales del buffer P2, invertir el frasco 3 veces e incubar 5 min a temperatura ambiente.

Agregar 10 mL del buffer P3, invertir 3 veces el frasco e incubar 20 min en hielo.

Decantar a tubos de 50 mL y centrifugar a 10 000 g durante 30 min a 4 ° C.

Decantar el sobrenadante a tubos limpios y centrifugar a 10 000 g durante 15 min a 4 ° C. Colocar la columna QIAGEN sobre un frasco y agregar 10 mL de Buffer QBT, después de pasar todo el volumen sobre la columna, pasar el sobrenadante que contiene al plásmido. Lavar dos veces la columna con 30 mL de buffer QC, eluir con 15 mL de amortiguador QC, finalmente colectar el DNA en un tubo limpio.

Precipitar con 10.5 mL de isopropano, mezclar y centrifugar a 9 000 g durante 30 min. Lavar el pellet de DNA con etanol al 70 % y centrifugar a 9 000 g durante 10 min (2 veces). Dejar a temperatura ambiente hasta que el pellet se seque completamente, resuspender el DNA con LoTE.

## VII.2 Electroforesis del DNA

Es un método de separación de ácidos nucleicos basado en el desplazamiento de las moléculas cargadas en un campo eléctrico por medio de su peso molecular. Todas las restricciones se analizaban por este método, para ver los fragmentos resultantes de la restricción correspondieran a los pesos que se esperaban.

### VII.2.1 Preparación del gel de agarosa al 1%

Pesar 0.5 g de agarosa (GibcoBRL) en un matraz Erlen Meyer, agregar 50 mL de amortiguador TAE 1X (Tirs-Acetato-EDTA), disolver la agarosa al colocarla 2 min en el horno de microondas. Agregar el volumen perdido (agua) cuando este tibio, agregar 1 µL de bromuro de etidio (stock 5 mg/mL), agitar vaciando la mezcla en la cámara de electroforesis y dejar gelificar.

El marcador de peso molecular utilizado fue el fago λ (Boehringer Mannheim) digerido con Hind III, proporcionando un patrón de bandas desde 23.13 Kpb hasta 0.564 Kpb. Colocar 1 µg de DNA-peso molecular.

El gel fue cubierto con el Buffer TAE 1X, totalmente. Colocar las muestras en los pozos y correr el gel a 70 Volts, hasta que el azul de bromofenol (contenido en el buffer de carga) migre 2/3 del gel.

Purificar la banda de DNA, partiendo del gel de agarosa, ver protocolo de purificación del DNA partiendo del gel de agarosa (QIAGEN).

## VII.3 Purificación del DNA

La purificación del DNA ya sea de otros fragmentos de DNA que no interesan o la eliminación de ciertos buffers de las enzimas de restricción que se utilizan en las restricciones del DNA. Tener el DNA sin buffer de las enzimas de restricción es necesario para posteriores manipulaciones.



### VII.3.1 Purificación del DNA, apartir de una banda en gel de agarosa. QIAEX II

Cortar la banda de agarosa que tienen el DNA, bajo la luz ultravioleta de onda corta.  
Colocar los fragmentos de agarosa con el DNA en micro tubos estériles. Pesar el fragmento de agarosa sin tomar en cuenta el peso del tubo estéril, agregar 3 volúmenes de buffer QX1, para fragmentos de DNA de 100 pb a 4 Kpb; para fragmentos mayores de 4 Kpb, agregar 3 volúmenes de buffer QX1, más dos volúmenes de agua.  
Resuspender la resina (dándole vortex por 20 seg) y agregarle 30  $\mu\text{L}$  de resina por cada 10  $\mu\text{g}$  de DNA.  
Incubar durante 10 min a 50 ° C, dándole vortex cada 2 min.  
Centrifugar a 14, 000 rpm por 30 seg, eliminar el sobrenadante.  
Resuspender el pellet con 500  $\mu\text{L}$  de buffer QX1, posteriormente agitar, y finalmente centrifugar a 14 000 rpm por 30 seg, eliminando el sobrenadante.  
Resuspender el pellet 2 veces con 500  $\mu\text{L}$  de buffer PE, posteriormente se agitó, y finalmente se centrifugó a 14 000 rpm por 30 seg, eliminando el sobrenadante.  
Secar 30 min a temperatura ambiente.  
Agregar 15  $\mu\text{L}$  de agua estéril e incubar 5 min a 50 ° C, centrifugar 30 seg a 14 000 rpm, recuperando la fase acuosa, colocar el sobrenadante en un tubo estéril nuevo (primera recuperación).  
Agregar 10  $\mu\text{L}$  de agua estéril e incubar 5 min a 50 ° C. Centrifugó 30 seg a 14 000 rpm, recuperando la fase acuosa (segunda recuperación), colocar el sobrenadante en el tubo estéril nuevo, que previamente tenía DNA puro (segunda recuperación).

### VII.3.2 Purificación del DNA por fenol / cloroformo

Método utilizado para eliminar los buffer de las enzimas de restricción del DNA.  
Para cada 100  $\mu\text{L}$  de DNA, añadir 50  $\mu\text{L}$  de fenol.  
Dar vortex, 30 seg.  
Añadir 50 mL de cloroformo, dar vortex 30 seg.  
Centrifugar 1 min a 14 000 rpm a temperatura ambiente.  
Con una punta nueva extraer la fase acuosa (arriba) y llevarla a un tubo limpio, I.  
Agregar 100 ml de  $\text{H}_2\text{O}$  al tubo que tiene fenol / cloroformo (de donde se tomo la fase acuosa). Dar vortex 30 seg.  
Centrifugar 1 min a 14 000 rpm, re-tomar la fase acuosa y colocarla en el tubo I, donde se encuentra el DNA puro.  
Al tubo que tiene “fase acuosa, pura” agregar 100  $\mu\text{L}$  de cloroformo (para eliminar el fenol), dar vortex y centrifugar 1 min a 14 000 rpm.  
Re-tomar la fase acuosa y pasarlo al tubo limpio, II.  
Al tubo que se le agrego cloroformo, se le re-agrega 100  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}$ ; dar vortex, 30 seg, centrifugar a 14 000 rpm.  
Recuperar la fase acuosa y se llevar al tubo II.

Medir la cantidad (volumen) de DNA que se tiene; Si se tuviera 260  $\mu\text{L}$  de DNA:

Agregar:	02.0 $\mu\text{L}$	Glucógeno
	66.5 $\mu\text{L}$	Acetato de amonio (stock de 10 M, 3 M conc. final)
	328.59 $\mu\text{L}$	Totales.

Agregar 2.5 volúmenes de alcohol absoluto (821.475  $\mu\text{L}$ ).

Incubar 20 min a  $-20^{\circ}\text{C}$  o  $-70^{\circ}\text{C}$ .

Centrifugar 15 min (hacerlo a  $4^{\circ}\text{C}$ ), decantar el sobrenadante.

Al paquete agregarle 1 mL de etanol 70 %, dar vortex y centrifugar 5 min a 14 000 rpm en frío (centrifugar 2 veces).

Secar en el Speed-Vac (~10 min).

Resuspender en  $\text{H}_2\text{O}$  estéril (la cantidad de  $\text{H}_2\text{O}$  es variable).

Etiquetar muy bien.

## VII.4 Digestión con enzimas de restricción

Cada enzima requiere de su buffer propio, es necesario ver las indicaciones del proveedor. A continuación se da un protocolo general para la digestión de 1  $\mu\text{g}$  de DNA

Para una reacción con un volumen final de 15  $\mu\text{L}$ :

DNA	1.0 $\mu\text{g}$
Buffer 10X	1.5 $\mu\text{L}$
Enzima <sup>1</sup>	0.1 $\mu\text{L}$ (1 U)
Agua (la cantidad necesaria para 15 $\mu\text{L}$ )	

<sup>1</sup>Una unidad de enzima está definida como la cantidad requerida para digerir 1  $\mu\text{g}$  de DNA en 60 min a temperatura apropiada bajo condiciones óptimas.

La mezcla de reacción se incuba a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 2 horas, agregarle 3  $\mu\text{L}$  del buffer de carga 6X y correr en un gel de agarosa 1 %.

## VII.5 Desfosforilación del vector

Después de la restricción, el vector es desfosforilado para evitar la recircularización o ligación del vector mismo. Este paso, consiste en eliminar los fosfatos en los extremos 5' de cada lado del vector, la reacción es catalizada por la fosfatasa alcalina. La desfosforilación del vector, permite la disminución de las colonias de fondo que solo tienen al vector vacío, cuando son transformados.

Las condiciones estándar para desfosforilar cualquier vector, para un volumen de 50  $\mu\text{L}$ , y de 1 a 20 pmoles de DNA como sustrato de CIP (calf intestine phosphatase):

DNA digerido	15 $\mu\text{L}$
Buffer 10X CIP	5 $\mu\text{L}$
CIP	0.1 U (Boehringer Mannheim)
Agua (agregarle hasta alcanzar un volumen de 50 $\mu\text{L}$ ).	

Incubar 2 h a 37 ° C.

Para quitar la enzima se sigue el protocolo estándar de extracción fenol-cloroformo.

## VII.6 Ligación

Para ligar dos moléculas de DNA (vector e inserto), y generar un plásmido recombinante, tanto el vector como el inserto deben de estar previamente cortados con las enzimas de restricción apropiadas (cuidando de tener extremos cohesivos compatibles), el vector debe de estar desfosforilado y ambos sin los buffers que tienen las enzimas de restricción. Para las ligaciones se hacen 2 reacciones, una como control y la otra que es el problema.

Durante la ligación con la enzima T4-DNA Ligase (ROCHE) cataliza la formación de un enlace fosfodiéster, entre los nucleótidos adyacentes con grupo fosfato en el extremo 5' y el grupo hidroxilo en el extremo 3'.

Las condiciones estándares de una ligación, generalmente se hacen en un volumen final de 15 µL (Current protocol in molecular Biology):

	Reacción 1	Reacción 2
Vector	2.0 µL	2.0 µL
Inserto	-----	6.0 µL
Buffer de Ligación 10X	1.5 µL	1.5 µL
T4-DNA Ligasa (3.5 U/ µL, ROCHE)	1.0 µL	1.0 µL
Agua(la necesaria para 15 µL)		

Incubarla a 12 ° C por 14-18 h. Transformar la mezcla directamente en células DH5α (bacterias competentes).

Se recomienda que exista una proporción de 3:1 (Inserto: Vector).

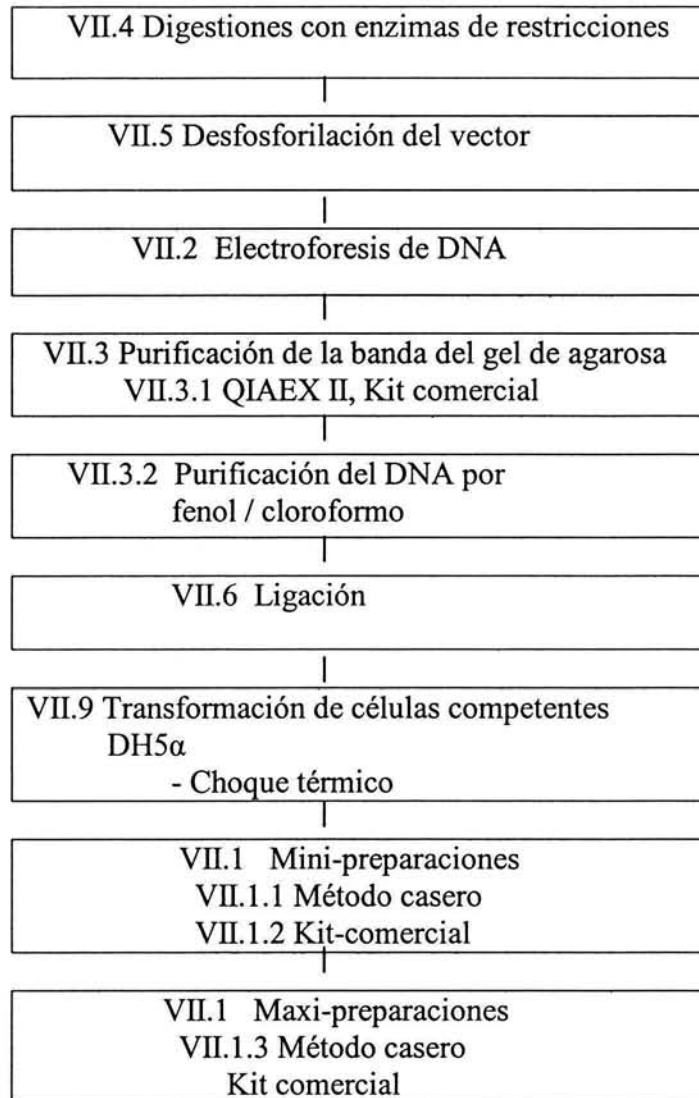
El vector puede ser pBKS, pCMV5 o cualquier otro.

La reacción 1, no tiene Inserto, así que las colonias transformante serán un fondo, de la eficiencia de la desfosforilación del vector.

La digestión, desfosforilación y ligación del DNA, se realizaron bajo las condiciones estándares, que en cualquier manual de biología molecular se encuentran (CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, VOL 1).

## Subclonación

La figura 32, indica los pasos a seguir para la subclonación de cualquier cDNA en cualquier vector.



**Figura 32. Subclonación.** Este esquema representa de manera general los pasos a seguir para cualquier subclonación de cualquier DNA en cualquier vector.

## VII.7 Mutación puntual, generación de un sitio Eag I único

Se hizo el siguiente procedimiento con la finalidad de generar un sitio Eag I justo antes de la región transmembrana, para posteriormente introducirle un oligo de doble cadena con sitios complementarios Eag I en sus extremos.

La PCR es una tecnología muy utilizada para la introducción de un cambio en la secuencia deseada del DNA de interés (current protocol).

Se diseñaron 2 oligos que permiten un cambio de base en el cDNA (una transversión de T a G), dichos oligos fueron AZM1 (oligo sense) y AZM2 (oligo antisense).

Dos oligos más se diseñaron, estos flanquean el sitio de la mutagénesis; el oligo PL7 (upstream del sitio de la mutagénesis) y el oligo MN7 (downstream del sitio de mutagénesis).

Las condiciones de la PCR son:

Para la amplificación de PL7 – AZM2 y de MN7 – AZM1 fueron las siguientes:

DNA templado	100 ng
Buffer 10 X	2 $\mu$ L
MgCl <sub>2</sub>	2.5 mM
dNTP's	200 $\mu$ M (de cada uno)
Primer 1	300 nM
Primer 2	300 nM
Polimerasa	1 $\mu$ L (3.5 U/ $\mu$ L)

H<sub>2</sub>O necesaria para 20  $\mu$ L.

Volúmenes para una reacción estándar de PCR, con un volumen final de 20  $\mu$ L.

En el termociclador Perkin Elmer Gene Amp PCR System se programó con las siguientes condiciones: 94 ° C por 2 min; 30 ciclos de: 94 ° C, 20 seg; 70 ° C, 20 seg, 72 ° C por 30 seg; 72 ° C por 5 min y 4 ° C.

La polimerasa es una enzima de alta fidelidad (Expand High Fidelity) de ROCHE.

## VII.8 Fosforilación de los oligos de doble cadena con la enzima polinucleótido kinasa (PNK)

Esta enzima permite la catálisis del  $\gamma$ -ATP al 5'-hidroxilo terminal del DNA. Las condiciones para la reacción son las siguientes:

Para una reacción de 30  $\mu$ L:

Buffer de T4-PNK 3.0  $\mu$ L

Oligo 1

Oligo 2

$\gamma$ -ATP

T4-PNK

H<sub>2</sub>O

Incubar a 37 ° C por 60 min, la reacción se detuvo al calentar la mezcla de reacción a 75 ° C por 10 min. Posteriormente, se hizo una extracción fenol / cloroformo, para quitar el buffer de la enzima y poderla ligar en el cDNA del betaglicano. NOTA: El  $\gamma$ -ATP no está radioactivo.

### VII.8.1 Ligación de los oligos de doble cadena al cDNA:

La introducción de oligo de doble cadena al cDNA, se hace despues quitarle el buffer de la enzima PNK y los oligonucleótidos por extracción con fenol / cloroformo.

cDNA del betaglicano

Buffer de la ligasa

Oligo de doble cadena fosforilados 1  $\mu$ g/  $\mu$ L

Incubar la reacción por 16 h a 4 ° C.

La ligación al cDNA se hace bajo el protocolo de ligación.

### VII.9 Transformación de bacterias competentes *E. coli* de la cepa DH5 $\alpha$

Este método permite la introducción del plásmido recombinante a una bacteria, para que cuando esta se divida, duplique su material genético y poder obtener el plásmido recombinante en cantidades suficientes para posteriores manipulaciones.

Choque Térmico:

Descongelar las bacterias competentes poco a poco (se mantuvieron dentro de hielo, 4 ° C) y mezclar suavemente.

En un micro tubo estéril se colocar 45  $\mu$ L de bacterias DH5 $\alpha$  y se les agregó 5  $\mu$ L de la mezcla de reacción 1 (ver protocolo de ligación).

En otro micro tubo estéril se colocó 45  $\mu$ L de bacterias DH5 $\alpha$  y agregarles 5  $\mu$ L de la mezcla de reacción 2 (ver protocolo de ligación).

Incubar 30 min en hielo, se dio un choque de calor a 42 ° C durante 2 min, inmediatamente, colocar en hielo, agregar 950  $\mu$ L de medio LB (esto se hizo en condiciones de esterilidad), centrifugar a 225 rpm durante 1 hora a 37 ° C; centrifugar 2 min a 6 000 rpm, eliminar parte del sobrenadante quedándose con aproximadamente 100  $\mu$ L de medio LB (en condiciones de esterilidad) que sirve para resuspender el pellet celular. Sembrar 20  $\mu$ L y 80  $\mu$ L del inóculo en cajas con LB-sólido con ampicilina (concentración final de 150  $\mu$ g/mL).

Inocular toda la noche a 37 ° C.

### VII.10 Iodinación del TGF- $\beta$ (Método de Cloramina T)

Tomar 2  $\mu$ g de TGF- $\beta$  en 5  $\mu$ L de acetonitrilo al 30 % - TFA 0.1% y mezclar con 5  $\mu$ L de amortiguador de fosfato de sodio 1.5 M. Añadier 400  $\mu$ Ci de Na- I<sup>125</sup> y se mezclar suavemente. A la mezcla de iodinación añadir 2  $\mu$ L de cloramina T (50  $\mu$ g/ml) 3 veces en lapsos de incubación de 2, 1.5 y 1 min, mezclar suavemente en cada ocasión. Detener la reacción con 10 $\mu$ L de N-acetiltirosina 30 mM, 100  $\mu$ L de KI 60 mM y 100  $\mu$ L de ácido

acético en urea 1 M. Hacer el análisis de incorporación por cromatografía en capa fina, por triplicado. Para este fin depositar 2  $\mu$ L de la mezcla de iodación en una tira de fibra de vidrio impregnada de sílica gel (Gelman Science, Ann Arbor, MI). Utilizar ácido tricloroacético al 10% como fase móvil. Cortar las tiras por la mitad y medir la radioactividad en la base y en el frente en un contador para radiación gamma (Packard). Una incorporación igual o mayor al 30 % es aceptable. La separación del Iodo libre de la mezcla de reacción se hizo por cromatografía de exclusión. Tomar toda la mezcla de reacción y depositarla en una columna PD-10 de sephadex G-25 (Pharmacia Biotech). Equilibrar con amortiguador de columna (HCl 4 mM, NaCl 75 mM, y BSA 0.1%). Eluir el líquido de la columna y recuperar en fracciones de 500  $\mu$ L. Seleccionar la fracción con el mayor índice de cuentas por minuto. La concentración del ligando marcado por cromatografía en capa fina, tomado 2  $\mu$ L de la fracción seleccionada. Alicuotar y almacenar a -20 C.

### VII.11 Transfección Transitoria de células COS-1 (DEAE-Dextran)

Sembrar células COS-1 en cajas de 10 cm de diámetro.

Preparar en el momento, tubos con 15 mL con:

Medio DMEM 5 mL

Cloroquina 10 mM (no congelar y descongelar)

Preparar el DNA (el plásmido):

Mezclar con vortex el stock del plásmido

Centrifugar para bajar el DNA

Hacer los cálculos para tener 10  $\mu$ g de plásmido de preparación pura (necesario para una eficiente trasfección).

Agregar el plásmido al medio DM con cloroquina. NOTA: no poner el plásmido en contacto directo con la cloroquina, por ser esta muy tóxica.

Lavar las células COS-1 dos veces con medio DM sin suero.

Agregar el DEAE-DEXTRAN 10 mg/ml (concentración final) a cada tubo por mezcla.

Agregar la mezcla previa a las células COS-1 por las paredes y de forma suave.

Incubar 4 h a 37 ° C, no menos de 3 h, ni más de 4 h.

Quitar el medio con una pipeta Pasteur estéril. Dar el choque con DMSO (DMSO 10 % en PBS 1X). Incubar por 1 ½ a 2 min a temperatura ambiente. Eliminar el DMSO.

Lavar con medio DMEM, 9 mL.

Agregar medio DM 10% SFB-Antibiótico.

Ensayar las células al día 2 o 3, después de la transfección.

## VII.12 Marcado por afinidad

Este es un ensayo funcional que permite analizar la actividad de unión del betaglicano al TGF- $\beta$ -I<sup>125</sup>.

### VII.12.1 Marcado por afinidad de la proteína expresada en membrana

El marcado por afinidad del betaglicano soluble de ratón se realizó mediante la técnica descrita por Andres y col. en 1989 utilizando TGF- $\beta$  marcado radiactivamente con I<sup>125</sup>. La iodinación del TGF- $\beta$  se realizó de acuerdo al método de cloramina-T. Para ello, se mezclaron 2  $\mu$ g de TGF- $\beta$  ( en 5  $\mu$ L de acetonitrilo al 30 % y TCA 0.1%) con 5 $\mu$ L de fosfato de sodio 1.5 M. Adicionar en la campana de extracción 4 $\mu$ L de Na-I<sup>125</sup> (aproximadamente 400  $\mu$ Ci) y 2  $\mu$ L de cloramina T (50  $\mu$ g/ml). Incubar la mezcla durante 2 min con agitación constante. Adicionar 2  $\mu$ L de cloramina T e incubar durante 1.5 min. Adicionar nuevamente 2  $\mu$ L de cloramina T e incubar durante 1 min. Detener la reacción o adicionando 10  $\mu$ L de N-acetiltirosina 50 mM, 100  $\mu$ L de KI 60 mM y 100  $\mu$ L de urea (1.2 g en ácido acético 1M). Realizar la separación del TGF- $\beta$  marcado del I<sup>125</sup> libre, utilizando columnas de sephadex-G25 (Pharmacia Biotech) y cuantificar su actividad específica mediante cromatografía en capa fina.

Los ensayos de unión de TGF- $\beta$  a saturación, se realizaron con 10 ng de betaglicano soluble recombinante resuspendido en PBS con tritón X-100 al 0.5%. Incubar las muestras con diferentes concentraciones (0.05-16 ng) de TGF- $\beta$ 1 marcado con I-<sup>125</sup> durante 3 h a 4 ° C. La reacción de entrecruzamiento se llevó a cabo mediante la adición de disuccinimidilsuberato (DSS) a una concentración de 0.1 mg/ml. Detener la reacción después de 15 min adicionando Tris a una concentración de 10 nM.

### VII.12.2 Marcado por afinidad de proteína expresada en solución

Colectar el medio condicionado a partir de la transfección transitoria , donde se encuentra la proteína de la forma soluble. Incubar con 250 pM de TGF $\beta$ -I<sup>125</sup> a 4 ° C por 3 h. El ligando unido se entrecruzó a la proteína soluble con disuccinimidilsuberato (DSS, PIERCE Chemical Co.) a una concentración final de 0.1 mg/ml. Detener la reacción de entrecruzamiento después de 15 min con Tris a una concentración de 10 nM. Inmunoprecipitar la muestra con el anticuerpo policlonal 822, contra el ectodominio del betaglicano, con una dilución 1:5000 y se analizar por electroforesis (SDS-PAGE) con geles al 8 % de poliacrilamida. Los resultados se visualizaron en un "Phosphoimager" (Molecular Dynamics).

## VII.13 Geles de poliacrilamida-SDS

Los extractos celulares y sobrenadantes de los cultivos donde se expresó el betaglicano soluble y el de membrana en el vector pCMV5, se analizaron por electroforesis en un gel 8 % de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE) y se corrieron en una cámara para electroforesis Bio-Rad modelo Mini-Protean II a 80 mAmp por gel.



Cada gel de poliacrilamida-SDS se preparará de acuerdo al siguiente protocolo (Harlow y Lane, 1998; Sambrook, et al 1989).

#### Gel separador

H <sub>2</sub> O	9.3 ml
30 % Mezcla acrilamida (29.2 % Acrilamida; 0.8 % N,N – metilen-bisacrilamida)	5.3 ml
1.5 M Tris (pH 8.8)	5.0 ml
10 % SDS (Dodecil Sulfato de Sodio)	0.2 ml
10 % Persulfato de amonio	0.2 ml
TEMED (N,N,N ,N ,-terametiletildiamina)	0.012 ml

#### Gel Concentrador

H <sub>2</sub> O	6.8 ml
30 % mezcla acrilamida	1.7 ml
1 M Tris (pH 6.8)	1.25 ml
10 %SDS (Dodecil Sulfato de Sodio)	0.1 ml
10 % Persulfato de amonio	0.1 ml
TEMED (N,N,N ,N ,-terametiletildiamina)	0.01 ml

Volúmenes usados para dos geles.

## VII.14 Métodos utilizados con los baculovirus

### VII.14.1 Transfección de células *Sf9*

Sembrar  $2 \times 10^6$  células en cajas de 60 mm con un volumen de 2 mL, incubar por 30 min para que las células se peguen a plato de cultivo.

Todo el procedimiento se hace en la campana de flujo laminar y con la luz apagada.

Para una mezcla de transfección, usar un tubo eppendorf de 1.5 mL que contiene 10  $\mu$ L (0.5  $\mu$ g) del DNA Bac-N-Blue<sup>TM</sup>.

Centrifugar el tubo a 14 000 rpm por 10 seg y agregar los siguientes reactivos:

Plásmido de transferencia recombinante (1 $\mu$ g/ $\mu$ L)	4 $\mu$ L
Medio GRACE'S (SIN SUERO)	1 ml
Liposomas Insectina-Plus <sup>TM</sup>	20 $\mu$ L

Agregar los liposomas al final, y dar vortex.

Dar vortex a la mezcla de transfección de manera exhaustiva.

Incubar la mezcla de transfección a temperatura ambiente por 15 min.

Remover cuidadosamente el medio de las células sin romper la monocapa celular, lavar las células al agregarle 2 mL de medio GRACE'S SIN SUERO. Eliminar todas las trazas de suero, ya que disminuye la eficiencia de transfección de los liposomas.

De nuevo, remover cuidadosamente todo el medio de la monocapa y agregar la mezcla de transfección por goteo en la caja de 60 mm. Repetir para cada una de las transfecciones.

Incubar las cajas a 28 ° C por 4 h en agitación suave (agitación de columpio, con una velocidad de dos vueltas por lado por min).

Después de las 4 h de incubación, añadir 1 mL de medio GRACE'S completo, sellar con parafilm las cajas e incubarlas a 28 ° C por 72 h..

Alrededor de las 72 h, las vesículas con virus son liberadas al medio. Este sobrenadante de transfección se cosecha a este tiempo y se evalúa para obtención de placas recombinantes (stock viral de transfección). Las células podrían no enseñar todos los signos de infección hasta el 4 ó 5 día.

Cosechar 2 mL de medio de cada caja de las células transfectadas y colocarlas en un tubo estéril. Este stock viral de transfección puede ser almacenado a 4 ° C hasta que se requiera. Este stock se usa para identificar virus recombinantes por ensayo de placa.

Agregar 3 mL de medio GRACE'S completo a las células transfectadas e incubarlas a 28 ° C por 48 h adicionales.

Checar las células de 4 - 7 días postransfección para confirmar visulamente el éxito de la transfección, esto se hace con la ayuda de un microscopio invertido de fase.

Después de haber visto que la transfección fue exitosa, se requiere purificar baculovirus recombinantes por ensayo de placas de virus transfectados.

## VII.14.2 Ensayo de placas

Sembrar  $1.5 \times 10^6$  células *Sf9* en placas de 3.5 cm de diámetro, en un volumen total de 2 mL (medio GRACE'S completo).

Incubar las células a 28 ° C por 1 h para que se adhieran las células a la placa. La calidad de la monocapa celular es crítica para que el ensayo de placas sea exitoso. Las células *Sf9* deben estar en fase logarítmica de crecimiento cuando se infecta (asegurarse de incluir un control con células, sin infectar).

Diluir el virus en medio de cultivo GRACE'S sin suero, haciendo diluciones de 1:10, esto se hace en la campana con la luz apagada.

Incubar a 28 ° C, 1 h con agitación suave (chechar que el virus cubra totalmente la placa).

Licuar del stock de agarosa de bajo punto de fusión 2 % (manteniéndola a 37 ° C para evitar la gelificación), añadir un volumen igual de medio GRACE'S completo a 37 ° C.

Eliminar el virus de las células con una pipeta Pasteur, con la ayuda de una punta amarilla en su extremo, para eliminar completamente todo el líquido.

Agregar 2 mL de la mezcla de agarosa con GRACE'S completo por la pared de la caja ( tener mucho cuidado de no desprender las células).

Dejar de 5-10 min para que gelifique, añadir 1 mL de medio GRACE'S completo.

Incubar por 4 días a 28 ° C, protegido de la luz y con una cámara húmeda.

Para identificar a los virus recombinantes, teñirlos con X-gal (300 µg, concentración final).

Remover el medio de cultivo de las cajas.

Agregar 1 mL de medio GRACE'S completo que tenga 15 µL de X-gal al 2 % ( por caja).

Incubar a 28 ° C durante toda la noche, eliminar el medio de cultivo al otro día por la mañana.

Observar, si es necesario incubar a 28 ° C, protegido de la luz y estar constantemente observando por 1 a 2 días, hasta que sean visibles las placas de lisis azules.

OBTENCION DEL STOCK P1 (pequeña escala, bajo título)

Todo el procedimiento se hace sin luz, en la campana de flujo laminar.

Poner 2 mL de medio GRACE'S completo (medio de pase) en placas de 12 pozos.

Sembrar  $5 \times 10^5$  células Sf9 en etapa logarítmica, en cada uno de los 12 pozos. El volumen no debe excederse de 3 mL

Utilizar una pipeta Pasteur y un bulbo, sacar una placa de lisis azul (tapón) de la garosa y ponerlas en cada uno de los pozos (dejar un control sin placas de lisis).

Tapar la caja de 12 pozos y sellarla con parafilm. Incubar a 28 ° C por 3 días.

A los tres días ver al microscopio de fase invertida los cuerpos de oclusión.

Incubar de 5 a 7 días más, hasta que las células se lisen (estar observándolas periódicamente a partir del día 7, comparar con el control sin infección).

Con una pipeta Pasteur recuperar todo el medio, subiendo y bajando el volumen con la pipeta, colocándolo en un tubo estéril, centrifugar a 4 000 rpm por 2 min para quitar partículas celulares.

Guardarlo a 4 ° C para seguir escalándolo, protegido de la luz.

### VII.14.3 Western Blot

Los medios condicionados fueron sometidos a electroforesis a geles desnaturalizantes (SDS-PAGE) de poliacrilamida, transferidos a membranas de nitrocelulosa y ensayado con anticuerpo 822 (anticuerpo policlonal de conejo, contra el ectodominio del betaglicano). Para la detección con el anticuerpo, las membranas fueron bloqueadas en PBS-Tween 20 al 0.1% conteniendo leche descremada al 5 %. Las membranas se incubaron durante 30 min a temperatura ambiente. Las membranas se lavaron con PBS-Tween y se incubaron contra el anticuerpo policlonal 822 de conejo diluido 1: 5000 en PBS-Tween, durante 45 min a temperatura ambiente. Posteriormente, las membranas se lavaron con PBS-Tween y se incubaron con el segundo anticuerpo anti-IgG (SIGMA-ALDRICH) diluido 1:5000 en PBS-Tween, durante 30 min a temperatura ambiente. Finalmente, las membranas se lavaron y se revelaron por quioluminiscencia utilizando el kit ECL (Western blotting detection reagents, Amersham Pharmacia biotech).

### VII.14.4 Tinción de plata

Correr las muestras en geles al 8 % hasta que el frente de corrida este por salir, se tiñen con plata para ver la proteína.

Se pone de 30 min a 1 h en la solución fijadora, lavar con agua mili-Q por dos min al gel, Lavar 3 veces, por 20 min con metanol 50 %, lavar con agua mili-Q por dos min. Lavar por 1 min con solución de oxidación. Lavar 3 veces por 20 seg con agua. Incubar por 15 min con la solución teñidora, ponerle papel aluminio para proteger a la plata que tiene esta solución. Lavar 2 veces por 20 seg con agua mili-Q. Agregar solución reveladora hasta que las bandas de las proteínas sean visibles. Lavar 2 veces por 1 min, con agua mili-Q. Parar la reacción con solución de stop, por 1 min. Lavar con agua mili-Q. Finalmente secar los geles.

## Soluciones:

Solución de fijación: metanol 50 %, ácido acético 12, 0.5 ml de formaldehído 37 %.

Solución de Oxidación:  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  0.2g/L.

Solución teñidora:  $\text{AgNO}_3$  2g/L, 0.75 % de formaldehído al 37 %.

Solución de Revelado:  $\text{NaCO}_3$  60g/L,  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  4mg/L, 0.5 mL de formaldehído 37 %.

Solución de Stop; metanol 50 %, ácido acético 12 %, 0.5 mL de formaldehído 37 %.

## VII.14.5 Purificación de la proteína recombinante que tiene una cola de 8 residuos de Histidina (8X-His)

La proteína recombinante tiene una cola de ocho residuos de His, seguida de un codón de stop. La proteína recombinante tendrá una cola de 8 residuos capaz de purificar por afinidad en agarosa-Ni-NTA.

1. Infectar una cantidad deseada de células con virus recombinante amplificado con una MOI de 5 a 10. Cosechar las células al tercer día.
2. Cosechar el sobrenadante de las células infectadas.
3. Centrifugar a 11, 000 g por 20 min, a 4 ° C. La proteína es secretada al medio extracelular (medio condicionado).
4. Eliminar las células después del centrifugado y quedarse con el sobrenadante (Aquí está la proteína recombinante).
5. Filtrar el medio condicionado, para eliminar restos celulares. El medio condicionado fue suplementado con PMSF 1mM (Concentración final).
6. Concentrar la proteína por medio de centricones.
7. Pasar el líquido concentrado por medio de una columna de sefarosa quelante, que fue cargada con  $\text{NiCl}_2$  50 mM y se equilibró en buffer de lavado (HEPES, 25 mM pH 7.5, KCl 1M, Imidazol 20 mM, PMSF 1 mM). La proteína recombinante que expresa en el extremo COOH terminal la cola de His se une al Ni (de la columna de sefarosa quelante) que esta adherida a la resina.
8. Lavar la columna de agarosa Ni-NTA con buffer de lavado con 6 volúmenes de la columna, para eliminar todo lo que paso y no se adhiere al Ni.
9. Pasar un gradiente de Imidazol de 20 a 250 mM, que permite eluir la proteína adherida al Ni. La proteína se recolecta en un colector de tubos, colectando 1 mL por tubo.
10. Correr las muestras de cada tubo por un gel de SDS-PAGE al 8 % y teñirlo con plata, para identificar las fracciones que contiene a la proteína recombinante. Las fracciones que tienen a la proteína se concentró por medio del sistema amicon de ultracentrifugación (Millipore, Bedford). Las fracciones positivas se dializaron contra el amortiguador de fosfatos con 1 % de (v/v) de glicerol y PMSF 1 mM y se almacenó a - 70 ° C

## VII.15 Medios de cultivo

### VII.15.1 Medios Líquidos

Son los empleados para crecer a las bacterias en suspensión, de esta forma cuando ellas se dupliquen, también lo haran con su material genético, y por ende también el plásmido que

se le introdujo a las bacterias por transformación; el plásmido recombinante nos proporciona material para trabajar.

### VII.15.1.1 Medio Luria-Bertani (LB)

10 g de triptona, 5 g de extracto de levadura, 10 g de NaCl, aforar a 1 L con agua mili-Q, esterilizar por autoclave durante 30 min a 15 lb de presión y 121 ° C.

### VII.15.1.2 Medio Terrific Broth (TB)

12 g de Bacto-triptona.

24 g de Bacto-Extracto de levadura.

4 ml de Glicerol.

0.17 M de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (concentración final)

0.72 M de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (concentración final)

Agregar agua hasta 1 L y pasarlo por autoclave durante 30 min a 15 lb de presión y 121 ° C.

### VII.15.1.3 Medio Sólido

Por litro:

Para 950 ml de agua desionizada, agregar:

Bacto-Triptona	10 g
Bacto-Extracto de Levadura	05 g
NaCl	10 g

Agitar hasta que se disuelva completamente, ajustar el pH 7 con NaOH.

Agregar 1.5 g de agar por cada 100 mL, para 1 L, agregar 15 g de agar.

Aforar a 1L con agua desionizada, agregar un agitador magnético.

Esterilizar por 25 min, en sistema de escape lento.

Colocar el medio estéril en un baño maría a 55 ° C, para atemperizar el medio estéril.

Agregar ampicilina a una concentración final de 150 µg/ml, poner a agitar durante 3 min para permitir que la ampicilina se distribuya por todo el medio.

Esperar que el medio se atemperice un poco, sin dejar que polimerice, decantarlo en cajas de 10 cm de diámetro.

Esperar que gelifique, secarlas durante 30 min en la campana, guardarlas a 4 ° C.

## VII.16 Medios Utilizados en Baculovirus

Las células COS-1 (CRL-1654, ATC) fueron cultivadas en medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, GIBCO/BRL) suplementado con 10 % de suero fetal bovino (SFB,

GIBCO/BRL) y antibiótico-antimicótico (100 unidades con Penicilina G, 100 µg de sulfato de estreptomina y 0.25 µg/ml de anfotericina B en solución salina 0.85 %, GIBCO/BRL). Las células de insecto *Sf9* (células ováricas de *Spodoptera frugiperda*, Invitrogen, Carlsbad, CA) fueron cultivadas en medio Grace (GIBCO/BRL) suplementado con 10 % de SFB, “yeastolate” (GIBCO/BRL), hidrolizado de lactoalbúmina (GIBCO/BRL) y antibiótico-antimicótico. Las células H5 “High five” (células ováricas de *Tricoplusia ni*, Invitrogen, Carlsbad, CA) fueron cultivadas en “spinners” a 27 ° C a 100 rpm usando medio Express Five (GIBCO/BRL) sin suero suplementado con 4 mM de glutamina y antibiótico-antimicótico.

## VII.17 Buffers:

### VII.17.1 Buffer TAE 50X para las electroforesis del DNA.

242 g de tris base.  
57.1 mL de ácido acético glacial.  
100 mL de 0.5 M de EDTA (pH 8).  
Aforar a 1 L.

Se corre a 1 X en cámara electroforética, y es el medio para preparar los geles de agarosa.

### VII.17.2 Buffer para proteína 5X Para 4 L

Glicina	288.0 g
Tris base	60.5 g
SDS	20.0 g

Ajustar pH a 8.6 con HCl.

## VIII. BIBLIOGRAFIA

1. Alberts Bruce, Alexander Johnson, Julian Lewis, Martín Raff, Keith Roberts, Peter Walter. *Molecular biology of the cell*. 2000. 4<sup>TH</sup> Edition Garland Science Inc. 2002 New York and London. Chapter 15.
2. Lodish, H., Baltimore, D., Berck, A., Zipursky, S. L., Matsudaira, P., and Darnell, J. 1999. *Molecular Cell Biology*. 2000. 4<sup>TH</sup> Edition W. H. Freeman and company. W.H Freeman and Company. USA. Chapter 20.
3. Massagué J. 1987. The TGF- $\beta$  family of growth and differentiation factors. *Cell* 49: 437-438.
4. Massagué J. 1990. The transforming growth factor- $\beta$  family. *Annu Rev Cell Biol* 6: 597-641.
5. Burt, D. W and I. R. Paton. 1992. Evolutionary origins of the transforming growth factor-beta gene family. *DNA Cell Biol* 11: 497-510.
6. Denhez, F., Lafyatis R., Kondaiah P., Roberts AB. and M.B. Sporn. 1990. Cloning by polymerase chain reaction of a new mouse TGF- $\beta$ , mTGF- $\beta$ 3. *Growth Factors* 3: 139-146.
7. Derynck R., Lindquist PB., Lee A., Wen D., Tamm J., Graycar JL., Rhee L., Mason AJ., Miller DA., Coffey RJ., et al. 1988. A new type of transforming growth factor-beta, TGF-beta 3. *EMBO J* 7: 3737-3743.
8. ten Dijke p., Hansen P., Iwata KK., pieler C., Foulkes JG. 1988. Identification of another member of the transforming growth factor type beta gene family. *Proc Natl Acad Sci USA* 85: 4715-4719.
9. Roberts, A. B., Anzano, M. A., Lamb, L. C., Smith, J.M. and Sporn, M. B. 1981. New class of transforming growth factors potentiated by epidermal growth factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 78: 5339-5343.
10. Tucker, R.F., Shipley, G. D., Moses, H.L. and Holley, R.W. 1984. Growth inhibitors from BSC-1 cells is closely related to the platelet type  $\beta$  transforming growth factor. *Science* 226: 705-707.
11. Roberts, A. B., Anzano, M. A., Wakefield, L.D., Roche, N.S., Stern, D.F. and Sporn, M. B. 1985. Type- $\beta$  transforming growth factor: a bifunctional regulator of cellular growth. *Proc Natl Acad Sci USA* 82: 119-123.
12. Massagué J. And Like, B. 1985. Cellular receptors for type beta transforming growth factor. *J Biol Chem* 260: 2636-2645.
13. Cheifetz, S., Weatherbee, J.A., Tsang, M.L., Anderson, J.K., Mole, J.E., Lucas R. and Massagué J. 1987. The transforming growth factor- $\beta$  system, a complex pattern of cross-reactive ligands and receptors. *Cell* 48: 409-415.
14. Segarini, P. R., Roberts, A.B., Rosen., M. D. and Seyedin, S. M. 1987. Membrane binding characteristics of two forms of transforming growth factor- $\beta$ . *J Biol Chem* 262:14655-14662.
15. McDonald, N. Q. And W. A. Hendrickson. 1993. A structural superfamily of growth factors containing a cystine knot motif. *Cell* 73: 421-424.
16. Daopin, S., K. A. Piez., Y. Ogawa and D. R. Davis. 1992. A structural of transforming growth factor-beta 2: an unusual fold for the superfamily. *Science* 257: 369-373.

17. Schlunegger, M. P. And M. G. Grutter. 1992. An unusual feature revealed by the crystal structure at 2.2 Å resolution of human transforming growth factor-beta 2. *Nature* 358: 430-434.
18. Kingsley, D. M. 1994. The TGF-beta superfamily: new members, new receptors, and new genetic tests of function in different organisms. *Genes Dev* 8: 133
19. Wrana, J. L., Liliana Attisano, Juan Cárcamo, Alejandro Zentella, Jacqueline Doody, Marikki Laiho, Xiao-Fan Wang and Massagué J. 1992. TGF-β signals through a heteromeric protein kinase receptor complex. *Cell* 71: 1003-1014.
20. Massagué J. 1998. TGF-β signals transduction. *Annu rev Biochem* 67:753-791.
21. Gougos, A. And M. Letarte. 1990. Primary structure of endoglin, an RGD-containing glycoprotein of human endothelial cells. *J Biol Chem* 265: 8361-8364.
22. Laiho M., F. M., Weis, F. T. Boyd, R. A. Ignatz and Massagué J. 1991. Responsiveness to transforming growth factor-beta(TGF-beta) restored by genetic complementation between cell defective in TGF-beta receptors I and II. *J Biol Chem* 266: 9108-9112.
23. Franzen P., C. H. Heldin and K. Miyazono. 1995. The GS domain of the transforming growth factor-beta type I receptor is important in signal transduction. *Biochem Biophys Res Commun* 207: 682-689.
24. Chen Y. G., F. Liu and Massagué J. 1997. Mechanism of TGF-beta receptor inhibition by FKBP12. *EMBO J* 16: 3866-3876.
25. Weis-Garcia, F. and Massagué J. 1996. Complementation between kinase defective and activation-defective TGF-beta receptor reveals a novel form of receptor cooperativity essential for signalling. *EMBO J* 15: 276-289.
26. Massagué J. 1985. Subunit structure of a high-affinity receptor for the type β-transforming growth factor. *J Biol Chem* 260: 7059-7066.
27. López-Casillas F., Cheifetz, J. Doody, J. L. Andres, W. S. Lane and Massagué J. 1991. Structure and expression of the membrane proteoglycan betaglycan, a component of the TGF-β receptor system. *Cell* 67:785-795.
28. Xiao-Fan Wang., Herbert Y. Lin, Elinor Ng-Eaton, J. Downward, H. F. Lodish and Robert A. Weinberg. 1991. Expression Cloning and characterization of the TGF-β type III receptor. *Cell* 67: 797-805.
29. Henis, Y. I., A. Moustakas, H. Y. Lin, and H. F- Lodish. 1994. The types II and III transforming growth factor-β receptors form homo-oligomers. *J Cell Biol* 126:139-154.
30. López-Casillas F., J. L. Wrana and Joan Massagué. 1993. Betaglycan presents ligand to the TGF-β signaling receptor. *Cell* 73: 1435-1444.
31. Diana Roetzer, Martin Roth, Marion Lutz, Dirk Lindemann, Walter Sebald and Petra Knaus. 2001. Type III TGF-β receptor-independent signalling of TGF-β2 via TβRII-B, and alternatively spliced TGF-β type II receptor. *EMBO J* 20: 480-490.
32. López-Casillas F., H. M. Payne, J.L. Andres and Joan Massagué. 1994. Betaglycan can act as a dual modulator of TGF-β access to signaling receptor: mapping of ligand binding and GAG attachment sites. *J Cell Biol* 124: 557-568.
33. Andres, J. L., K. Stanley, S. Cheifetz and Massagué J. 1989. Membrane-anchored and soluble form of betaglycan, a polymorphic proteoglycan that bind transforming growth factor-β. *J Cell Biol* 109: 3137-3145.



34. Ponce-Castañeda Verónica, López-Esparza José, Vilchis Landeros M., Mendoza R. Valentín and López-Casillas Fernando. 1998. Murine betaglycan primary structure, expression and glycosaminoglycan attachment sites. *Biochem Biophys Acta* 1384: 189-196.
35. Segarini, P. R., Seyedin, S, M. 1988. The high molecular weight receptor to transforming growth factor- $\beta$  contains glycosaminoglycan chains. *J Biol Chem* 263: 8366-8370.
36. Brown B., Christopher, Angelique S. Boyer, Raymond B. Runyan, Joey V. Barnett. 1999. Requirement of type III TGF- $\beta$  receptor for endocardial cell transformation in the heart. *Science* 283: 2080-2082.
37. Kathy A. Lewis, Peter C. Gray, Amy L. Blount, Leigh A. MacConell, Ezra Wiater, Louise M. Bilezikjian and Wylie Vale. 2000. Betaglycan binds inhibin and can mediate functional antagonism of activin signalling. *Nature* 404: 411-414.
38. José Esparza-López, J. L. Montiel, M. Vilchis-Landeros, Toshihide Okadome, Kohei Miyazono and Fernando López-Casillas. 2000. Ligand binding and functional properties of betaglycan, and Co-receptor of transforming growth factor- $\beta$  superfamily. *J Biol Chem* 276: 14588-14596.
39. López-Casillas Fernando, Cecilia Riquelme, Yoshiaki Pérez-Kato, Verónica Ponce-Castañeda, Nelson Osses, José Esparza-López, Gerardo Gonzáles-Núñez, Claudio Cabello-Verrugio, Valentín Mendoza, Victor Troncoso and Enrique Brandan. 2003. Betaglycan expression is transcriptionally up-regulated during skeletal muscle differentiation. *J Biol Chem* 278: 382-390.
40. Gerard C. Blobe, William P. Schiemann, Marie-Claude Pepin, Michael beachemin, Aristidis Moustakas, Harvey F. Lodish and Maureen D O'Connor-McCourt. 2001. Functional roles for the cytoplasmic domain of the type III transforming growth factor  $\beta$  receptor in regulating transforming growth factor  $\beta$  signalling. *J Biol Chem* 276: 24627-24637.
41. Wei Chen, Kellye C. Kirkbride, Tam How, Christopher D. Nelson, Jinyao Mo, Joshua P. Frederick, Xiao-Fan Wang, Robert J. Lefkowitz and Gerard C. Blobe. 2003.  $\beta$ -arrestin 2 mediates endocytosis of type III TGF- $\beta$  receptor and down-regulation of its signaling. *Science* 301: 1394-1397.
42. Kaye I. Stenvers, Melinda L. Tursky, Kenneth W. Harder, Nicole Kountouri, Supavadee Amatayakul-Chantler, Dianne Grail, Clayton Small, Robert A. Weinberg, Andrew M. Sizeland and Hong-Jian Zhu. 2003. Heart and liver defect and reduced transforming growth factor  $\beta$  type III receptor-deficient embryos. *Mol Cell Biol* 23: 4371-4385.
43. Gougos, A and Michelle Letarte. 1988. Identification of a human endothelial cell antigen with monoclonal antibody 44G4 produced against a pre-B leukemic cell line. *J Immunol* 141: 1925-1933
44. Qu, R., Silver MM, Letarte M. 1998. Distribution of endoglin in early human development reveals high levels on endocardial cushion tissue mesenchyme during valve formation. *Cell Tissue Res* 292: 333-343.
45. McAllister KA, Grogg KM., Johnson DW, Gallione CJ., Baldwin MA., Jackson CE., Helmbold E. A., Markel D. S., McKinnon, Murrell J, et al. 1994. Endoglin, a TGF-beta binding protein of endothelial cells, is the gene for hereditary haemorrhagic telangiectasia type 1. *Nat Genet* 8: 345-351.

46. Barbara Pece Nadia, Wrana L., J. and Letarte M. 1999. Endoglin is an accessory protein that interacts with the signaling receptor complex of multiple members of the transforming growth factor- $\beta$  superfamily. *J Biol Chem* 272: 584-594.
47. Cheifetz, S., Bellón T., Calés C., Vera S., Bernabeu C., Massagué J., and Letarte M. 1992. Endoglin is a component of the transforming growth factor- $\beta$  receptor system in human endotelial cells. *J. Biol Chem* 267: 19027-19030
48. Bellón T., Corbí A., Lastres P., Calés C., Cebrián., Cheifetz S., Massagué J. and Bernabeu C. 1993. Identification and expression of two forms of the human transforming growth factor-beta binding protein endoglin with distinct cytoplasmic regions. *Eur J Immunol* 23: 2340-2345
49. Lastres P., Bellón T., Cabanas C., Sánchez-Madrid F., Acevedo A., Gougos A., Letarte M., Bernabeu C. 1992. Regulated expression on human macrophages of endoglin, an Arg-Gly-Asp-containing surface antigen. *Eur J Immunol* 22: 393-397.
50. St-Jacques S., Cymerman U., Pece N. and Letarte M. 1994. Molecular characterization and in situ localization of murine endoglin reveal that it is a transforming growth factor-beta binding protein of endothelial and stromal cells. *Endocrinology* 134: 2645-2657.
51. Li, D., Sorensen L. K., Brooke B. S., Urness L. D., Davis E. C., Taylor D. G., Boak B. and Wendel D. P. 1999. Defective angiogenesis in mice lacking endoglin. *Science* 284: 1534-1537
52. Bourdeau A., Dumont D. J. and Letarte M. 1999. A murine model of hereditary hemorrhagic telangiectasia. *J Clin Invest* 104: 1343-1351.
53. Padgett R. W. 1999. TGF $\beta$  Signaling pathways and human diseases. *Cancer Metastasis Rev* 18: 247-259.
54. Raftery L. A and Sutherland D. J. 1999. TGF-beta family signal transduction in *Drosophila* development: from Mad to Smad. *Dev Biol* 210: 251-260
55. Attisano Liliana and Wrana J. F. 2000. Smads as transcriptional co-modulators. *Curr Opin Cell Biol* 12: 235-243.
56. Jeffrey L. Wrana. 2000. regulation of smad activity. *Cell* 100: 189-192.
57. Macias-Silva Marina , Shirin Adbollah, Pamela A. Hoodless, Rosa Pirone, Liliana Attisano and J.L. Wrana. 1996. MADR2 is substrate of the TGF $\beta$  receptor and its phosphorylation is required for nuclear accumulation and signaling. *Cell* 87: 1215-1224.
58. Tsukazaki T., Chiang T. A., Davison A. F. Attisano L. and Wrana JL. 1998. SARA, a FYVE domain protein that recruits smad2 to the TGF- $\beta$  receptor. *Cell* 95: 779-791.
59. Attisano Liliana and Si Tuen Lee-Hoeflich. 2001. The Smads. *Genome Biology* 2:1-6.
60. Attisano Liliana and Wrana J. F. 2002. Signal transduction by the TGF- $\beta$  superfamily. *Science* 296: 1646-1647.
61. Derynck R., Zhang y. And Feng X-H. 1998. Smads: transcriptional activators of TGF- $\beta$  responses. *Cell* 95: 737-740.
62. Massagué J. and David Wotton. 2000. Transcriptional control by the TGF- $\beta$ /Smad signaling system. *EMBO J* 19: 1745-1754.
63. Akiyoshi, S., Inoue, H., Hanagi, J., Kusunagi, K., Nemoto, N. Miyazono, K. and Kawabata, M. 1999. c-Ski acts as a transcriptional co-repressor in transforming growth factor- $\beta$  signaling trough interaction wit Smads. *J Biol Chem* 274: 35269-35277.

64. Luo, K., Stroschein S. L., Wang, W., Chen D., Marten E., Zhou S. and Zhou Q. 1999. The Ski oncoprotein interacts with the smad protein to repress TGF- $\beta$  signaling. *Genes Dev* 13: 2196-2206.
65. Wotton D., Lo R. S., Lee S. and Massagué J. A Smad transcriptional corepressor 1999. *Cell* 97: 29-39.
66. Lo R. S. and Massagué J. 1999. Ubiquitin-dependent degradation of TGF-activated smad2. *Nat Cell Biol* 1: 472-478.
67. Derynck Rik and Zhang E. Ying. 2003. Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF- $\beta$  family signalling. *Nature* 425: 577-584.
68. Coligan J., Dunn Ben., Ploegh H., Speicher D. and Wingfield P. Chapter: 5 production of recombinant protein. *Current protocols in protein science*. Vol 1. pp:5.4.1-5.5.18.
69. Luckow, V. A and Summers, M. D. 1988. Trends in the development of baculovirus expression vectors. *Bio/Technology* 6: 47-55.
70. Miller L.K. 1988. Baculoviruses as gene expression vectors. *Annu Rev microbiol* 42: 177-199.
71. Carbonell, L. F., Klowden, M. J., and Miller, L. K. 1985. Baculovirus-mediated expression of bacterial genes in dipteran and mammalian cells. *J virol* 85: 153-160.
72. Kitts, P. A., Ayres, M. D. and Possee, R. D. 1990. Linearization of baculovirus DNA enhances the recovery of recombinant virus expression vectors. *Nucl Acids Res* 18: 5667-5672.
73. Kitts, P. A. and Possee, R. D. 1993. A method for producing recombinant baculovirus expression vectors at high frequency. *BioTechniques* 14: 810-817.
74. O'Reilly, R. D., Miller, L. K. and Luckow, V. A. 1992. *Baculovirus expression vectors*. H. W. Freeman and Company, New York.
75. Jarvis, D. L. and Summer, M. D. 1992. *Baculovirus expression vectors*. In recombinant Dna bacines: rationale and strategies (R.E. Isaacson, ed):265-291. Marcel Dekker, New York.
76. Vilchis-Landeros M., Montiel José Luis, Mendoza Valentín Mendoza-Hernández G. and López-Casillas F. 2001. Recombinant soluble betaglycan is a potent and isoform-selective transforming growth factor- $\beta$  neutralizing agent. *Biochem J* 355: 215-222.