



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO
EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

CLONACIÓN DEL RECEPTOR TIPO III DEL
TGF- β DEL PEZ CEBRA (*Danio rerio*).

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE :
MAESTRO EN CIENCIAS (BIOQUÍMICAS)

P R E S E N T A :
ADVERQUEYDI ZÚÑIGA TOALÁ

Tutor: DR. FERNANDO LOPEZ CASILLAS



MÉXICO, D. F.

Junio 2006



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.

CLONACIÓN DEL RECEPTOR TIPO III DEL TGF- β DEL PEZ CEBRA (*Danio rerio*).

RECONOCIMIENTOS

Esta tesis de maestría se realizó bajo la dirección del Dr. Fernando López Casillas en el laboratorio 202 ote., en el Departamento de Biología Celular del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Miembros del Jurado:

Dr. Jorge Vázquez Ramos
Dra. Herminia Loza Tavera
Dra. Marina Macías Silva
Dr. Jesús Aguirre Linares
Dr. Marco A. Cerbón Cervantes

Dedico esta tesis con mucho cariño

A mis padres
Isolina y Manuel

Agradezco al Dr. Fernando López Casillas por permitirme formar parte de su grupo.

Al Dr. Ernesto Maldonado por permitirme realizar gran parte de esta tesis en su laboratorio.

A la Dra. Herminia Loza Tavera, por todas las sugerencias hechas durante este trabajo. Muchísimas gracias Herminia.

A la Dra. Rosa Navarro Gonzáles por sus comentarios durante los seminarios.

Al Med. Cir. Valentín Mendoza Rodríguez, por todas sus sugerencias para la realización de este trabajo. Por todos los consejos que me dio para que finalmente terminará este trabajo.

A todos mis compañeros del laboratorio 202 ote y del laboratorio 125 nte.

ÍNDICE DE CONTENIDO

	Página
Índice de figuras	iii
Abreviaturas	iv
Resumen	vi
I. INTRODUCCIÓN	1
1. El TGF- β	1
1.1 La Síntesis del TGF- β	2
1.2 La estructura del TGF- β	5
2. Los receptores del TGF- β	6
3. Los receptores tipo I y II	6
4. El receptor tipo III	8
4.1 Las características estructurales del betaglicano	9
4.2 La forma soluble y membranal del betaglicano	11
4.3 El betaglicano como co-receptor de inhibina	13
4.4 El betaglicano en el desarrollo cardiovascular	14
4.5 Las interacciones del dominio citoplasmático del betaglicano con los receptores tipo II	15
4.6 La expresión del betaglicano	15
4.7 La endogлина	15
5. Las proteínas Smads	16
6. El Pez Cebra como modelo de estudio en la biología del desarrollo	20
6.1 Los estadios del desarrollo del pez cebra	22
II. OBJETIVOS	25
III. RESULTADOS	26
1. Clonación del exón 5 al exón 16	28
2. Amplificación del extremo 5' del cDNA (5' RACE)	29
3. Amplificación del extremo 3' del cDNA (3' RACE)	31
4. Localización y estructura <i>in silico</i> del gen Betaglicano en <i>D. rerio</i> .	31
5. Comparación del betaglicano de pez cebra con otras especies	38
6. Expresión del betaglicano en pez cebra	38
IV. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	44

V. CONCLUSIONES	46
VI. MATERIALES Y MÉTODOS	47
1. Clonación del exón 5 al exón 16	
47	
2. Amplificación del extremo 5' del cDNA (5' RACE)	48
3. Amplificación del extremo 3' del cDNA (3' RACE)	48
4. Transcripción <i>in vitro</i> e hibridización <i>in situ</i>	49
5. Preparación de RNA total apartir de embriones	55
6. Cuidado de los peces	
57	
7. Análisis <i>in silico</i> del betaglicano	58
VII. BIBLIOGRAFÍA	59

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. El Precursor y la forma latente del TGF- β	4
Figura 2. La estructura del TGF- β	5
Figura 3. Los receptores de transducción de las señales para el TGF- β	7
Figura 4. El mecanismo de transducción de las señales del TGF- β	9
Figura 5. Las características estructurales del betaglicano	10
Figura 6. Marcado por afinidad del betaglicano en células COS-1	11
Figura 7. La estructura de los receptores tipo III (betaglicano y endogлина)	12
Figura 8. Efecto del betaglicano sobre la acción del TGF- β	13
Figura 9. Las proteínas Smads	18
Figura 10. Los dominios de las proteínas Smads y sus funciones	19
Figura 11. El pez cebra adulto	21
Figura 12. Ciclo de vida del pez cebra (<i>Danio rerio</i>)	23
Figura 13. Alineamiento entre el betaglicano murino (rat) y dos clonas de pez cebra (zv) encontradas en www.ensembl.org/Danio_rerio	26
Figura 14. Diseño de la biblioteca de cDNA de pez cebra	27
Figura 15. Obtención del cDNA del betaglicano	28
Figura 16. Amplificación del exón 5 al 16 del betaglicano (BG)	29
Figura 17. Amplificación del extremo 5' del cDNA de betaglicano (RACE)	31
Figura 18. Amplificación del extremo 3' del cDNA de betaglicano (RACE)	32
Figura 19. Secuencia completa del cDNA del betaglicano de pez cebra	34
Figura 20. Mapa genético de la distribución de intrones y exones del betaglicano	35
Figura 21. Alineamiento múltiple de los exones 13 y 14	37
Figura 22. Alineamiento múltiple entre las distintas especies de betaglicano	40
Figura 23. Transcripción <i>in vitro</i> de Betaglicano (BG) y Myo-D	41
Figura 24. Hibridaciones <i>in situ</i>	42
Figura 25. Expresión del BG desde estadios tempranos (E, epibolia) hasta estadios tardíos (Días, 2, 3 y 5).	43
Tabla 1. Superfamilia del TGF- β y sus actividades representativas	3
Tabla 2. Comparación del betaglicano de pez cebra con sus homólogos en otras especies	35
Tabla 3. Tamaño de los exones del betaglicano de pez cebra	36
Tabla 4. Tamaño de los intrones del betaglicano de pez cebra	36

ABREVIATURAS

aa	Aminoácidos
ActRII	Receptor tipo II de activina
ActRI	Receptor tipo I de activina
ALK	Activin receptor like-kinase
BAMBI	BMP and Activin receptor membrane bound inhibitor
bFGF	Factor de crecimiento para fibroblastos básico
BG	Betaglicano
BG-KO	Ratón <i>knockout</i> del gen betaglicano
BMPs	Bone morphogenetic proteins
BMPRI	Receptor tipo I de BMPs
BMPRII	Receptor tipo II de BMPs
CBP	CREB-binding protein
Cdk	cyclin-dependent protein kinase
CREB	cAMP response element binding protein
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
dpf	días post fertilización
dpp	decapentaplegic
FISH	Fluorescent <i>in situ</i> hybridization
FKBP12	Proteína Inmunofilina
FSH	Hormona Folículo Estimulante
GAGs	Cadenas de glicosaminoglicanos
GDNF	Factor nervioso de crecimiento y diferenciación
GDF	Factor de crecimiento y diferenciación
Hgs	Hepatocyte growth factor-regulated tyrosine kinase substrate
hpf	horas post fertilización
LAP	Latency-Associated Protein
LLC	Large Latent Complex
LTBP	Latent TGF- β -binding Protein
MAD	Mothers against dpp
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MEC	Matriz extracelular
MH1	Dominio de homología a MAD 1
MIS/AMH	Müllerian inhibiting substance/ Anti-Müllerian hormone
NCBI	Centro Nacional de Información Biotecnológica (USA)
NGF	Factor de crecimiento neuronal
NUP	Nested universal primer (oligonucleótido)
ORF	Open Reading Frame
pb	Pares de bases
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDP	Piruvato deshidrogenasa fosfatasa
PTU	1-fenil-2-tiourea
PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
RNA	Ácido Ribonucleico
SARA	Smad anchor for receptor activation

Ski	Sloan-Kettering Institute proto-oncogene
SLC	Small Latent Complex
Smurf 1	Smad ubiquitination regulated factor 1
SnoN	Ski-related novel gene N
TGIF	Correpresor tanscripcional de las Smads
TGF β	Factor de crecimiento transformante tipo beta.
T β RI	Receptor tipo I del TGF- β
T β RII	Receptor tipo II del TGF- β
T β RIII	Receptor tipo III de TGF- β ó betaglicano
UPM	Universal Primer Mix (oligonucleótido)
UTR	Untranslated Region

Resumen

El betaglicano o receptor tipo III del TGF- β es un proteoglicano de membrana plasmática, con un dominio extracelular grande, un pase transmembranal y una región carboxilo terminal muy conservada. El betaglicano modula el acceso del TGF- β a sus receptores de señalización; la forma membranal favorece su acceso y la forma soluble lo impide. El ratón carente del gen para el betaglicano (BG-KO) muere en el útero materno por problemas severos en el desarrollo del hígado y el corazón.

Con el objetivo de estudiar los mecanismos que determinan la letalidad embrionaria temprana en el BG-KO emprendimos la tarea de obtener el cDNA y determinar su expresión durante el desarrollo temprano del pez cebra (*Danio rerio*). La estructura primaria del betaglicano en esta especie demostró que está formada por 848 aminoácidos y presenta un 64 % de identidad comparada con el betaglicano murino. La comparación de la secuencia primaria entre estas dos especies, señala que 15 de 16 cisteínas están conservadas (excepto la que se encuentra en el péptido señal). La Ser522 es la contraparte de la Ser533 del betaglicano murino, sitio de adición de las cadenas de heparán sulfato; además, la región transmembranal y el dominio carboxilo terminal son casi idénticos en ambas especies (>90 % de identidad). El arreglo genómico de intrones y exones está conservado en ambas especies, exceptuando los exones 13 y 14 que están juntos en el pez cebra, a diferencia de lo que ocurre en especies como el ratón y el humano donde están separados. Finalmente, el RNA

mensajero del betaglicano se encuentra presente en embriones de *D. rerio* desde las 7 horas post-fertilización hasta los 5 días post-fertilización.

I. INTRODUCCIÓN

En los organismos metazoarios es esencial que las células se comuniquen con sus vecinas. Detectar lo que sucede en su ambiente y responder de manera adecuada ante diversos estímulos es una situación de sobrevivencia. Los organismos han desarrollado diversas moléculas y formas de señalización celular que les permiten saber el estado del organismo completo. El fascinante tema de la comunicación celular ha permitido a través de los últimos años dilucidar de forma bastante clara cómo las células transmiten sus mensajes a otras células específicas y como estas responden apropiadamente ante el estímulo, desarrollando el concepto de transducción de señales. La investigación en este tema ha permitido observar cómo la comunicación entre las células es bastante precisa y altamente regulada, y cuando se pierde esta precisión y/o regulación las consecuencias son nocivas para el organismo [1, 2].

1. El TGF- β

En los años 1980s se identificó un factor que tenía la capacidad de producir un fenotipo de células transformadas (promover crecimiento independiente de anclaje) en cultivos de fibroblastos, esta proteína recibió el nombre de Factor de Crecimiento Transformante tipo beta, TGF- β (“*Transforming Growth Factor type beta*”). Posteriormente se descubrió que este factor podía promover o inhibir el crecimiento celular dependiendo del tipo celular examinado [3, 4]. En general, los TGF- β s tienen efecto mitogénico en células de origen mesenquimal y un efecto antiproliferativo en células de origen epitelial, endotelial y hematopoyéticas [5, 6]. El efecto inhibitorio del TGF- β en estas células está mediado por: a) la disminución de la expresión del proto-oncogen *c-myc* (factor de transcripción que promueve la proliferación celular en muchos tejidos); b) la disminución de la expresión de la proteína fosfatasa de tirosinas Cdc25A (principal proteína implicada en remover los fosfatos inhibitorios de los complejos ciclina D-Cdk4/6, que son los motores del ciclo celular) ; y c) el aumento de la expresión de las proteínas p15Ink4b y p21Cip, cuya función es inhibir los complejos ciclina D-Cdk4/6 [7].

El TGF- β es el miembro prototipo de una superfamilia de factores de crecimiento celulares que comprende aproximadamente 30 miembros que se expresan desde *Drosophila* hasta los humanos. Esta citocina tiene funciones en el crecimiento celular, diferenciación, angiogénesis, formación de matriz extracelular, homeostasis, morfogénesis, desarrollo embrionario y la respuesta inmune. La superfamilia del TGF- β se ha dividido en varias subfamilias en

función de comparar las secuencias de los dominios bioactivos: BMP2, BMP5, GDF5, Vg1, BMP3, miembros intermedios, activinas, TGF- β y miembros distantes (tabla 1) [5, 6].

Existen tres isoformas de TGF- β en mamíferos: TGF- β 1, TGF- β 2 y TGF- β 3; en pollo se describió el homólogo de TGF- β 1 y se le denominó TGF- β 4 y en *Xenopus leavis* se ha encontrado una isoforma a la que se le asignó el nombre de TGF- β 5. Cada una de las tres isoformas en vertebrados tiene una localización cromosómica diferente; en humanos: TGF- β 1 en 19q13, TGF- β 2 en 1q41 y TGF- β 3 en 14q24 [5]. Todas las isoformas de TGF- β s están muy conservadas entre ellas y entre las especies. El TGF- β 1 maduro tiene una similitud del 97 % en varias especies de aves y de mamíferos, lo mismo es observado para las isoformas TGF- β 2 y TGF- β 3. El TGF- β 1 comparte una identidad del 74 % con el TGF- β 2 y 76 % con el TGF- β 3, y las isoformas de TGF- β 2 y TGF- β 3 comparten entre si una identidad del 82 % [8, 9]. El alto grado de identidad que comparten las tres isoformas de TGF- β y las funciones similares que de forma general tienen *in vitro*, sugiere que estas proteínas tienen funciones redundantes. Sin embargo, esto no es cierto *in vivo*. La evaluación de la función que tiene cada una de estas tres proteínas en ratones *knockout* (en los que alguno de los genes ha sido inhabilitado), claramente señala que cada una de las isoformas de TGF- β tienen funciones únicas que no pueden ser sustituidas por ninguna de las otras isoformas, al menos durante el desarrollo embrionario del ratón. En ratones *knockout* de TGF- β 1, la mitad mueren de forma intrauterina y la otra mitad que sobrevive desarrolla una respuesta inflamatoria excesiva que les produce la muerte en la tercera o cuarta semana de vida [10, 11]. En los ratones que carecen del gen TGF- β 2, dos tercios mueren justamente antes del alumbramiento, el tercio restante que nace son cianóticos y mueren minutos después. El análisis de estos ratones permite observar que tienen múltiples defectos en el desarrollo cardíaco, pulmonar, columna vertebral, en las extremidades, oído interno y aparato urogenital [12]. Los ratones *knockout* de TGF- β 3 mueren en el útero, presentando paladar hendido y defectos en el desarrollo pulmonar [13, 14]. Los ratones que carecen de ambas isoformas de TGF- β 2 y TGF- β 3 tienen una letalidad en el día 15.5 del desarrollo embrionario y los fenotipos presentados son más severos que cada una de las isoformas por separado [15].

1.1 La Síntesis del TGF- β

Todas las isoformas del TGF- β son sintetizadas como precursores diméricos y secretadas al medio extracelular como formas inactivas. La célula produce un precursor dimérico del TGF- β 1 de 390 aminoácidos por monómero, el cual tiene un sitio de corte de cuatro aminoácidos básicos que precede al dominio bioactivo (figura 1), los 112 residuos del extremo carboxilo. La pro-región amino, llamada péptido asociado de latencia (LAP) tiene las siguientes funciones: favorecer la dimerización y el plegamiento adecuado del dominio bioactivo durante la síntesis y permitir la unión a la forma activa del factor, para

Tabla 1. Superfamilia del TGF- β y sus actividades representativas.

Nombre	%	Actividades representativas
Subfamilia BMP2		
BMP2 (Dpp ^D) BMP4	100	Gastrulación, neurogénesis, condrogénesis, apoptosis interdigital.
Subfamilia BMP5		
BMP5 (60 A ^D) BMP6/Vgr1 BMP7/OP1 BMP8/OP2	61 61 60 55	Desarrollo de órganos (riñón), y neurogénesis.
SubfamiliaGDF5		
GDF5/CDMP1 GDF6/CDMP2 GDF7	57 54 57	Condrogénesis en el desarrollo de las extremidades.
Subfamilia Vg1		
GDF1 (Vg1 ^X) GDF3/ Vgr2	42 53	Inducción del mesodermo axial en ranas y peces.
Subfamilia BMP3		
BMP3/ Osteogenina GDF10	48 46	Diferenciación osteogénica, formación de hueso y quimiotaxis de monocitos.
Miembros intermedios		
Nodal (Xnr 1 a 3 ^X) Dorsalina GDF8 GDF9	42 40 41 34	Inducción del mesodermo axial, regulación de la diferenciación celular en el tubo neural e inhibición del crecimiento del músculo esquelético.
Subfamilia activinas		
Activina β A Activina β B Activina β C Activina β E	42 42 37 40	Producción de la hormona folículo estimulante y diferenciación celular eritroide, inducción de mesodermo.
Subfamilia TGF-β		
TGF- β 1 TGF- β 2 TGF- β 3	35 34 36	Control de la proliferación y la diferenciación celular, producción de matriz extracelular, inmunosupresión. Funciones importantes en el desarrollo embrionario.
Miembros distantes		
MIS/AMH Inhibina A GDNF	27 22 23	Regresión del tubo Mulleriano. Inhibición de la producción de FSH. Supervivencia de neuronas y desarrollo del riñón.

Todos los miembros en esta lista se han identificado en humano y/o ratón. En paréntesis se encuentran los homólogos importantes en *Drosophila* (^D) y *Xenopus* (^X). % es el porcentaje de identidad entre BMP2 y los respectivos polipéptidos maduros. Modificado de Massagué [6].

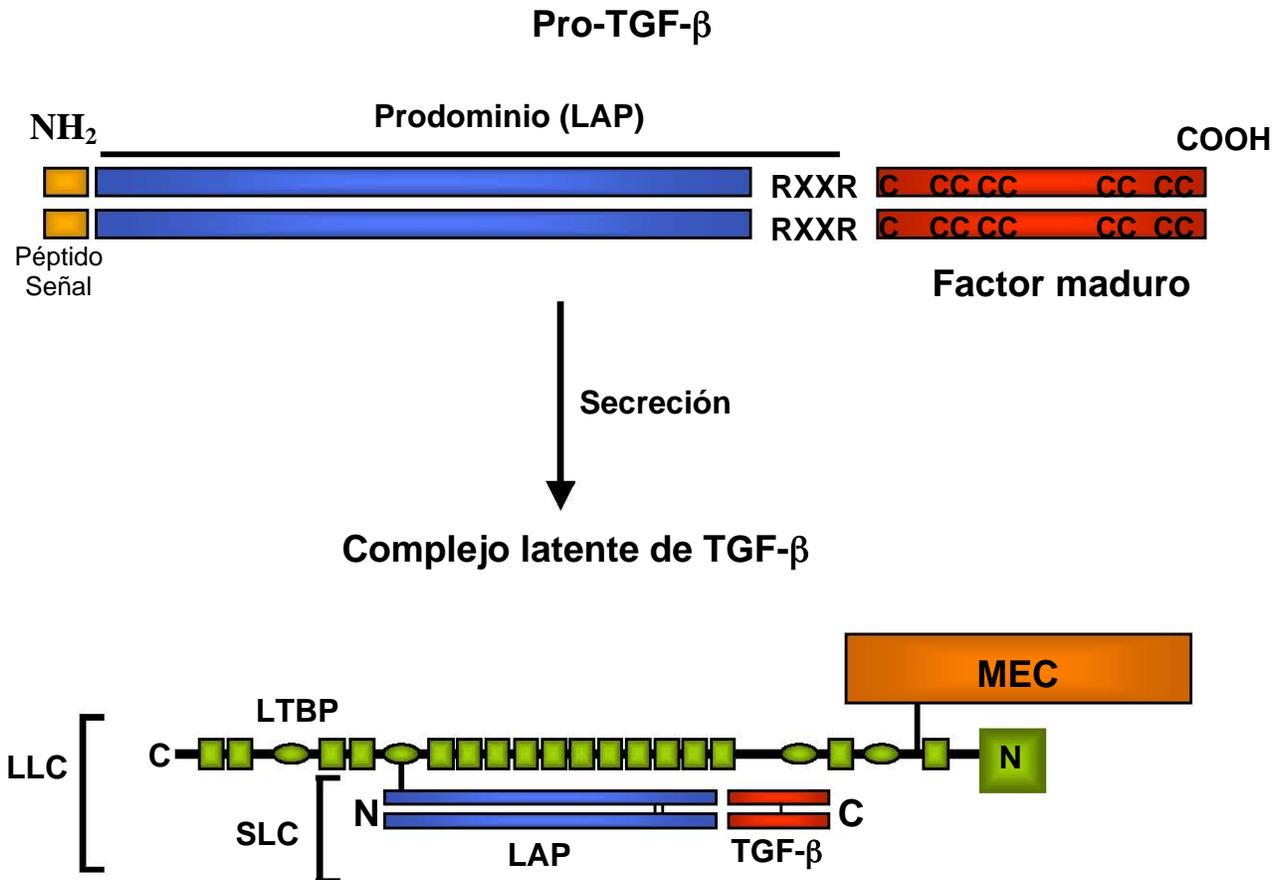


Figura 1. El Precursor y la forma latente del TGF-β. El precursor del TGF-β1 está formado por un péptido señal NH₂, un prodominio y el dominio bioactivo (factor maduro) compuesto por nueve cisteínas (C), que participan en la formación del “nudo de cistinas”. La secuencia RXXR, es el sitio de corte para liberar al dominio bioactivo. El prodominio (LAP) después de ser cortado proteolíticamente permanece asociado al dímero de TGF-β por interacciones no covalentes, formando lo que se llama el Complejo Latente Pequeño (SLC). El SLC se une a la proteína LTBP por medio de puentes de disulfuro (|) para formar el complejo latente grande (LLC). El LLC se une a la matriz extracelular (MEC). En la forma precursora del TGF-β de la parte inferior de la figura, N y C representan el dominio amino y carboxilo, respectivamente. Modificado de [5].

producir un complejo latente (el LAP-TGF-β, se le denomina complejo latente pequeño, SLC). El SLC es secretado de forma constitutiva, excepto en las plaquetas donde es almacenado en los gránulos α. El SLC se asocia a la proteína de unión al TGF-β latente (LTBP, figura 1); la LTBP favorece la unión del SLC a las miofibrillas de la matriz extracelular de algunos tipos de células [16]. En el complejo latente el TGF-β no tiene actividad, presumiblemente porque no puede unirse a sus receptores de superficie celular [17]. Para que el TGF-β tenga actividad, debe liberarse del complejo latente. *In vitro* esto se logra

mediante la exposición a detergentes o pH extremo, indicando que la interacción es de tipo no-covalente [5]. La activación del TGF- β en condiciones fisiológicas es más compleja. Se ha demostrado que una proteína de matriz extracelular, la trombospondina-1, se une al complejo latente cambiándole la conformación, lo que permite que el TGF- β sea liberado del complejo de latencia y pueda unirse a sus receptores [18]; también la integrina $\alpha v\beta 6$ puede activar al TGF- $\beta 1$, por medio de una interacción con el péptido asociado de latencia que permite que el TGF- β se una a sus receptores [19].

La vida media del TGF- β bioactivo en circulación es corta (<3 min) y la unión a diversas proteínas como la $\alpha 2$ -macroglobulina, el proteoglicano decorina, proteínas acarreadoras como albúmina o IgG, están implicadas en su degradación y/o en mantener un reservorio de TGF- β en el organismo [5].

1.2 La estructura del TGF- β

El TGF- β bioactivo es un homodímero formado por dos cadenas polipeptídicas de 112 aminoácidos unidos por un enlace tipo puente disulfuro. La estructura cristalográfica del TGF- $\beta 2$ reveló que seis de las nueve cisteínas que se encuentran en cada monómero (figura 2A), forman una estructura central rígida, conocida como el nudo de cistinas [20]. 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 [21, 22]. 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 (figura 2B). A diferencia de los otros miembros de la familia, los TGF- β s y las Activinas contienen una región amino 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 2B). Las características tridimensionales observadas en el TGF- $\beta 2$ son similares a la de otros miembros de la superfamilia. El factor de crecimiento neuronal (NGF) y el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) son dos factores diméricos cuya secuencia primaria es muy divergente de la secuencia del TGF- β y sin embargo también presentan el nudo de cistinas (figura 2C) [20]. Esto sugiere que este motivo estructural se ha conservado bastante durante la evolución, probablemente porque le confiera estabilidad a estas proteínas extracelulares [23].

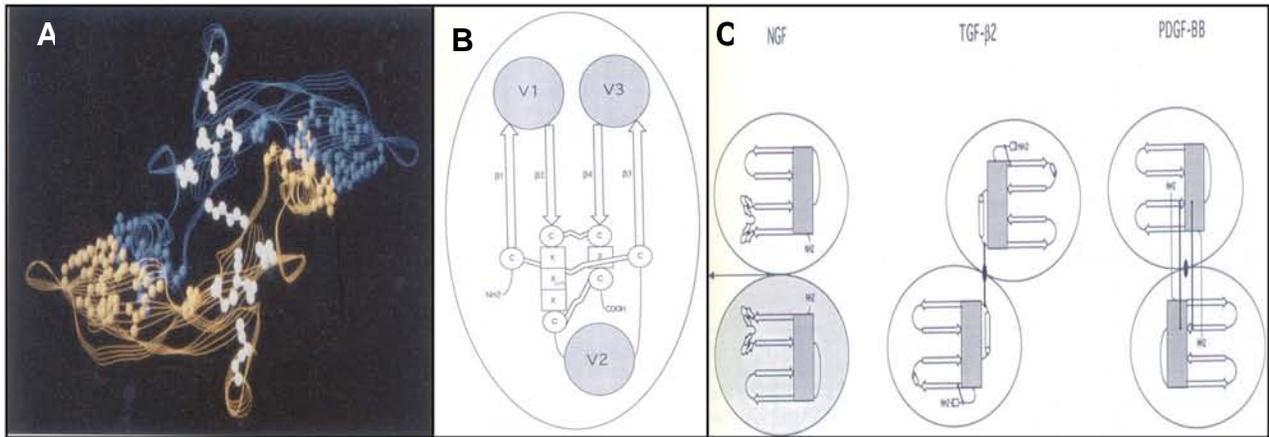


Figura 2. La estructura del TGF- β . A. Modelo de listones del TGF- β 2. Los monómeros están orientados en forma antiparalela uno del otro. B. Representación del nudo de cistinas. El “nudo de cistinas”, es una estructura central rígida formada por un anillo de ocho aminoácidos cerrados por dos puentes disulfuro y atravesados por un tercer puente. De este nudo de cistinas se extienden cuatro hojas beta antiparalelas y una alfa hélice. Una séptima cisteína forma un puente disulfuro con su correspondiente cisteína en el otro monómero. C. Representación del nudo de cistinas en otros factores de crecimiento. Proteínas que no pertenecen a la familia del TGF- β como NGF y PDGF, conservan el nudo de cistinas. Tomado de [21].

2. Los receptores del TGF- β

Los TGF- β y factores relacionados de la superfamilia del TGF- β transducen su señal a través de una familia de proteínas transmembranales con actividad de cinasas de serinas y treoninas, los receptores tipo I y II (T β RI y T β RII) [6, 24].

La búsqueda de proteínas que tuvieran la capacidad de unir al TGF- β en la superficie celular por la técnica de marcado por afinidad, reveló la existencia de varias proteínas con la propiedad de unir TGF- β y fueron clasificadas de acuerdo a su peso molecular como receptores tipo I, II y III [25]. Los receptores tipo I y II son glicoproteínas transmembranales (53 y 75 kDa, respectivamente) con actividad de cinasa de serinas y treoninas y están involucrados directamente en la vía de transducción de señales por TGF- β [26, 27], mientras que el receptor tipo III no tiene función de transducción de señal y se ha considerado que únicamente modula el acceso del TGF- β a los receptores de señalización. Los T β RI y T β RII tienen la capacidad de distinguir entre las diferentes isoformas del TGF- β , los receptores unen con alta afinidad al TGF- β 1 y TGF- β 3 y presentan una afinidad muy baja por TGF- β 2 [6].

3. Los receptores tipo I y II

Los T β RI y T β RII presentan un dominio extracelular relativamente corto (150 aminoácidos), un pase transmembranal y una región citoplasmática con actividad de cinasa de serinas y treoninas (figura 3). La región extracelular

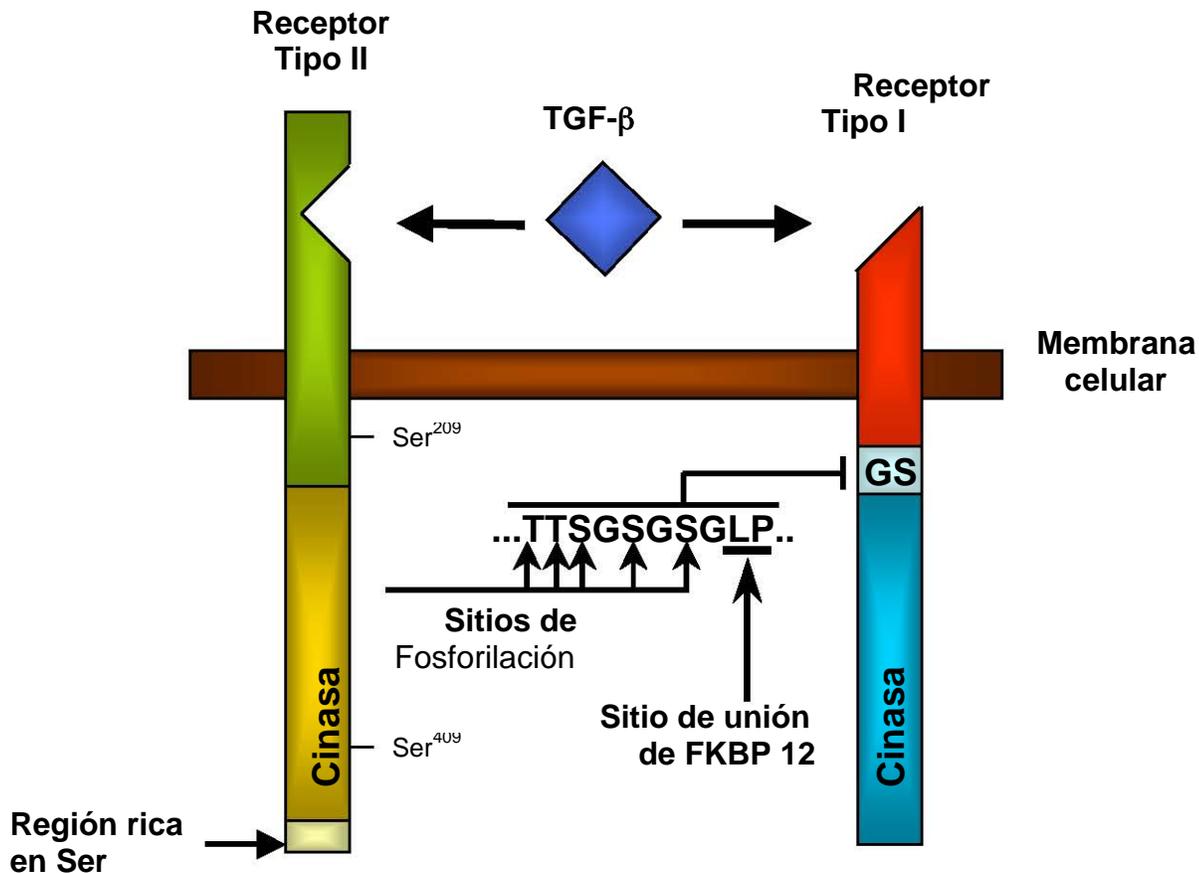


Figura 3. Los receptores de transducción de las señales para el TGF-β. Los receptores I y II son proteínas transmembranales, con un dominio de unión al ligando (en el extremo amino terminal) en la parte extracelular y un dominio de cinasa en la parte intracelular (extremo carboxilo terminal). El receptor I tiene el dominio GS altamente conservado (TTSGSGSG) que precede al dominio de cinasa, siendo un sitio para la regulación por fosforilación. La proteína FKBP12 se une al motivo estructural Leu-Pro (LP) del receptor I en su estado inactivo. El receptor tipo II tiene en su extremo carboxilo terminal una secuencia con un alto contenido en residuos de Ser, cuya función aún se desconoce. En el TβRII se indican las Ser²⁰⁹ y Ser⁴⁰⁹ necesarias para el efecto autocatalítico. Tomado de [6].

presenta glicosilaciones en residuos de asparagina y contiene 10 o más cisteínas que determinan el plegamiento de esta región [28, 29].

El receptor tipo I tiene la secuencia característica SGS GSG, llamado dominio GS (por su contenido de Gly-Ser) en el extremo amino que precede al dominio de cinasa [27]. Inmediatamente después de la región GS, tiene un motivo estructural Leu-Pro, que sirve para la unión de la proteína inmunofilina FKBP12. Esta proteína se une al dominio GS no fosforilado, inhibiendo la

señalización por TGF- β [30, 31, 32]. La proteína BAMBI (que actúa como pseudo-receptor) presenta un dominio de unión de ligando y una región citoplasmática muy corta similar al T β RI; BAMBI compite con el T β RI para incorporarse al complejo de receptores de señalización inducidos por ligando, bloqueando la señalización [33].

El receptor tipo II en su extremo carboxilo tiene una región rica en serinas y treoninas. Esta región es un sitio de regulación potencial por fosforilación [34], sin embargo su delección no tiene efecto en la señalización por TGF- β [35]. La cinasa del T β RII es activa de forma constitutiva; requiere de la fosforilación en la Ser²¹⁶ para mediar su efecto catalítico; la fosforilación en la Ser⁴⁰⁹ estimula la capacidad del receptor II para fosforilar el dominio GS del T β RI [36]. La unión del TGF- β al T β RII permite el reclutamiento del T β RI al complejo de señalización (T β RII-TGF- β -T β RI); la cinasa del T β RII fosforila múltiples serinas y treoninas en la secuencia TTSGSGSG de la región GS citoplasmática del T β RI, permitiendo la activación de la cinasa del T β RI [27]. La fosforilación en el dominio GS del T β RI produce que la superficie donde se une la proteína FKBP12 modifique su conformación y se convierta en un sitio de alta afinidad para las proteínas Smads, factores transcripcionales en la vía canónica del TGF- β (Figura 4) [37]. Los receptores I y II poseen afinidad intrínseca entre ellos, pero su asociación en condiciones fisiológicas es estimulada por la unión del TGF- β al receptor tipo II [38]. El T β RI requiere al T β RII para unir TGF- β , pero el T β RII necesita al T β RI para transducir la señal [39].

4. El receptor tipo III

Además de los receptores tipos I y II existen otras proteínas que unen al TGF- β con alta afinidad. Estas proteínas son el betaglicano y la endogлина. Aunque ocasionalmente se les ha denominado receptores tipo III del TGF- β , este término es utilizado comúnmente para referirse al betaglicano (cuando designemos al receptor tipo III en esta tesis, específicamente nos referimos al betaglicano). Células que carecen del betaglicano (myoblastos) o de la endogлина (endotelio) aún responden al TGF- β , sugiriendo que estas proteínas no participan directamente en la vía de transducción de la señal. A partir de esta observación se les denominó “receptores accesorios”. La función que se les ha sugerido es la de modular el acceso del TGF- β a los receptores de señalización [6, 40]. Sin embargo los efectos *in vivo* de la ausencia del betaglicano y de la endogлина, implican a estas proteínas en funciones biológicas indispensables. Los ratones *knockout* del betaglicano y de la endogлина presentan letalidad embrionaria, lo que indica claramente que son proteínas indispensables en el organismo [41, 42].

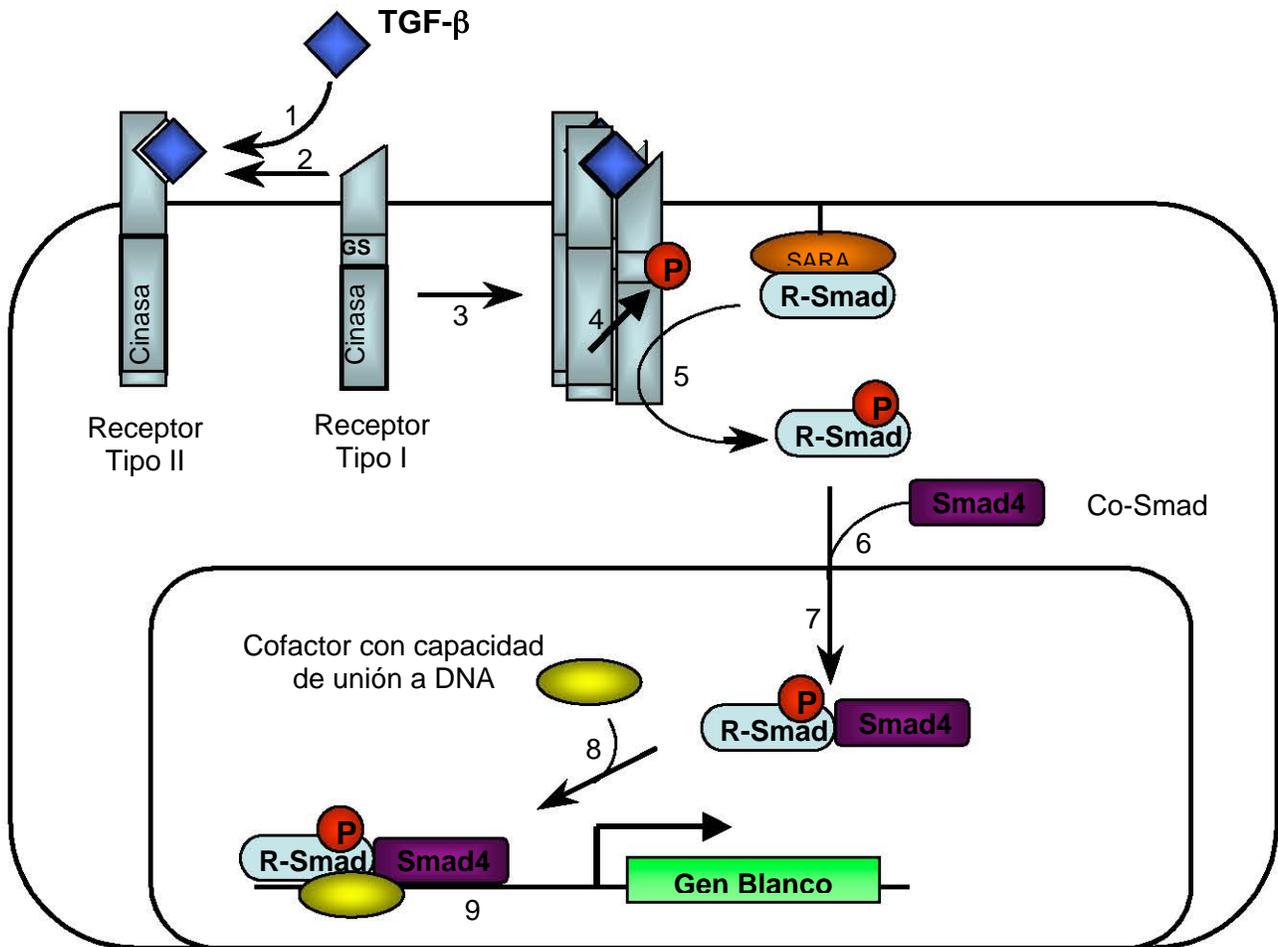


Figura 4. El mecanismo de transducción de las señales del TGF-β. El TGF-β se une al receptor tipo II (1), esto permite reclutar (2) al receptor tipo I, formando un complejo heterotetramérico (3), para fosforilar al receptor tipo I (4). El receptor I activado fosforila a la R-Smad (5), disminuyendo su afinidad por SARA y formando un complejo con la proteína Co-Smad (6), para translocarse al núcleo (7). En el núcleo este complejo se asocia con proteínas con capacidad de unión al DNA (8), para finalmente unirse y/o activar/reprimir a los promotores (9) de genes que responden al TGF-β.

4.1 Las características estructurales del betaglicano

El betaglicano es un proteoglicano transmembranal dimérico que une todas las isoformas de TGF-βs con alta afinidad [43, 44]. Posee cadenas de glicosaminoglicanos (GAGs, de tipo condroitín y heparán sulfato) no requeridas para la expresión de la proteína, ni para unir al TGF-β [45, 46]. En el betaglicano de rata la Ser⁵³⁵ es el sitio para la adición de cadenas de heparán sulfato y la

Ser⁵⁴⁶ es el sitio para la adición de cadenas de condroitín sulfato (figura 5) [45]. Ensayos *in vitro* demuestran que las cadenas de tipo heparán sulfato tienen la capacidad de unir al factor de crecimiento para fibroblastos básico (bFGF), aunque se desconoce si esta propiedad del betaglicano tiene alguna relevancia fisiológica [47]. A partir de la clonación del gen del betaglicano de rata se dedujo la estructura primaria de esta proteína. Se sintetiza como un precursor de 853 aminoácidos, con un dominio extracelular que contiene 16 cisteínas, una región transmembranal y un dominio citoplasmático de 43 residuos rico serinas y treoninas, que no tiene funciones de señalización conocidas [48, 49]. La proteína medular (“core protein”) del betaglicano tiene una masa molecular calculada de 90 785 Da. Además de las glicosilaciones en las serinas, tiene aproximadamente 10 kDa de azúcares en residuos de asparaginas. La proteína medular del betaglicano experimenta la adición de los GAGs, que le confiere un patrón característico de migración electroforética entre 280-330 kDa [48, 49, 50] (figura 6). La búsqueda de similitud con otras proteínas permitió establecer que la región extracelular en la región amino tiene similitud a la proteína endoglina (figura 7) y en su porción carboxilo (del dominio extracelular) tiene similitud a la proteína uromodulina, a los receptores espermáticos Zp2 y Zp3 y a la proteína de secreción de gránulos pancreáticos GP-2 [51, 52]. Finalmente, el dominio extracelular del betaglicano presenta al menos dos sitios de unión para TGF- β , uno reside en la región similar a endoglina (residuos 45-409, BG de rata) y el otro en la región similar a uromodulina (residuos 410-781, BG de rata) [46, 53, 54].

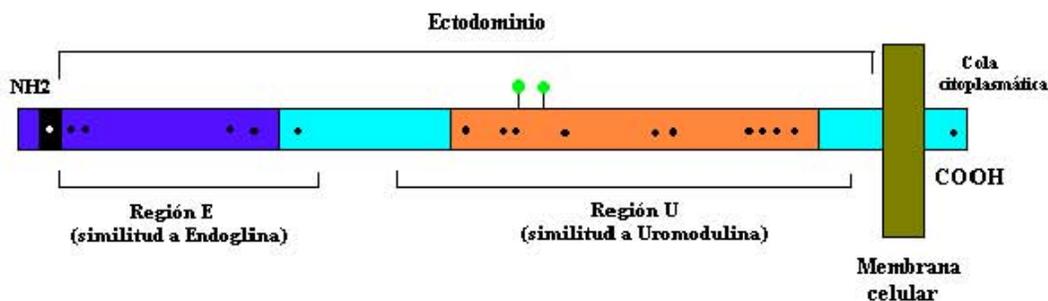


Figura 5. Las características estructurales del betaglicano. La proteína tiene un péptido señal (caja negra) en el extremo NH₂ terminal, un dominio extracelular grande, una región transmembranal y una cola citoplasmática rica en serinas y treoninas. La región amino tiene homología con la proteína endoglina (región E, color morado), la mitad yuxtamembranal del ectodominio tiene homología con la proteína uromodulina (región U, color naranja). El betaglicano tiene 2 sitios para la adición de glicosaminoglicanos (círculos verdes), y 16 cisteínas (puntos negros).

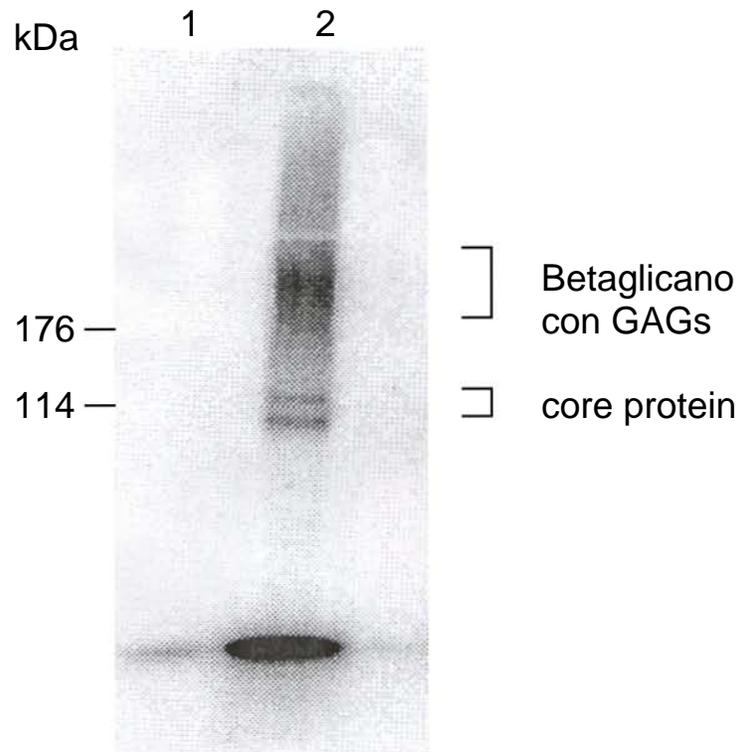


Figura 6. Marcado por afinidad del betaglicano en células COS-1. Células COS-1 fueron transfectadas en forma transitoria con el vector vacío (pCMV5, carril 1), o con el betaglicano membranal de ratón (carril 2). Imagen obtenida durante mi tesis de licenciatura.

4.2 La forma soluble y membranal del betaglicano

El betaglicano tiene la capacidad de unir las tres isoformas de TGF- β con alta afinidad (TGF- β 2>TGF- β 3>TGF- β 1) [55, 56]. El betaglicano membranal (figura 8) facilita la interacción del TGF- β con sus receptores de señalización (incrementando la señalización por la formación del complejo betaglicano-TGF- β -T β RII), propiedad conocida como función “presentadora del TGF- β ” [45, 49]. La función presentadora del betaglicano es crítica para la isoforma del TGF- β 2, debido a que ésta tiene una afinidad muy baja por los receptores T β RII y T β RI[57]. Otro nivel de complejidad está dado por la variabilidad del betaglicano. Dependiendo de la línea celular, el betaglicano parece inhibir la señalización por TGF- β debido al tipo y la abundancia de GAGs que impiden la unión del TGF- β a la proteína medular [58]. También se ha reportado que el betaglicano se encuentra de forma soluble en suero y matriz extracelular [59]. La forma soluble del betaglicano inhibe la acción del TGF- β , es decir, impide que la citocina se asocie a los receptores tipo I y II, bloqueando la señalización del TGF- β (figura 8) [46]. Por estas características funcionales al betaglicano se le ha considerado como una proteína que regula de forma dual el acceso del

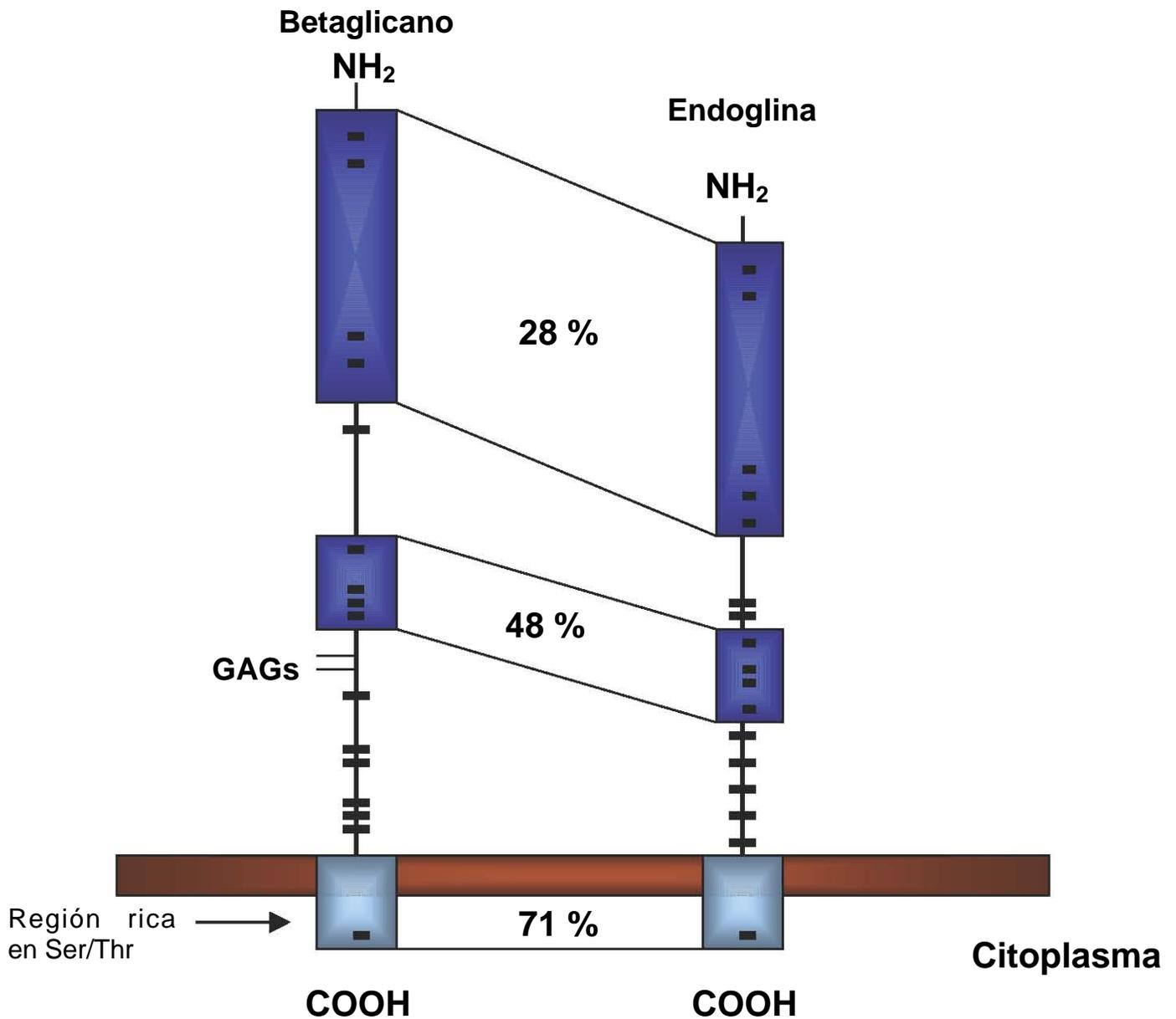


Figura 7. La estructura de los receptores tipo III (betaglicano y endoglina). Comparación entre el betaglicano (853 aminoácidos) y la endoglina (633 aminoácidos). La mayor similitud entre ambas proteínas se presenta en la región membranal y en el extremo carboxilo (71 %); dos regiones con cierta similitud se presentan en el ectodominio de ambas proteínas (cuadros azules). Las cisteínas en cada una de las proteínas están representados por marcas negras (■ / ▣). Se señala los sitios de adición de glicosaminoglicanos (GAGs) y la región rica en Ser y Thr en el extremo carboxilo del betaglicano. Modificado de [52].

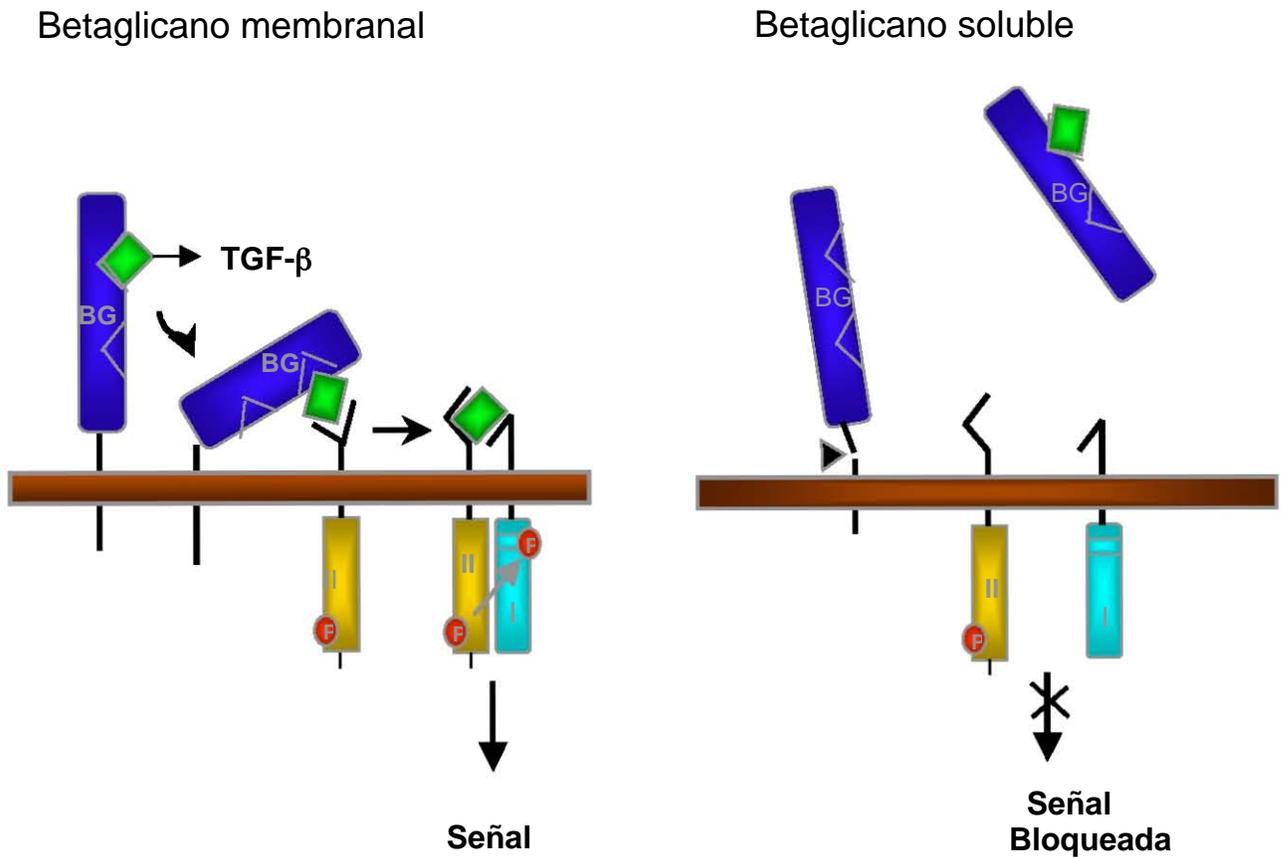


Figura 8. Efecto del betaglicano sobre la acción del TGF-β. El betaglicano membranal funciona como “presentador” del TGF-β al receptor tipo II facilitando la señalización. La forma soluble del betaglicano originado a partir de un corte proteolítico (►), impide que el TGF-β se asocie a sus receptores de señalización.

TGF-β a los receptores de señalización. El betaglicano soluble (producido de forma recombinante en células de insecto) bloquea el efecto de la sobreproducción del TGF-β en modelos experimentales como glomerulonefritis, tuberculosis y el cáncer de próstata y de glándula mamaria [60, 61].

4.3 El betaglicano como co-receptor de inhibina

Las activinas y las inhibinas son miembros de la superfamilia del TGF-β que tienen una función antagonista en la secreción celular de la hormona folículo estimulante. Los efectos de la activina están mediados de forma similar al TGF-β, mediante la formación del complejo de señalización: receptor tipo II-Activina-receptor tipo I. El receptor tipo II de activina (ActRII) también tiene la capacidad de unir inhibina (con una afinidad de aproximadamente 10 veces menor en relación a la activina), formando un complejo inhibitorio para la activina, ActRII-inhibina [62]. El betaglicano puede unir Inhibina A con alta afinidad en presencia del ActRII [63], a través de su dominio similar a uromodulina [64]. La unión de la inhibina al betaglicano favorece la formación

del complejo ActRII-inhibina, que impide la señalización mediada por activina, siendo hasta ahora el modelo que mejor explica la función antagónica que ejerce la inhibina sobre la activina [62]. También las Proteínas Morfogénicas de Hueso (BMPs) utilizan al ActRII (y al BMPRI, ALK3 y ALK6) en su vía de señalización [65]. Luego entonces, la formación del complejo ActRII-inhibina, también inhibe la señalización por BMPs. La inhibina interacciona directamente con el BMPRII en presencia del betaglicano [66]. Esto sugiere que el betaglicano es un co-receptor que modula el acceso de varios ligandos de la superfamilia del TGF- β . Un reporte más reciente, indica que el betaglicano participa en una vía de señalización de forma independiente de TGF- β a través de la activación de la vía de p38 (MAPK) [67].

4.4 El betaglicano en el desarrollo cardiovascular

Existen varias evidencias que sugieren que el betaglicano participa en el desarrollo embrionario del corazón. El T β RII y el betaglicano participan en la transformación epitelio-mesenquimal en el corazón embrionario, mecanismo necesario para formar las válvulas del corazón. El tratamiento con un anticuerpo contra el betaglicano, impide que las células endoteliales que se colocan en el lumen de las regiones de los cojinetes (primordio de las válvulas) en explantes de pollo, se transformen en células mesenquimales y su posterior migración, proceso requerido para formar las válvulas del corazón [68, 69]. El patrón de expresión del TGF- β 2 durante el desarrollo murino sugirió que podría estar participando en el desarrollo cardíaco [70]. Durante el desarrollo embrionario del pollo se ha observado que el T β RII y el betaglicano se co-expresan en las válvulas cardíacas [71]. Los ratones *knockout* del TGF- β 2 presentan una letalidad poco antes o durante el parto, teniendo problemas en la columna vertebral, pulmones, oído interno, aparato urogenital y sistema cardiovascular [12]. Los ratones *knockout* del betaglicano detienen su desarrollo en el día 13.5 embrionario, presentando problemas cardiovasculares y hepáticos [42]. Por muchos años la función principal que se le ha asignado al betaglicano es la de presentador del TGF- β 2 [45]. La comparación de ambos fenotipos, señala coincidencias únicamente en los defectos cardíacos; por lo que se sugiere que el betaglicano pudiera estar participando en otras funciones aún desconocidas para esta proteína. El mapeo genético del betaglicano humano por técnicas citogenéticas y FISH, ha reportado su localización en el cromosoma 1 en la banda 1p32-33 [72], sin embargo la secuenciación del genoma humano logró asignar con mayor exactitud que el gen-betaglicano se encuentra en la posición genómica 1 p21-22 (NCBI). Un estudio realizado en humanos reportó que un “grupo de pacientes” que tienen susceptibilidad a defectos cardíacos congénitos con un patrón autosómico dominante y penetrancia incompleta mapea en el *locus* 1 p21-31 [73]. Todos estos datos sugieren una posible participación del betaglicano en la formación de las válvulas del corazón y probablemente esta función se deba a la acción conjunta que tiene con el TGF- β 2 [74].

4.5 Las interacciones del dominio citoplasmático del betaglicano con los receptores tipo II

El dominio citoplasmático del betaglicano tiene un alto contenido de serinas y treoninas (42 %), sugiriendo sitios potenciales de regulación por fosforilación [48, 49]. *In vitro* la cinasa del T β RII puede fosforilar al dominio citoplasmático del betaglicano [75]. En líneas celulares humanas, se ha reportado que la cinasa del T β RII fosforila a la Thr⁸⁴¹ del betaglicano permitiendo a la β -arrestina 2 unirse al betaglicano fosforilado. Este evento desencadena la endocitosis del complejo betaglicano-T β RII, apagando (“down-regulation”) la vía de señalización del TGF- β [76]. Un dato más reciente indica que betaglicano tiene la capacidad de inducir una respuesta del TGF- β , independiente de ligando, y esta al parecer depende del dominio citoplasmático del betaglicano [67]. Estos datos empiezan a esclarecer algunas funciones del dominio citoplasmático del betaglicano, que está muy conservado en todas las especies donde se ha reportado [77].

4.6 La expresión del betaglicano

El betaglicano se expresa durante el desarrollo embrionario en células del sistema nervioso, ojos, corazón (válvulas), pulmón, intestino delgado, hígado (células mesenquimales que rodean al hígado) y en el tracto urogenital [42, 71, 78]. En los tejidos adultos se ha observado su expresión desde ciertas regiones del cerebro (gonadotropos de la glándula pituitaria), gónadas (ovarios y testículos), glándula suprarrenales hasta el sinciotrofoblasto de mujeres durante el tercer trimestre de embarazo [79, 80, 81, 82]. Es interesante señalar que se han reportado transcritos de diferentes tamaños con respecto al mensajero que se reportó inicialmente (6 kb). En testículo maduro de ratas se encontró la presencia de un mRNA de 5.5 kb y otro de 3.5 kb. Otro reporte señaló la presencia de un mRNA de 2.7 kb y otro >7.5 kb, en testículo y en las glándulas suprarrenales de ratas, respectivamente. Un último reporte señaló la presencia de un transcrito de diferente tamaño al de 6 kb en ovario de pollo [83, 84, 85]. Sin embargo, hasta la fecha no se ha caracterizado con profundidad a estos transcritos, para saber con detalle que exones presentan.

El promotor del betaglicano ha sido clonado en rata y ratón. En ambos casos carece de la típica “caja TATA”, pero tienen una región rica en GC (69 %) “río arriba” del inicio de la transcripción, situación encontrada también en los genes de los otros receptores del TGF- β [86, 87]. Ensayos con el promotor murino han señalado que se induce la expresión del mRNA del betaglicano durante la diferenciación de mioblastos C2C12 a miotubos [87].

4.7 La endoglina

El otro co-receptor del TGF- β es la proteína endoglina, esta glicoproteína homodimérica presenta un dominio extracelular grande, un pase transmembranal y una región citoplasmática pequeña sin ningún motivo estructural de señalización aparente [88] (figura 7). Los sitios de expresión predominante en humanos son células de linaje linfóide y pre-eritroide, células endoteliales vasculares y el sincitiotrofoblasto de la placenta humana [88, 89]; también se ha reportado la expresión transitoria durante la formación del corazón [90]. La mutación en el gen de la endoglina genera el problema vascular autosómico dominante conocido como Telangectasia Hemorrágica Hereditaria Tipo I [91, 92]. La endoglina tiene la capacidad de unir TGF- β 1 y TGF- β 3 con alta afinidad en células endoteliales humanas pero a diferencia de betaglicano no puede unir al TGF- β 2 [52]. La unión de los TGF- β s por endoglina requiere de la co-expresión del T β RII. La endoglina también tiene la capacidad de unir Activina A, BMP2 y BMP7 en presencia de sus respectivos receptores de señalización [93].

La endoglina y el betaglicano presentan una similitud del 71 % en la región transmembranal y el dominio citoplasmático, ver figura 7. Esto sugiere que probablemente a nivel de esta región, ambas proteínas pudieran tener alguna función similar. Se han reportado dos isoformas de la región citoplasmática de la endoglina humana, la L-endoglina y la S-endoglina. Ambas isoformas tienen la capacidad de unir TGF- β , pero la S-endoglina carece de los últimos 33 residuos del dominio citoplasmático (extremo carboxilo terminal) [94].

Una de las características principales de la endoglina humana es la presencia de los residuos Arg-Gly-Asp, que lo asocia a mecanismos de adhesión celular, sin embargo la secuencia primaria murina carece de estos residuos [95, 96]. Finalmente, la inactivación genética de la endoglina en el ratón señala que esta proteína tiene una función insustituible al menos durante el desarrollo embrionario, ya que presenta letalidad embrionaria a partir del día 10–10.5 post-coito, con defectos cardiovasculares severos [41, 92].

5. Las proteínas Smads

El primer mediador intracelular descubierto que participa en la señalización del TGF- β fue la proteína MAD (Mothers against dpp), encontrada en *Drosophila*. Poco después se reportaron sus ortólogos en *C. elegans* y se les denominó SMA (en *C. elegans*, mutaciones en estos genes producían una reducción del tamaño corporal, “**Small**”) [97, 98]. La combinación de los nombres de estas dos proteínas de invertebrados, dió origen a la palabra Smads, que define a una familia de factores transcripcionales en la vía de señalización del TGF- β . En vertebrados se han encontrado ocho proteínas consideradas homólogas de Mad y Sma [6, 99, 100].

De acuerdo a sus características funcionales y estructurales las proteínas Smads se han dividido en tres familias (figura 9). Las Smads que son reguladas directamente mediante fosforilación por los receptores (por ejemplo T β RI), son las R-Smads; la Smad que se asocia con las Smads reguladas por los receptores, la Co-Smad; y las Smads que inhiben la señalización del TGF- β , las I-Smad. Entre las R-Smad se encuentran Smad2 y Smad3 que son reguladas por los receptores tipo I de TGF- β y activina (figura 9); las Smad1, Smad5 y Smad8 son reguladas por el receptor tipo I de BMPs (figura 9). Solo una proteína Co-Smad se ha reportado, la Smad4 (la forma encontrada en *Xenopus* se le denominó Smad4 β). La familia de las I-Smad está integrada por Smad6 y Smad7; estas proteínas son las más divergentes entre la familia de las Smads [101, 102, 103, 104].

Las Smads tienen dos dominios muy conservados (figura 10). En el extremo amino terminal, el dominio MH1 (homología a Mad 1) tiene la capacidad de unirse al DNA [101]. En el estado basal, el dominio MH1 inhibe la actividad biológica del dominio MH2 debido a la asociación entre estos dos dominios. En el extremo carboxilo terminal, el dominio MH2 es el responsable de la interacción con el receptor, de interaccionar con otras proteínas (Smad4, SARA, etc) y de contactar directamente con el poro nuclear para el recambio núcleo-citoplasma [101, 105]. La región de la proteína que une estos dos dominios conservados, la “región linker”, no está conservada entre la familia de las Smads, variando en longitud y secuencia entre las Smads reguladas por el receptor; esta región tiene la secuencia PXSP que es blanco de regulación (fosforilación) por las MAP-quinasas. La fosforilación de ciertos residuos de serinas en este dominio impide que las R-Smads se acumulen en el núcleo [106, 107].

En el estado basal las Smads se encuentran en el citoplasma formando homo-oligómeros. En la vía de transducción de señales del TGF- β , la cinasa del T β RI fosforila a dos residuos de serinas en la secuencia SSXS del dominio MH2 de la R-Smad [108, 109]. La estructura cristalográfica ha permitido definir que el asa L-45 de la cinasa del T β RI interacciona directamente con el asa L3 (secuencia SSXS) de las R-Smad [37]. Proteínas ancladas a la membrana como SARA, Hgs permiten reclutar a las R-Smad y colocarlas cercanas al T β RI [105, 110]. La fosforilación en la secuencia SSXS de la R-Smad produce la disociación de la proteína SARA y la exposición de una región de importe nuclear localizada en el dominio MH2 [111]. Esta fosforilación permite que las R-Smads aumenten su afinidad para asociarse con la Smad4 a través de su dominio MH2, formando complejos heterotetraméricos. Estos complejos se translocan al núcleo para unirse a la secuencia 5-CAGAC-3 (elementos de unión a Smad, poco selectivos y de baja afinidad) de promotores específicos en algunos genes que responden al TGF- β [105]. Las Smads activadas aumentan su afinidad y especificidad de interacción con el DNA a través de su asociación con co-factores que se unen al DNA [105]. La asociación del complejo Smad1-Smad4 con el factor transcripcional OAZ (“Olf-Associated Zinc Finger”, dominio de dedos de zinc) permite su unión al promotor del gen *Vent2* generando una respuesta específica de BMPs [112, 113]. Otro grupo de proteínas que permite la unión de los complejos Smads a ciertos promotores,

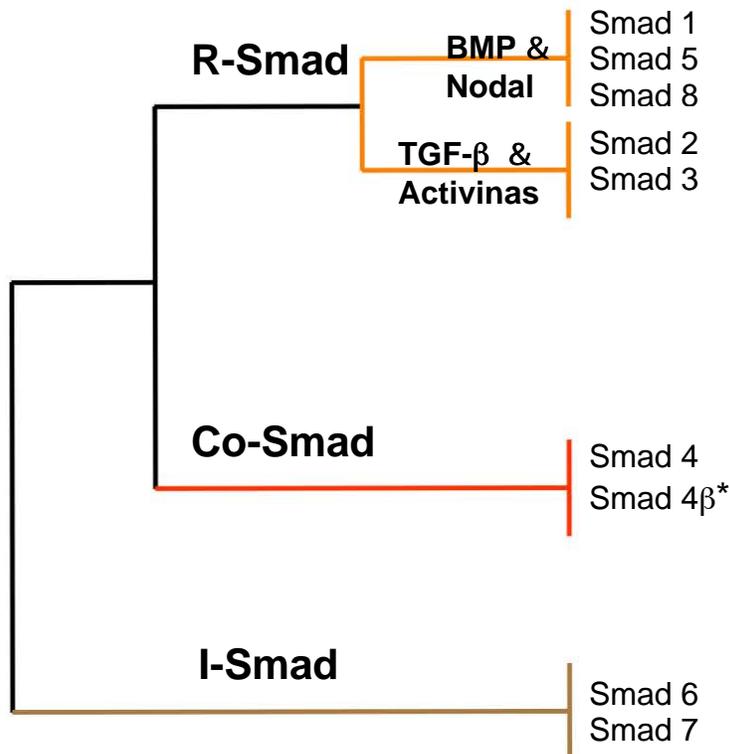


Figura 9. Las proteínas Smads. Existen tres familias de proteínas Smads: Las R- Smads, la Co-Smad, y las I-Smads. Las R-Smads participan en la vía de BMPs y en la vía de TGF-β; en *Xenopus* (*), se le ha llamado Smad 4β a la única co-Smad conocida; las I-Smads son proteínas que inhiben las vía de transducción de señal del TGF-β (Smad7) o de BMPs (Smad6).

tienen la capacidad de reclutar a co-activadores o co-represores. En este grupo se encuentra JUNB, TFE3 (“transcription factor binding to immunoglobulin heavy constant mu enhancer 3”), CBFA/AML (“core-binding factor A/acute myeloneous leukaemia”) y LEF1 / TCF (“lymphid enhancer-binding factor / T-cell-specific factor”). La activación transcripcional de ciertos genes por estos complejos requiere de la participación de acetilasas de histonas como p300 y CBP; en la represión transcripcional participan proteínas como TGIF y los proto-oncogenes Ski y SnoN [114, 115, 116].

La familia de proteínas I-Smad tiene la función de regular de forma negativa la vía de señalización del TGF-β [100, 101]. En el estado basal, las I-Smads se encuentran en el núcleo y la estimulación por el TGF-β o BMP permite el recambio del núcleo al citoplasma. La Smad7 compite con las R-Smad para interaccionar con el receptor tipo I activado y de esta forma inhibir la fosforilación de las R-Smads [117]. La Smad6 en contraste con la Smad7 no compite por los receptores tipo I; en la vía de las BMPs compite con Smad1 para asociarse a la Smad4 [118].

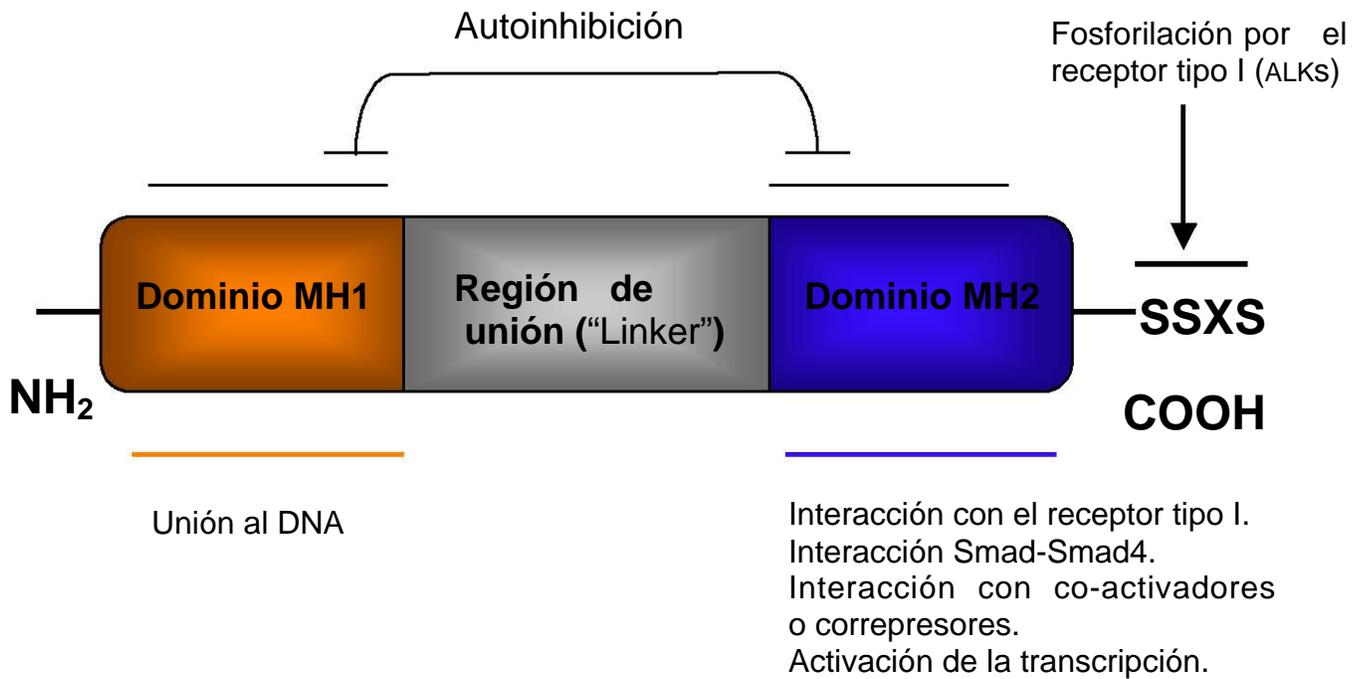


Figura 10. Los dominios de las proteínas Smads y sus funciones. Las proteínas Smads tienen dos dominios muy conservados, dominios MH1 y MH2 (homología a la proteína Mad) y están enlazados por la región de unión ("linker") poco conservada entre las Smads pero que tiene ciertas serinas que son fosforiladas por MAPK.

Las R-Smads activadas por fosforilación se translocan al núcleo para actuar sobre diversos genes, sin embargo la señalización iniciada por TGF- β o BMP tiene que apagarse. Una vía para alcanzar este objetivo, es la eliminación de las Smads fosforiladas. El mecanismo que apaga las señales en la vía de BMPs es la degradación mediada por el proteosoma. En la vía de las BMPs, la Smad 1 y la Smad5 interaccionan con Smurf1 (E3, ligasa de ubiquitinas), adicionándole moléculas de ubiquitina en ciertos residuos de lisinas de las Smads, señal molecular que les permite ser degradadas mediante el proteosoma en ciertos contextos celulares [119]. Muy recientemente se ha descrito que la piruvato deshidrogenasa fosfatasa (PDP) es una proteína encargada de inhibir la vía de las Smads. La PDP elimina ciertos fosfatos en la proteína MAD (vía Dpp en *Drosophila*). Ésta es la primera fosfatasa reportada que tiene la capacidad de inhibir la vía de las Smads [120].

5. El Pez Cebra como modelo de estudio en la biología del desarrollo

La biología del desarrollo tiene como objeto de estudio investigar como las características (genes) que son transmitidas de una generación a la siguiente se expresan durante la formación de un organismo. La embriología experimental, que fue el antecedente de la biología del desarrollo, ha utilizado diversos modelos (cada uno con diferentes ventajas que le son características) desde algunas especies de erizos de mar (*Strongylocentrotus purpuratus* y *Lytechinus variegatus*), la mosca de fruta (*Drosophila melanogaster*), la rana africana (*Xenopus laevis*), el pollo (*Gallus gallus*) hasta el ratón (*Mus musculus*) para tratar de explicar como se expresan los genes durante el desarrollo embrionario. Es así como muchos de los principios fundamentales de embriología en vertebrados fueron descubiertos por experimentos clásicos en embriones de anfibios y aves.

Dos modelos para estudiar el desarrollo embrionario se establecieron en los 70s. El nemátodo *Caenorhabditis elegans* como un modelo de organismos invertebrados, y el pez cebra (*Danio rerio*, formalmente *Brachydanio rerio*) como un organismo ideal para estudiar el desarrollo de los vertebrados [121]. Desde que George Streisinger propuso en 1981 al pez cebra, como un organismo adecuado como modelo experimental por sus características peculiares, el conocimiento en el área de la biología del desarrollo en los vertebrados ha crecido de una forma rápida [122, 123].

El pez cebra es un animal pequeño encontrado de forma natural en algunos ríos de la India (aunque se encuentra en menor proporción en ríos de agua dulce de Pakistan) y es muy frecuente encontrarlo en acuarios. Es un organismo diploide ($2n = 25$ cromosomas) con un genoma aproximado de 1.7 Gbases (un poco más de la mitad del genoma humano). El cuerpo del pez adulto es de color azul, mide de 4-5 cm de longitud, presenta líneas longitudinales doradas y plateadas (de ahí su nombre, figura 11), y generalmente se encuentra en cardúmenes [124, 125].

El pez cebra se ha convertido en un modelo ampliamente utilizado en muchos laboratorios alrededor del mundo (y la comunidad que trabaja con pez cebra sigue creciendo). Las ventajas que dieron origen a este modelo son:

1. Embriones transparentes durante las primeras 24 horas y tamaño del huevo relativamente grande (0.6-0.7 mm de diámetro), característica principal que permite observar varios de los estadios del desarrollo con un microscopio de disección [122, 126]. En la actualidad se utilizan compuestos químicos como el 1-fenil-2-tiourea (PTU) para bloquear la pigmentación después de las 24 hpf, lo que facilita seguir observando estadios más tardíos del pez con el microscopio de disección.
2. La fertilización y el desarrollo embrionario ocurren de forma externa [127]. Una gran diferencia entre los mamíferos utilizados para estudiar el desarrollo embrionario y el pez cebra, es que la fertilización de los primeros ocurre en el



Figura 11. El pez cebra adulto. Imagen característica de *Danio rerio* adulto en acuarios.

útero (ratón); pero el hecho de que estos procesos biológicos ocurra de forma externa en el pez cebra ha facilitado la visualización y manipulación a partir del estadio de una sola célula.

3. Se puede realizar un análisis genético con relativa facilidad experimental [128, 129]. Ésta es una de las ventajas que ha permitido colocar al pez cebra como un modelo muy utilizado en el estudio de la biología del desarrollo de los vertebrados. Se pueden hacer tamizajes genéticos a gran escala y obtener mutaciones recesivas con la utilización de mutágenos químicos (etil-nitrosourea) u otros agentes (DNA exógeno, retrovirus) que permiten obtener mutantes, en la tercera generación [130].

4. Desarrollo embrionario rápido y ciclo de vida relativamente corto [131]. A las 10 hpf se han definido los ejes anteroposterior y dorsoventral; a las 24 hpf se observan primordios de ciertos órganos y a los 5 dpf muchos órganos (corazón, hígado, riñones, etc.) son completamente funcionales. La edad adulta se alcanza a las 12 semanas (figura 12).

5. Facilidad para la obtención de material biológico [122]. Una pareja de peces produce en promedio de 100-200 huevos fertilizados por semana.

6. Bajos costos de mantenimiento en el laboratorio [121, 126]. Crecer y mantener al pez cebra es mucho más demandante que mantener los *stocks* de invertebrados, pero menos que mantener los *stocks* de mamíferos. Por su tamaño relativamente pequeño se pueden mantener poblaciones relativamente grandes en espacios similares a los ocupados por ratones u otros mamíferos.

7. Se han desarrollado muchas metodologías que facilitan el estudio del desarrollo embrionario del pez cebra [132]. En la actualidad se han logrado aplicar muchas técnicas genéticas que son normalmente utilizadas en invertebrados como *Drosophila melanogaster*. Se pueden observar proteínas o

la acción de elementos regulatorios (promotores, *enhancer*) *in vivo*, por la fusión con la proteína verde fluorescente [133]; transplantes y eliminación de células se realizan de forma exitosa [121]; se han producido peces transgénicos [132]; se puede hacer genética reversa, eliminando (“*knockdown*”) la expresión de genes de forma específica mediante la inyección de oligonucleótidos modificados tipo morfolinós [134]; existen mapas físicos muy precisos de cada uno de los 25 cromosomas, además que en el año 2001 el Sanger Center (www.sanger.ac.uk/) emprendió la tarea de secuenciar el genoma completo de la cepa Tübingen [135].

El avance que ha tenido la biología del desarrollo en vertebrados debido a la utilización de pez cebra es muy notable. En 1996, los laboratorios de Christiane Nüsslein-Volhard (Instituto Max-Planck, Alemania) y de Wolfgang Driever (Escuela de Medicina de Harvard, USA) llevaron a cabo un análisis a gran escala de mutantes de peces; este esfuerzo en conjunto produjo como resultado la publicación de un número completo en la revista *Development* (*Development* 1996; 123: 1-461), con un total de 37 artículos que describieron genes implicados en diversos procesos biológicos como morfogénesis, organogénesis, diferenciación y otros [125]. Por otro lado, el grupo de Kimmel ha realizado una descripción detallada de la morfología, desde la fertilización hasta las 72 hpf del desarrollo del pez, lo que proporciona una herramienta muy útil para la familiarización con este modelo [123].

5.1 Los estadios del desarrollo del pez cebra

Brevemente, el desarrollo del pez se ha dividido en 7 periodos: cigoto, divisiones tempranas (“*cleavage*”), blástula, gástrula, segmentación, faríngrula y eclosión (“*hatching*”). El periodo de cigoto (0 – 3/4 hpf) comprende desde que el huevo es fertilizado hasta que ocurre la primera división celular, alrededor de 40 min después de que ocurre la fertilización. El periodo de divisiones (“*cleavage*”) tempranas (3/4 – 2 1/4 hpf) se considera a partir de la primera división hasta la séptima división celular, estas divisiones son sincrónicas y el citoplasma de los blastómeros experimenta una división meroblástica (división celular incompleta, debido a que los blastómeros quedan conectados por puentes citoplasmáticos). El periodo de blástula (2 1/4 – 5 1/4 hpf) empieza a partir de que el blastodisco (parte superior del citoplasma que se segrega de la yema hacia el polo animal) adopta una forma de pelota hasta la gastrulación. El periodo de gástrula (5 1/4 – 10 hpf) está definido por la presencia de movimientos morfogénicos que permiten formar las capas germinales primarias y los ejes embrionarios. En el periodo de segmentación (10 – 24 hpf) se empiezan a formar los somitos (precursores de músculo y esqueleto) desde el tronco hasta la cola, siendo visibles los primordios de algunos órganos. El periodo de faríngrula (24 – 48 hpf) se refiere al tiempo en que el embrión se ha desarrollado hasta el “estadio filotípico” (estadio del desarrollo donde los embriones de diferentes especies presentan características morfológicas comunes). El periodo de eclosión (después de las 48 hpf) está definido por la liberación del embrión de su corión [131].

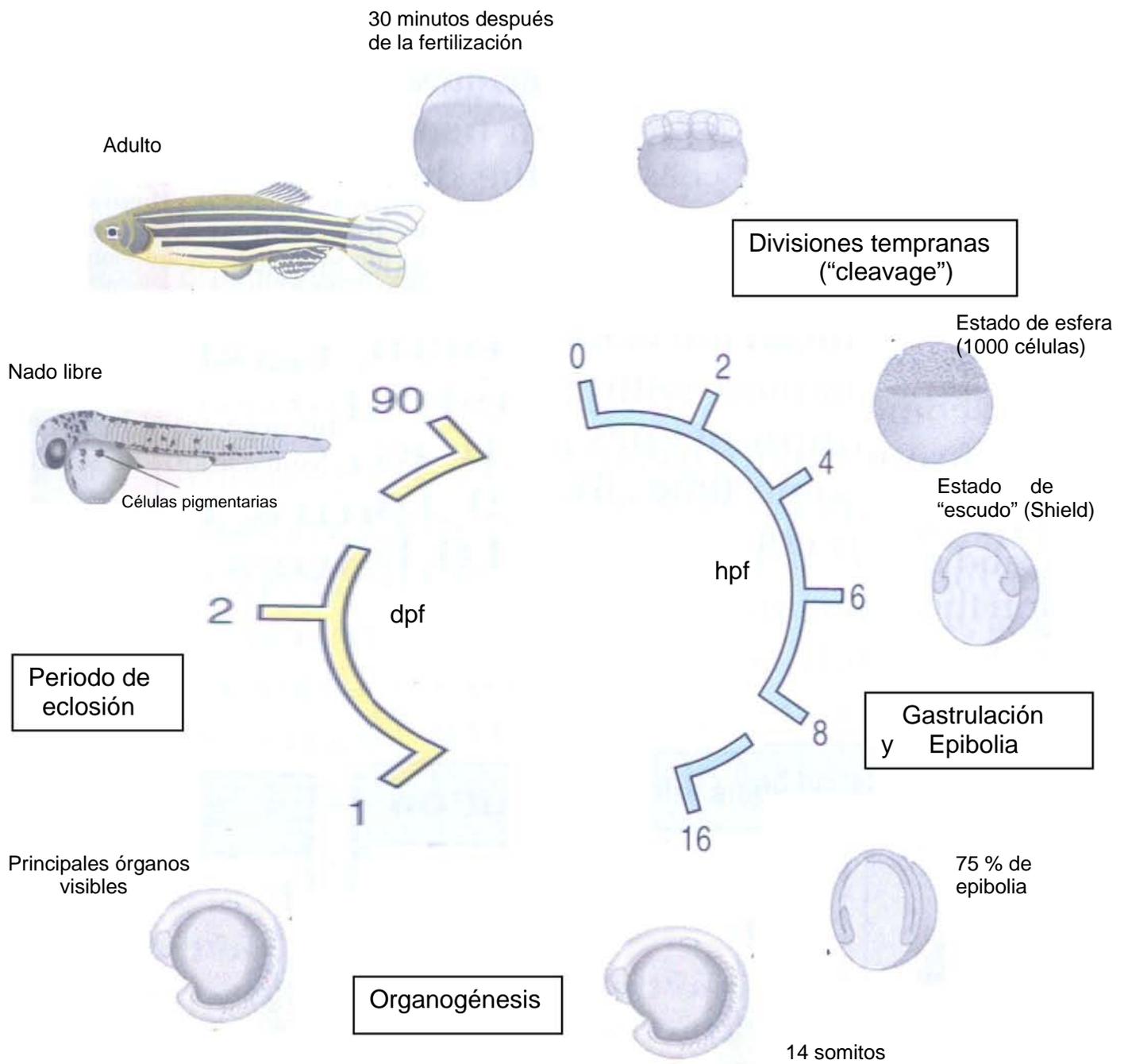


Figura 12. Ciclo de vida del pez cebra (*Danio rerio*). El desarrollo es rápido, desde la fertilización hasta que el pez tiene la capacidad de nadar de forma libre a los 2 días. Modificado de [136]. hpf: horas post-fertilización; dpf: días post-fertilización.

El pez cebra es un modelo ampliamente utilizado (para estudiar diversas enfermedades humanas, evaluación de fármacos, formación del sistema nervioso, definición de los ejes embrionarios, etc) que ha permitido el entendimiento de varios fenómenos biológicos en los vertebrados, pero su utilidad para estudiar al sistema cardiovascular no ha tenido comparación con otros modelos que se utilizan en biología del desarrollo. La evaluación de los genes implicados en la formación del sistema cardiovascular en modelos de mamíferos y aves ha sido muy difícil y poco exitosa, fundamentalmente porque el desarrollo embrionario del organismo se detiene de forma rápida en ausencia de un sistema cardiovascular funcional. El embrión de pez cebra no depende totalmente de su sistema cardiovascular funcional (el corazón es el primer órgano que se forma y funciona durante la embriogénesis de vertebrados) en los primeros días del desarrollo. Debido a que los peces reciben suficiente oxígeno por difusión simple pueden sobrevivir y continuar su desarrollo en una forma relativamente normal por varios días, aún en ausencia total de circulación sanguínea. Esta característica ha permitido un análisis detallado de animales con defectos cardiovasculares severos [137].

II. OBJETIVOS

El ratón que carece del gen del betaglicano reveló que este gen tiene funciones esenciales, al menos durante el desarrollo embrionario murino. Sin embargo, debido a la letalidad tan temprana por defectos cardiacos en el modelo murino, no fue posible estudiar la función de este gen durante todo el desarrollo embrionario. Hasta el momento no se ha encontrado algún gen que pudiera ser considerado el ortólogo del betaglicano en organismos modelos como *Drosophila* o *C. elegans*, cuyos genomas están siendo secuenciados, lo que sugiere que es un gen que no existe en invertebrados. Para estudiar los efectos que ocasiona la letalidad embrionaria debido a la ausencia del betaglicano, proponemos emplear como modelo al pez cebra. Por lo tanto, como primer paso es requisito la obtención del gen completo del betaglicano, de este organismo. Además, es importante determinar su patrón de expresión del gen durante el desarrollo, lo que sugerirá los tejidos u órganos donde participa el betaglicano.

El **objetivo general** de este trabajo es obtener el cDNA del gen del betaglicano en pez cebra.

Objetivos Particulares:

- 1) Clonar el cDNA del betaglicano de pez cebra.
- 2) Determinar la expresión del betaglicano durante el desarrollo embrionario en *D. rerio*.
- 3) Determinar la estructura del gen *in silico*.

III. RESULTADOS

Basándonos en la secuencia primaria del betaglicano murino, se buscó en la base de datos (www.ensembl.org/Danio_erio) la existencia de alguna secuencia que presentara similitud al compararla con la secuencia murina (figura 13). La base de datos de pez cebra arrojó dos secuencias que presentaban un porcentaje relativamente alto de similitud. En un alineamiento pareado, la clona genómica zv10319773 presentó 55 % de similitud con la secuencia murina y la clona genómica zv42744476 presentó una región casi perfecta de similitud (en un dominio muy conservado para las secuencias reportadas del betaglicano). Estas regiones que presentaron un alto grado de similitud fueron sitios seleccionados para el diseño de los oligonucleótidos 3.1 y 3.5 (figuras 13 y 15).

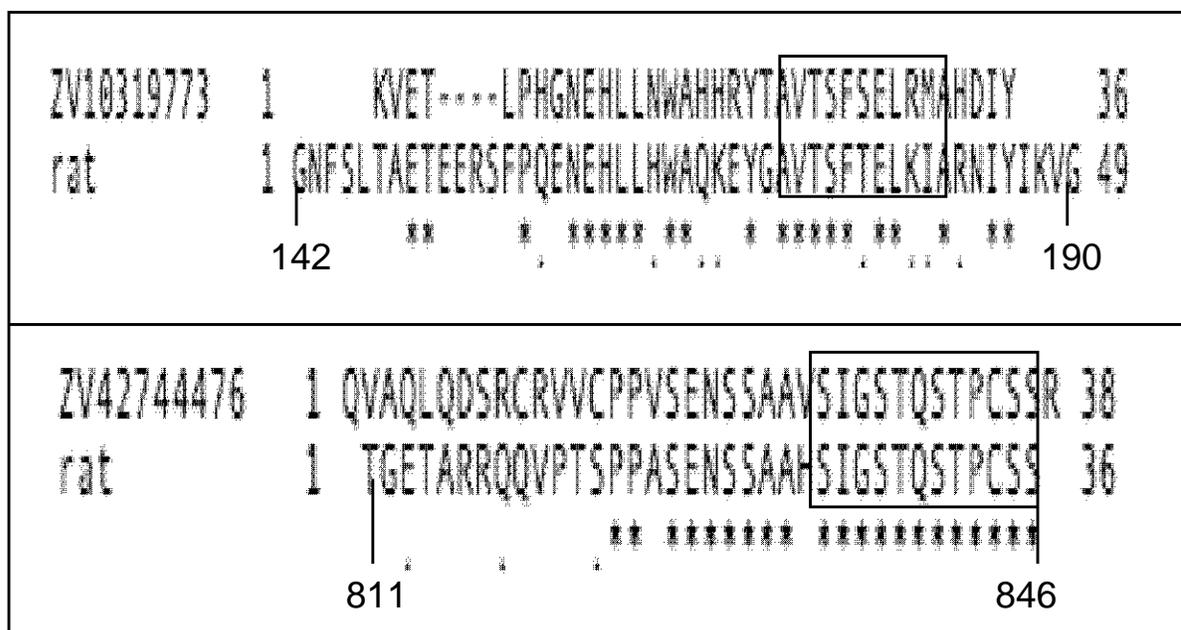


Figura 13. Alineamiento entre el betaglicano murino (rat) y dos clonas de pez cebra (zv) encontradas en www.ensembl.org/Danio_erio. En la parte superior de la figura se coloca en un recuadro el sitio seleccionado para el oligonucleótido 3.1. En la parte inferior de la figura se coloca en un recuadro el sitio seleccionado para el oligonucleótido 3.5.

Para clonar el gen del betaglicano se utilizó una biblioteca de cDNA de pez cebra. Esta se obtuvo a partir de mRNA de diversos estadios del desarrollo embrionario. Ésta biblioteca se hizo utilizando la tecnología SMART que permite agregar en los extremos 5' y 3' de cada uno de los cDNA una secuencia de referencia (CLONTECH, Cat. No. K1051-1). La figura 14 presenta en que consiste la tecnología SMART (“Switching Mechanism At 5' end of RNA Transcript”). El kit de construcción de la biblioteca de cDNA SMART™ es un método que produce cDNA completos y de alta calidad. Este protocolo utiliza

los oligonucleótidos SMART en la síntesis de la primera cadena del cDNA (ss cDNA). Una gran ventaja de este método es la producción de un alto porcentaje de clonas que tienen el extremo 5' no traducido del mRNA. El oligo (dT) se utiliza para sintetizar el ss cDNA e incorporar la secuencia SMART (Sfi I B) en el extremo 3' del cDNA. La actividad transferasa terminal de la retrotranscriptasa agrega de 3-5 nucleótidos de desoxicidina (dC) al alcanzar el extremo 5' del mRNA. Por otro lado, el oligonucleótido SMART (Sfi I A) tiene en su extremo 3' de 3-5 nucleótidos de desoxiguanidina (dG), que le permite complementarse con la secuencia dC. La retrotranscriptasa ahora cambia de molde y

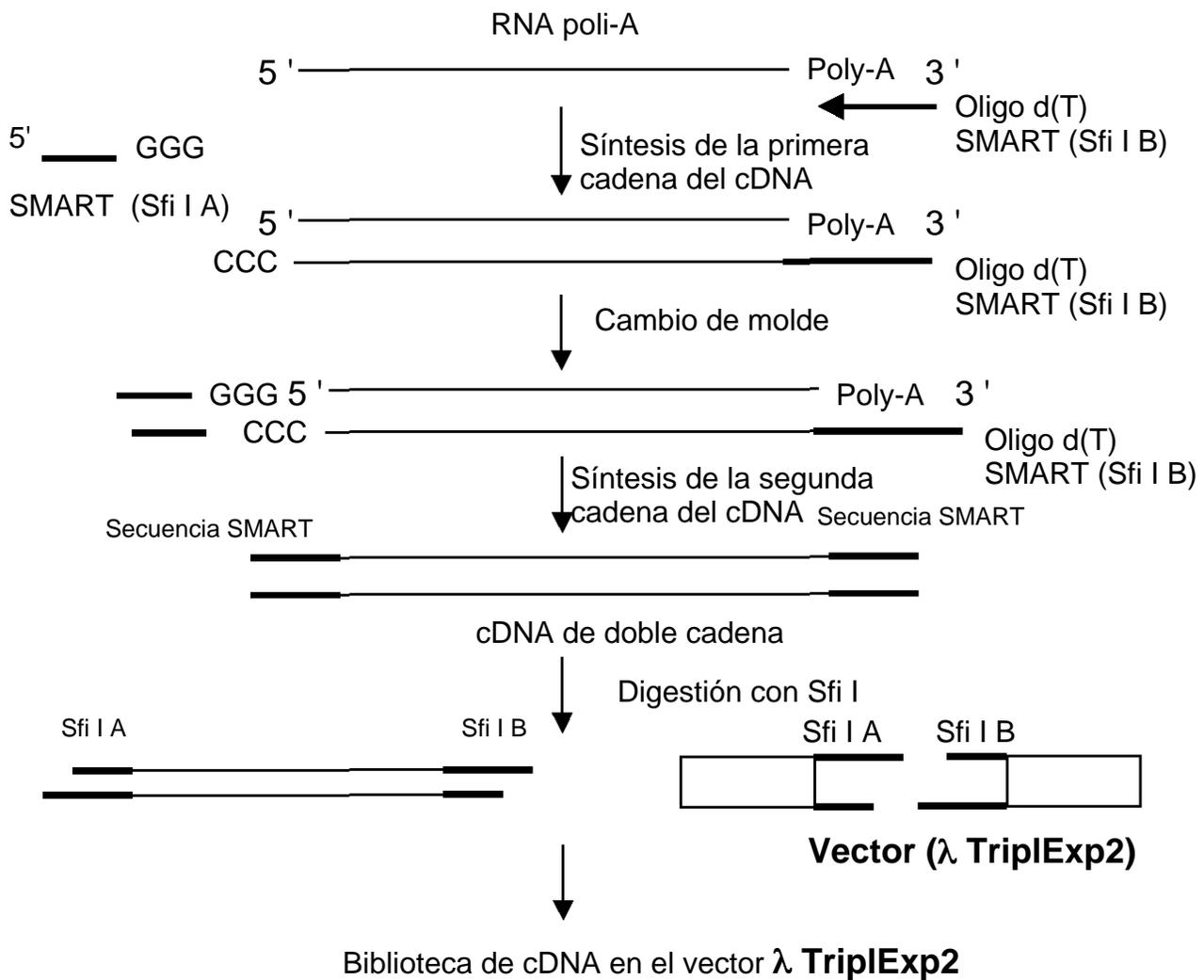


Figura 14. Diseño de la biblioteca de cDNA de pez cebra. La tecnología SMART (oligonucleótido SMART) permite agregar una secuencia que posteriormente se utilizará para obtener los extremos 5' y 3' de cada gen.

continua replicando el extremo del oligonucleótido SMART (Sfi I A). El mRNA es eliminado con la adición de NaOH. La DNA polimerasa agrega nucleótidos complementarios al ss cDNA hasta producir cDNA de cadena doble (ds cDNA). Después de obtener una mezcla enriquecida de ds cDNA, la restricción con Sfi I presente en los sitios SMART, permite generar sitios compatibles para su posterior ligación con el vector λ TriplExp2 del kit, ver la figura 14.

Los oligonucleótidos NUP y UPM utilizados en el 5' y 3' RACE tienen una secuencia complementaria en las regiones 5' y 3' del ds cDNA introducida por los oligonucleótidos SMART, (figura 15).

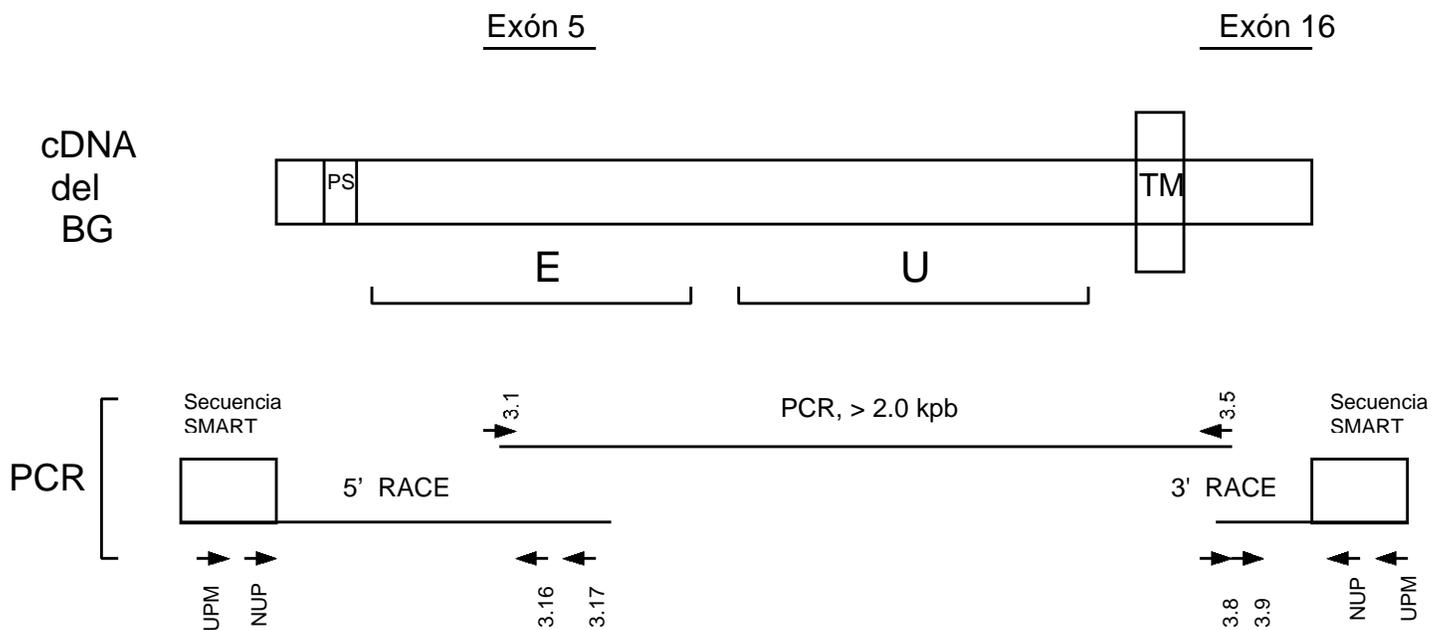


Figura 15. Obtención del cDNA del betaglicano. El cDNA del betaglicano se obtuvo con los oligonucleótidos representados en la figura. Los oligonucleótidos NUP ("Nested Universal Primer") y UPM ("Universal Primer Mix), tienen secuencias complementarias a la secuencia SMART. PS, péptido señal; TM, región transmembranal. E y U, representan la región similar a Endoglina y Uromodulina del betaglicano, respectivamente.

1. Clonación del exón 5 al exón 16

El primer objetivo fue tratar de amplificar por PCR algún producto que correspondiera al homólogo del betaglicano murino. Mediante los oligonucleótidos 3.1(5' > AAGGTGGAACTCTTCCTCATGGCA) y 3.5 (5' > CTGCTTGAACACGGTGTGCTCTGT) (figura 15), se amplificó un producto mayor a 2.0 kb

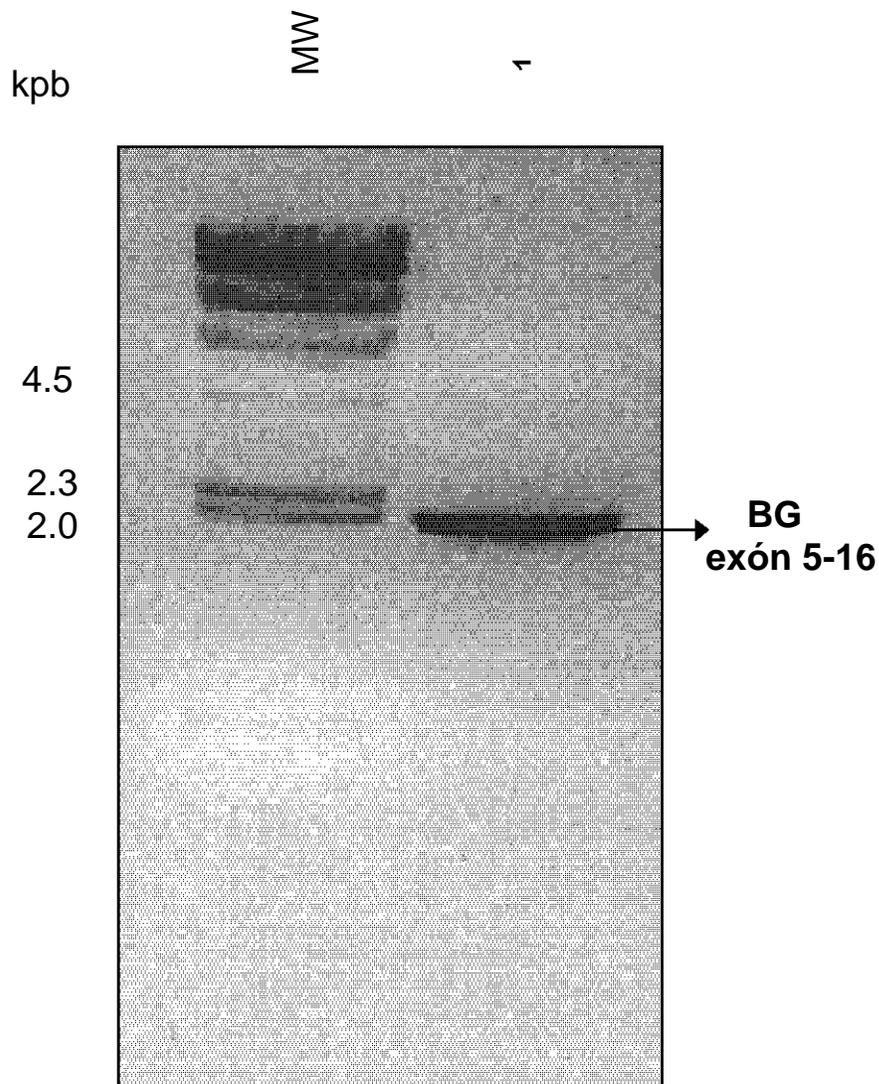


Figura 16. Amplificación del exón 5 al exón 16 del betaglicano (BG). Por PCR se amplificó un fragmento >2.0 pb a partir de una biblioteca de cDNA de pez cebra, que se obtuvo de diferentes estadios del desarrollo embrionario. En el carril 1, está la amplificación con los oligonucleótidos 3.1-3.5. MW, marcador de peso molecular.

(Figura 16), que fue secuenciado en la Unidad de Biología Molecular (UBM) del IFC. El análisis de la secuencia obtenida a nivel de aminoácidos señaló que correspondía del exón 5 al exón 16, teniendo una similitud mayor al 60 % con el gen del ratón.

La comparación entre la secuencia murina y la que se obtuvo indicaba que hacían falta aminoácidos en los extremos 5' y 3', además de las regiones no traducidas, para obtener un cDNA que contuviera al menos el ORF del mRNA. Partiendo de la secuencia de 2.0 kpb, se diseñaron oligonucleótidos para la obtención de los extremos 5' y 3' por el método de amplificación de los extremos del cDNA (RACE).

2. Amplificación del extremo 5' del cDNA (5' RACE)

El extremo 5' del cDNA se obtuvo a partir de la misma biblioteca de la que se obtuvo el fragmento de 2.0 kpb. El extremo 5' de la secuencia de 2.0 kpb fue utilizada como referencia para hacer un par de oligonucleótidos en esta región. Estos oligonucleótidos, 3.16 (5' > GTGGAATGTCACCATCCAGAGGCC) y 3.17 (5' > CTGTTTGACCGTCTTTGACACCTGC) amplificaron por PCR anidado ("nested"), un fragmento > 1.1 kb (figuras 15 y 17).

La secuenciación del fragmento > 1.1 kb se sobrelapa perfectamente con el extremo 5' de la secuencia de 2.0 kpb. El fragmento > 1.1 kb reveló 155 aminoácidos que hacían falta en el extremo 5' del cDNA del betaglicano (figuras 15 y 17).

3. Amplificación del extremo 3' del cDNA (3' RACE)

La amplificación del extremo 3' del cDNA se obtuvo a partir de la misma biblioteca de la que se obtuvo el fragmento de 2.0 kpb. El extremo 3' de la secuencia de 2.0 kpb fue utilizado como referencia para hacer un par de oligonucleótidos en esta región. Estos oligonucleótidos, 3.8 (5' > TCTACTCGCATACAGGTGGCAGC) y 3.9 (5' > ACAGAGCACACCGTGTTCAAGCAG) amplificaron un fragmento < 510 pb por PCR anidado ("nested"), figuras 15 y 18. La secuenciación de este fragmento sobrelapa perfectamente con el extremo 3' de la secuencia de 2.0 kpb. Esta secuencia tenía los últimos residuos del ORF y el extremo 3' UTR con aproximadamente 250 pares de bases después del codón de terminación de la traducción y su respectiva cola de poli-Adeninas.

La figura 19 se hizo a partir de ensamblar las tres secuencias antes referidas. El marco abierto de lectura está formado por 2544 pares de bases, que a partir de la traducción conceptual produce una proteína de 848 aminoácidos. Las regiones no traducidas en los extremos 5' y 3' (UTRs) del cDNA están formadas por aproximadamente 100 y 250 pares de bases, respectivamente. Es importante notar que al comparar las secuencias a nivel de aminoácidos entre los diversos ortólogos de BG se observa un alto grado de conservación evolutiva (tabla 2).

4. Localización y estructura *in silico* del gen Betaglicano en *D. rerio*.

Utilizando la base de datos del Sanger Center (www.sanger.ac.uk/), se logró determinar la estructura genómica del gen betaglicano. La secuencia genómica identificó un *locus* genético de aproximadamente 200 kpb en el cromosoma 14 como el sitio donde reside el betaglicano.

La comparación de la secuencia que se obtuvo experimentalmente con la base de datos permitió delimitar los sitios donde terminan cada uno de los exones en el cDNA del betaglicano, que en la figura 19 se representó por una

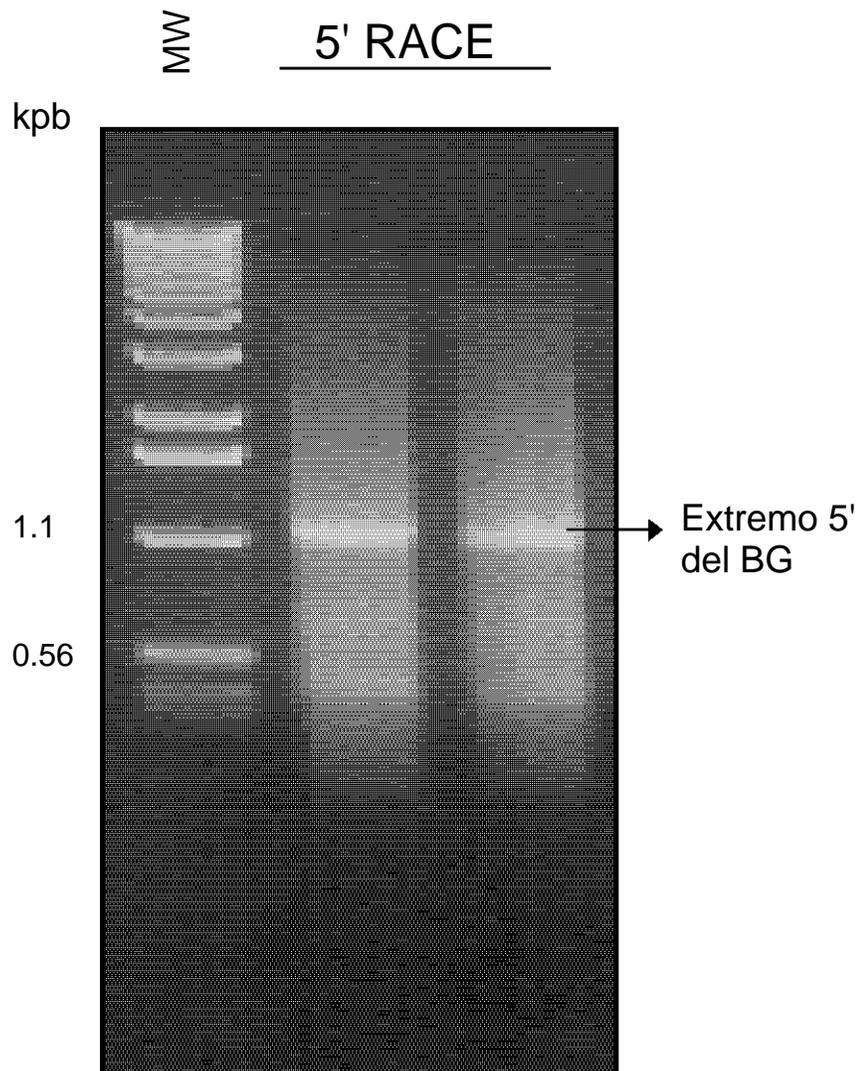


Figura 17. Amplificación del extremo 5' del cDNA de betaglicano (RACE). Amplificación del extremo 5' de cDNA con los oligonucleótidos 3.16 y 3.17. MW, marcador de peso molecular.

alternancia de colores sobre la secuencia de nucleótidos. El análisis de estos datos permitió conocer con precisión el tamaño de cada uno de los exones e intrones del gen-betaglicano (figura 20 y tablas 3 y 4).

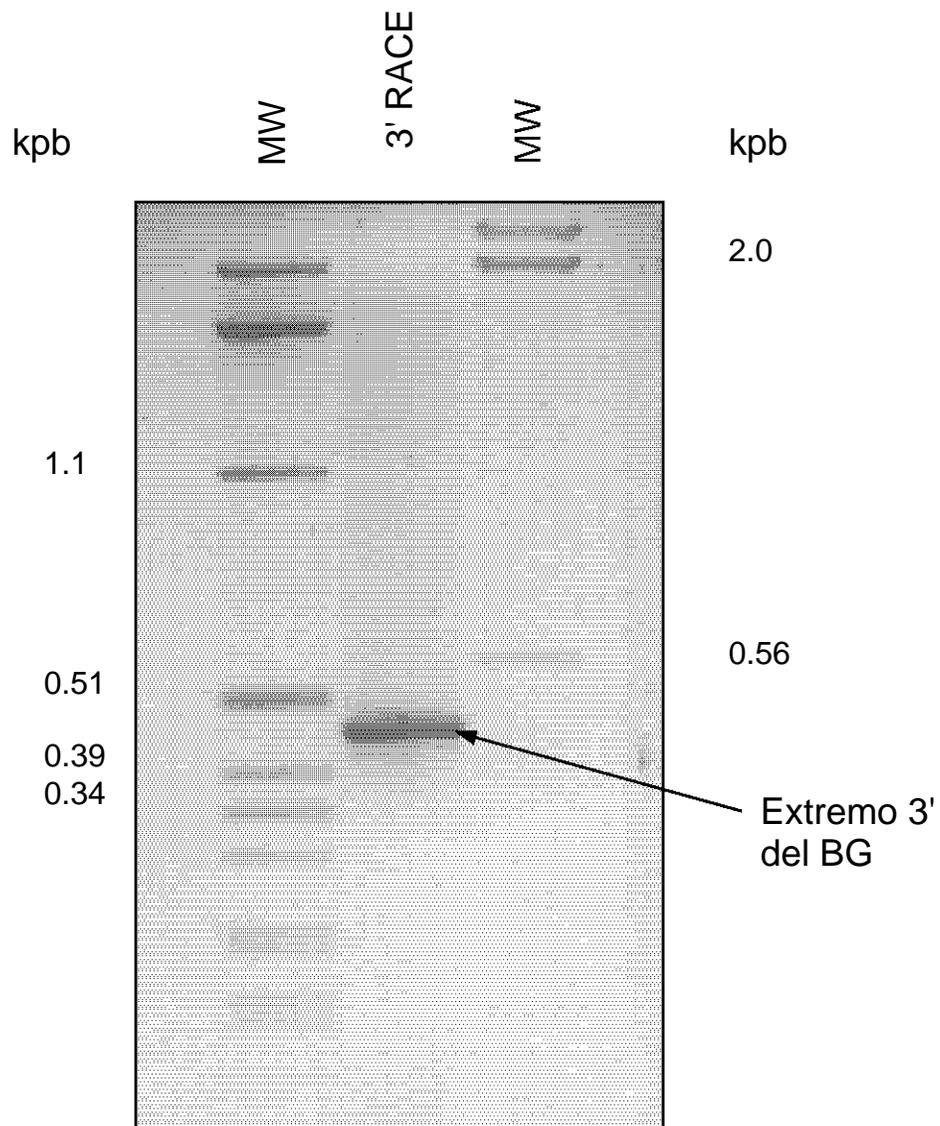


Figura 18. Amplificación del extremo 3' del cDNA de betaglicano (RACE). Amplificación del extremo 3' de cDNA con los oligonucleótidos 3.8 y 3.9 .MW, marcador de peso molecular.

1 ACCGGGGGAT TCTTCAGAGT GTGTGGGGAS CATTCAAGAA GACAGCCTGC TCTTCAGATT TCTGGCAGG
+2 M W L R A H I H P S A I L L
71 CTGGTTCAG GAAGTGTITT TCTTCAGCC ATTTGGTAA GGGCAGACAT AGCAGCCTTC GGCAGCTTC
+2 L L Y L S S L A S A G P L S N S P C E L L P V G
141 TATTCAGCCT CAGCAGCCTC GCTCTGCAG GTCATCTTC TCGAGCCTT TGTCACTTC TCCACTTGC
+2 S V G H P V G A M L K S F F A L S G C A S R G Y
211 TGTGATCAG GAGTTCAGG CAATGTAAA GAGTTTAA GCTTATAG GCTGCTTAC CAGAGCAGT
+2 T S H P G E V H I I N L R W G R A G G A R E N M
281 ACCAGCCAGC CTGAGCCTT GTCATCTTC AACCTAGAA AGCAGCCTC ACAGAGCCT ACAGAGCCT
+2 M A E V A L R L R P I Q S L H V M Q K P L V F I
351 TCGAGCCTT GCTTTCAT CTGGGGGCA TCGATCTTC GCTATCTTC CAGAGCCTT TCTTTCAT
+2 I L N S P G P I L W R V R T E K L A P G V K R I
421 TGTGATCAG GCTCAGCCTA TCTTGGGAA GCTTGGGCA GAGAACTGG CCGAGGAGT TAAAGCATT
+2 F H V V E G S E V H F E V G N F S K S G E V K V
491 TCTCATCTTC TACAGCCTC TCGATCTTC TGTGATCAG GAGTTCAGG AACCTAGAA GAGTTCAGG
+2 V E Y L P H G N E H L L N W A H H H V T A V T S
561 TGTGATCAG TCTTTCAT TCGAGCCTT TCTTAA GCTTTCAT CAGAGCCTT CAGTTCAT
+2 S F S E L R M A H G E Y I K V G E G P V F S E T
631 TGTGATCAG CCGAGCCTT CAGAGCCTT CAGAGCCTT GCTTGGGAG GCTTGGGAG GCTTGGGAG
+2 C K I G N K F L S E N T L A S Y I E P Q P S T G
701 TGTGATCAG TGTGATCAG GCTTTCAT TGTGATCAG CAGAGCCTT CAGAGCCTT CAGAGCCTT
+2 G G V L S G P G R E G E V H I I E L G A P N S S
771 TGTGATCAG CAGAGCCTT GAGTTCAGG AGAGTTCAG TATCATCTTC CTGAGCCTT CAGAGCCTT
+2 S S A F G V D V I V D L R P L G G G I P L H R G
841 CAGTTCAGG CAGTTCAGG TGTGATCAG TGTGATCAG CAGAGCCTT CAGAGCCTT CAGAGCCTT
+2 V V L L L K G E K S V W V I K A H N V M G N L
911 TGTGATCAG TGTGATCAG CAGAGCCTT GAGTTCAGG TGTGATCAG CAGAGCCTT CAGAGCCTT
+2 I E I M T S G T V S L S E G T E R L M G V S K T
981 TGTGATCAG GAGTTCAGG ACAGTTCAG TGTGATCAG CAGAGCCTT CAGAGCCTT CAGAGCCTT
+2 T V K G K L P A G S G A L I Q W A E E N G F N P
1051 TGTGATCAG AACCTAGAA GCTTTCAT GCTTTCAT CAGAGCCTT CAGAGCCTT CAGAGCCTT
+2 V I S Y I N T P V A N H F N L H L R E G V S D V
1121 GAGTTCAGG ACAGTTCAG TGTGATCAG AACCTAGAA TGTGATCAG CAGAGCCTT CAGAGCCTT
+2 V G I M G E G M L P P F S I L R N I N P L P K P
1191 TGTGATCAG GAGTTCAGG ACAGTTCAG GAGTTCAGG TGTGATCAG CAGAGCCTT CAGAGCCTT
+2 P S A R G A P P R N G F P F P F L P M D G D G S
1261 CAGAGCCTT GAGTTCAGG CAGAGCCTT TGTGATCAG GCTTTCAT CAGAGCCTT CAGAGCCTT
+2 F P P L M P P H E D S V Y L A G G P E E H G G S
1331 TGTGATCAG TGTGATCAG TGTGATCAG TGTGATCAG TGTGATCAG CAGAGCCTT CAGAGCCTT
+2 S A D V G F N V G C E K N K M V V S I G K E T L
1401 TGTGATCAG AACCTAGAA GCTTTCAT TGTGATCAG AACCTAGAA AACCTAGAA AACCTAGAA
+2 L D A N G F G R P N I T L G D S G E K A Y S M A
1471 AACCTAGAA GCTTTCAT AACCTAGAA AACCTAGAA AACCTAGAA AACCTAGAA AACCTAGAA

```

+2  T H Y I L E T P L S G C G T S K I P S H P S P V
1541 ACCGATTATA TACTGGAGAC GCTCTCTTCT 1GGCTGGCCAA CCTCCAAAAT CCCCCTGGAC CCGAGCCGAC
-2  V V L Y F N A I V I S Q S E Q K D G S G W P V D
1631 TGGCTCTCTA CACCAATGCA ATCTTATGCA CCGAATGCA GCGAAATGAT CCAATGATG CCCCCTCTCA
+2  D D E D M E P G E V L L P D D A L P E L T E R I
1681 TCAATCAAGT ATGGAGCCG CAGAAGTCTT ATTACCTGGA GATGATGAC CCGAGCCGAC ACGAGCAAT
+2  L P V N Q H H A T I L F N C T Y R K N Q D S P F
1751 TTACGCTGTA ACCGACATCA TGGGACTATT TTCTTCACT GCAGCTACCG CAGAGCCGAC GAGCTCTCT
+2  F D T S A G S D D F L V D S T A N V T F N M E L
1821 TTGACACCGA TGCCTGGATC GATGATTTTC TTGTAGACGC TACAGCCCAT GTGACTTCA ACGAGCACT
+2  L Y N N H F Q F P N S Q P F L T V T E N R P V F
1891 TTATACACAC CACTTCCAGT TCCGCTACGC CAGCTCTCTT CTCAGCTCA CTCAGACAG ACCCTCTCTT
+2  V E I A A T K A D P N L Q F M I Q T D F I S P D
1961 CCGAGCAATG CAGCAGAAA AGCAGCCCG ACCCTCTCTT TCAATGCA GACTCTCTT AAGCTCTCT
+2  D S N P A V G S E Y V V I E N I C P K D D S V V
2031 ACTCCATCTC TCCCTCTGAG TGGGACTATG TTCTTATGCA GAGCTCTCTT CCGAGCCGAC ACTCTCTCT
+2  Y Y Y P Q R G D F P I P H A Q M D K N R Y S F Y
2101 CAGCTCTCTC CAGCAGAGG ATTCTCCCAT TCTTATGCT CAGATGACA AAAAGCTT CAGCTCTCT
+2  Y R S K F N V S L L F L H C E M S L C S R R N D
2171 TACAGACAAA ATCTTCAATG CAGCTCTCTT TCTCTGACT GTAGACTCTT ACTCTCTCTT ACGAGCAAT
+2  D K E M N L A E C M L P D E A C T S L S I E S I
2241 ACGAGCAATG CAGCAGAAA GAGCTCTCTT TACCTGATG ACTCTCTCTT CCGCTCTCTT TAGAGCAAT
+2  I L L I M M N T K T L T K P I V V I S Q D M P V
2311 CCACTCTCTC ATGATGACA CAGCAGCTT GACCAACCA ATACTCTCTA TATCTGAGA CAGCTCTCT
+2  T V K V P W D E S # P R Q G I I Y V L D T P T Y
2381 ACTCTTAAAG TCTCTGGA TGAAGTCCA CCACTCTCTT CAGCAGATA GAGCTCTCTT ACTCTCTCT
+2  V Y G I A F A A F V I G A L L T G A L W F I Y S
2451 TCCCTCTCTC CAGCTCTCTT CCGCTCTCTT TCCAGCTCTT CAGCAGAAA CAGCTCTCTT TACCTCTCT
+2  S H Y G G T A A G Q Q V P S C P P V S E N S S A
2521 CAGCAGCTT CAGCAGCTT CAGCAGCTT CAGCAGCTT TCTCTCTCTT TCTCTCTCTT CAGCAGCTT
+2  A H S I G S T G S T P C S S S S V A *
2591 CAGCAGCTT TCCAGCTT CAGCAGCTT CAGCAGCTT CAGCAGCTT CAGCAGCTT CAGCAGCTT
+2  CAGCAGCTT TCCAGCTT CAGCAGCTT CAGCAGCTT CAGCAGCTT CAGCAGCTT CAGCAGCTT
2661 ACTCTCTCTT CAGCTCTCTT TTCTCTCTT ACTCTCTCTT AAGTCTCTT ACTCTCTCTT TCTCTCTCTT
2731 TCTCTCTCTT CAGCTCTCTT CAGCTCTCTT ACTCTCTCTT TCACTCTCTT TCACTCTCTT CAGCTCTCTT
2801 CAAACAAAAT TCACTCTCTT TCTCTCTCTT TCACTCTCTT AAGCTCTCTT TCTCTCTCTT AAGCTCTCTT
2871 CAGCTCTCTT AAGCTCTCTT AAGCTCTCTT AAGCTCTCTT

```

Figura 19. Secuencia completa del cDNA del betaglicano de pez cebra. El exón 1 comprende hasta el nucleótido 171. El exón 16 está formado a partir del nucleótido 2528 hasta el final de la secuencia. Cada exón está representado por la alternancia de los colores. Se marcó con flechas los oligonucleótidos empleados para obtener este cDNA. 1= Oligonucleótido 3.1; 2= Oligonucleótido 3.5; 3= Oligonucleótido 3.8; 4= Oligonucleótido 3.9; 5= Oligonucleótido 3.17; y 6= Oligonucleótido 3.16.

%	<i>Danio rerio</i>	<i>Mus musculus</i>	<i>Rattus norvegicus</i>	<i>Gallus gallus</i>	<i>Homo sapiens</i>
<i>Danio rerio</i>	100	64	63	65	63

Tabla 2. Comparación del betaglicano de pez cebra con sus homólogos en otras especies. El análisis a nivel de secuencia primaria de las proteínas demuestra un alto grado de similitud entre los BGs de diferentes especies.

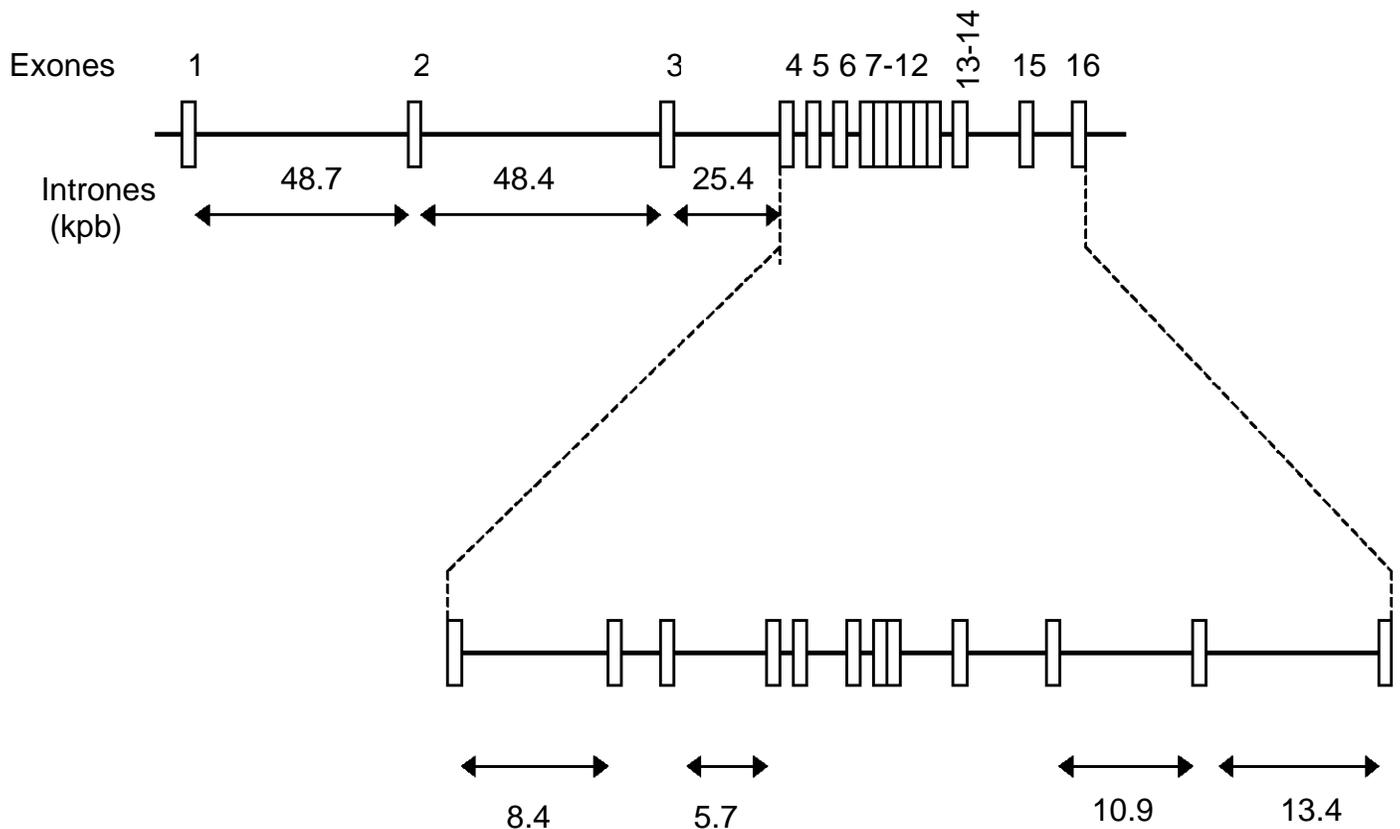


Figura 20. Mapa genético de la distribución de intrones y exones del betaglicano. Representación de exones-intrones del gen del betaglicano de pez cebra. En las tablas 3 y 4 se indica el tamaño de los exones y el de los intrones más pequeños. NOTA: Las secuencias correspondientes a los exones 13 y 14 que en ratón y humanos están separados por un intrón, en pez cebra están continuos.

No. de exón	Tamaño en pb	Localización en el ORF
1	170	1 hasta el nuc. 170
2	188	171 hasta el nuc 358
3	138	359 hasta el nuc. 496
4	184	497 hasta el nuc. 680
5	163	681 hasta el nuc. 843
6	148	844 hasta el nuc. 991
7	190	992 hasta el nuc. 1181
8	293	1182 hasta el nuc. 1474
9	156	1475 hasta el nuc. 1630
10	153	1631 hasta el nuc. 1783
11	183	1784 hasta el nuc. 1966
12	297	1967 hasta el nuc. 2263
13-14(*)	157	2264 hasta el nuc. 2420
15	108	2421 hasta el nuc. 2528
16	380	2529 hasta el nuc. 2908

Tabla 3. Tamaño de los exones del betaglicano de pez cebra. Los exones 13 y 14 en pez cebra se encuentra juntos, a diferencia del ratón donde están separados. Por propósitos de comparación se le llamó exón 13-14 (*); el exón 15 en todas las especies representa la región transmembranal. Se indica la posición de cada exón en el cDNA. nuc=nucleótido.

No. de intrón	Tamaño en pb
1	48 702
2	48 427
3	25 448
4	8 433
5	1 455
6	5 731
7	799
8	2 618
9	870
10	430
11	2 679
12	4 873
13	10 915
14	13 458

Tabla 4. Tamaño de los intrones del betaglicano de pez cebra. La longitud de los intrones fue obtenida del Sanger Center (www.ensembl.org/Danio_rerio; Versión número 5 del ensamble; zebrafish assembly version 5 (Zv5).

La comparación del diseño modular de los exones en los genomas de pez cebra y ratón, permitió observar que los exones 13 y 14 están separados en el ratón, mientras que en pez cebra se encuentran juntos (como un exón único, y para facilitar la comparación se le denominó exón 13-14). La comparación de los exones 13 y 14 en diversos genomas, señaló que en especies como *Danio rerio* (Pez cebra), *Takifugu rubripes* (Pez globo) y *Xenopus tropicalis* (Rana) se encuentran formando un solo exón y en especies como *Gallus gallus* (Pollo), *Rattus norvegicus* (Rata), *Mus musculus* (Ratón) y *Homo sapiens* (Humano) están separados por un intrón de tamaño variable, desde 3.7 kpb en el *G. gallus* hasta 10.5 kpb en *H. sapiens*; en la figura 21 se observa el alineamiento múltiple de los exones 13 y 14 del betaglicano en diversas especies. Es importante destacar que la secuencia que corresponde al exón 14 es una de las regiones más variables en todo el gen y que el siguiente exón (exón 15, siguiendo esta nomenclatura) en todos los casos corresponde a la región transmembranal del betaglicano, y como se puede ver en la figura 22 (penúltimo exón), es una región muy conservada.

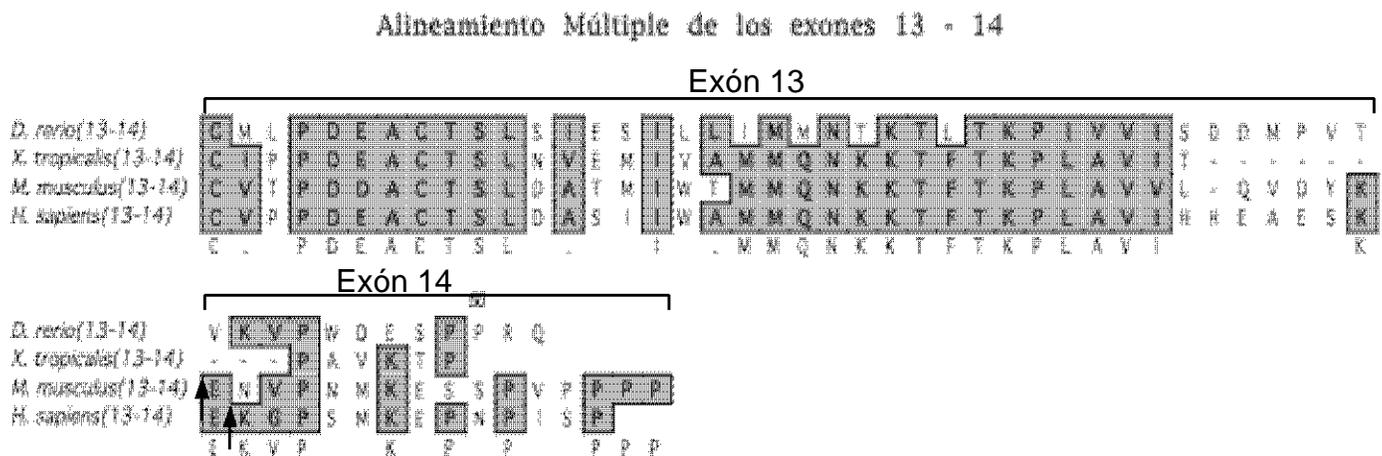


Figura 21. Alineamiento múltiple de los exones 13 y 14. En pez cebra como en *Xenopus* los exones 13 y 14 están juntos, mientras que en ratón y humano estos exones están separados por un intrón (ver las flechas, que señalan donde termina el exón 13).

5. Comparación del betaglicano de pez cebra con otras especies

Hasta ahora se han reportado las secuencias de betaglicano en *G. gallus*, *R. norvegicus*, *M. musculus*, *Sus scrofa* y *H. sapiens*. La comparación a nivel de secuencia de aminoácidos entre estas especies y la de *D. rerio*, demuestra un alto grado de conservación evolutiva entre estos ortólogos (figura 22 y la tabla 2). Es importante señalar el alto grado de identidad (mayor al 90 %) entre la región transmembranal y el dominio citoplasmático en todas las especies, lo que sugiere una función conservada de esta región (figura 22, últimos dos exones).

Finalmente, la búsqueda de algún gen que pudiera ser considerado el ortólogo de betaglicano en otras especies, identificó al betaglicano a partir de especies como *Xenopus tropicalis* y *Takifugu rubripes*, lo que sugiere que este gen solo se encuentra en vertebrados.

6. Expresión del betaglicano en pez cebra

Para evaluar los tejidos de expresión del betaglicano en embriones completos de *D. rerio* se emprendió la tarea de hacer hibridaciones *in situ* en diversos estadios del desarrollo embrionario del pez. Como primer paso para hacer las hibridaciones, se subclonó un fragmento de 0.67 kpb (sitios de restricción *Apa I*-*Cla I*, que corresponde aproximadamente del exón 5 al exón 8) en el vector pBluescript (en el que en los extremos del sitio de clonación múltiple se encuentran los promotores de las T3 y T7 RNA polimerasas). La figura 23 muestra la sonda RNA-antisentido que se utilizó para las hibridaciones *in situ*.

Se realizaron hibridaciones *in situ* en embriones completos de diversos estadios del desarrollo: 3 hpf, 6 hpf, 9 hpf, 16 hpf, 20 hpf, 24 hpf sin encontrar sitio alguno de expresión del betaglicano. Como controles positivos para constatar que la técnica estuviera funcionando adecuadamente se hizo de forma paralela las hibridaciones *in situ* con los genes Sonic Hedgehog y *MyoD* (figura 24), cuyo patrón de expresión corresponde con el previamente descrito en la literatura [138, 139].

La pigmentación del pez empieza después de las 24 hpf. Ésto hace cada vez más difícil observar la expresión de genes por hibridación *in situ* en el pez completo. Sin embargo, el tratamiento con inhibidores de la pigmentación como el 1-fenil 2-tiourea (PTU) permite observar tinciones en estadios posteriores. Debido a que no logramos detectar expresión en estadios tempranos (hasta las 24 hpf), se trataron a los peces con PTU y se evaluó la expresión a las 48 hpf (figura 24 E y F). Al parecer existe cierta señal de expresión (aunque el patrón es difuso y no permite saber con claridad cual es la estructura cuando se compara con el control negativo (sonda, RNA-sentido). Sin embargo, este resultado es **preliminar** ya que solamente se realizó una sola vez y será necesario repetirlo y corroborar si este dato es reproducible y específico de betaglicano.



Figura 22. Alineamiento múltiple entre las distintas especies de betaglicano. Se puede observar el alto grado de similitud que presentan los homólogos de betaglicano en diferentes especies donde se han clonado. En el DNA genómico se determinó los límites de cada exón, que en esta figura (traducción conceptual del betaglicano en diversas especies) están representados por líneas verticales.

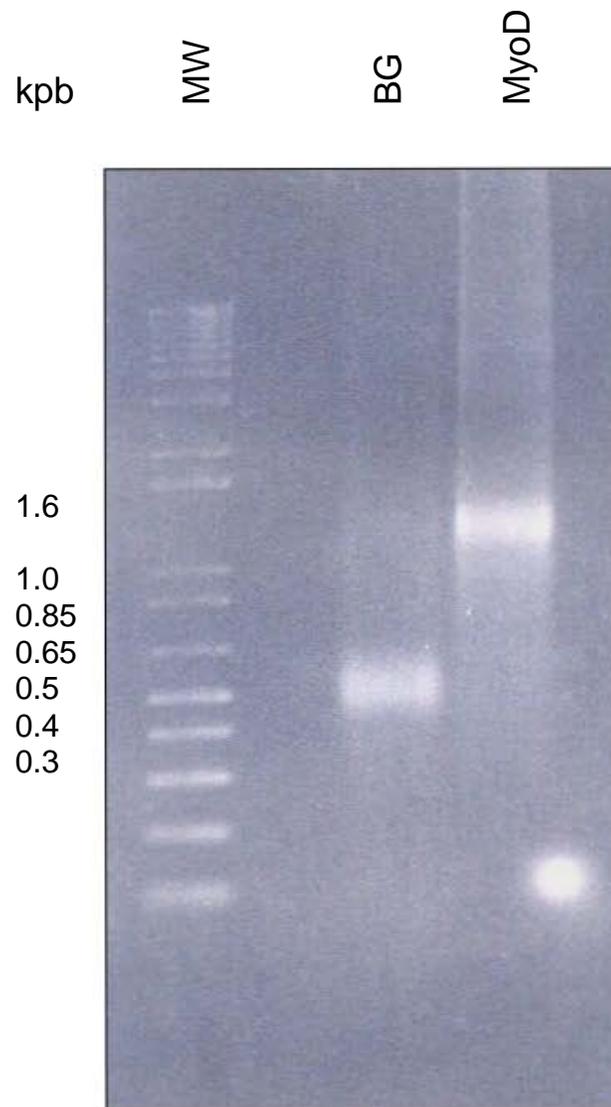


Figura 23. Transcripción *in vitro* de Betaglicano (BG) y *Myo-D*. Estos transcritos fueron utilizados para la hibridación "*in situ*" en embriones completos. En el gel se cargaron 5 μ L de BG y *Myo-D*.

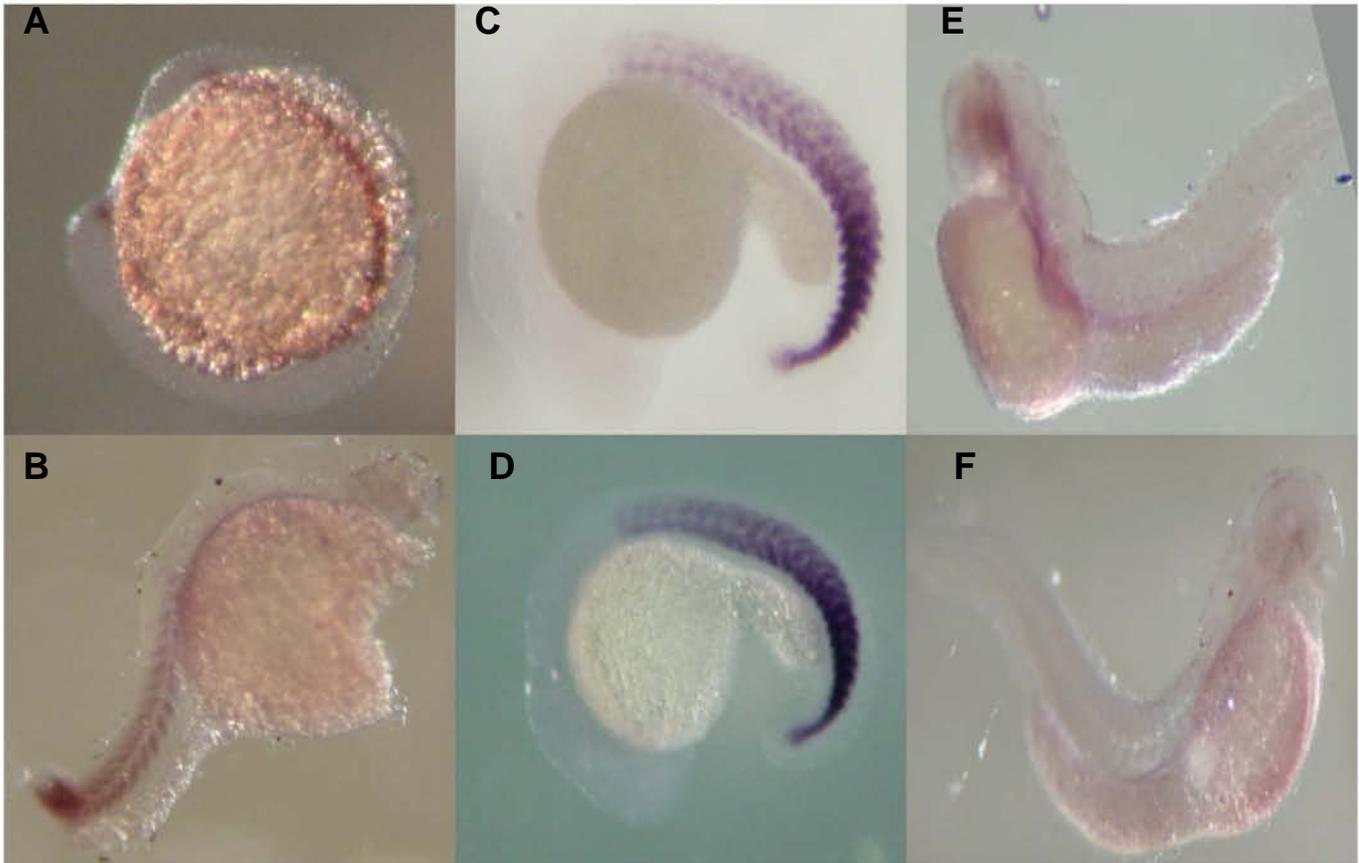


Figura 24. Hibridaciones *in situ*. A, patrón de expresión de *Shh* a 11 hpf. B, expresión de *MyoD*, 22 hpf. C y D, expresión de *MyoD*, 24 hpf. E, expresión de betaglicano a 48 hpf. F, control negativo de expresión de betaglicano (sonda sentido).

Al no obtener tinciones positivas para la expresión del betaglicano por hibridación *in situ* en estadios tempranos (hasta las 24 hpf), era necesario descartar la posibilidad de que el RNA mensajero no se estuviera expresando durante los estadios evaluados. Esta situación fue resuelta al extraer el RNA total de peces, durante diversos estadios del desarrollo embrionario. Se observó que el RNA mensajero del betaglicano se expresa desde estadios muy tempranos (70 y 90 % de epibolia; aproximadamente de 7 a 9 hpf) del desarrollo embrionario, hasta estadios donde prácticamente el pez se ha desarrollado de forma completa (día 2, 3 y 5) (figura 25). Este dato se obtuvo a partir de la amplificación por PCR de un fragmento de 585 pb que corresponde del exón 5 al exón 8 (oligonucleótidos 3.14 – 3.15), la identidad del betaglicano fue confirmada por la secuenciación de este fragmento. La discrepancia entre la hibridación *in situ* y el RT-PCR podría ser debida a que la última es una técnica mucho más sensible que la primera, o a la diferente cantidad de mRNA encontrado en los tejidos.

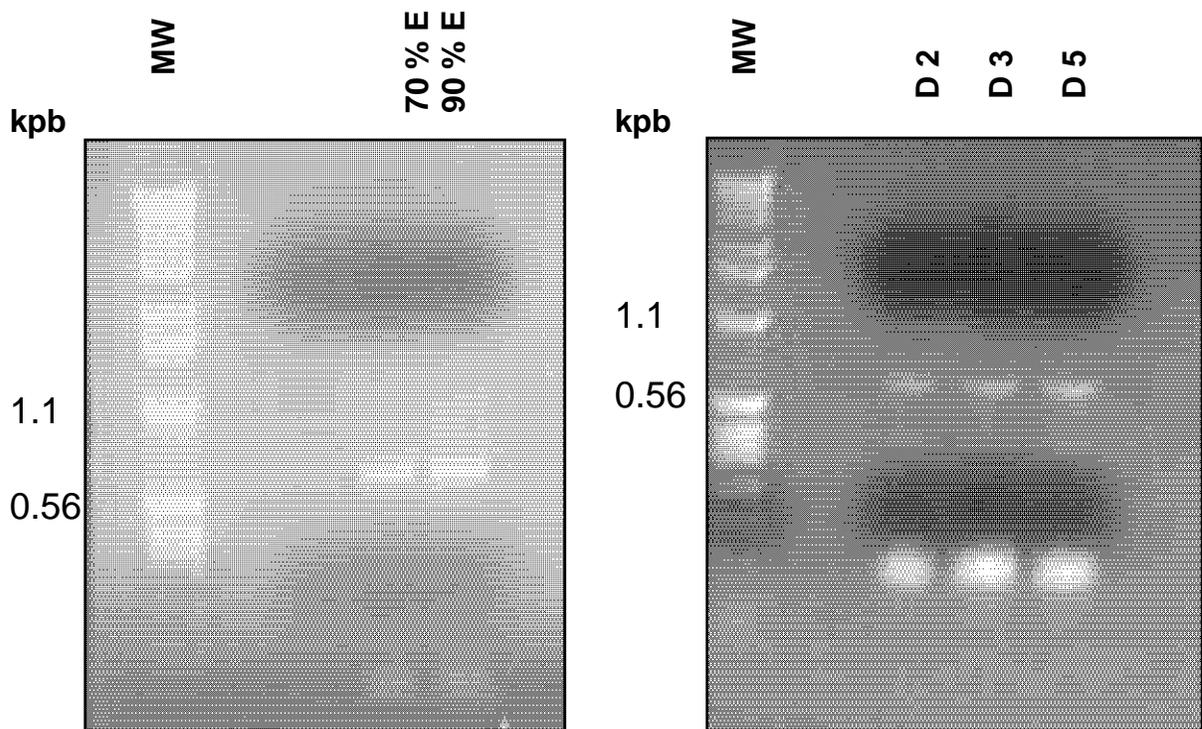


Figura 25. Expresión de BG desde estadios tempranos (E, epibolia) hasta estadios tardíos (D, Días, 2, 3 y 5). Por RT-PCR se observó la expresión del BG. La banda de 585 pb corresponde al BG. NOTA: No se observó amplificación en muestras sin retrotranscriptasa (no mostrada en el gel).

IV. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

La comparación de la secuencia del gen del betaglicano del pez cebra, obtenida en este trabajo, con las reportadas para otros vertebrados, permiten concluir que tenemos el gen ortólogo de betaglicano en pez cebra (tabla 2). La comparación entre los diferentes proteínas ortólogas demuestra que es un gen muy conservado desde especies de vertebrados inferiores (*Xenopus tropicalis*) hasta mamíferos como el ratón y los humanos [77].

La secuencia del betaglicano de pez cebra tiene 15 de las 16 cisteínas encontradas en todo el ORF del betaglicano murino [77]. Este hecho sugiere que las cisteínas probablemente tienen un papel muy importante en la estabilidad de la proteína.

Desde que se obtuvo el primer cDNA de betaglicano en rata, luego en pollo y de forma sucesiva en otras especies, ha sido evidente el alto grado de conservación de la región transmembranal y el dominio citoplasmático. La secuenciación de diversos genomas [*Xenopus tropicalis* (Rana), *Takifugu rubripes* (Pez globo), *Canis familiaris* (Perro), *Bos taurus* (Toro), *Pan troglodytes* (Chimpancé)] sigue corroborado el alto grado de conservación en estas dos regiones, sugiriendo que probablemente tengan alguna función muy conservada [77]. Un requisito mínimo de las regiones transmembranales de muchas proteínas es que estén formadas por residuos hidrofóbicos principalmente; el hecho de que la secuencia primaria del betaglicano esté muy conservada, permitiría suponer que tiene alguna función adicional a la de la localización transmembranal.

Un estudio realizado en líneas celulares humanas reportó que la Thr841 es un residuo para la fosforilación de la cinasa del T β RII. Esta fosforilación es una señal molecular que permite que los receptores de TGF- β sean desensibilizados [76]; por simple comparación, la Thr840 de pez cebra podría tener una función equivalente.

El betaglicano murino tiene una región de aproximadamente 30 residuos rodeada de aminoácidos ácidos donde la Ser533 y la Ser544 son blanco para la adición de cadenas de heparan sulfato y condroitin sulfato, respectivamente [48, 77]. En pez cebra solo hay un sitio conservado para la adición de glicosaminoglicanos, la Ser522 (homóloga a la Ser533 murina). Las cadenas de heparán sulfato de la Ser533 tienen la capacidad de unir bFGF *in vitro* [47]. Sería interesante evaluar primero si este sitio potencial de glicosilación en pez cebra tiene cadenas de heparan sulfato y segundo si tienen alguna relevancia funcional en el pez completo.

El análisis de las secuencias a nivel genómico permitió encontrar una diferencia significativa en el diseño de los exones. Para especies como pollo, rata, ratón y humano, los exones 13 y 14 están separados por un intrón en el DNA genómico, sin embargo en especies como *X. tropicalis*, *T. rubripes* y *D. rerio* no lo están, ya que forman un solo exón. Este hecho sugiere que inicialmente los exones 13 y 14 formaban un solo exón, y que a través de la evolución (probablemente a partir de roedores) se dividieron en dos.

A pesar de muchos intentos infructuosos para tratar de detectar el RNA mensajero por hibridación *in situ* en embriones de *D. rerio*, únicamente se detectó su expresión por RT-PCR. El mRNA del betaglicano se detectó desde estadios muy tempranos (70 y 90 % de epibolia, 7-9 horas después de la fertilización) hasta estadios tardíos (días, 2, 3 y 5) por RT-PCR (figura 25). La detección de los genes controles (Shh y Myo-D) realizados en paralelo, nos indica que la falta de expresión para el betaglicano no se debe a ningún problema metodológico durante la hibridación *in situ*. Además, la región amplificada por RT-PCR es idéntica a la sonda utilizada en las hibridaciones, lo que descarta la posibilidad de que la sonda utilizada en las hibridaciones no estuviera representada en el RNA mensajero del betaglicano. Probablemente la discrepancia entre los resultados obtenidos por RT-PCR y los ensayos de hibridación *in situ* se deba a que la primera es una técnica más sensible que la segunda [140, 141].

Finalmente, en un solo ensayo se detectó la expresión del mRNA del betaglicano en peces completos por hibridación *in situ* (comparar las figuras 24 E y 24 F). Sin embargo, el patrón de expresión el mRNA del betaglicano es difuso y no permite determinar con precisión en que tejido/órgano se expresa el mRNA del betaglicano. Es muy importante señalar que esta imagen proviene de un solo ensayo y será necesario repetir este experimento para verificar que sea reproducible y no sea resultado de una tinción inespecífica.

V. CONCLUSIONES

Se clonó y secuenció el cDNA del betaglicano en *Danio rerio*. El ORF del betaglicano en pez cebra está formado por 2544 pb (848 aminoácidos).

Todas las cisteínas están conservadas en la secuencia de pez cebra, excepto la que se encuentra en el péptido señal.

La Ser522 en pez cebra está conservada al compararla con el betaglicano murino (homólogo de la Ser533 murina, serina modificada con azúcares de tipo heparán sulfato).

La región transmembranal y la región carboxilo están altamente conservadas cuando se compara con sus ortólogos de otras especies (> 90 % de identidad).

El análisis *in silico* demostró que en vertebrados como el ratón y el humano, el arreglo de los exones está conservado. Sin embargo, los exones 13 y 14 en vertebrados como ratón y humano están separados por un intrón, a diferencia de pez cebra que forman un solo exón. La región del exón 13-14 de la proteína es una de las partes con mayor variabilidad, aunque la región que le precede y la región que le sigue (región transmembranal) están muy conservadas en todas las especies reportadas.

Se detectó la expresión del mRNA del betaglicano por RT-PCR, desde estadios tempranos hasta estadios tardíos del desarrollo del pez cebra.

Perspectivas

Para continuar el estudio del betaglicano en pez cebra, sería interesante caracterizar el patrón de expresión del betaglicano durante el desarrollo de pez cebra por hibridación *in situ*, ya que además de saber que se expresa, nos permitiría determinar los tejidos/órganos donde se expresa.

Con la secuencia completa del cDNA de betaglicano, se podría estudiar el patrón electroforético de la proteína en sistemas de expresión heterólogos (COS-1).

El pez cebra es un modelo muy útil para hacer genética reversa mediante los oligonucleótidos tipo morfolino y sería muy interesante bloquear la expresión del betaglicano y caracterizar el fenotipo producido.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

1. Clonación del exón 5 al exón 16

Para amplificar el fragmento > 2.0 kb que corresponde del exón 5 al exón 16 murino se utilizaron los oligonucleótidos 3.1 y 3.5 (figura 12), ver la secuencia en la parte inferior. El DNA utilizado como molde proviene de una biblioteca de cDNA de diversos estadios del desarrollo del pez cebra producida con un kit de la compañía CLONTECH que permite la adición de secuencias conocidas en los extremos 5' y 3'.

La secuencia de los oligonucleótidos es la siguiente:

3.1 :

5> AAG GTG GAA ACT CTT CCT CAT GGC A-3 (25 pb).

3.5 :

5> CTG CTT GAA CAC GGT GTG CTC TGT-3 (24 pb).

Las condiciones para el PCR son las siguientes:

cDNA de la biblioteca	100 ng
Buffer 10X	2 µL
MgCl ₂	2.5 mM
dNTPs	200 µM (de cada uno)
Oligonucleótido 3.1	300 nM
Oligonucleótido 3.5	300 nM
Polimerasa (EHF ¹)	1µL (3.5 U)
H ₂ O necesaria para	20 µL.

¹ Se utilizó una enzima de alta fidelidad de la compañía ROCHE ("Expand High Fidelity"; Cat. No. 1 732 650)

Se realizó el PCR en el termociclador Perkin Elmer Gene Amp PCR System, y las condiciones fueron las siguientes: 35 ciclos

Desnaturalización inicial	94 °C	2 min
Desnaturalización	94 °C	15 seg
Alineamiento	60 °C	30 seg
Elongación	68 °C	2.30 min
Elongación final	72 °C	10 min

2. Amplificación del extremo 5' del cDNA (5' RACE)

Para amplificar el extremo 5' del cDNA, se diseñaron un par de oligonucleótidos (3.16 y 3.17) en el extremo 5' de la secuencia previamente obtenida. El DNA utilizado como molde proviene de una biblioteca de cDNA de diversos estadios del desarrollo del pez cebra producida con un kit de la compañía CLONTECH que permite la adición de secuencias conocidas en el extremo 5' del cDNA. La biblioteca de cDNA tiene en sus extremos conocidos las secuencias de los oligonucleótidos UPM ("Universal Primer Mix") y NUP ("Nested Universal Primer"). Este par de oligonucleótidos UPM y NUP se utilizan en conjunto con los oligonucleótidos específicos del gen (3.16 y 3.17).

La secuencia de los oligonucleótidos es la siguiente:

3.16 :

5> GTG GAA TGT CAC CAT CCA GAG GCC-3 (24 pb)

3.17 :

5> CTG TTT GAC CGT CTT TGAC ACC TGC-3 (25 pb)

UPM ("Universal Primer Mix"):

5> AAG CAG TGG TAT CAA CGC AGA GT-3 (23 pb)

NUP ("Nested Universal Primer"):

5> CCC CAA AAG CAG TGG TAT CAA CGC AGA GT-3 (específico del extremo 5' del cDNA)

3. Amplificación del extremo 3' del cDNA (3' RACE)

Para amplificar el extremo 3' del cDNA, se diseñaron un par de oligonucleótidos (3.8 y 3.9) en el extremo 3' de la secuencia previamente obtenida. El DNA utilizado como molde proviene de una biblioteca de cDNA de diversos estadios del desarrollo del pez cebra producida con un kit de la compañía CLONTECH que permite la adición de secuencias conocidas en el extremo 3' del cDNA. La biblioteca de cDNA tiene en sus extremos conocidos las secuencias de los oligonucleótidos UPM ("Universal Primer Mix") y NUP ("Nested Universal Primer"). Este par de oligonucleótidos UPM y NUP se utilizan en conjunto con los oligonucleótidos específicos del gen (3.8 y 3.9).

3.8 :

5> TCT ACT CGC ATA CAG GTG GCA CAG C-3 (25 pb).

3.9 :

5> ACA GAG CAC ACC GTG TTC AAG CAG-3 (24 pb)

UPM ("Universal Primer Mix"):

5> AAG CAG TGG TAT CAA CGC AGA GT-3 (23 pb)

NUP ("Nested Universal Primer"):

5> AAAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTdT(15)-3 (específico del extremo 3' del cDNA)

Todos los productos de PCR fueron subclonados en pCR 4-TOPO de la compañía Invitrogen.

NOTA: Las digestiones, y ligaciones del DNA se realizaron bajo las condiciones estándares, que se encuentran en cualquier manual de biología molecular (Current protocols in molecular Biology Vol 1).

4. Transcripción *in vitro* e hibridización *in situ*

Con el objetivo de producir un RNA complementario al RNA mensajero del betaglicano, para hacer las hibridaciones *in situ*, se subclonó un fragmento de 674 pb (Apa I – Cla I) en el sitio de clonación múltiple de pBluescript KS -, que tiene en ambos extremos los promotores para la T3 y T7 RNA polimerasa.

1. Linearizar 5 µg del vector con una enzima que deje extremos 5' cohesivos.
2. Limpiar la digestión del plásmido con columnas (QIAquick Gel extraction Kit, QIAGEN.); eluir la muestra en 50 µL, correr 5 µL en un gel de agarosa al 1 % para corroborar que se realizó la digestión completamente.

La transcripción *in vitro* fue hecha con un "kit de ROCHE" (Cat No. 999 644)

3. Preparar la siguiente mezcla:

2 µL de buffer de transcripción *in vitro*.

1 µg de plásmido digerido (limpiado por columnas QIAquick, para eliminar la enzima).

8 µL de NTP – DIG 2.5X.

8 µL de Inhibidor de RNAasa (" Rnase Inhibitor", ROCHE).

20 U de RNA polimerasa (T3 o T7, RNA polimerasa).

Agregar el volumen necesario de H₂O (tratada con DEPC) para un total de 20 µL.

4. Incubar a 37 °C por 2 horas 1/2.

5. Eliminar el DNA molde; agregar 10 U de DNAasa.
6. Incubar a 37 ° C por 15 min.
7. Detener la reacción. Agregar EDTA, 100 µM (concentración final).
8. Purificar el RNA producido por una columna ("Quick Spin Columns", ROCHE, Cat No. 1 274 015).
 - 8.1 Invertir varias veces la columna para resuspender el medio.
 - 8.2 Remover la tapa de arriba de la columna, después remover la tapa de abajo (NOTA: En este orden)
 - 8.3 Permitir que drene el buffer por gravedad.
 - 8.4 Colocar la columna en un tubo de recolección y centrifugar a 1 100 g (3 400 rpm) por 2 min.
 - 8.5 Mantener con mucho cuidado la columna hacia arriba; agregar el RNA en el centro de la columna.
 - 8.6 Centrifugar por 4 min a 1 100 g, recuperando el líquido eluido.
 - 8.7 En el líquido eluido, se encuentra el RNA purificado.
9. Precipitar la muestra del RNA:
Agregar 0.1 volúmenes de Acetato de sodio (3 M pH 5.2) y 2.5 volúmenes de etanol al 100 %.
Incubar por 20 min a -70 °C.
Centrifugar a 14 000 rpm por 30 min.
Eliminar el sobrenadante y agregar 1 mL de etanol 70 %. Centrifugar a 8 900 rpm por 5 min.
Eliminar el sobrenadante y dejar secar por 5 a 10 min a temperatura ambiente.
Resuspender en 80 µL de HYB + (Antes de utilizar el HYB +, se deja a temperatura ambiente 20 min antes de utilizarla).
10. Correr en un gel de agarosa al 1.5 % 5 µL de sonda para evaluar la muestra. (NOTA: Calentar a 80 ° C la sonda por 5 min).
Este RNA antisentido (sonda marcada) se utilizará para hacer las hibridaciones *in situ*.

Fijación de los embriones y la hibridación *in situ*.

Fijar los embriones en 4% de paraformaldehído en PBS por 4 horas a temperatura ambiente en agitación suave o bien o/n a 4 °C sin agitación (El paraformaldehído debe ser fresco o haberse mantenido en congelación justo después de prepararse).

NOTAS: Si los embriones tienen colas extendidas hay que eliminar el corión antes de fijarlos, si no pueden fijarse primero y eliminar el corión después.

Si se va a hacer la hibridación en estadios con pigmentación se recomienda inhibir la pigmentación colocando a los embriones a las 20 - 24 hpf en PTU 0.01 % disuelto en "medio de embrión" o "agua de pez".

Si los embriones NO van a ser utilizados el mismo día de la fijación, entonces remover el paraformaldehído y deshidratar de la siguiente forma:

2 cambios de 5 min c/u en metanol 50% (agitación suave).

2 cambios de 5 min c/u en metanol 100% (agitación suave).
Guardar a – 20 °C.

El día que se van a utilizar se rehidratan de la siguiente forma:

2 cambios de 5 min c/u en metanol 50% (agitación suave)

2 cambios de 5 min c/u en metanol 30%/PBST (agitación suave)

2 cambios de 5 min c/u en PBST (agitando suave)

Eliminar el corión si es necesario (pasar a caja de petri, eliminar el corión y regresar al tubo de 2 ml).

Fijar por 20 minutos en 4% de paraformaldehído en PBST (agitación suave).

Si los embriones se utilizan el mismo día que se fijaron, entonces:

Embriones con corión:

Lavar 4 veces con PBST por 5 min c/u.

Colocar los embriones en una caja de petri y eliminar el corión con unas pinzas.

Regresarlos al tubo de 2 ml.

Lavar 5 veces , 5 min c/u en PBST (agitación suave)

Embriones sin corión:

5 cambios de 5 min c/u en PBST (agitación suave).

Permeabilizar los embriones con Proteinasa K (10 µg/ml en PBST) de acuerdo a la siguiente tabla:

NOTA: La Proteinasa K se prepara al momento de usarla, ya que pierde rápidamente su actividad.

1 min para embriones de 3 – 5 somitos

3 min para embriones de 8 – 10 somitos

5 min para embriones de 16 – 20 somitos

7 min para embriones de 24 hpf

15 min para embriones de 30 – 36 hpf o más

Eliminar la proteínasa K; agregar y retirar PBST (2 veces). Agregar PBST e incubar por 5 min en agitación suave. NOTA: Es muy importante eliminar toda la proteínasa K, ya que de lo contrario la digestión del embrión continua.

Fijar por 20 minutos en 4% de paraformaldehído en PBST (4 °C).

Lavar 2 veces con PBST por 5 min c/u (agitación suave).

Transferir los embriones (no más de 40) a un tubo eppendorf de 0.5 ml (agregar y remover PBST si es necesario).

Eliminar el PBST, e inmediatamente después agregar 500 µl de HYB- (a temperatura ambiente).NOTA: Es muy importante que los embriones no queden completamente secos.

Colocar en el horno de hibridación a 55 °C por 5 min.

Cuidadosamente reemplazar el HYB- con 500 µl de HYB + (precalentado a 55 °C) y pre-hibridizar a 65 °C por un mínimo de 3 horas (12 horas es lo recomendable).

Eliminar 100 µl de HYB + (no permitir que la solución deje de cubrir los embriones) y agregar 50 nanogramos de la sonda marcada (que previamente se ha preparado).

Incubar por 12 horas a 65 °C (Incubar 68 °C aumenta la especificidad).

Retirar la sonda (NOTA: No permitir que la solución deje de cubrir los embriones; la sonda puede ser reutilizada al menos 3 a 4 veces).

Lavar a los embriones para eliminar la sonda que no se a unido de forma específica.

Precalentar a 65 °C las siguientes soluciones:

Lavar con 500 µl 75% de formamida / 2X SSCT.

Agregar 500 µl e incubar por 15 min de 75% de formamida / 2X SSCT a 65 °C.

Agregar 500 µl e incubar por 15 min de 50% de formamida / 2X SSCT a 65 °C.

Agregar 500 µl e incubar por 15 min de 25% de formamida / 2X SSCT a 65 °C.

Agregar 500 µl e incubar por 15 min 2X SSCT a 65 °C.

Agregar 500 µl e incubar por 20 min 0.2X SSCT a 65 °C.

Agregar 500 µl e incubar por 20 min 0.2X SSCT a 65 °C.

Incubar a temperatura ambiente por 10 minutos.

Recambiar con 500 µl de PBST (PBST a temperatura ambiente) y agitar suavemente por 5 minutos a temperatura ambiente.

Recambiar con 500 µl de “Solución Bloqueadora” y agitar suavemente por un mínimo de 3 horas a temperatura ambiente.

Diluir la solución bloqueadora al momento en H₂O MilliQ.(NOTA: apartir del stock 5X a 1X).

Recambiar con 300 µl de “Solución con anticuerpo” y agitar suavemente por 12 horas a temperatura ambiente. NOTA: La solución con anticuerpo es la misma que la solución bloqueadora, nada más que contiene el anticuerpo.

Lavar con 500 µl de “Solución Bloqueadora” 4 veces (agitar suavemente por 25 minutos a temperatura ambiente).

Lavar con 500 µl de “Solución Colorante” y agitar suavemente por 5 minutos a temperatura ambiente.

Transferir los embriones a placas excavadas o multipozos, colocarlas en un agitador orbital.

Finalmente, intercambiar con 500 µl de “Solución Colorante con NBT y BCIP”.

Agitar suavemente; proteger de la luz (cubrir con papel aluminio).

Cada 15 min, observar los embriones con la ayuda del microscopio de disección para detener la reacción en el momento deseado. Para detener la reacción, recambiar la solución colorante con NBT y BCIP por 500 µl de PBST y agitar suavemente por 1 minuto a temperatura ambiente.

Tomar la fotografía.

NOTA: Los embriones pueden guardarse hasta por 6 meses sin perder la señal (Fijarlos en 4% de paraformaldehido en PBST y guardar a 4 °C protegidos de la luz).

Se utilizó un kit para la Transcripción *in vitro* de la compañía ROCHE (Cat No. 999 644) y las columnas para purificar RNA de la transcripción fueron de la compañía ROCHE (Cat No. 1 274 015).

Receta de las soluciones:

H₂O destilada tratada con DEPC (Diethylpirocarbonato):

Preparar H₂O con DEPC 0.1%. Agregar el DEPC e incubar 1 hora a 37 °C, con agitación.

Esterilizar por autoclave, en ciclo de líquidos.

Tween-20 20%:

Agregar 5 mL de Tween-20 20% de la botella (Sigma P-1379),

Agregar 25 mL de H₂O-DEPC.

Acetato de Sodio 3 M pH 5.2:

Pesar la cantidad necesaria de acetato de sodio para tener un stock 3M, el pH se ajusta con Ácido acético glacial. Esterilizar por autoclave.

Etanol 70% en H₂O-DEPC:

Para 100 ml: 35 ml de Etanol absoluto + 15 ml de dH₂O-DEPC.

EDTA 200 mM pH 8.0:

Pesar la cantidad necesaria de EDTA para tener un stock 200 mM, el pH se ajusta con Hidróxido de sodio concentrado. Esterilizar por autoclave.

PBS (10X) Phosphate Buffer Saline:

1.37 M de NaCl

27 mM de KCl

100 mM de Na₂HPO₄

20 mM de KH₂PO₄

Disolver en 800 ml de H₂O 80 g de NaCl, 2 g de KCl 14.4 g de Na₂HPO₄ y 2.4 g de KH₂PO₄ , el pH se ajusta a 7.4 con HCl. Filtrar por autoclave.

PBST:

Agregar PBS, más Tween-20 al 0.1%

Paraformaldehido 4% en PBS:

Para 25 ml: Disolver 1.2 g de Paraformaldehido en 25 ml de H₂O, adicionar 3 ml de PBS 10 X y poner en agitación, para facilitar que se disuelva: agregar 90 µl de NaOH 5M o calentar. Utilizar inmediatamente o hacer alícuotas para guardarlas a –20 °C.

NOTA: debe de ser preparado al instante o mantenerse congelado a –20 °C.

Paraformaldehido 4% en PBST :

Para 50 ml de Paraformaldehido 4% en PBS se le agregan 250 µl de Tween-20 20%.

NOTA: debe de ser preparado al instante o mantenerse congelado a –20 °C.

Metanol 30 % en PBST :

Para 100 ml: agregar 30 ml de Metanol absoluto + 10 ml de PBS 10 X + 500 µl de Tween-20 20% + 59.5 ml de H₂O.

Proteinasa K (10 µg/ml) en PBST :

A 2 ml de PBST adicionar 1 µl del Stock de Proteinasa K (20 mg/ml).

NOTA: La Proteinasa K se disuelve en Tris-HCl 50 mM pH 8, 1.5 mM de acetato de calcio. Guardar a –20 °C y las alícuotas no deben congelarse y descongelarse repetidamente.

SSC (20X) Saline Sodium Citrate :

NaCl 3.0 M, Citrato de sodio 0.3 M, pH 7.0

El pH se ajusta con HCl. Esterilizar por autoclave y guardarlo a –20 °C.

HYB– :

Formamida 50%,

SSC 5X

Tween-20 0.1 %

HYB + :

Formamida 50%,SSC 5X, Tween-20 0.1 %.

Agregar 500 µL de RNA de torula (yeast; 500 µg/mL) (ROCHE).

Agregar 50 µL de Heparina 50 µg/mL (SIGMA).

NOTA: El RNA de torula y la heparina se preparan en H₂O-DEPC.

75% de formamida / 2X SSCT :

Para un stock de 25 mL: agregar 18.75 mL de formamida de la botella + 2.5 mL de SSC 20 X + 125 µL de Tween-20 20% + 3.625 mL de H₂O-DEPC.

50% de formamida / 2X SSCT :

Para un stock de 25 mL: agregar 12.5 mL de formamida de la botella + 2.5 mL de SSC 20 X + 125 µL de Tween-20 20% + 9.875 mL de H₂O-DEPC.

25% de formamida / 2X SSCT :

Para un stock de 25 mL: agregar 6.25 mL de formamida de la botella + 2.5 mL de SSC 20 X + 125 μ L de Tween-20 20% + 16.125 mL de H₂O-DEPC.

2 X SSCT :

Para un stock de 25 mL: agregar 2.5 mL de SSC 20 X + 125 μ L de Tween-20 20% + 22.375 mL de H₂O-DEPC.

0.2 X SSCT :

Para un stock de 25 mL: agregar 250 μ L de SSC 20 X + 125 μ L de Tween-20 20% + 24.625 mL de H₂O-DEPC.

Solución Bloqueadora 10 X :

El reactivo bloqueador fue adquirido de la compañía ROCHE (Cat No. 1 096 176). El reactivo bloqueador se diluye en el buffer de ácido maleico (100 mM de ácido maleico, 150 mM de NaCl; ajustar el pH a 7.5 con NaOH).

Disolver el reactivo bloqueador a una concentración final de 10 % en buffer de ácido maleico. Es necesario calentarlo de 5 a 10 min.

Solución con Anticuerpo :

A la solución bloqueadora se le agraga el anticuerpo Anti-digoxigenina-AP, dilución 1: 1000.

(según el catálogo de Roche debe utilizarse entre 100 a 500 veces de dilución). Se diluye en 2% de Sheep serum y 2 mg/ml BSA en PBST.

Solución de coloración:

100 mM de Tris pH 9.5

50 mM MgCl₂

100 mM NaCl

0.1% Tween-20

1 mm Levamisol (agregar al momento)

NOTA: El pH de 9.5 se ajusta con HCl y es muy importante para que la solución se disuelva, ya que de lo contrario se forman precipitados al agregar el MgCl₂.

Stock NBT (nitroblue tetrazolium) :

75 mg/ml en 70% Dimethylformamide (DMF)

Stock BCIP (5-bromo-4-chloro-3-indolyl galactopyranoside) :

50 mg/ml en Dimethylformamide (DMF).

5. Preparación de RNA total apartir de embriones

1. Colocar aproximadamente 100 larvas (embriones) en un tubo de 1.6 mL.

2. Eliminar el agua de acuario y agregar 800 μL de Trizol (Trizol Reagent, GIBCO BRL. Cat. No. 15596-018) de la botella.
3. Homogenizar completamente las larvas (embriones) con un pistilo de plástico estéril a temperatura ambiente. Verificar que los embriones se hayan homogenizado completamente.
4. Adicionar 200 μL de cloroformo, dar vortex por 20 seg.
5. Centrifugar a 4°C por 15 min, 13 400 rpm.
6. Transferir la fase acuosa a un tubo nuevo. NOTA: Tener mucho cuidado de no llevarse la interfase.
7. Precipitar con 500 μL de alcohol isopropílico (2-propanol), mezclar por inversión varias veces.
8. Incubar por 10 min a temperatura ambiente.
9. Centrifugar a 4°C por 15 min, 13 400 rpm.
10. Eliminar el sobrenadante, tener mucho cuidado con el precipitado (el pellet es de color blanco).
11. Lavar con 1 mL de etanol 75 % (en H_2O DEPC).
12. Centrifugar a 4°C por 5 min, 10 500 rpm.
13. Eliminar el sobrenadante.
14. Dejar el tubo a temperatura ambiente y esperar que el pellet se seque.
15. Eliminar el DNA genómico, resuspender en 60 μL , de la siguiente forma:

34 μL de H_2O DEPC

6 μL de buffer de transcripción

20 μL de DNAasa (libre de RNA, 20 U).

16. Incubar a 37 °C por 60 min.
17. Agregar 140 μL de H_2O DEPC.
18. Eliminar la DNAasa; agregar 200 μL de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico.
19. Dar vortex por 20 seg e incubar 3 min a temperatura ambiente.
20. centrifugar a 4°C por 15 min, 13 400 rpm. Transferir la fase acuosa a un tubo nuevo.
21. Precipitar al agregar 500 μL de isopropanol, agitar el tubo por 10 min.
22. Centrifugar a 4°C por 10 min, 13 400 rpm.
23. Eliminar el sobrenadante.
24. Lavar con 1 mL de etanol 75 %.
25. Centrifugar a 4 °C por 5 min, 10 500 rpm.
26. Eliminar el sobrenadante y dejar el tubo abierto a temperatura ambiente hasta que se seque el pellet.
27. Resuspender el pellet en 25 μL de H_2O DEPC (Se recomienda 25 μL para 100 embriones).
28. Precalentar la muestra de RNA a 65 ° C por 5 min, para correrlo en un gel de agarosa al 1.5 %. Cuantificar el RNA con el espectrofotómetro.
29. Guardar a – 70 ° C.

NOTA: Este RNA se utiliza para hacer cDNA, de la siguiente forma:

Para hacer cDNA se parte de 1.5 µg de RNA total. Siempre que se hace cDNA, se pone un control donde no se le agrega la enzima (retrotranscriptasa reversa).

1. Incubar a 65 °C, por 5 min:

1.5 µg de RNA

1 µL de dNTPs (10 mM)

1 µL del oligo dT (0.5 µg/µL)

Agregar H₂O-DEPC, hasta completar un volumen de 10 µL.

2. Preparar la siguiente mezcla de reacción, adicionando cada componente en el orden indicado:

	2X
10X Buffer RT	4 µL
25 mM de MgCl ₂	8 µL
0.1 mM de DTT	4 µL
RNAasaOUT inhibitor	2 µL

3. Agregar 4.5 µL a cada tubo, mezclar con la pipeta y centrifugar.

4. Incubar a 42 °C por 2 min.

5. Agregar 50 U de SuperScript II RT (Invitrogen, Cat No. 18064-022) a solo un tubo.

NOTA: Al tubo control no se le agrega SuperScript II RT.

6. Incubar 42 °C por 50 min.

7. Detener la reacción, colocar el tubo a 70 °C por 15 min. Colocarlo en hielo.

8. Centrifugar a 13 400 rpm por 10 seg.

9. Agregar 1µL de RNAasa H a cada tubo e incubar 20 min a 37 °C. El protocolo del kit, recomienda utilizar 1.5 µL de cDNA para amplificar por PCR.

6. Cuidado de los peces

El crecimiento de forma controlada se realiza a una temperatura de 28.5 ° C, aunque puede haber cierta variación de algunos grados. Cuando se pone las cruas, la pareja de peces se coloca en una “caja para cruzar” que tiene en la parte inferior una red que impide que los huevos fertilizados sean devorados por el padre. La obtención de los huevos fertilizados se coloca en agua de acuario y se incuba a 28.5 ° C, eliminando los huevos que no fueron fertilizados ya que producen efectos nocivos sobre los huevos fertilizados. Para mayor información sobre los cuidados del pez cebra, consultar el libro de “The Zebrafish Book”, que se encuentra en la página www.zfin.org/zf_info/zfbook/zfbk.

7. Análisis *in silico* del betaglicano

El análisis de la secuencia fue hecho con el programa MacVector 7.2. También se utilizó la base de datos del Sanger Center (www.sanger.ac.uk/).

VII.BIBLIOGRAFÍA

1. Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. Molecular biology of the cell. 2002. 4TH Edition Garland Science Inc. New York and London. Chapter 15.
2. Lodish, H., Berck, A., Matsudaira, P., Kaiser C., Krieger M., Scott M., Zipursky, S. L and Darnell J. 2004. Molecular Cell Biology.4TH Edition W. H. Freeman and company. W.H Freeman and Company. USA. Chapter 13.
3. 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.
4. Roberts, A. B., Anzano, M. A., Wakefield, L.D., Roche, N.S., Stern, D.F. and Sporn, M. B. 1985. Type- β transforming growth factor: a bifunctional regulator of cellular growth. *Proc Natl Acad Sci USA* 82: 119-123.
5. Massagué J. 1990. The transforming growth factor- β family. *Annu Rev Cell Biol* 6: 597-641.
6. Massagué J. 1998. TGF- β signals transduction. *Annu rev Biochem* 67: 753-791.
7. Massagué J., Blain, S.W., and Lo, R.S. 2000. TGF- β Signaling in growth control, cancer, and heritable disorders. *Cell* 103: 295–309.
8. Derynck, R., Rhee, L., Chen, E. Y., and Van Tilburg, A. 1987. Intro-exon structure of human transforming growth factor- β precursor gene. *Nucleic Acids Res* 15: 3188-3189.
9. Jakowlew S. B., Dillard P. J., Kondiah P., Sporn M. B., and Roberts A. B. 1998. Complementary deoxiribonucleic acid cloning of a novel transforming growth factor- β messenger ribonucleic acid form chick embryo chondrocytes. *Mol endocrinol* 2: 747-755.
10. Shull, M. M., Ormsby, I., Kier, A. B., Pawlowski, S., Diebold, R. J., Yin, M., Allen, R., Sidman, C., Proetzel, G., Calvin, D., Annunziata, N. and Doetschman, T. 1992. Targeted disruption of the mouse transforming growth factor-beta 1 gene results in multifocal inflammatory disease. *Nature* 359: 693-699.
11. Kulkarni, A. B., Huh, C. G., Becker, D., Geiser, A., Lyght, M., Flanders, K. C., Roberts, A. B., Sporn, M. B., Ward, J. M. and Karlsson, S. 1993. Transforming growth factor beta 1 null mutation in mice causes excessive inflammatory response and early death. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 770-774.
12. L. Philip Sanford, Ilona Ormsby, Adriana C. Gittenberger-de Groot, Hannu Sariola, Rick Friedman, Gregory P. Boivin, Emma Lou Cardell and Thomas Doetschman. 1997. TGF β 2 knockout mice have multiple developmental defects that are non-overlapping with other TGF β knockout phenotypes. *Development* 124: 2659-2670.

13. Proetzel, G., Pawlowski, S. A., Wiles, M. V., Yin, M., Boivin, G. P., Howles, P. N., Ding, J., Ferguson, M. W. and Doetschman, T. 1995. Transforming growth factor-beta 3 is required for secondary palate fusion. *Nature Genet.* 11: 409-414.
14. Kaartinen, V., Voncken, J. W., Shuler, C., Warburton, D., Bu, D., Heisterkamp, N. and Groffen, J. 1995. Abnormal lung development and cleft palate in mice lacking TGF-beta 3 indicates defects of epithelial-mesenchymal interaction. *Nature Genet.* 11: 415-421.
15. Nicole Dünker and Kerstin Kriegelstein. 2002. $Tgfb\beta 2^{-/-}Tgfb\beta 3^{-/-}$ double knockout mice display severe midline fusion defects and early embryonic lethality. *Anat Embryol* 206: 73–83.
16. Oklu R. and R. Hesketh. 2000. The latent transforming growth factor beta binding protein (LTBP) family. *Biochem J* 352: 601-610
17. Lawrence D., Pircher R., and Jullien P. 1985. Conversion of a high molecular weight latent beta-TGF from chicken embryo fibroblasts into a low molecular weight active beta-TGF under acid conditions. *Biochem Biophys Res Commun* 133: 1026-1034.
18. Crawford S.E., Stelimach V., and Murphy-Ulrich. 1998. Thrombospondin-1 is a major activator of TGF- β 1 in vivo. *Cell* 93: 1159-1170.
19. Munger JS., Harpel JG., Gleizes P-E., Mazzieri R., Nunes I. and Rifkin D.B. 1997. Latent transforming growth factor- β : structural features and mechanisms of activation. *Kidney Int* 51: 1376-1382.
20. McDonald, N. Q. and W. A. Hendrickson. 1993. A structural superfamily of growth factors containing a cystine knot motif. *Cell* 73: 421-424.
21. 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.
22. Schlunrger, 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.
23. Sun P.D. and Davies D.R. 1995. The cysteine-knot growth-factor superfamily. *Ann Rev Biophys Biomol Struct* 24: 269-291.
24. Massagué J. 1987. The TGF- β family of growth and differentiation factors. *Cell* 49: 437-438.
25. Cheifetz, S. H. Hernandez, M. Laiho, P. ten Dijke, K. K. Iwata, and Massagué J. 1990. Distinct transforming growth factor-beta (TGF-beta) receptor subsets as determinants of cellular responsiveness to three TGF-beta isoforms. *J. Biol. Chem.* 265: 20533–20538.
26. Wrana, J. L., Attisano, L., Carcamo, J., Zentella, A., Doody, J., Laiho, M., Wang, X.-F. and Massagué J. 1992. TGF- β signals through a heteromeric protein kinase receptor complex. *Cell* 71: 1003– 1014.
27. Wrana, J., Attisano, L., Wieser, R., Ventura, F., and Massagué J. 1994. Mechanism of activation of the TGF- β receptor. *Nature* 370: 341–347.
28. Wells, R. G., Yankelev, H., Lin, H. Y., and Lodish, H. F. 1997. biosynthesis of the type I and type II TGF-beta receptors. Implication for complex formation. *J. Biol. Chem.* 272: 11444 –11451.
29. Cheifetz, S., Andres, J.L., and Massagué J. 1988. The transforming growth

- factor- β receptor type III is a membrane proteoglycan. *J. Biol. Chem.* 263: 16984 – 16991.
30. 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.
31. Chen, Y. G., F. Liu and Massagué J. 1997. Mechanism of TGF-beta receptor inhibition by FKBP12. *EMBO J.* 16: 3866 –3876.
32. Huse, M., Chen, Y.-G., Massagué J., and Kuriyan, J. 1999 . Crystal structure of the cytoplasmic domain of the type I TGF- β receptor in complex with FKBP12. *Cell* 96: 425–436.
33. Onichtchouk, D., Chen, Y.G., Dosch, R., Gawantka, V., Delius, H., Massagué J., and Niehrs, C. 1999. Silencing of TGF- β signaling by the pseudoreceptor BAMBI. *Nature* 401: 480–485.
34. Souchelnytskyi S., ten Dijke, . Miyazono K and Heldin C. H. 1996. Phosphorylation of Ser165 in TGF-beta type I receptor modulates TGF-beta1 induced cellular responses. *EMBO J.* 15: 6231-6240. Erratum in: *EMBO J.* 1997:16: 6055.
35. Wieser R., Attisano L., Wrana JL and Massagué J. 1993. Signaling activity of transforming growth factor beta type II receptors lacking specific domains in the cytoplasmic region. *Mol. Cell Biol.* 13: 7239-7247.
36. Luo K. X., and Lodish H F. 1997. Positive and negative regulation of type TGF- β receptor signal transduction by autophosphorylation on multiple serine residues. *EMBO J.* 16: 1970-81.
37. Huse, M., Muir, T.W., Xu, L., Chen, Y.-G., Kuriyan, J., and Massagué J. 2001. The TGF- β receptor activation process: an inhibitor to substrate-binding switch. *Mol. Cell* 8: 671–682.
38. 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.
39. 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.
40. Cheifetz S., Weatherbee J. A., Tsang M. L., Anderson J. K., Mole J. E., Lucas R., and Massagué J. The transforming growth factor-beta system, a complex pattern of cross-reactive ligands and receptors. *Cell* 48: 409 – 415.
41. 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.
42. Stenvers KL., Tursky ML, Harder KW, Kountouri N, Amatayakul-Chantler S, Grail D, Small C, Weinberg RA, Sizeland AM., and Zhu HJ. 2003. Heart and liver defects and reduced transforming growth factor beta2 sensitivity in transforming growth factor beta type III receptor-deficient embryos. *Mol Cell Biol.* 23: 4371-85.
43. Segarini, P. R., Roberts, A.B., Rosen., M. D. and Seyedin, S. M. 1987. Membrane binding characteristics of two forms of transforming growth factor- β . *J Biol Chem* 262: 14655-14662.

44. 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.
45. López-Casillas F., J. L. Wrana and Massagué J. 1993. Betaglycan presents ligand to the TGF- β signaling receptor. *Cell* 73: 1435-1444.
46. López-Casillas F., H. M. Payne, J.L. Andres and Massagué J. 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.
47. Andres, J. L., D. DeFalcis, M Noda, and Massagué J. 1992. Binding of two growth factor families to separate domain of the proteoglycan betaglycan. *J Biol Chem*. 267: 5927-5930.
48. 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.
49. 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.
50. M.M. Vilchis-Landeros, J.L. Montiel, V. Mendoza, G. Mendoza-Hernandez and López-Casillas F. 2001. Recombinant soluble betaglycan is a potent and isoform-selective transforming growth factor- β neutralizing agent. *Biochem. J.* 355: 215-222.
51. Bork, P., and C. Sander. 1992. A large domain common to sperm receptors (zp2 and Zp3) and TGF-beta type III. *FEBS Letter* 300: 237-240.
52. 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- β receptor system in human endothelial cells. *J. Biol Chem* 267: 19027-19030.
53. Pepin, M.-C., Beauchemin, M., Plamondon, J. and O'Connor-McCourt, M. D. 1994. Mapping of the ligand binding domain of the transforming growth factor β receptor type III by deletion mutagenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 6997-7001.
54. Kaname, S. and Ruoslahti, E. 1996 Betaglycan has multiple binding sites for transforming growth factor- β 1. *Biochem. J.* 315: 815-820.
55. Segarini, P. R., Roberts, A.B., Rosen., M. D. and Seyedin, S. M. 1987. Membrane binding characteristics of two forms of transforming growth factor- β . *J Biol Chem* 262: 14655-14662.
56. Cheifetz, S., and Massagué J. 1991. Isoform-specific transforming growth factor-beta binding protein with membrane attachments sensitive to phosphatidylinositol-specific phospholipase C. *J. Biol Chem* 266: 20767-20772.
57. Ohta, M., J. S. Greenberger, P. Anklesaria, A. Bassols, and Massagué J. 1987. Two forms of transforming growth factor-beta distinguished by multipotential haematopoietic progenitor cells. *Nature* 329: 539 -
58. Eickelberg, O., M. Centrella, M. Reiss, M. Kashgarian, and R. G. Wells. 2002. Betaglycan inhibits TGF-beta signaling by preventing type I-type II receptor complex formation. Glycosaminoglycan modifications alter betaglycan function. *J. Biol. Chem.* 277: 823-829.

59. 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.
60. Bandyopadhyay, A., López-Casillas F., Malik, S. N., Montiel J. L., Mendoza V., Yang, J and Sun, L.Z. 2002. Antitumor activity of a Recombinant Soluble Betaglycan in Human Breast cancer Xenograft. *Cancer Research* 62: 4690-4695.
61. Bandyopadhyay, A., Wang, L., López-Casillas F., Mendoza V., Yeh, I-T. and Sun, L.Z. 2005. Systemic administration of a Soluble Betaglycan Suppresses Tumor growth, angiogenesis, and Matrix Metalloproteinase-9 Expression in a Xenograft Model of Prostate Cancer. *The Prostate* 63: 81-90.
62. Wylie Vale, Ezra Wiater, Peter Gray, Craig Harrison, Louise Bilezikjian and Senyon Choe. 2004. Activins and Inhibins and their signaling. *Ann. N. Y. Acad Sci.* 1038: 142-147.
63. 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.
64. José Esparza-López, J. L. Montiel, M. Vilchis-Landeros, Toshihide Okadome, Kohei Miyazono and López-Casillas F. 2000. Ligand binding and functional properties of betaglycan, and Co-receptor of the transforming growth factor- β superfamily. *J Biol Chem* 276: 14588-14596.
65. Craig A. Harrison, Ezra Wiater, Peter C. Gray, Jason Greenwald, Senyon Choe and Wylie Vale. 2004. Modulation of activin and BMP signaling. *Molecular and Cellular Endocrinology* 225: 19–24.
66. Wiater E. and Wylie Vale. 2003. Inhibin is an Antagonist of Bone Morphogenetic Protein Signaling. *J Biol Chem* 278: 7934-7941.
67. Santander C. and Brandan E. 2006. Betaglycan induces TGF- β signaling in a ligand-independent manner, through activation of the p38 pathway. *Cellular Signalling* 18: 1482-1491.
68. Angelique S. Boyer and Raymond B. Runyan. 2001. TGF- β Type III and TGF- β Type II receptors have distinct Activities During Epithelial-Mesenchymal Cell Transformation in the Embryonic Heart. *Dev Dyn* 221: 454-459.
69. Brown B., Christopher, Angelique S. Boyer, Raymond B. Runyan and Joey V. Barnett. 1999. Requirement of type III TGF- β receptor for endocardial cell transformation in the heart. *Science* 283: 2080-2082.
70. Marion C. Dickson, Hans, G. Slager, Elizabeth Duffe, Christine L. Mummery and Rosemary J. Akhurst. 1993. RNA and protein localisations of TGF- β in the early mouse embryo suggest an involvement in cardiac development. *Development* 117: 625-693.
71. Barnett, J. V., Moustakas, A., Lin, W., Wang, X. F., Lin, H. Y., Galper, J. B. and Maas, R. L. 1994. Cloning and developmental expression of the chick type II and type III TGFbeta receptors. *Dev. Dyn.* 199: 12-27.
72. David W Johnson, Mazin Qumsiyeh, Moncef Benkhalifa and Douglas A. Marchuk. 1995. Assignment of Human Transforming Growth Factor- β Type I and Type III Receptor Genes (TGFB1 and TGFB3) to 9q33-34 and 1p32-33, Respectively. *Genomics* 28: 356-357.

73. Sheffield VC, Pierpont ME, Nishimura D, Beck JS, Burns TL, Berg MA, Stone E M, Patil S.R., and Lauer RM. 1997. Identification of a complex congenital heart defect susceptibility locus by using DNA pooling and shared segment analysis. *Hum Mol Genet* 6: 117–121.
74. Barnett Joey V and Jay S. Desgrosellier Jay S. 2003. Early Events in Valvulogenesis: A Signaling Perspective. *Birth Defects Research (Part C)* 69: 58–72.
75. Gerard C. Blobe, William P. Schiemann, Marie-Claude Pepin, Michael Beauchemin, 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 β receptor in regulating transforming growth factor β signalling. *J Biol Chem* 276: 24627-24637.
76. 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. β -arrestin 2 mediates endocytosis of type III TGF- β receptor and down-regulation of its signaling. *Science* 301: 1394-1397.
77. Ponce-Castañeda V., López-Esparza J., Vilchis Landeros M., Mendoza R. Valentín and López-Casillas F. 1998. Murine betaglycan primary structure, expression and glycosaminoglycan attachment sites. *Biochim Biophys Acta* 1384: 189-196.
78. Harold E. Olivey, Joey V. Barnett and Bettye D. Ridley. 2003. Expression of the Type III TGF β Receptor During Chick Organogenesis. *The Anatomical Record Part A* 272A: 383–387.
79. Ann E. Drummond, Minh tanLle, Jean-Francois Ethier, Mitzi Dyson, and Jock K. Findlay. 2002. Expression and Localization of Activin Receptors, Smads, and β glycan to the Postnatal Rat Ovary. *Endocrinology* 143: 1423–1433.
80. Leigh A. Mconell, Angela M. O. Leal, and Wylie W. Vale. 2002. The Distribution of Betaglycan Protein and mRNA in Rat Brain, Pituitary and Gonads: Implications for a Role for Betaglycan in Inhibin-Mediated Reproductive Functions. *Endocrinology* 143: 1066–1075.
81. Liu J., Kuullasmaa T., Veli-Matti K., Ralf B., Teemu V., Hydén-Granskog C., and Raimo Voutilainen. 2003. Expression of Betaglycan, an Inhibin Coreceptor, in normal Human Ovaries and Ovarian Sex Cord-Stromal Tumors and Its Regulation in Cultured Human Granulosa- Luteal Cell. *J. Clinical Endocrinology and Metabolism* 88: 5002-5008.
82. Ciarmela P., Florio P., Toti P., Grasso D., Santopietro R., Tosi P. and Petraglia F. 2003. Expression of betaglycan in pregnant tissues throughout gestation. *European Journal of Endocrinology* 149: 433-437.
83. Magueresse-Battistoni B, Morera AM, Goddard I, Benahmed M. 1995. Expression of mRNAs for transforming growth factor-beta receptors in the rat testis. *Endocrinology* 136: 2788-2791.
84. Bernard, D.J., and Woodruff, T.K. 2001. Inhibin binding protein in rats: alternative transcripts and regulation in the pituitary across the estrous cycle. *Mol. Endocrinol.* 15: 654 – 667.

85. Sheila A Sweeney and Patricia A Johnson. 2005. Messenger RNA and Protein Expression Analysis of Betaglycan in the Pituitary and Ovary of the Domestic Hen. *Biology of Reproduction* 72: 172-178.
86. Changhua Ji, Yun Chen, Thomas L. McCarthy, and Michael Centrella. 1999. Cloning the Promoter for Transforming Growth Factor- β Type III Receptor. *J. Biol. Chem.* 274: 30487–30494.
87. López-Casillas F., Riquelme C., Yoshiaki Pérez-Kato, Ponce-Castañeda V., Osses N., Esparza-López J., Gonzáles-Núñez G., Cabello-Verrugio C., Valentín Mendoza, Troncoso V., and Brandan E. 2003. Betaglycan expression is transcriptionally up-regulated during skeletal muscle differentiation. *J Biol Chem* 278: 382-390.
88. Gougos A. and Letarte M. 1990. Primary structure of endoglin, an RGD-containing glycoprotein of human endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 265: 8361 – 8364.
89. Gougos A. and Letarte M. 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.
90. Qu, R., Silver M. M, and 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.
91. McAllister, K. A., Grogg, K. M., Johnson, D. W., Gallione, C. J., Baldwin, M. A., Jackson, C. E., Helmbold, E. A., Markel, D. S., McKinnon, W. C., Murrell, J., McCormick, M. K., Pericak-Vance, M. A., Heutink, P., Oostra, B. A., Haitjema, T., Westerman, C. J., Porteous, M. E., Guttmacher, A. E., Letarte, M., and Marchuk, D. A. 1994. Endoglin, a TGF-beta binding protein of endothelial cells, is the gene for hereditary haemorrhagic telangiectasia type 1. *Nat Genet* 8: 345-351.
92. Bourdeau A, Dumont D. J. and Letarte M. 1999. A murine model of hereditary hemorrhagic telangiectasia. *J Clin Invest* 104: 1343–1351.
93. Nadia P.B., 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- β superfamily. *J Biol Chem* 272: 584-594.
94. 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.
95. Lastres P., Bellón T., Cabanas C., Sánchez-Madrid F., Acevedo A., Gougos A., and 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.
96. 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.
97. Sekelsky, J.J., Newfeld, S.J., Raftery, L.A., Chartoff, E.H., and Gelbart, W.M. 1995. Genetic characterization and cloning of mothers against dpp, a gene

- required for decapentaplegic function in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 139: 1347–1358.
98. 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.
99. Derynck R., Zhang y. and Feng X-H. 1998. Smads: transcriptional activators of TGF- β responses. *Cell* 95: 737-740.
100. Attisano Liliana and Wrana J. F. 2002. Signal transduction by the TGF- β superfamily. *Science* 296: 1646-1647.
101. Attisano Liliana and Wrana J. F. 2000. Smads as transcriptional co-modulators. *Curr Opin Cell Biol* 12: 235-243.
102. Derynck Rik and Zhang E. Ying. 2003. Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF- β family signalling. *Nature* 425: 577-584.
103. Jeffrey L. Wrana. 2000. regulation of smad activity. *Cell* 100: 189-192.
104. Attisano Liliana and Si Tuen Lee-Hoeflich. 2001. The Smads. *Genome Biology* 2: 1-6.
105. Shi Y., and Massagué J. 2003. Mechanisms of TGF- β Signaling from Cell Membrane to the Nucleus. *Cell* 113: 685–700.
106. Kretzschmar M, Doody J. and Massagué J. 1997. Opposing BMP and EGF signalling pathways converge on the TGF-beta family mediator Smad1. *Nature* 389: 85- 89.
107. Massagué J., and Chen, Y.-G. 2000. Controlling TGF- β signaling. *Genes Dev.* 14: 627–644.
108. Macias-Silva M., Shirin Adbollah, Pamela A. Hoodless, Rosa Pirone, Liliana Attisano and J.L. Wrana. 1996. MADR2 is substrate of the TGF β receptor and its phosphorylation is required for nuclear accumulation and signaling. *Cell* 87: 1215-1224.
109. Kretzschmar, M., Liu, F., Hata, A., Doody, J., and Massagué J. 1997. The TGF- β family mediator Smad1 is phosphorylated directly and activated functionally by the BMP receptor kinase. *Genes Dev.* 11: 984–995.
110. Tsukazaki T., Chiang T. A., Davison A. F. Attisano L. and Wrana J.L. 1998. SARA, a FYVE domain protein that recruits smad2 to the TGF- β receptor. *Cell* 95: 779-791.
111. Xu, L., Chen, Y.-G., and Massagué J. 2000. Smad2 nuclear import function masked by SARA and unmasked by TGF β -dependt phosphorylation. *Nat. Cell Biol.* 2: 559–562.
112. Hata A., Seoane, J., Lagna, G., Montalvo, E., Hemmati-Brivanlou, A., and Massagué J. 2000. OAZ uses distinct DNA- and protein- binding zinc fingers in separate BMP-Smad and Olf signaling pathways. *Cell* 100: 229 –240.
113. Wotton D., Lo R. S., Lee S. and Massagué J. 1999. A Smad transcriptional corepressor. *Cell* 97: 29-39.
114. Luo, K., Stroschein S. L., Wang, W., Chen D., Marten E., Zhou S. and Zhou Q.1999. The Ski oncoprotein interacts with the smad ptein to repress TGF- β signaling. *Genes Dev* 13: 2196-2206.
115. Massagué J. and David Wotton. 2000. Transcriptional control by the TGF- β /Smad signaling system. *EMBO J.* 19:1745-1754.

116. Massagué J. 2000. How cells read TGF- β signals. *Nature review in molecular cell biology* 1: 169-178.
117. Itoh, S., Landstrom, M., Hermansson, A., Itoh, F., Heldin, C.-H., Heldin, N.-E., and ten Dijke, P. 1998. Transforming growth factor β 1 induces nuclear export of inhibitory Smad7. *J. Biol. Chem.* 273: 29195–29201.
118. Hata, A., Lagna, G., Massagué J., and Hemmati-Brivalou, A. 1998. Smad6 inhibits BMP/Smad1 signaling by specifically competing with the Smad4 tumour suppressor. *Genes Dev.* 12: 186–197.
119. Zhu, H., Kavsak, P., Abdollah, S., Wrana, J.L., and Thomsen, G.H. 1999. A SMAD ubiquitin ligase targets the BMP pathway and affect embryonic pattern formation. *Nature* 400: 687–693.
120. Hong B. Chen, Jiali Shen, Y. Tony Ip, and Lan Xu. 2006. Identification of phosphatases for Smad in the BMP/DPP pathway. *Gene Dev.* 20:648–653.
121. Nüsslein-Volhard C. and Dahm Ralf. 2002. Zebrafish. Oxford University Press.
122. Streisinger G., Walker C., Dower N., Knauber D., and Singer F. 1981. Production of clones of homozygous diploid zebra fish (*Brachydanio rerio*). *Nature* 291: 293–96.
123. Eisen J. 1996. Zebrafish Make a Big Splash. *Cell* 87: 969-977.
124. Müller W.A. 1997. Developmental Biology. Springer-Verlag New York, Inc. Chapter 3.
125. Kimmel, C.B. 1989. Genetics and early development of zebrafish. *Trends Genet.* 5: 283-288.
126. Grunwald, D.J. and Eisen, J.S. 2002. Headwaters of the zebrafish—Emergence of a new model vertebrate. *Nat. Rev. Genet.* 3: 717–724.
127. Alexander F. Schier and William S. Talbot. 2005. Molecular Genetics of Axis Formation in Zebrafish. *Annu. Rev. Genet.* 39: 561–613.
128. Haffter P., Granato M., Brand M., Mullins C.M., Hammerschmidt M., Kane A.D, Odenthal J., van Eeden J.M, Jiang J.Y., Heisenberg P.C., Kelsh N.R., Seiki F.M., Vogelsang E., Beuchle D., Schach U., Fabian C. and Nüsslein-Volhard C. 1996. The identification of genes with unique and essential functions in the development of the zebrafish, *Danio rerio*. *Development* 123: 1–36.
129. Lekven C.A., Helde A.K., Thorpe J.C, Rooke R. and Moon T.R. 2000. Reverse genetics in zebrafish.. *Physiol Genomics* 2: 37 – 48.
130. Amsterdam A. 2003. Insertional Mutagenesis in Zebrafish. *Dev Dyn* 228: 523 – 534.
131. Kimmel, C. B., Ballard, W. W., Kimmel, S. R., Ullmann, B. and Schilling T. 1995. Stages of embryonic development of the zebrafish. *Dev. Dyn.* 203: 253-310.
132. Jill L.O. de Jong and Zon L.I. 2005. Use of the Zebrafish System to Study Primitive and Definitive Hematopoiesis. *Annu. Rev. Genet.* 39: 481–501.
133. Patton, E.E and Zon L. I. 2001. The art and design of genetic screens: zebrafish. *Nature Rev. Genet.* 2: 956- 966.
134. Nasevicius A. and Stephen Ekker. 2000. Effective targeted gene “knockdown” in zebrafish. *Nature* 26: 216-220.

135. Roest C. Huges and Weissenbach J. 2006. Fish genomics and biology. *Genome Research* 15: 1675-1682.
136. Beddington R., Brockes J., Jessell T., Lawrence P., and Meyerowitz E. 1998. Principles of development, Lewis Wolpert. Oxford University Press. Chapter 2.
137. Stainier D. 2001. zebrafish genetics and vertebrate heart formation *Nat. Rev. Genet* 2: 39-48.
138. Krauss S., Concordet J.P., and Ingham P.W. 1993. A functionally conserved homolog of the Drosophila segment polarity gene hh is expressed in tissues with polarizing activity in zebrafish embryos. *Cell* 75: 1431-44.
139. Weinberg E.S., Allende M.L., Kelly C.S., Abdelhamid A., Murakami T., Andermann P., Doerre O.G., Grunwald D.J., and Riggleman B. 1996. Developmental regulation of zebrafish MyoD in wild-type, no tail and spade tail embryos. *Development* 122: 271-80.
140. Giselbert H. 2001. One- Two-, and Three-Color Whole Mount in Situ Hybridization to Drosophila Embryos. *Methodos* 23: 359- 372.
141. Braissant O. and Wahli W. 1998. A Simplified *In Situ* Hybridization Protocol Using Non-radioactively Labeled Probes to Detect Abundant and Rare mRNA mRNAs on Tissue Sections. *Biochemica* 1: 10-16.