



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

“Detección del receptor tipo III de TGF- β en embriones de pez cebra
(*Danio rerio*)”

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA:
Tonatiuh Molina Villa

TUTOR PRINCIPAL

Dr. Fernando López Casillas
Instituto de Fisiología Celular, UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dra. Diana Escalante Alcalde
Instituto de Fisiología Celular, UNAM

Dra. Hilda María Lomeli Buyoli
Instituto de Biotecnología, UNAM

MÉXICO, D. F. Febrero, 2015



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

Agradecimientos Académicos

Al Dr. Fernando López Casillas por la oportunidad de realizar este trabajo en su laboratorio bajo su tutoría.

Este proyecto fue apoyado por los donativos de CONACYT (No. 131226) y PAEP.

A mi comité tutorial, Dra. Diana Esclante Alcalde y Dra. Hilda María Lomeli Buyoli, por los comentarios y consejos para la realización de mi proyecto.

A mi jurado de examen por sus observaciones y correcciones a mi tesis.

Al Médico Valentín Mendoza Rodríguez, por sus enseñanzas, consejos y ayuda brindada en la realización de todos mis experimentos.

A Laura Montero León por sus enseñanzas y ayuda para trabajar con proteínas y células en cultivo.

A CONACYT por la beca otorgada para la realización de mis estudios de maestría, a través del Posgrado en Ciencias Bioquímicas, UNAM.

A PAEP por el apoyo otorgado para la asistencia a congresos.

A los miembros de la unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular por los servicios y equipo prestados:

Dra. Laura Ongay Larios

Biól. Ma. Guadalupe Códiz Huerta

M. en C. Minerva Mora Cabrera

Se reconoce a los miembros de Bioterio del IFC, UNAM, por su asesoría y apoyo técnico:

MVZ. Claudia V. Rivera Cerecedo

MVZ. Héctor Malagón

Agradecimientos Personales

A mis padres por siempre apoyarme incondicionalmente y por todo el amor hacia mi.

A mis hermanas y sobrinas por su cariño y apoyo.

A mis compañeros del laboratorio 202 Oriente: Valentín y Lizbeth, por su amistad y apoyo durante estos años.

A mis amigos Aura, Laura y Roberto por todas las pláticas, risas y momentos memorables.

A los chicos del Laboratorio 225 Norte: Genaro, Dianita, Cass, Manuel, Eugenio y Marce por muchos momentos divertidos juntos.

A mis amigos que desde lejos siempre me animaron: Rebeca, Emired y Uri.

A todas las personas que conocí durante esta etapa y con las cuales compartí muchos momentos juntos.

Índice

Índice de figuras.....	iii
Resumen.....	v
Abreviaturas.....	vi
1. Introducción.....	1
1.1. Superfamilia de TGF- β	1
1.2. Receptores y vías de señalización.....	3
1.3. Receptor tipo III de TGF- β	4
1.4. Expresión del receptor tipo III de TGF- β	7
1.5. Knock out de Betaglicano.....	9
2. Pez Cebra (<i>Danio rerio</i>).....	11
2.1. Desarrollo temprano del pez cebra.....	13
3. Antecedentes específicos.....	14
4. Justificación.....	17
5. Objetivo General.....	18
5.1. Objetivos específicos.....	18
6. Metodología.....	19
6.1. Extracción de ARNm.....	19
6.2. Síntesis de cDNA.....	19
6.3. Tabla de oligonucleótidos.....	19
6.4. PCR cuantitativo en tiempo real.....	20
6.5. Análisis estadístico.....	20
6.6. Sobreexpresión del ectodominio de betaglicano de pez cebra....	20
6.7. Purificación de la proteína recombinante de BG de pez cebra....	21
6.8. Tinción de Plata.....	21
6.9. Western Blot.....	22
6.10. Transfección de células COS-1 con DEAE-Dextrán.....	22
6.11. Inmunoprecipitación (IP).....	22
6.12. Detección del BG endógeno de embriones de pez cebra...	22
6.13. Tratamiento enzimático con Condroitinasa y Heparitinasa..	23
7. Resultados.....	25
7.1. Expresión del ARNm de Betaglicano en pez cebra.....	25
7.2. Sobreexpresión y purificación del ectodominio de betaglicano de pez cebra (zBG).....	28
7.3. Obtención de anticuerpos policlonales.....	36

7.4. Detección de Betaglicano endógeno de pez cebra (zBG).....	43
7.5. Determinación del tipo de GAG's en BG endógeno de pez cebra.....	37
8. Discusión.....	54
9. Conclusiones.....	58
10. Perspectivas.....	59
11. Bibliografía.....	60

Índice de Figuras

Figura 1. Estructura de los miembros de la familia de TGF- β	1
Figura 2. Ligandos, Receptores y Señalización de la superfamilia de TGF- β	4
Figura 3. Estructura del Betaglicano.....	5
Figura 4. Expresión del ARNm de betaglicano en raton y pollo.....	8
Figura 5. Periodos del desarrollo temprano del pez cebra.....	12
Figura 6. Estrcutura del gen y la proteína de BG de pez cebra.....	16
Figura 7. RT-PCR de betaglicano para 6 estadios diferentes del desarrollo del pez cebra.....	25
Figura 8. Estandarización de la qRT-PCR.....	26
Figura 9. Niveles de expresión del gen de betaglicano durante diferentes estadios del desarrollo del pez cebra.....	27
Figura 10. Esquema de eBG recombinante.....	28
Figura 11. Sobreexpresión del ectodominio de BG de pez cebra.....	30
Figura 12. Western Blot de ensayos de sobreexpresión del ectodominio de BG.....	31
Figura 13. Estabilidad del eBG recombinante durante el proceso de purificación de cuerpos de inclusión.....	33
Figura 14. Purificación del eBG.....	34
Figura 15. Caracterización de las Pools 1 y 2 del eBG purificado.....	35
Figura 16. Esquema de inmunización.....	37
Figura 17. Especificidad de los anticuerpos policlonales contra eBG.....	39
Figura 18. Titulación de los sueros obtenidos contra eBG.....	40
Figura 19. Sobreexpresión del receptor de BG pez cebra en células COS-1.....	41
Figura 20. Ensayo de unión por marcado por afinidad en células COS-1.....	42
Figura 21. Ensayo de unión por marcado por afinidad con I ¹²⁵ -TGF- β 2.....	44

Figura 22. Niveles de la proteína de BG durante el desarrollo del pez cebra.....	45
Figura 23. Tratamiento enzimático con Heparitinasa y Condroitinasa de las construcciones de zBG.....	47
Figura 24. Tratamiento enzimático de los receptores de rBG y zBG.....	48
Figura 25. Tratamiento enzimático para el BG endógeno de células RAT.....	49
Figura 26. Tratamiento enzimático del BG endógeno de pez cebra.....	50
Figura 27. Efectos del uso de morfolinós en el transcrito y nivel de proteína de BG en el pez cebra.....	52
Tabla 1. Fenotipos de los modelos deficientes en ligandos y receptores de la subfamilia de TGF β	10

Resumen

La superfamilia del TGF- β (del inglés: **T**ransforming **G**rowth **F**actor **β**) es un grupo de factores de crecimiento relacionados estructuralmente que controlan múltiples procesos celulares que incluyen la supervivencia celular, proliferación, migración y diferenciación; y regulan procesos como la respuesta inmune y la embriogénesis. El receptor tipo III de TGF- β o Betaglicano (BG) es el correceptor más abundante en diferentes tipos de células, y es capaz de unir a las tres isoformas de TGF β , así como a inhibina A, inhibina B, y ciertas BMP's a través de su dominio extracelular. El receptor tipo 3 del TGF- β , se encuentra conservado en los vertebrados, tanto en su arreglo exónico, como en su estructura proteica terciaria por lo que durante el presente trabajo se planteó determinar la expresión del receptor tipo III del TGF- β durante el desarrollo del pez cebra.

En ensayos de RT-PCR y qRT-PCR se detectó la presencia del ARNm mensajero de betaglicano a partir de las 8 hpf hasta las 144 hpf. Se logró sobreexpresar y purificar el ectodominio de BG de pez cebra de forma recombinante y la obtención de 2 anticuerpos policlonales contra el receptor. Por medio de ensayos bioquímicos se demostró la expresión del receptor de BG durante el desarrollo del pez cebra, y se mostró que es capaz de unir TGF- β 2 e inhibina. Se determinó que las cadenas de glicosaminoglicanos (GAG's) presentes en el BG de pez cebra están formadas principalmente por heparán sulfato, y por otro tipo de glicosaminoglicano diferente al condroitín sulfato. Finalmente se demostró que la inyección de morfolinis dirigidos contra el RNAm de betaglicano es capaz de disminuir la cantidad de la proteína presente en los embriones y provocar defectos vasculares en el desarrollo embrionario.

Abreviaturas

°C - Grados Centígrados

aa. - Aminoácidos

RNA_m - Ácido ribonucleico mensajero

BG - Betaglicano

C-terminal - Carboxilo terminal

cDNA - Ácido desoxiribonucleíco complementario

cm - Centímetro

E. coli - Escherichia coli

eBG - Ectodominio del betaglicano

EDTA - Ácido etildiaminotetraacético

GAG - Glicosáminoglicanos

Gbp - Giga pares de bases

gl - GAG less

h - Horas

hpf - Horas post-fertilización

IPTG - isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido

Kbp - Kilo pares de bases

kDa - Kilo Daltones

L - Litros

mg - Mili gramos

min. - Minutos

ml. - Mililitros

mM - Mili molar

mU - Mili unidades

N-terminal - Amino terminal

ng - nano gramos

NP-40 - octyl phenoxy polyethoxy ethanol

ON - over night

pb - Pares de bases

PCR - Reacción de la cadena de la polimerasa

PMSF - Fluoruro de fenilmetilsulfonilo

qRT-PCR - Reacción de la cadena de la polimerasa con Transcripción reversa cuantitativa

rBG - Betaglicano de rata

rpm - Revoluciones por minuto

RT-PCR - Reacción de la cadena de la polimerasa con Transcripción reversa

TA - Temperatura ambiente

TGF- β - Transforming Growth Factor β

V - Volts

WB - western blot

wt - Wild-type

zBG - Betaglicano de pez cebra

μ g - Micro gramos

μ l - Micro litros

1. Introducción.

1.1 Superfamilia del TGF- β .

La superfamilia del TGF- β (del inglés: **T**ransforming **G**rowth **F**actor **β**) es un grupo de proteínas relacionadas estructuralmente, que incluye a los factores de Crecimiento Transformante β (TGF- β s), Activinas, Inhibinas, Proteínas Morfogenéticas del Hueso (BMP's), y los Factores de Crecimiento y Diferenciación (GDF's). Estos factores controlan múltiples procesos celulares que incluyen la supervivencia celular, proliferación, migración y diferenciación, así como la respuesta inmune y la embriogénesis (Massague, 2000);(Mythreye and Blobe, 2009)

Las proteínas de la superfamilia del TGF β participan en el desarrollo embrionario, donde regulan el establecimiento del plano corporal y la diferenciación tisular (Derynck and Zhang, 2003). La superfamilia del TGF- β se divide en dos familias; la TGF- β /Activina/Nodal y la BMP/GDF/MIS; agrupadas por similitud de secuencias y por las vías de señalización específicas que activan (Shi and Massague, 2003).

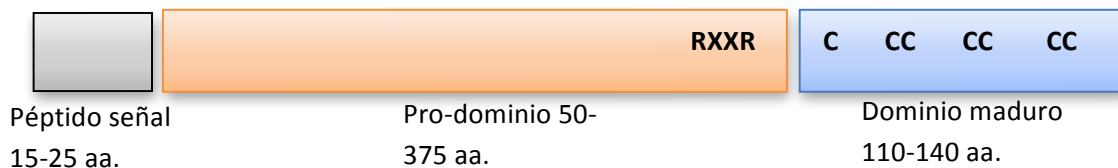


Figura 1. Estructura de los miembros de la familia de TGF- β . Los miembros de la familia de TGF- β son sintetizados como proteínas precursoras con un péptido señal, un pro-dominio variable y una región C-terminal con 7 siete cisteínas conservadas. Modificado de:(Kingsley, 1994).

Los genes que codifican a los miembros de TGF- β comprenden 42 marcos de lectura abiertos en humano, 9 en Drosophila y 6 en C. elegans (Lander et al.,

2001). Los diferentes miembros de la superfamilia de TGF- β son sintetizados inicialmente como moléculas precursoras con una secuencia señal amino-terminal que dirige a la molécula precursora a la vía secretoria y un pro-dominio variable que quizás asista en el plegamiento, dimerización y regulación de la actividad del factor. La proteína precursora es cortada usualmente en un sitio dibásico o RXXR, para liberar un segmento carboxilo-terminal de 110-140 aminoácidos con siete residuos de cisteína característicos de esta región, casi invariantes en varios miembros de la superfamilia (Figura 1 ;(Kingsley, 1994).

La molécula de señalización activa está compuesta de homodímeros o heterodímeros de los segmentos carboxilo de los precursores (Kingsley, 1994), y en la mayoría de los casos, estos dímeros se estabilizan por interacciones hidrofóbicas, que se ven reforzadas por un puente disulfuro entre las dos subunidades (Groppe et al., 2008).

La familia del TGF- β está formada por 3 isoformas TGF- β 1, TGF- β 2 y TGF- β 3, las cuales tienen una identidad, en la estructura primaria de sus monómeros maduros, del 70-80% (Derynck et al., 1988). Los precursores de las isoformas de TGF- β constan de un péptido señal en el extremo amino, seguido de un segmento denominado LAP (Latency-associated polypeptide) y un polipéptido de 112 a.a. en el extremo carboxilo terminal que constituye el monómero maduro. Un corte proteolítico por la proteasa furina libera al monómero maduro del LAP.

El polipéptido maduro de las isoformas de TGF- β cuenta con nueve cisteínas, ocho de las cuales están apareadas. Las ocho cisteínas forman puentes disulfuro intramoleculares que en conjunto constituyen un nudo de cisteínas, mientras que la novena restante forma parte del enlace de cisteína intermolecular que media la dimerización; a su vez, cada monómero contiene cuatro láminas β antiparalelas y una hélice α larga separada (Daopin et al., 1992). La secuencia de aminoácidos localizada entre la cisteína cinco y seis, la más divergente entre las isoformas de TGF- β ; queda expuesta en la superficie de la proteína y puede tener un papel importante en la determinación de la especificidad del reconocimiento ligando-receptor.

Los TGF- β s se liberan de las células como dímeros que incluyen al LAP, lo que impide que TGF- β active a sus receptores, por lo que se dice que lo mantienen en un estado inactivo o “latente”. Estos complejos “latentes” están normalmente unidos a alguna de las proteínas asociadas a TGF- β , como la proteína LTBP-1 (Latent TGF- β binding protein)(Oklu and Hesketh, 2000). La activación de TGF- β ocurre a través de actividad proteolítica, principalmente por la acción de la trombospondina 1 y secundariamente por la acción de la integrina $\alpha_v\beta_6$ (Munger et al., 1999; Daniel et al., 2004), aunque también proteasas como la plasmina, las catepsinas y las metaloproteasas de matriz 9 y 2 participan en el proceso de activación de TGF- β .

1.2 Receptores y vías de señalización.

El TGF- β y en general todos los miembros de la superfamilia, inician la cascada de señalización a través de su unión a los receptores con actividad de cinasa de residuos de serina/treonina, tipo I y tipo II. La familia de estos receptores comprende 12 miembros dentro del genoma humano; 7 para el tipo I y 5 para el tipo II, todos ellos involucrados en la señalización de la familia de TGF- β . Ambos tipos de receptores consisten en general de aproximadamente 500 aminoácidos, compuestos por un N-terminal extracelular, que a su vez es el dominio de unión al ligando; una región transmembranal y un dominio C-terminal con actividad de cinasa de residuos serina/treonina (Shi and Massague, 2003).

El TGF- β inicia su señalización uniéndose a su receptor tipo II y promoviendo su asociación con el receptor tipo I. Esto permite al receptor tipo II fosforilar al dominio cinasa del receptor I, el cual propaga la señal a través de la fosforilación de las proteínas Smad. Existen 8 diferentes proteínas Smad, constituyendo tres clases funcionales: las Smad reguladas por receptor (R-Smad), la Smad Co-mediadora (Co-Smad) y las Smads inhibitoras (I-Smad). Las R-Smad (1,2,3,5,8) son fosforiladas y activadas directamente por el receptor tipo I, llevándolas a formar homodímeros y posteriormente heterotrímeros con la Co-Smad (Smad 4) (Derynck and Zhang, 2003; Shi and Massague, 2003), los cuales son translocados

al núcleo y en conjunto con otros factores regulan la transcripción de sus genes blanco (Figura 2).

Las I-Smad, Smad 6 y 7, regulan negativamente la señal de TGF- β al competir con las R-Smad por el receptor o la Co-Smad y por unión al receptor para dirigirlo a su degradación (Derynck and Zhang, 2003).

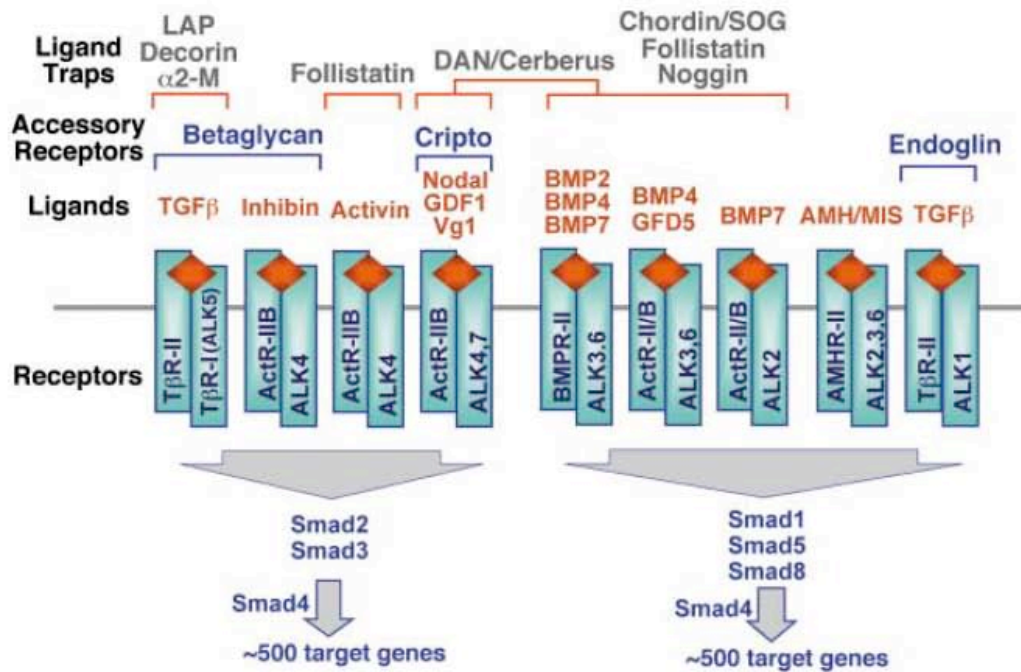


Figura 2. Ligandos, Receptores y Señalización de la superfamilia de TGF- β . Relación esquemática de los diferentes ligandos de la superfamilia de TGF- β con atrapa ligandos, receptores accesorios y sus receptores tipo I y tipo II en vertebrados (Shi and Massague, 2003)

1.3 Receptor tipo III TGF- β

Aparte de los receptores, existen proteínas de membrana que participan en la unión y señalización de los ligandos de la superfamilia del TGF- β . Para el caso del TGF- β , existen dos glicoproteínas transmembranales que funcionan como co-receptores, Betaglicano y Endoglina (Massague, 2000). De éstos, el receptor tipo

III o Betaglicano es el correceptor más abundante en diferentes tipos de células (Bilandzic and Stenvers, 2012).

El betaglicano humano está codificado en un gen único localizado en el cromosoma 1 (p32-p33), que consiste de 17 exones extendidos a lo largo de 272,000 pares de bases (pb), y que se expresa como un mRNA de 7000 nucleótidos (Wang et al., 1991). La estructura primaria del betaglicano humano comparado con el de rata, cerdo, ratón y pollo indica que es una proteína altamente conservada (Figura3).

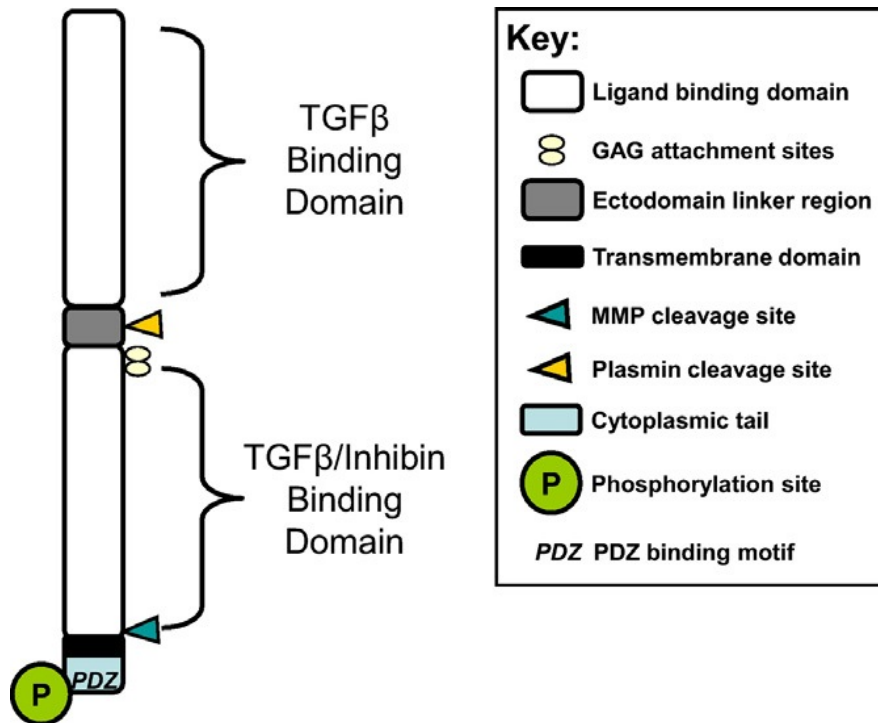


Figura 3. Estructura del Betaglicano. Esquema de los dominios de unión a ligando, sitios de corte enzimático y residuos intracelulares importantes para la asociación de proteínas adaptadoras (Bilandzic and Stenvers, 2012).

Betaglicano es un proteoglicano de 851 aminoácidos, con un dominio extracelular de 797 aminoácidos, una región transmembranal y un dominio intracelular de 42 aminoácidos. Cuenta con dos regiones de unión a ligando dentro del dominio

extracelular, uno en el amino-terminal y otro sitio próximo a la membrana. Ambos dominios están unidos por una región de unión no estructurada de 50 aminoácidos accesible a corte proteolítico por plasmina y BMP1 (Mendoza et al., 2009; Delolme et al., 2014).

Betaglicano une a las tres isoformas de TGF β , inhibina A, inhibina B, y ciertas BMP's a través de su dominio extracelular. Las isoformas de TGF β y BMP's se unen a ambos dominios de unión extracelulares. En particular TGF β 2 presenta la mayor afinidad de unión (Esparza-Lopez et al., 2001). En contraste, Inhibina A e inhibina B se unen solamente al dominio de unión próximo a la membrana (Wiater et al., 2006).

El dominio extracelular cuenta con dos sitios de unión de glicosaminoglicanos (GAG), heparan y condroitin sulfato, localizadas en Ser535 y Ser546. Estas cadenas de GAG no son esenciales para la unión de TGF- β pero podrían mediar la unión de otra clase de factores de crecimiento, como el Factor de Crecimiento Fibroblástico, y contribuir así a las funciones de betaglicano (Lopez-Casillas et al., 1994). Por otro lado, su ectodominio puede ser liberado de la membrana por corte proteolítico cerca del dominio transmembranal, lo que genera un forma soluble del receptor de 120 kDa, que se encuentra en la leche, suero y la matriz extracelular. La forma soluble puede secuestrar a los ligandos de su receptor, antagonizando su señalización (Lopez-Casillas et al., 1994).

Debido a que betaglicano carece de un dominio prototípico de señalización, no parece tener un rol señalador directo. Su presencia en la superficie celular incrementa la unión de las moléculas de TGF β a su receptor tipo II. Este efecto es más pronunciado para TGF β 2, el cual se une pobremente al receptor tipo II en ausencia de betaglicano y solo en su presencia, tiene la misma potencia que las isoformas 1 y 3 (Lopez-Casillas et al., 1993; Esparza-Lopez et al., 2001).

El betaglicano es un coreceptor esencial para la acción de inhibina como antagonista de la activina. Betaglicano es capaz de unir a través de su dominio U la subunidad α de inhibina, formando un complejo estable con el receptor ActRII.

Se ha observado que betaglicano se expresa en tejidos que responden a los efectos de la inhibina como las células de Leydig, que responden a la inhibina producida por las células de Sertoli para modular la esteroidogénesis; además la expresión de betaglicano en células que normalmente no lo hacen, les confiere sensibilidad a esta hormona (Lewis et al., 2000).

1.4 Expresión del receptor tipo III de TGF- β

Para poder determinar la función de betaglicano durante el proceso de desarrollo de los organismos, es importante primero determinar los sitios y procesos del desarrollo durante las cuales se expresa el receptor. Estudios en el ratón, muestran que BG se expresa normalmente en todo el embrión al inicio de la gestación; mientras que para el día E8.5, BG se expresa en los cardiomiocitos trabeculares del ventrículo en desarrollo y no en aquellos subepicardiales. Se ha observado también, que betaglicano se expresa normalmente en células cardíacas que llevan a cabo una transformación epitelio-mesenquima (Brown et al., 1999). Para el día E9.5, BG se expresa en el *septum transversum* que rodea el endodermo hepático presuntivo, y para los días E10.5 y E11.5 BG se expresa en grandes niveles en la mayoría de los tipos celulares del hígado (Stenvers et al., 2003).

En las gónadas de ratón se ha descrito que betaglicano se expresa en poblaciones celulares somáticas, y actúa en conjunto con inhibina (Sarraj et al., 2007; Sarraj et al., 2010). En el ovario, betaglicano se ha identificado en células de la granulosa y de la teca; y alteraciones en su expresión se relaciona con tumores de células de la granulosa y falla ovárica temprana (Bilandzic et al., 2009). Se ha demostrado también, que betaglicano es esencial para el desarrollo normal de testículos en el humano y en el ratón. Se expresa en células de Sertoli y de Leydig, donde participa con activinas y TGF β s para la disminución en la producción de andrógenos y durante la gonadogénesis temprana; (Bilandzic et al., 2009).

En el humano BG se expresa en etapa adulta en gónadas, glándulas suprarrenales, algunas regiones del cerebro (glándula pituitaria) y hasta en sincitiotrofoblastos (Bilandzic and Stenvers, 2012). Existe evidencia de que betaglicano es requerido por inhibina para actuar en células gonadotróficas. Inhibina antagoniza la producción de la Hormona Folículo Estimulante (FSH) por la glándula pituitaria y la ausencia de betaglicano demuestra su importancia dentro de la regulación del eje hormonal reproductivo (Makanji et al., 2008).

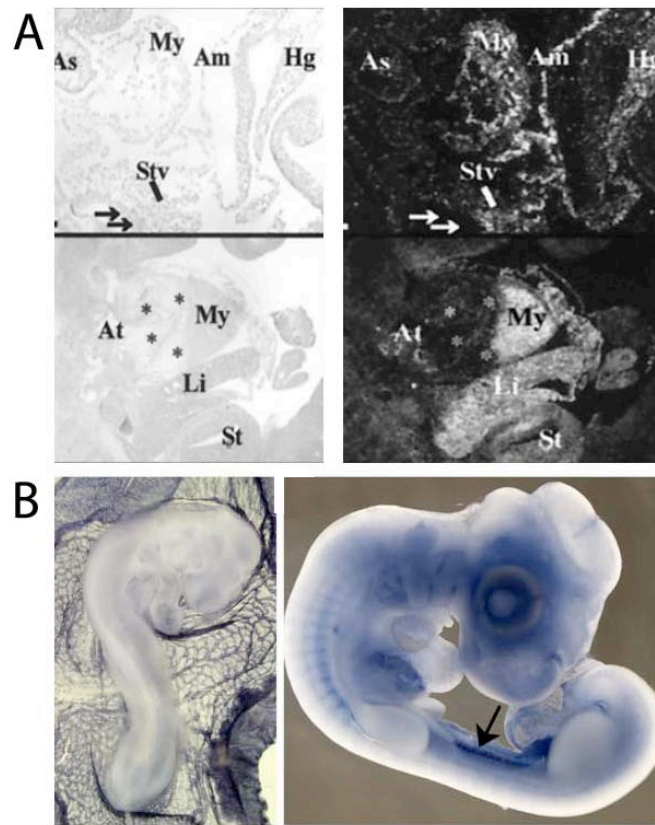


Figura4. Expresión del ARNm de betaglicano en raton y pollo. A: Expresión del RNAm de betaglicano en el corazón de ratón durante los estadíos E.9.5 (imagen superior) y E11.5 (imagen inferior). **B:** Expresión del RNA, de betaglicano en embriones de pollo en los estadíos 14 y 26. Modificado de: (Stenvers et al., 2003; Cooley et al., 2014)

Estudios en embriones de pollo, muestran que el RNAm de BG se expresa débilmente a partir de los estadíos 4-6 en el mesodermo extraembrionario, y a inicios de los estadíos 5-6 el transcrito de BG se detecta en células endodermales

del vitelo extraembrionario. Entre los estadios 8-12 la expresión de BG es evidente en las células embrionarias y extraembrionarias laterales, y en el endodermo extraembrionario, así como, en el piso del intestino anterior a inicios del estadio 9. En estadios más tardíos (15-26) el transcrito de BG se detecta en niveles moderados en el endocardio y robustamente en células endoteliales de la vasculatura extraembrionaria, el hígado y el mesonefros (Cooley et al., 2014).

Otro estudio en pollo muestra que la proteína de BG se expresa en riñón, principalmente en el mesodermo mesonefrogénico, glomérulos presuntivos y células epiteliales parietales de las nefronas. A partir del estadio 16 BG se expresa en el tubo neuronal, en las células que rodean las fibras nerviosas de las neuronas motoras y en los pares craneales. Entre los estadios 14 y 26, BG se expresa en el mesodermo lateral, intermedio y paraxial, células mesenquimales y en el endodermo presuntivo de pulmón (Olivey et al., 2003).

1.5 Knock out de Betaglicano.

Un paso importante para el estudio de betaglicano *in vivo* fue el desarrollo de ratones carentes de este receptor. Stenvers y colaboradores demostraron que al contrario de lo que se pensaba sobre la función de BG como receptor accesorio, y no fundamental para la fisiología celular, los embriones carentes del receptor presentaban un fenotipo letal al día 16.5 del desarrollo embrionario teniendo defectos en la proliferación de células cardíacas y en la apoptosis en el hígado; con inhibición de la eritropoyesis como efecto secundario de la apoptosis hepática (Stenvers et al., 2003). Los corazones de los embriones presentaban paredes miocárdicas delgadas y defectos en el septum. Se comprobó que las células fibroblásticas del knockout presentaban una sensibilidad reducida a TGF β 2 en términos de inhibición del crecimiento, activación de genes reporteros y localización nuclear de Smad2 (Stenvers et al., 2003).

En el ratón carente de betaglicano, también existe una inhibición en la diferenciación de las células de Leydig, con una reducción en la expresión de

múltiples genes involucrados en el desarrollo de células somáticas y la esteroidogénesis (Sarraj et al., 2010).

Especie	Gene	Fenotipo	Defectos	Referencia
Ratón	TGF- β 1	Letalidad posnatal (4 semanas)	Inflamación multifocal, defectos en hematopoyesis y vasculogénesis del saco vitelino.	(Shull et al., 1992; Kulkarni et al., 1993; Dickson et al., 1995)
	TGF- β 2	Letalidad embrionaria	Cianosis. Malformaciones en ojo, columna espinal, oído interno, corazón, pulmón, extremidades, urogenitales y craneofaciales.	(Sanford et al., 1997)
	TGF- β 3	Letalidad posnatal (24 h)	Defectos en palatogénesis y retraso en desarrollo y maduración de los pulmones	(Kaartinen et al., 1995)
	TGF β R-II	Letal (E10.5)	Defectos en hematopoyesis y vasculogénesis del saco vitelino.	(Oshima et al., 1996)
	TGF β R-III	Letal (E13.5)	Defectos de proliferación en corazón y apoptosis en hígado	(Stenvers et al., 2003; Compton et al., 2007)
Pez cebra	TGF- β 3	No letal	Defectos en la condrogénesis craneofacial. Malformaciones en los cartílagos del arco faríngeo y neurocraneal.	(Cheah et al., 2010)

Tabla 1. Fenotipos de los modelos deficientes en ligandos y receptores de la subfamilia de TGF β . Modificado de: (Dunker and Kriegelstein, 2000)

A pesar de que se podría pensar lo contrario, debido a que el betaglicano es el equipotenciador del TGF β 2, los fenotipos de los ratones carentes de betaglicano y de TGF β 2, no se sobrelapan. El ratón knockout para TGF β 2 presenta defectos craneofaciales, esqueléticos en el ojo, oído y tracto urinario y sin defectos en el

hígado (Ver tabla 1) (Sanford et al., 1997). Los dos fenotipos sólo coinciden en la presencia de defectos cardiacos, por lo que se sugiere que la función de betaglicano no se limita a la señal de TGF β 2, y podría estar participando en otros procesos del desarrollo embrionario.

La obtención del ratón Knockout demostró la importancia del betaglicano en etapas tempranas del desarrollo; y se ha determinado su función relativa a ciertas clases de ligandos. Sin embargo, debido a su unión a múltiples ligandos y su complejo modo de acción, el mecanismo exacto por el cual el betaglicano actúa en situaciones fisiológicas, sus implicaciones en la biología de TGF β y principalmente en el desarrollo embrionario son todavía poco entendidas.

2. Pez Cebra (*Danio rerio*)

Estudiar el papel que juega BG en el desarrollo del pez cebra nos ayudaría a entender el fenotipo letal del BG en el ratón, pues el *D. rerio* permite el seguimiento en tiempo real del comportamiento de células individuales y linajes celulares durante el desarrollo embrionario (Neumann, 2002).

El pez cebra es un animal pequeño de 4-5 cm de longitud y presenta líneas longitudinales doradas y plateadas. Se encuentra en forma natural en ríos de la India, y muy frecuentemente en acuarios. Fue introducido como modelo de estudio por George Streisinger de la Universidad de Oregon en la década de los 70's, con la finalidad de estudiar las características de organización y desarrollo embrionario del sistema nervioso de vertebrados a través del uso de cepas mutantes (Grunwald and Eisen, 2002).

El pez cebra es un organismo diploide ($1n = 25$ cromosomas), y el tamaño de su genoma es de aproximadamente 1.7 Gbp. Presenta varias características que lo convierten en un excelente modelo de estudio. En primer lugar, su fácil crianza en el laboratorio, pudiéndose mantener a los adultos en cruza durante todo el año, produciendo un gran número de embriones (100-200 huevos fertilizados por cada cruza). En segundo lugar, la fertilización y el desarrollo embrionario es de forma

externa, por lo cual se pueden manipular las condiciones de fertilización y mantener a los gametos por separado; y en tercer lugar, los embriones son transparentes las primeras 24 horas y puede hacerse uso de químicos para mantenerlos así durante todo el desarrollo, haciendo factible la detección y visualización directa e *in vivo* de fenotipos específicos (Grunwald and Eisen, 2002).

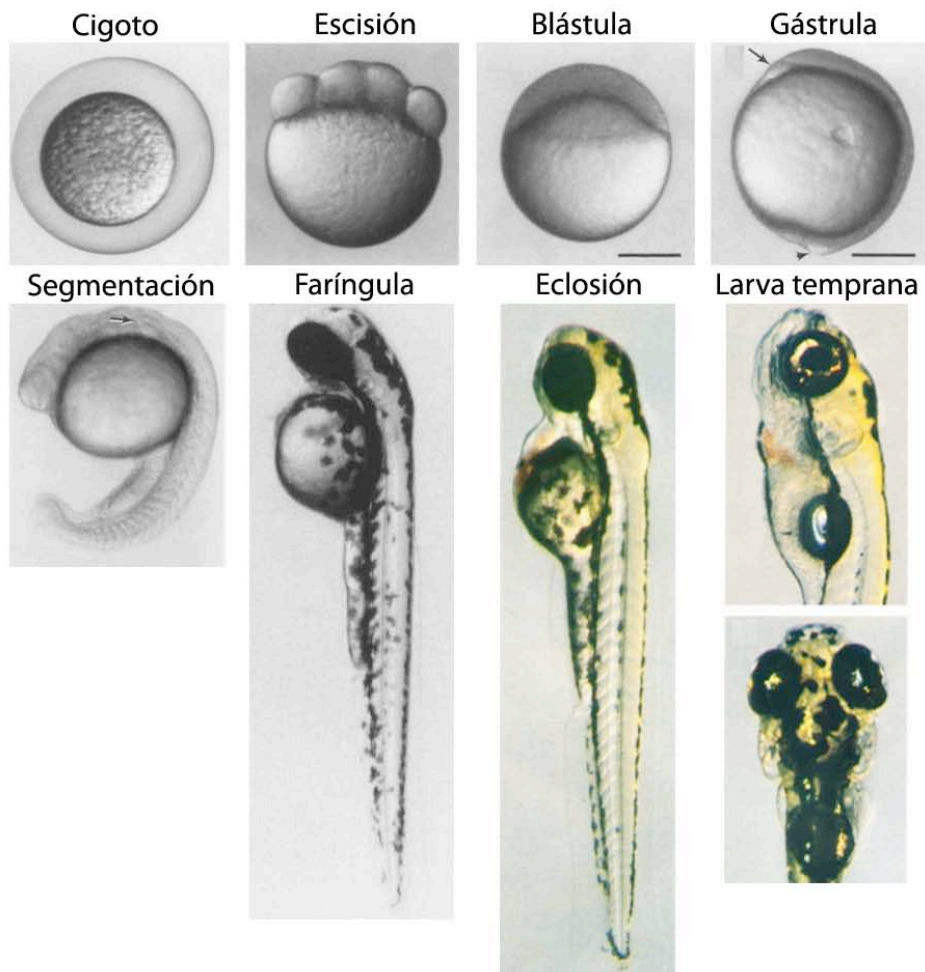


Figura 5. Periodos del desarrollo temprano del pez cebra. Imágenes de diferentes estadios del desarrollo de pez cebra, pertenecientes a cada uno de los periodos del desarrollo. Escisión (1.25 hpf), Blastula (4,7 hpf), Gastrula (10 hpf), Segmentación (19 hpf), Farínula (48 hpf), Eclosión (72 hpf) y Larva temprana (120 hpf). Modificado de: (Kimmel et al., 1995).

Usando al pez cebra como modelo de estudio, los investigadores han obtenido algo que se creía imposible para un vertebrado: un gran catálogo de mutaciones seleccionadas solamente en base a cómo afectan al organismo vivo. Cientos de mutaciones se han descrito incluyendo aquellas que afectan el establecimiento de la forma del embrión, la generación de las capas germinales, órganos y tipos de células específicas, así como también la organización de distintas regiones del cerebro y de la arquitectura vascular (Grunwald and Eisen, 2002)

2.1 Desarrollo temprano del pez cebra.

Kimmel y colaboradores estudiaron y describieron ampliamente los estadios tempranos del desarrollo del pez cebra (Figura 5). Con el fin de describir el tiempo de desarrollo se definen periodos y estadios, o menos preferido, horas de desarrollo a una temperatura estándar, comúnmente 28.5°C (Kimmel et al., 1995).

El periodo de cigoto comprende desde la fertilización del huevo hasta la primera división celular y comprende 4 estadios morfológicos: estadio plano, estadio redondo (6-12 minutos después de la fertilización) donde el cigoto es turgente; el estadio quiescente y la división 1, 18 minutos después de la fertilización.

El periodo de división, comienza con la primera mitosis, el embrión comienza sus divisiones en blastómeros, y la separación del vitelo del citoplasma, también llamada segregación bipolar, aclaran el embrión dándole su apariencia cristalina. Este periodo se divide en estadios correspondientes al número de células en el embrión, de 2 células, aproximadamente a los 30 min de desarrollo, hasta 64-células a las 2 horas post-fertilización (hpf). Las primeras divisiones son incompletas o meroblásticas y hasta el estadio de 8 células todos los blastómeros se continúan con el vitelo.

El periodo de Blástula comprende las divisiones sincrónicas tardías, la transición de la blástula media y los estadios tempranos de epibolia, cubriendo un tiempo de 2.3 a 5.3 hpf. Durante este periodo el embrión comienza la transición del control materno al control cigótico del desarrollo. El periodo de Gástrula se extiende de las

5.5 a las 10 hpf, durante las cuales se empiezan a formar las capas germinales y la epibolia continua y empieza la gastrulación.

El periodo de Segmentación comprende el resto del primer día de desarrollo, de las 10h hasta las 24 hpf; un periodo donde empiezan las subdivisiones del plano corporal y la segmentación del mesodermo paraxial en somitas. De las 24 a las 48 hpf, estadio de faríngrula, el eje corporal del embrión se alarga de su curvatura inicial sobre el vitelo, inicia la pigmentación y el desarrollo de las aletas. En el estadio de eclosión se da una rápida morfogénesis de los sistemas de órganos primarios, se desarrolla el cartílago de la cabeza y aletas pectorales, y el proceso de eclosión es asincrónico. A partir de las 72 hpf, se infla la vejiga natatoria de los embriones y desarrollan los comportamientos de evasión y búsqueda de alimento.

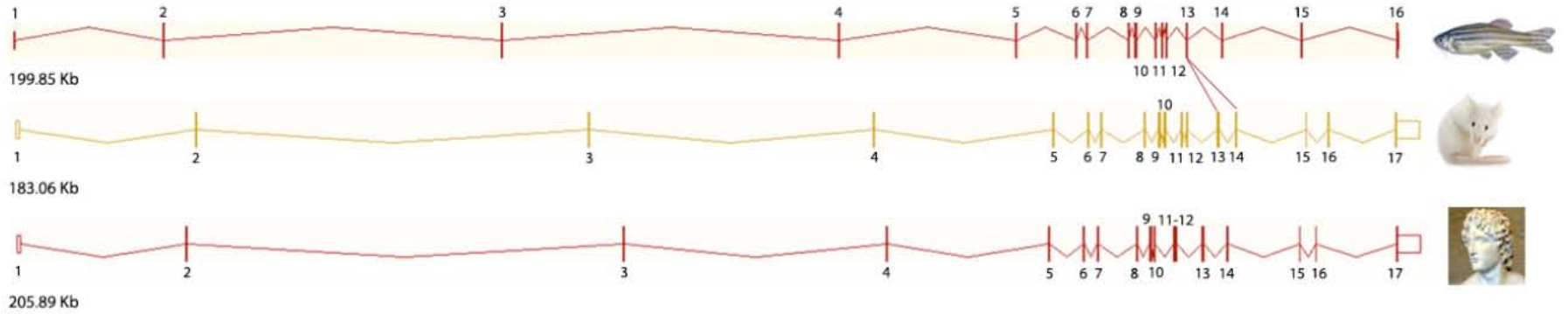
3. Antecedentes específicos.

En el pez cebra el gen del receptor tipo III para TGF β (*tgfb3*) está codificado en el cromosoma 6, y al contrario de la mayoría de los genes en el pez cebra que cuentan con una segunda copia debido a un proceso de duplicación del genoma, *tgfb3* es único. La base de datos de Ensembl muestra que el gen de BG en el pez cebra tiene un tamaño total de 199.85 Kpb, y cuenta con 16 exones, a diferencia de los 17 exones con los que cuenta su versión en mamíferos. La alineación de la secuencia de cDNA de *tgfb3* de diferentes especies muestra que la secuencia correspondiente a los exones 13 y 14 de mamíferos se encuentra en un solo exón en el pez cebra (Figura 6), pero más allá de esta diferencia, la distancia y el tamaño de los exones se encuentran conservados entre especies. Usando esta información, hemos clonado y secuenciado el cDNA de betaglicano en el pez cebra (Kamaid et al, sometido). El mRNA de *tgfb3* contiene un ORF de 2544 pb, que codifica para una proteína de 848 aminoácidos. El análisis de la secuencia primaria de aminoácidos de la proteína de BG en pez cebra, y la organización de sus módulos funcionales y estructurales muestra una alta similitud con la de otras especies. La proteína de BG contiene en el amino terminal un

péptido señal de 21 aminoácidos (aa), seguido de una porción extracelular de 762 aa, un dominio transmembranal de 24 aa, y una pequeña porción citoplasmática de 41 aa en el carboxilo terminal. El dominio extracelular de BG de pez cebra conserva las características de su versión en mamíferos; contiene un dominio E en el amino terminal, con una similitud del 54.8% con el de ratón, una región linker no estructurada con una alta variabilidad en la secuencia de aa y un dominio U próximo a la región transmembranal con un 45.1% de similitud con su versión murina. Los dominios transmembranal y citoplasmático de la proteína cuentan con la mayor similitud con otras especies, 85,1% (Figura 6). Otras características del BG de pez cebra es que conserva 16 de las cisteínas presentes en otros BG's, conserva uno de los dos sitios de unión a cadenas GAG's de su versión en mamíferos (Ser 522), así como la treonina 841 de la versión murina, la cual es fosforilada por el receptor TGF β RII e interactúa con β -arrestina, para la internalización del complejo de señalización (Chen et al., 2003).

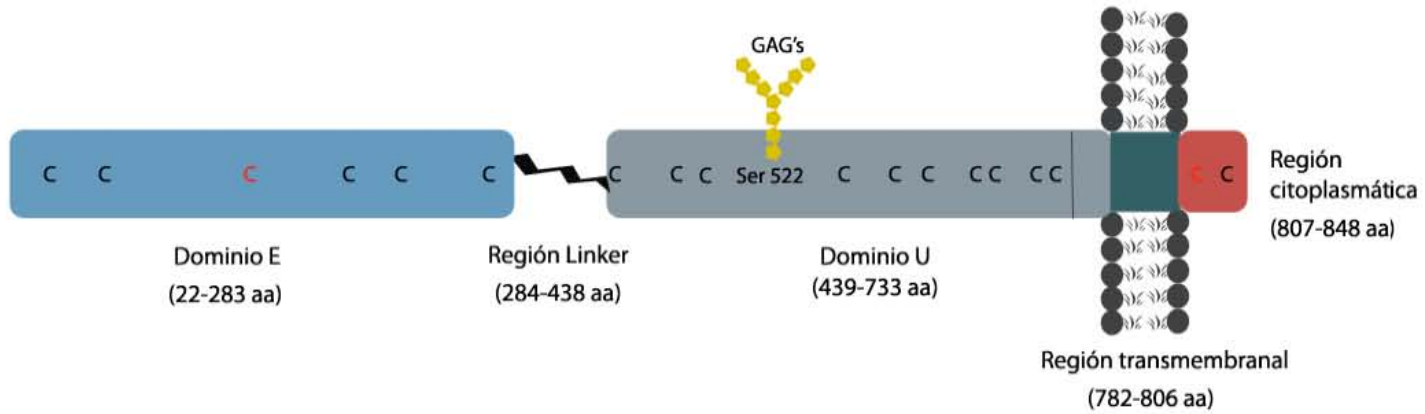
Siguiente página:

Figura 6. A. Estructura del gen y la proteína de BG de pez cebra. Comparación del tamaño y arreglo exónico de *tgfr3* en pez cebra, con el de ratón y humano (Tomado de Ensembl, ENSDART00000151274.1, ENSMUST00000031224.9, ENST00000212355.6). **B.** Dominios de la proteína de BG de pez cebra, tamaño, y similitud de la secuencia primaria de aminoácidos con otras especies. También se muestran las cisteínas conservadas y el sitio de unión a GAG's.



Secuencia primaria
EG de Pez cebra vs.

	Humano	Rata	Ratón
Dominio E	52.10%	53.90%	54.80%
Región linker	23.50%	20.60%	21.90%
Dominio U	43.40%	44.50%	45.10%
Región Transmembranal	91.67%	91.67%	91.67%
Región Citoplasmática	83.33%	83.33%	83.33%



4. Justificación

La investigación sobre el betaglicano ha determinado las funciones en las que participa al interactuar con TGF β 2 e inhibina, y la obtención del ratón Knockout logró demostrar su importancia en el desarrollo embrionario. Sin embargo, debido a su unión a otros ligandos y sus múltiples funciones celulares, el mecanismo exacto por el cual el betaglicano actúa en situaciones fisiológicas, sus implicaciones en la biología del TGF β y principalmente en biología del desarrollo, son todavía desconocidas en gran parte.

La conservación de características a nivel de gen y la proteína de BG de pez cebra con el de mamíferos, permiten validar el estudio del receptor en este modelo de desarrollo de vertebrados, lo que nos proporcionará información para comenzar a dilucidar a mayor detalle los procesos en los que BG participa durante el desarrollo. Para esto es necesario primero determinar la expresión del receptor durante el desarrollo embrionario, y contar con las herramientas necesarias para llevar a cabo diversos estudios.

La obtención de anticuerpos policlonales capaces de reconocer el betaglicano de pez cebra, será de gran utilidad para la realización de diversas técnicas que permitan estudiar la expresión, las características bioquímicas y la función del receptor tipo 3 de TGF β (Betaglicano) durante el desarrollo del pez cebra.

5. Objetivo General.

Determinar la presencia del receptor tipo III de TGF- β durante el desarrollo del pez cebra.

5.1 Objetivos específicos.

1. Identificar y cuantificar el transcrito de betaglicano en diferentes estadios del desarrollo embrionario del pez cebra.
2. Sobreexpresar y purificar el ectodominio de betaglicano de pez cebra.
3. Inmunizar conejas con el ectodominio de betaglicano de pez cebra para obtener un antisuero específico contra el BG de pez cebra.
4. Titular y caracterizar los anticuerpos obtenidos, en ensayos para detectar el BG de pez cebra.
5. Detectar y caracterizar bioquímicamente al Betaglicano de pez cebra durante el proceso de desarrollo embrionario.

6. Metodología

6.1 Extracción de RNAm

Se seleccionaron seis estadios de desarrollo para el estudio del desarrollo del pez cebra: 8hpf (75% epibolia), 14hpf (10-somitas), 24hpf, 48hpf, 72hpf y 144hpf (6d). RNA total fue obtenido por extracción con Trizol (Invitrogen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La concentración del RNA se determinó usando un espectrofotómetro NanoDrop.

6.2 Síntesis de cDNA

1 μ g de RNA total fue usado para la síntesis del cDNA, usando transcriptasa reversa M-MLV (Invitrogen) con oligonucleótidos random (hexámeros Invitrogen) durante 50 minutos a 37°C. En todos los casos se puso un control de la reacción sin enzima para analizar la contaminación con DNA genómico.

6.3 Tabla de oligonucleótidos

Nombre	Secuencia (5'-3')	Sentido	Uso
BG037	CTG AAT TCA AGG ATG ACT CTG TGG TCT ACT AC	Delantero	RT-PCR
BG038	CTG AAT TCT TTT CAG ACA CTG GCG GAC AAC TC	Reverso	
zbActinF01	CGA GCA GGA GAT GGG AAC C	Delantero	qRT-PCR
zbActinR01	CAA CGG AAA CGC TCA TTG C	Reverso	
zBGF03	CAC AAG GAG CCA GAG AGA AAA CG	Delantero	qRT-PCR
zBGR03	GGG GAG TTC AGG ATA AAA ACC AGT G	Reverso	
zBG101	aaacatatgGGTCCATTGTCCAGATCTGAC	Delantero	PCR
zBG102	tttctcgagAGTGACTGGCATGTCGTCAGA	Reverso	

6.4 PCR cuantitativo en tiempo real.

Se prepararon reacciones de 15 μ l de la siguiente manera: 7.5 μ l de SYBR green mix con Rox (Invitrogen), 1.5 μ l del oligonucleótido delantero (2.5 μ M), 1.5 μ l del oligonucleótido reverso (2.5 μ M), 1.2 μ l de templado y 3.3 μ l de agua estéril. El templado fue diluido 1:20 y en el caso de NTC (controles sin templado), el cDNA se reemplazó por agua, así también, se incluyeron controles de RT sin transcriptasa reversa. Todos los ensayos de real time fueron hechos por triplicado, a partir de experimentos separados. La amplificación fue: 5 min a 95°C, seguida de 40 ciclos de: 94°C por 30 s, 58°C por 1 min, y 60°C por 1 min. La expresión del gene se calculada usando la fórmula $E^{-\Delta\Delta Ct}$, donde E es la eficiencia de la PCR. La expresión de *tgfr3* se normalizó con β -actina.

6.5 Análisis estadístico.

El error estándar del promedio (SEM) para cada valor de la expresión relativa del gen se calculó como la medida de la variación de los datos. Se utilizó la prueba de Fisher para el análisis estadístico de los datos. Valores de $p \leq 0.05$ se consideraron como significativos.

6.6 Sobreexpresión del ectodominio de betaglicano de pez cebra.

Se amplificó por PCR un fragmento NdeI-XhoI que codifica para el ectodominio de zBG (Gly24 hasta Thr761), que incluye una etiqueta Flag después de la Ser29, en el extremo N-terminal. Como se muestra en la figura 10, la construcción también contiene una cola de 6 histidinas. Este fragmento se subclonó en el vector pET-23b (Novagen, Madison WI) que resultó en los plásmidos pET23b+7, pET23b+9 y pET23b+10. Las cepas de *E. coli* BL21 codon plus, que contenían los plásmidos pET23b vacío y pET23b+10, se inocularon en medio LB con ampicilina a 37°C en agitación constante hasta alcanzar una $D.O_{260}$ de 0.6. Se añadió IPTG en una concentración final de 0.1mM para inducir la sobreexpresión de la proteína recombinante de BG y se incubaron a 20°C durante 6 horas en agitación constante.

6.7 Purificación de la proteína recombinante de BG de pez cebra.

Para purificar la proteína de 85 KDa, se usó el protocolo descrito por (Mahlawat et al., 2012), que permite purificar por afinidad, en condiciones desnaturizantes, proteínas marcadas con una cola de 6 histidinas. En breve, para un cultivo de 2L, se obtuvo la pastilla por centrifugación a 12000 rpm y se resuspendió en 75 ml de la solución 1 (100mM Tris pH8, 10mM EDTA, 1mM PMSF). Se sonicó la muestra durante 1 minuto 5 veces en frío. Se centrifugó a 12000rpm durante 15 min y la pastilla se resuspendió en 75 ml de la solución 2 (100mM Tris pH8, 10mM EDTA, 1mM PMSF, 500mM NaCl); se centrifugó a 12000rpm 10 minutos y se resuspendió la pastilla en 75 ml de la solución 3 (100mM Tris pH8, 10mM EDTA, 1mM PMSF, 0.5% Triton X-100). Se centrifugó a 12000rpm durante 10 min, la pastilla se resuspendió en 100 ml de la solución 4 (8M urea, 25mM Tris pH8, 7.5mM Imidazol, 1mM PMSF, 300mM NaCl) y se dejó agitando a 4°C ON. Al día siguiente la muestra se centrifugó a 12000rpm 20min a 4°C y el sobrenadante se filtró.

El sobrenadante se carga en una columna de Ni²⁺ previamente equilibrada con la solución 4. Se realiza un lavado con 30 ml de la solución 4 y se eluye la proteína con 50 ml de la solución 4 más 50 ml de la solución 5 (8M urea, 25mM Tris pH8, 300mM Imidazol, 1mM PMSF, 300mM NaCl) puestas en vasos comunicantes para crear un gradiente de imidazol. Se recolectaron fracciones de 3ml y cada fracción se analizó por tinción de plata.

6.8 Tinción de Plata.

El gel de poliacrilamida se fija en 50%metanol/12% ácido acético/0,0185% formaldehído durante toda la noche, se lava 2min en agua, después se lava en 50% metanol durante 20min 3 veces (3X), y con agua 2 min. Se incuba 1 min en tiosulfato, se lava 3X 20seg, se incuba en AgNO₃/formaldehído 37% 15 min, después se lava con agua 2X 20seg, se incuba en NaCO₃/Na₂S₂O₃x5H₂O/formaldehído 37% hasta obtener la señal deseada.

Finalmente se lava en agua 2X 1min y posteriormente en 50%metanol/12% ácido acético/formaldehído 37%.

6.9 Western Blot.

Las muestras separadas en geles de SDS-PAGE, se transfirieron a una membrana de PDVF, previamente activada con metanol durante 1 minuto, durante 1h30 a 100 V. La membrana se bloquea con TBST 0.1% Tween-Leche 5% durante 1 hora a temperatura ambiente (TA). Se incuba con el anticuerpo primario (α -Flag 1:5000, α -822 1:5000, α -zfBG 1:6000) durante 1 hora a TA, y se lava 3X10min con TBST 0.1% Tween. Se agrega el anticuerpo secundario (1:5000) y se incuba por 1 hora a TA. Se lava 3X10min con TBST 0.1% Tween, y se revela con luminol.

6.10 Transfección de células COS-1 con DEAE-Dextrán

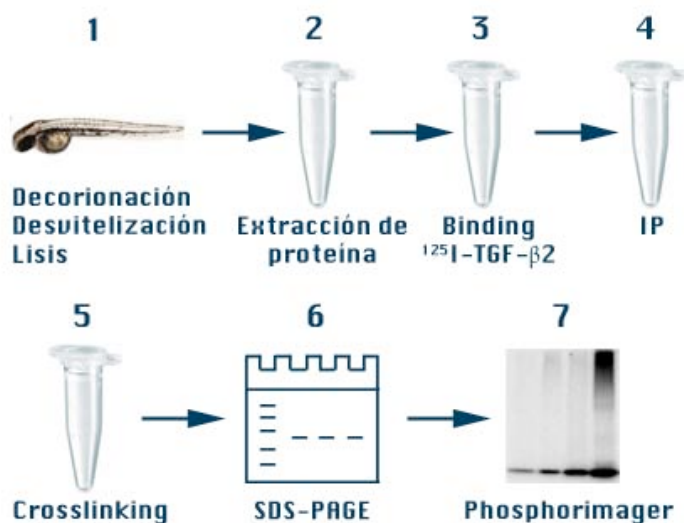
Se siembran 500,000 células por caja de 10cm de diámetro, 3 días antes de la transfección. Se lavan las células con PBS 1X, y DMEM HG sin suero + antibiótico. La mezcla de transfección se prepara con 5 ml de DMEM HG sin suero + antibiótico, 50 μ l de cloroquina, 10 μ g de DNA y 200 μ l de DEAE-Dextrán. Se mezcla con vórtex, se le añade a las células y se incuba durante 3 horas a 37 °C. Se quita el medio y se agregan 10 ml de DMSO 10% en PBS durante 2 min. Se enjuaga con medio DMEM HG sin suero + antibiótico y se sustituye por medio completo.

6.11 Inmunoprecipitación (IP)

Se toman 300 μ g de proteína total y se lleva a un volumen final de 300 μ l; se añaden 50 μ l de suero preinmune y se incuba ON en agitación a 4 °C. Se agregan 50 μ l de proteína G y se incuba 40 min a 4 °C. Se centrifuga a 123000 rpm 20 seg y se recupera el sobrenadante; se le añaden 50 μ l de los anticuerpos (α -zfBG) y se incuban durante 2 h en agitación a 4 °C. Se le añaden 50 μ l de proteína G y se incuba 45 min a 4 °C. Se centrifuga 20 seg a 12300 rpm y se desecha el

sobrenadante; la pastilla se lava 3X con PBS Triton 0.1% SDS 0.02% + PMSF, se le agrega Buffer de Laemmli 4X + DTT y se hierve a 94°C 5 min.

6.12 Detección del BG endógeno de embriones de pez cebra. Ver esquema a continuación.



I. Obtención de proteína total de embriones de pez cebra (pasos 1-2).

Los embriones del estadio deseado se decorionaron manualmente y se colocaron entre 150-200 embriones en tubos de 1.5 ml; se les retira el agua, se les añade buffer desvitelinizante (NaCl 55 mM, KCl 1.8 mM, NaHCO₃ 1.25 mM) y mediante pipeteo se retira el vitelo. Se centrifuga a 3000 rpm por 15 seg, y se lavan 2X con buffer de lavado (NaCl 110 mM, KCl 3.5 mM, CaCl₂ 2.7 mM y Tris Hcl 10 mM pH. 8.5). Se resuspenden en 350 µl de buffer de lisis (TNTE 0.5% + PMSF) y con Politrón se da un pulso continuo a la menor velocidad durante 1 min. Se centrifuga a 13200 rpm durante 15 min a 4 °C y se recupera el sobrenadante. La concentración de proteína se determinó por el método de Bradford.

II. Marcado por afinidad en extractos de pez cebra (pasos 3-7).

Se toman 500 µg de proteína total y se lleva a un volumen final de 500 µl con TBS 0.1% Triton 100-X; se añaden 150 pM de ¹²⁵I-TGFβ-2 y se incuba 2h en agitación

a 4 °C. Se agregan 5 µl del anticuerpo #31 o suero preinmune y se incuban toda la noche (ON) en agitación a 4 °C. Se le añaden 50 µl de proteína G y se incuba 50 min a 4 °C. Se centrifuga 20 seg a 12300 rpm y se desecha el sobrenadante, la pastilla se lava 3X con PBS adicionado de Triton 0.1% y SDS 0.02% (Solución de lavado). La pastilla se resuspende en 250 µl de solución de lavado y se añaden 1.5 µl de DSS (10 mg/ml DMSO) y se incuba 15 min a 4 °C. Se añaden 500 µl de solución de lavado + 25 mM Tris pH 7.4. Se centrifuga y la pastilla se resuspende en 30 µl de buffer de Laemmli 4X + DTT y se hierve 5 min a 94 °C. Las muestras se llevan al contador-gamma y posteriormente se corren en geles de SDS-PAGE al 6%. El gel se fija durante 30 min en 50%metanol/12% ácido acético/formaldehído 37%, se lava 1x con agua durante 15 minutos y se seca a 80°C durante 1 hora. El gel se expone en pantalla blanca y se revela usando Molecular Dynamics Thyphon Phosphorimager.

6.13 Tratamiento enzimático con Condroitinasa y Heparitinasa

Después de realizar el marcado por afinidad y la inmunoprecipitación del receptor, la pastilla de Proteína G de 4 tubos, se resuspende en 250 µl de buffer de digestión (10mM Tris-HCl pH7.5, 50mM $C_2H_3NaO_2$ pH7.5, 2.5mM $CaCl_2$, 0.1% Triton X-100, 0.01% BSA y 1mM de inhibidores de proteasas), se mezclan y se vuelven a repartir en 4 tubos. Se centrifugan, se elimina el sobrenadante y se resuspenden en 100 µl de buffer de digestión solo, con 200 mU de Condroitinasa ABC, 200 mU de Heparitinasa o ambas. Se incuban a 37 °C durante 12 horas y la reacción se detiene añadiendo 25 µl de buffer de Laemmli 4x + DTT e hirviendo 5 min a 94 °C. Las muestras se llevan al contador-gamma y posteriormente se corren en geles de SDS-PAGE al 6%. El gel se fija durante 30 min en 50%metanol/12% ácido acético/formaldehído 37%, se lava con agua durante 15 minutos y se seca a 80°C durante 1 hora. El gel se expone en pantalla blanca y se revela usando Molecular Dynamics Thyphon Phosphorimager.

7. Resultados.

7.1 Expresión del ARNm de Betaglicano en pez cebra.

Con el propósito de determinar la presencia del RNA mensajero de Betaglicano en diferentes estadios del desarrollo del pez cebra, se realizaron experimentos de RT-PCR en 6 estadios diferentes del desarrollo 5hpf (50% epibolia), 8hpf (75% epibolia), 14hpf (10-somitas), 24hpf, 48hpf, 72hpf y 144hpf (6d)). Los resultados muestran que el RNAm de betaglicano es capaz de detectarse en bajo nivel a partir de las 8hpf; y en mayor nivel a partir de las 14 hpf y hasta las 144 hpf (Figura 7). La detección del RNAm a partir de las 8 hpf, nos sugiere que el transcrito es de origen cigótico y no materno. (Figura 7.)

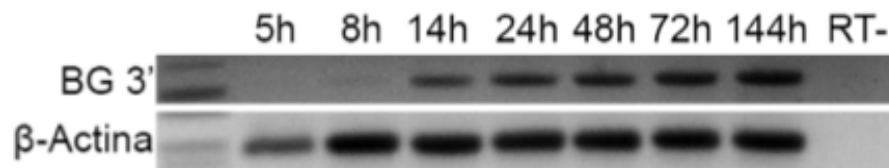


Figura 7. RT-PCR de betaglicano para 7 estadios diferentes del desarrollo del pez cebra. Se usó a β -actina como control positivo de la RT-PCR y como control negativo se utilizó una reacción de RT sin transcriptasa reversa. BG3': producto de la región 3' del RNAm. Imagen representativa de al menos 3 experimentos independientes.

Con el fin de conocer, no solo la presencia del transcrito de betaglicano, sino también las diferencias en los niveles de expresión del transcrito de BG en cada uno de los estadios analizados, se realizaron experimentos de PCR en tiempo real. Se comenzó con la estandarización de la PCR para betaglicano y β -actina, el cual sirvió para normalizar los datos de expresión de betaglicano.

Se utilizó una dilución seriada del templado de RNA (1:10, 1:100, 1:1000, 1:2000, 1:10000) para la determinación de la eficiencia de amplificación de los oligonucleótidos utilizados. Para determinar la eficiencia de amplificación se calcula el promedio de los valores de la señal de fluorescencia a un Ct (cycle

threshold) determinado, de los triplicados de cada serie de dilución y se grafican contra el logaritmo de la concentración (Figura 8 A. y B.). En ambos casos, la pendiente fue menor a -3.32, que es el valor al cual se espera un incremento de 10 veces la cantidad del amplicón durante la fase exponencial de la PCR y tener un 100% de eficiencia.

Para que las expresiones de 2 genes, en este caso el gen de referencia (β -actina) y nuestro gen problema (betaglicano), puedan ser comparables, la eficiencia de amplificación de los 2 pares de oligonucleótidos debe ser igual o muy similar. Para saber si esto aplicaba para nuestras reacciones, se realizó una gráfica de comparación de eficiencias; donde se calculó el ΔCt (Ct del gen problema – Ct del gen referencia) para cada uno de los factores de dilución. Estos valores se volvieron a graficar contra el logaritmo de concentración y se determinó la pendiente de la recta resultante (Figura 8C).

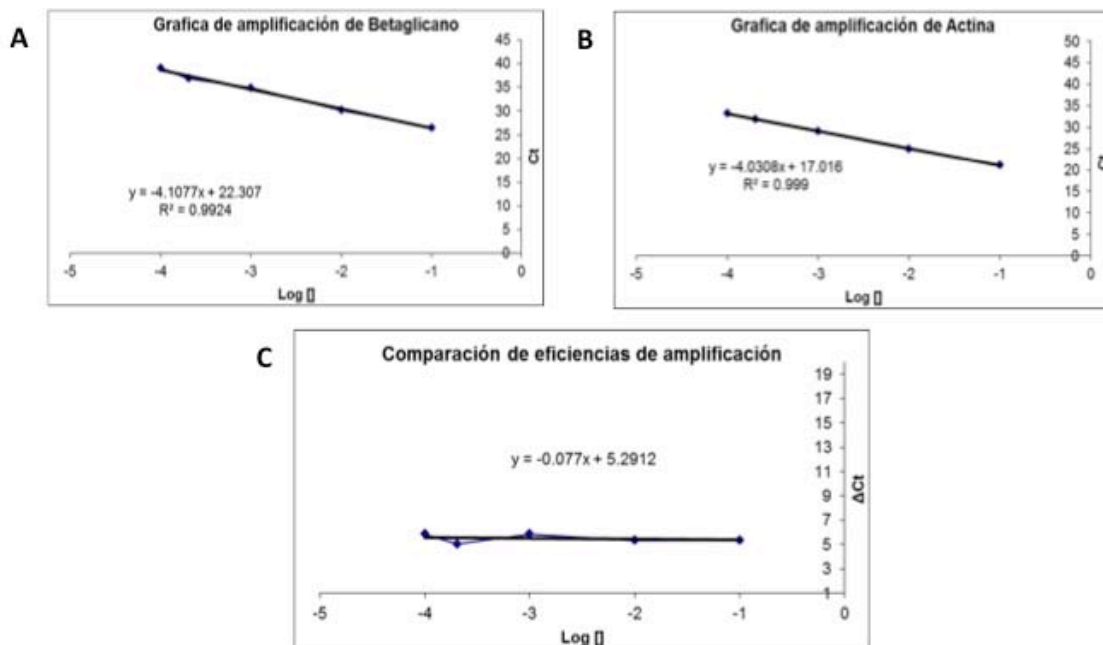


Figura 8. Estandarización de la qRT-PCR. Graficación del valor de fluorescencia para cada PCR (**A.** Betaglicano y **B.** Actina) en un ciclo seleccionado empíricamente (Ct) y en cada una de las diluciones usadas contra el logaritmo de la concentración de cDNA. **C.** Comparación de las eficiencias de amplificación para ambas reacciones de PCR.

Al graficar los valores de ΔCt , se obtuvo un valor de pendiente de -0.077, que se encuentra dentro del rango permitido para la comparación de las eficiencias (-0.1 y 0.1). A partir de estos datos se calculó la eficiencia de amplificación, mediante la siguiente fórmula: $E=(10^{-1/m} -1) \times 100 = 76.867 \%$. Obteniendo la eficiencia promedio de las dos reacciones se prosiguió a definir la fórmula a utilizarse para los cálculos de expresión relativa mediante la siguiente fórmula:

$$1+E^{-\Delta\Delta Ct} = 1.76^{-\Delta\Delta Ct}.$$

con la cual se obtuvieron todos los datos de expresión relativa de betaglicano.

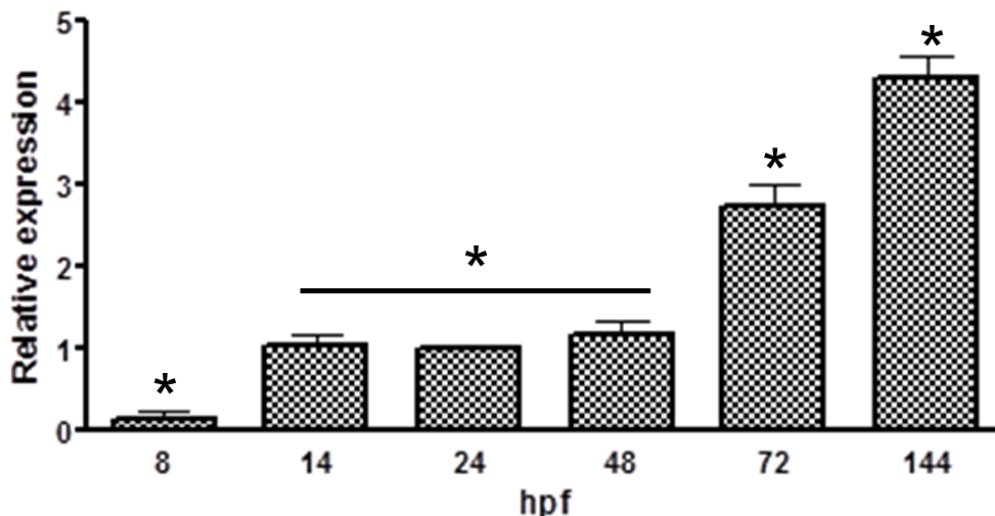


Figura 9. Niveles de expresión del gen de betaglicano durante diferentes estadios del desarrollo del pez cebra. Los resultados están expresados como el promedio de tres experimentos independientes \pm SEM. (*) indican una $p \leq 0.05$.

Los resultados muestran que a las 8 hpf el RNAm de BG comienza a expresarse en muy bajo nivel, y aumenta su nivel de expresión para las 14 hpf; el cual se mantiene hasta las 48 hpf sin variaciones considerables. Para las 72 hpf y las 144 hpf el nivel del transcrito de BG aumenta significativamente (1.5 y 2.5 veces respectivamente) en comparación al nivel del RNAm presente a las 48 hpf (Figura 9).

7.2 Sobreexpresión y purificación del ectodominio de betaglicano de pez cebra (zBG).

Con base en los resultados de la RT-PCR-cuantitativa, decidimos determinar por igual la presencia y niveles de la proteína de BG durante el desarrollo; sin embargo, los anticuerpos existentes contra BG de rata y humano no tienen una reacción cruzada con el del pez cebra. Por esta razón nos dimos a la tarea de desarrollar anticuerpos policlonales específicos para el BG de esta especie. Para ello fue necesario obtener una proteína recombinante que sirviese como antígeno. Con ese fin, se hizo un vector para la expresión en bacterias del ectodominio del BG de pez cebra, denominado eBG de aquí en adelante.

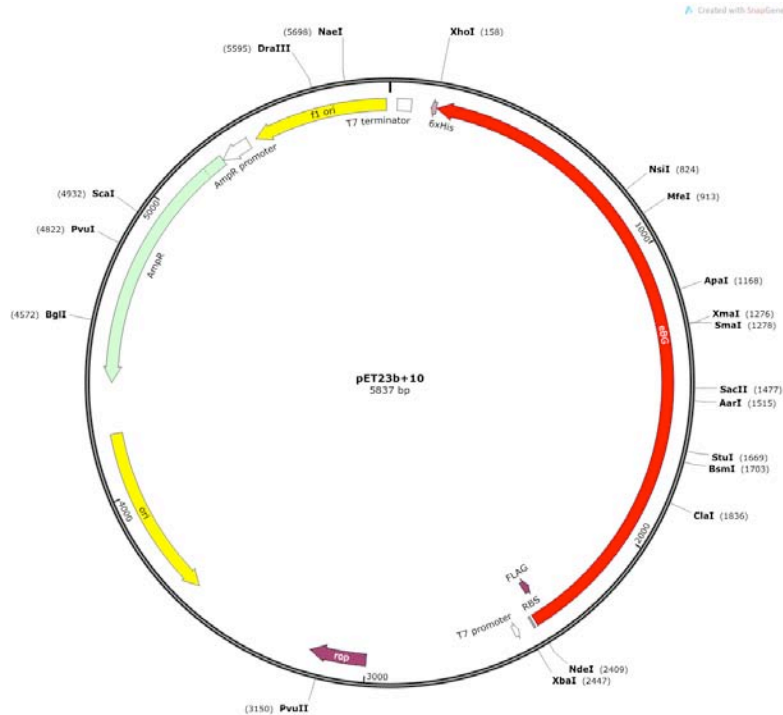


Figura 10. Esquema de eBG recombinante. El fragmento del ectodominio de BG se clonó en el vector pET23b+ en los sitios NdeI y XhoI, de tal forma que se produzca la proteína eBG de 751 aa., y que abarca del residuo 24 hasta el 761 de la región extracelular de zBG; además de contener una etiqueta FLAG en el N-terminal y un etiqueta 6His en el C-terminal.

Esta construcción se hizo amplificando por PCR un fragmento de 2235 pb, que codifica desde la Gly24 hasta la Thr761 del ectodominio del Betaglicano de pez cebra. Como templado se utilizó el plásmido FLT17wt, que codifica para la versión completa de betaglicano del pez marcado con un epítotope Flag, de ahí que eBG lo tenga después de la Ser29. El fragmento de PCR se subclonó en el vector pET23b, de tal forma que codificara para la región de eBG seguida de 6 His en la región C-terminal, con un peso esperado de 85 KDa (Figura 10), bajo el promotor bacteriano del operon de lac, por lo que su expresión fuese inducible con IPTG (isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido).

Usando 3 clonas diferentes de la misma construcción (P+7, P+9 y P+10) se iniciaron los ensayos de sobreexpresión de la proteína en cultivos de *E. coli* BL21 codon plus a 37°C durante 2h y 20h. Bajo estas condiciones no se observó la inducción de eBG por tinción de Coomassie en ninguna de las 3 clonas (Figura 11A), por lo que se decidió utilizar al epítotope Flag para determinar si eBG se estaba expresando. Los experimentos de Western blot (WB) mostraron la expresión de una proteína en bajas concentraciones y parcialmente degradada en las 3 clonas, quizás debido al alto número de cisteínas presentes en el ectodominio, que aumentaba con el tiempo de inducción (Figura 11B).

Con el fin de disminuir la cantidad de proteína degradada presente en los ensayos de sobreexpresión, se decidió probar nuevas temperaturas de inducción, 20°C y 30°C durante un periodo corto (3h). El resultado de los ensayos permiten observar una baja cantidad de proteína, incapaz de ser detectada por tinción de Coomassie, pero sí por WB, que mostró que a 20°C la proteína se mantiene mayormente intacta a diferencia del extracto a 30°C, que continúa presentando gran parte de la proteína degradada (Figura 12A.). Usando estas mismas condiciones se probó sonicar las muestras de cultivo bacteriano para tratar de romper cualquier cuerpo de inclusión que pudieran estar agregando a las proteínas. Lo que observamos fue un barrido de proteína por arriba del peso esperado en todos los carriles donde se indujo la proteína, esto quizás fue debido a que el proceso de sonicado produjo

una agregación de la proteína, lo que modificó su patrón migración electroforético (Figura 12B).

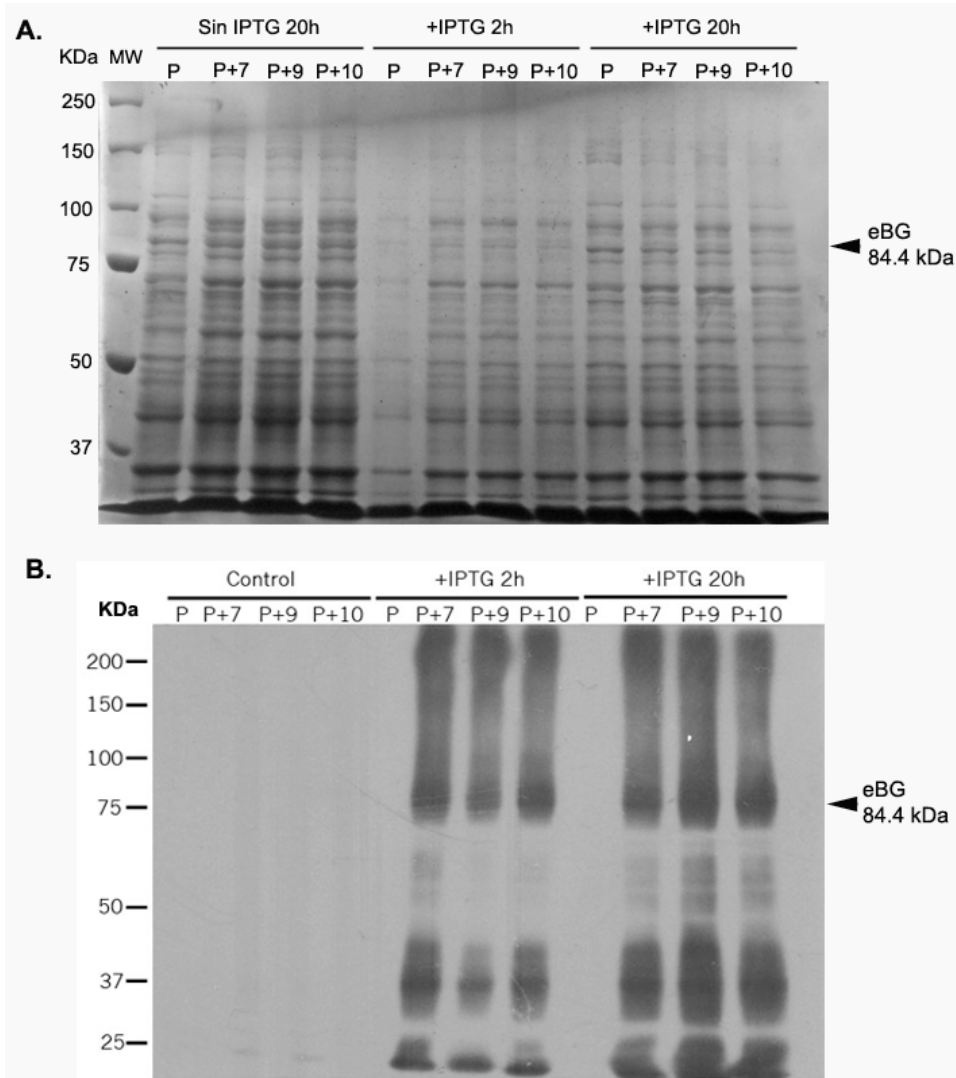


Figura 11. Sobreexpresión del ectodominio de BG de pez cebra. A. Tinción de Coomassie para detectar la sobreexpresión de la proteína recombinante en las diferentes clonas. **B.** Ensayo de WB, usando α -Flag (1:2000) para detectar a la proteína recombinante, en los ensayos de sobreexpresión. Para ambos experimentos se utilizó el vector vacío (P) como control negativo y tres clonas para el eBG (P+7, P+9 y P+10). Se cultivaron en tres condiciones diferentes; sin presencia de IPTG (control) y en presencia de IPTG durante 2h (+IPTG2h) y 20h (+IPTG 20h) a 37°C. Imágenes representativa de al menos 3 experimentos independientes

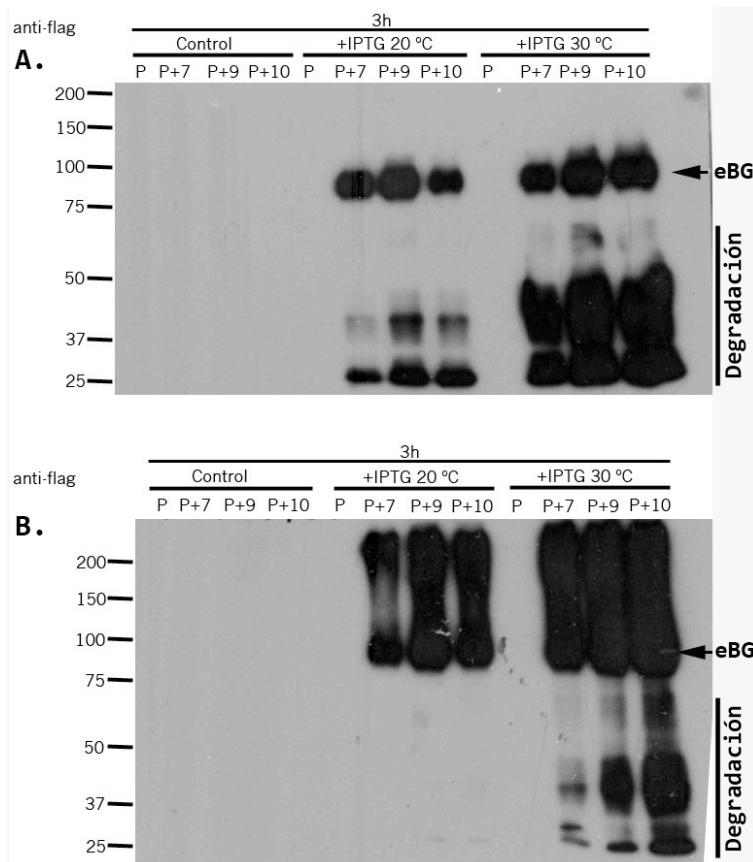


Figura 12. Western Blot de ensayos de sobreexpresión del ectodominio de BG. A. Muestras de cultivo bacteriano inducido a diferentes temperaturas. **B.** Muestras del sobrenadante de los cultivos sonicados. Para ambos experimentos se utilizó el vector vacío (P) como control negativo y tres clonas para el eBG (P+7, P+9 y P+10). Se cultivaron en tres condiciones diferentes; sin presencia de IPTG (control) y en presencia de IPTG durante 3h a 20°C (+IPTG20°C) y 30°C (+IPTG 30°C). Anticuerpo α -Flag 1:2000. Imagen representativa de al menos 2 experimentos independientes.

Bajo la misma hipótesis de que la proteína inducida se encontraba en cuerpos de inclusión, se decidió realizar un procedimiento de purificación a partir de ellos. En un primer ensayo se decidió analizar la estabilidad de la proteína al proceso de purificación que se utilizaría, y para fines prácticos se decidió analizar solo la clona P+10. El ensayo de purificación de cuerpos de inclusión se realizó a 4 diferentes tiempos de inducción, a 20°C. El resultado de WB mostró una eficiente purificación de los cuerpos de inclusión que contienen a nuestra proteína recombinante, al

estar presente solo en la fracción insoluble de las muestras (pastillas) y no en los sobrenadantes. Así también, mostró que conforme se avanza en el proceso de purificación la estabilidad de la proteína se ve afectada y aumenta la degradación de nuestra proteína (Pastilla 1 y Pastilla 2 Figura 13).

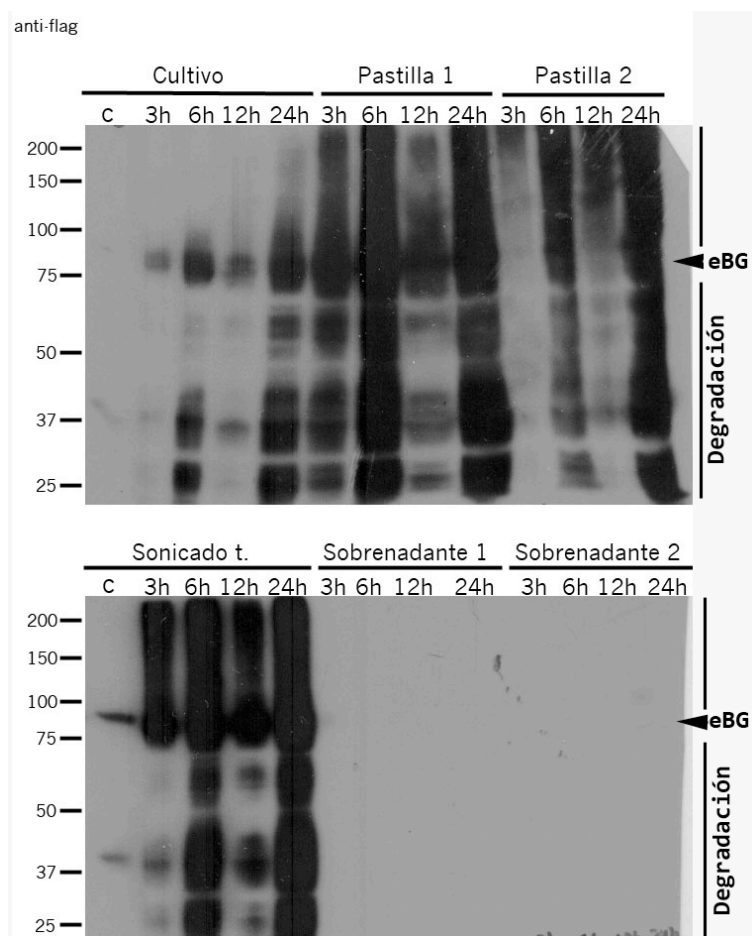


Figura 13. Estabilidad del eBG recombinante durante el proceso de purificación de cuerpos de inclusión. Se analizaron muestras del proceso de purificación de cuerpos de inclusión. Como control negativo se usó el vector vacío (C), y del vector pET23+10 se usaron 4 tiempos de inducción con IPTG (3h, 6h, 12h y 24h). Para cada tiempo de inducción se cargaron 10 µl del cultivo total (Cultivo), 10 µl del cultivo lisado por sonicación (sonicado t.), 10 µl del sobrenadante (sobrenadante 1) y de la pastilla (Pastilla 1) después del tratamiento con la solución 1 y posterior centrifugación, y 10 µl del sobrenadante (sobrenadante 2) y la pastilla (Pastilla 2) después del tratamiento con la solución 2 y posterior centrifugación. WB α-Flag 1:2000. Número de experimentos= 1

Los ensayos anteriores mostraron que los niveles de inducción de la proteína recombinantes de eBG eran bajos, además de ser poco estable a la temperatura y procesos de sonicación. Sin embargo, se decidió realizar el ensayo de purificación por cromatografía de afinidad utilizando un volumen grande de cultivo. Se realizó un cultivo de 2 litros, que se indujo con 0.1mM de IPTG a 20°C durante 6 horas. La pastilla se resuspendió en el buffer de lisis (solución 1), se sonicó y la pastilla obtenida (cuerpos de inclusión) se lavó con buffers de lavado (solución 2 y 3) y se resuspendieron en un buffer desnaturante (solución 4). La solución se cargó en una columna de afinidad de iones metálicos inmovilizados (Ni^{2+}) y la proteína eBG se eluyó en un gradiente de imidazol y se recolectaron fracciones de 3 ml, las cuales se analizaron por tinción de plata para saber las fracciones que contenían a la proteína (Figura 14).

El análisis de las fracciones mostraron que nuestra proteína de interés se pegó a la columna de Ni^{2+} , y que eluyó en múltiples fracciones de elución recolectadas. Como era de esperarse la proteína purificada presentaba degradación, pero debido a la gran cantidad de fracciones recolectadas se pudieron obtener muestras que solo contenían a la proteína recombinante intacta. Se decidió entonces, concentrar la proteína purificada en 2 grupos (pools), el primero con una gran cantidad de proteína pero con alto nivel de degradación (fracciones 15-21), y el segundo con menor cantidad de proteína pero que aparentemente no contenía proteína degradada (fracciones 22-26) (Figura 14).

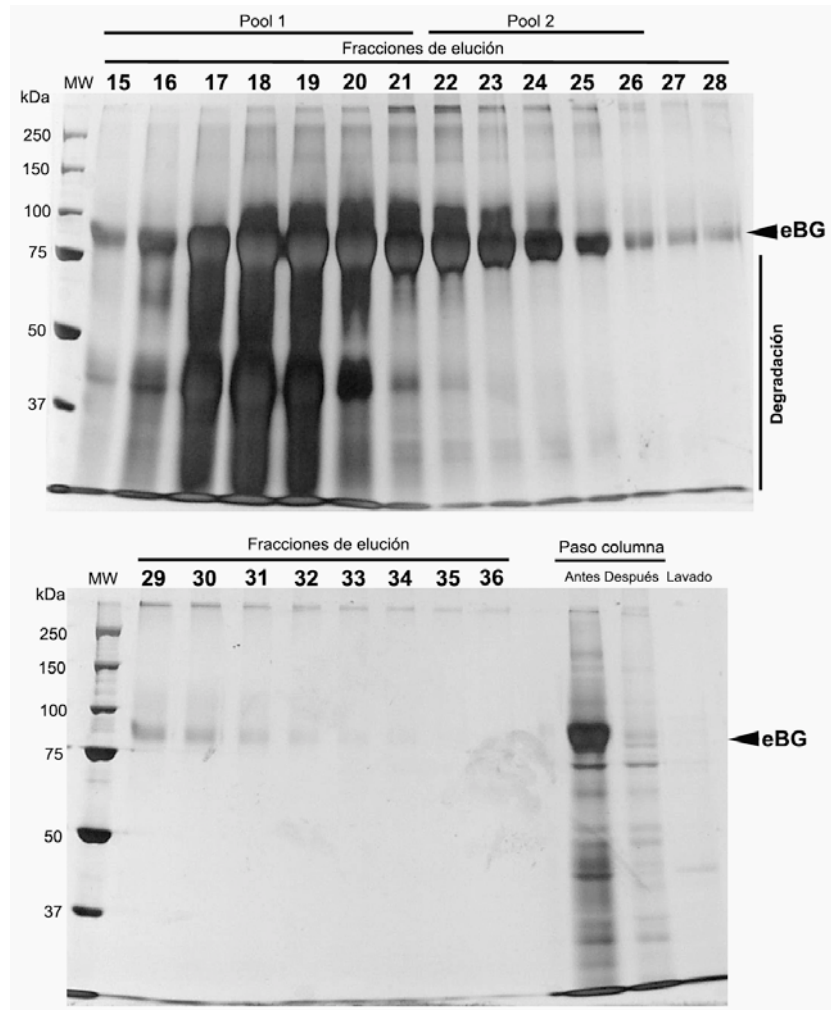


Figura 14. Purificación del eBG. Se muestra el proceso de elución del eBG, se analizaron por tinción de plata las fracciones, lisado total y los lavados de la columna de la cromatografía de afinidad. Se cargaron 20 μ l de las fracciones de elución 15 hasta la 36 obtenidas durante la purificación de eBG. Las fracciones 15-21 se mezclaron posteriormente para obtener el Pool 1 de eBG, y las fracciones 22-26 se mezclaron para obtener el Pool 2 de eBG. Como control de la cromatografía se cargaron 20 μ l del sobrenadante 4 antes de cargarlo en la columna (Antes), 20 μ l del sobrenadante 4 que salió de la columna (Después), y 20 μ l de la solución 4 usada para lavar la columna antes de la elución (Lavado). Número de experimentos= 1

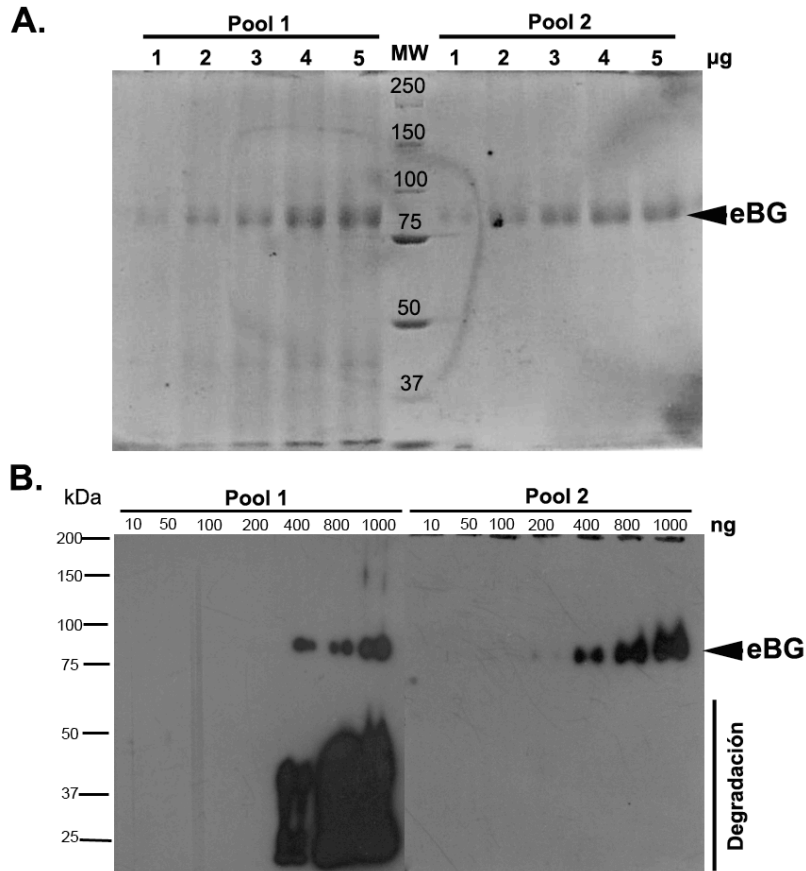


Figura 15. Caracterización de los Pools 1 y 2 del eBG purificado. Tinción de azul de coomassie (A) y WB α -Flag (B). En ambos casos se analizaron concentraciones crecientes de la proteína para observar su pureza; para el ensayo de Azul de coomassie se cargaron desde 1 hasta 5 μ g del Pool 1 y 2. Para el ensayo de WB se hicieron diluciones de eBG para tener en el gel desde 1000 ng hasta 10 ng de la proteína. α -Flag 1:2000. Número de experimentos= 1

En total se obtuvieron 22.176 mg de proteína del pool 1 y 6.227 mg de proteína en el pool 2. Ambos se analizaron por tinción de Coomassie y WB para determinar la calidad de la proteína obtenida, y en ambos ensayos se analizaron concentraciones crecientes de la proteína. Como se puede observar en la Figura 15, el pool 1 muestra en ambos ensayos que existe una proteína secundaria de aproximadamente 42 kDa que es el resultado de la degradación de nuestra proteína por la manipulación durante el proceso de purificación, y que debe

corresponder al dominio carboxilo de la proteína, pues éste contiene las 6 histidinas que permiten la unión de la proteína a la columna de cromatografía. Por otra parte el pool 2, en ninguno de los dos ensayos muestra ningún fragmento diferente al esperado, por lo que nos aseguramos de que toda nuestra proteína se encontraba intacta. Con lo observado en estos ensayos decidimos ocupar la proteína de el pool 2 para la inmunización y obtención de anticuerpos policlonales.

7.3 Obtención de anticuerpos policlonales.

El siguiente paso fue el desarrollo de anticuerpos policlonales anti BG de pez cebra. Se eligió inducir una respuesta inmunitaria en conejo debido a la gran cantidad de sangre y suero que se pueden obtener de este animal, en comparación de otros como ratón, cuyo o rata.

Se diseñó un esquema de inmunización para cada una de las 2 conejas que se utilizaron. Para la coneja 30 las inmunizaciones se realizaron cada 15 días y en el caso de la coneja 31, éstas se realizaron cada 30 días, con el fin de lograr mayor especificidad de los anticuerpos. Para ambas conejas, 7 días posteriores a cada inmunización se obtuvo suero para monitorear la producción de anticuerpos IgG contra nuestro antígeno, así como su especificidad, en ensayos tipo WB. Después de la 4ta inmunización, las conejas se sangraron a blanco para la obtención del suero sanguíneo total (Figura 16). El primer paso fue la obtención de suero sanguíneo días antes de la primera inmunización con el fin de utilizarlo como control negativo en los ensayos de WB, el llamado suero “pre-inmune”.

Las inmunizaciones se realizaron con 500 µg de eBG proveniente de la fracción 2, la cual cabe mencionar se encontraba en estado de desnaturalización debido a la alta concentración de urea del buffer de elución. La primera inoculación se realizó con adyuvante completo de Freund, el cual contiene partículas de *Mycobacterium tuberculosis*, y las siguientes 3 inoculaciones se realizaron usando adyuvante incompleto.

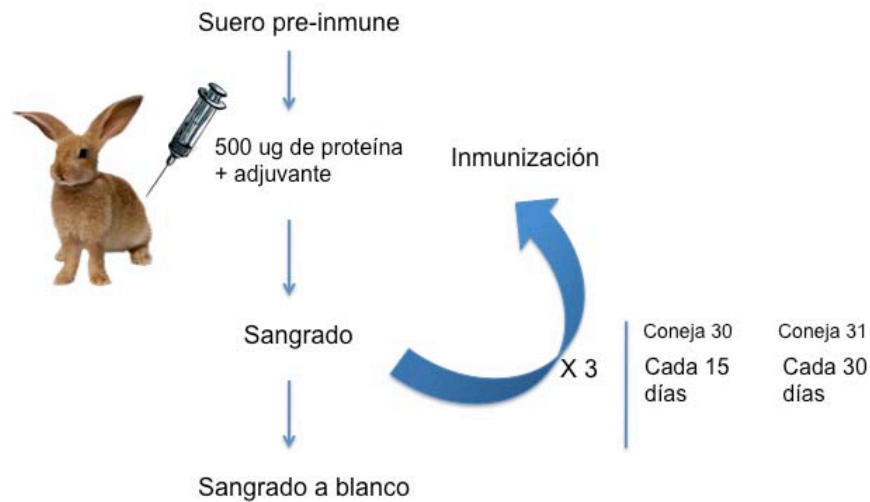


Figura 16. Esquema de inmunización. Se diseñó un esquema de 4 inoculaciones del eBG en conjunto con adyuvante para promover una respuesta inmune. Los días de inoculación variaron para cada coneja.

El suero obtenido después de cada inoculación se probó en ensayos de WB para monitorear la producción de anticuerpos y determinar su especificidad de reconocimiento de nuestro antígeno. Para este fin, el suero se retó en ensayos de WB contra lisados totales de *E. coli* con el vector vacío, la clona de *E. coli* que sobreexpresa la proteína eBG, y la proteína de eBG ya purificada (Figura 17). Los resultados mostraron que posterior a las 4 inmunizaciones, ambas conejas produjeron anticuerpos policlonales, que en ensayos de WB son capaces de reconocer específicamente a la proteína recombinante eBG. El suero 4 de ambas conejas no reconoce ninguna proteína presente en el lisado de bacterias con el vector vacío, y dan señal en el lisado correspondiente a la sobreexpresión de la proteína recombinante, que se muestra como un barrido en el caso del suero de la coneja 30, o como una banda única en el suero de la coneja 31. Ambos sueros reconocen 30 ng de eBG de pez cebrá purificado, y es un reconocimiento específico de los anticuerpos, ya que como control se usó el suero pre inmune, el cual, no reconoce ninguna proteína presente en ninguna de las tres muestras

analizadas. Esto nos confirmó que se obtuvieron anticuerpos policlonales específicos contra Betaglicano de pez cebra.

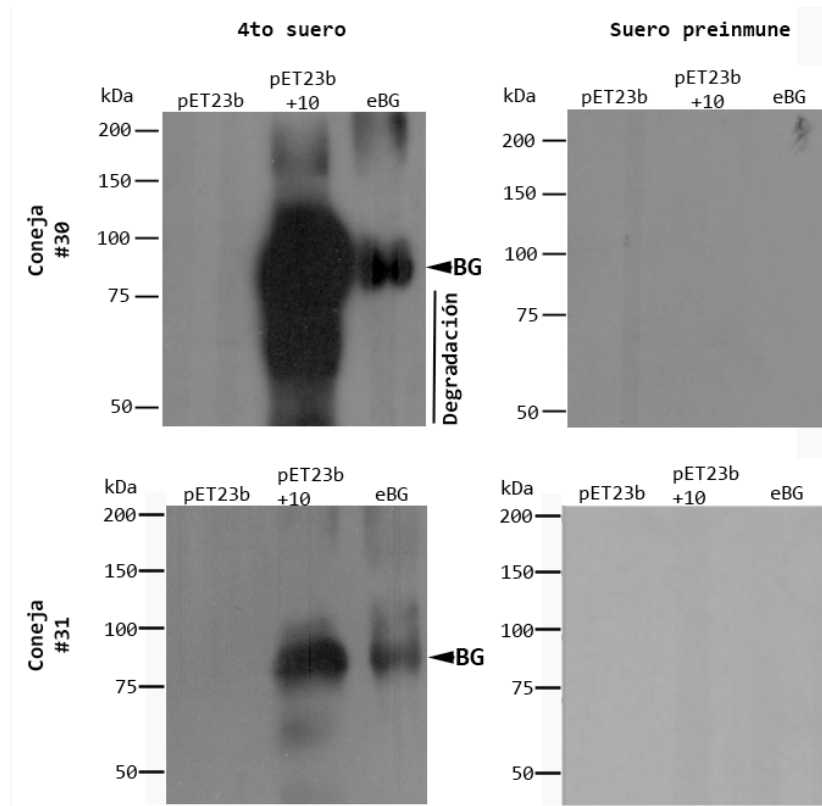


Figura 17. Especificidad de los anticuerpos policlonales contra eBG. Los sueros obtenidos (4to suero y suero preimmune) de las conejas #30 y #31, se probaron en ensayos de WB contra muestras de cultivo inducido con IPTG del vector vacío (pET23b) y de la clona pET23b+10; además de 30 ng de la proteína eBG. Dilución del suero 1:50,000. Número de experimentos= 2

Una vez comprobado que los anticuerpos reconocían a la proteína eBG, se prosiguió con la titulación de los anticuerpos para determinar la dilución capaz de detectar la menor cantidad del antígeno. Para esto se realizaron en un primer experimento 2 diluciones del anticuerpo (1:50,000 y 1:25,000) que se retó con diluciones seriadas de la proteína eBG purificada, desde 300 ng hasta 18.5 ng. Este experimento mostró que el suero 4 de la coneja 30 reconoce hasta 150 ng de la proteína en ambas diluciones, mientras el suero 4 de la coneja 31 reconoce

hasta 70 ng de la proteína (Figura 18). En un segundo ensayo se disminuyó las diluciones ensayadas de los sueros (1:12000, 1:6000 y 1:3000), así como, la cantidad de la proteína utilizada (30-3.75 ng). A una dilución de 1:12000 ambos sueros (30 y 31) son capaces de reconocer 30 ng de la proteína; mientras que a 1:6000 el suero 4 de la coneja 31 logra reconocer hasta 15 ng de la proteína eBG purificada y el suero 4 de la coneja 3^o solo reconoce 30 ng (Figura 18). En una menor dilución los anticuerpos no mejoran su capacidad de reconocer al antígeno y presentan una mayor cantidad de fondo; por lo que de aquí en adelante se utilizó el suero 4 de la coneja 31 (S #31) para los ensayo de WB en una dilución de 1:6000.

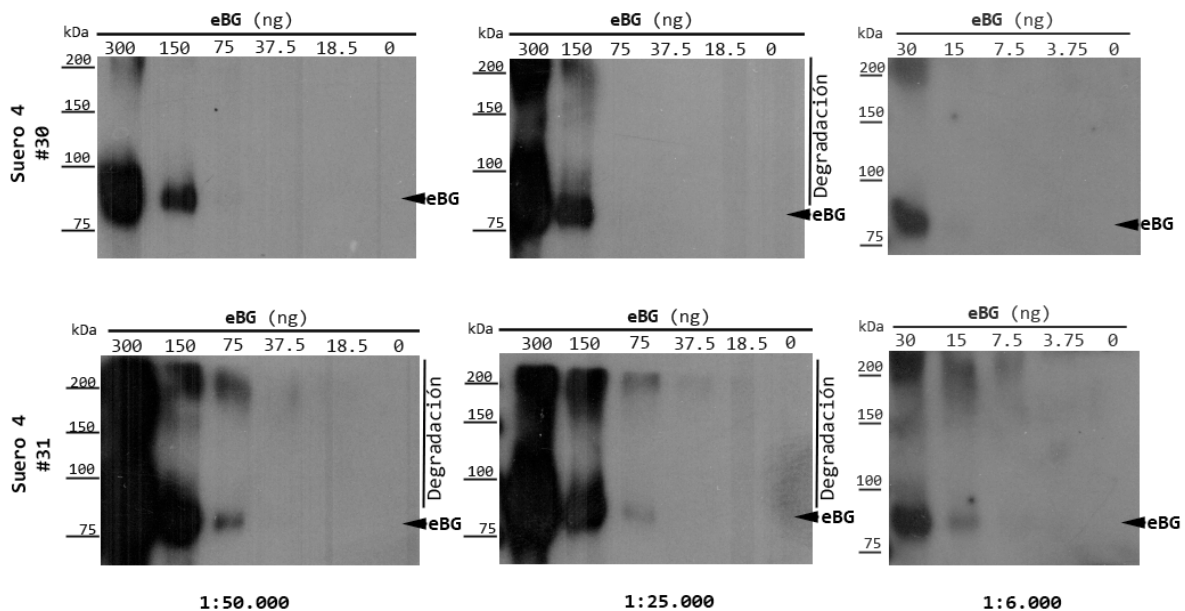


Figura 18. Titulación de los sueros obtenidos contra eBG. Se probaron los sueros 4 de las conejas #30 y #31 en 3 diluciones distintas (1:50.000, 1:25.000 y 1:6000) en ensayos de WB. Como muestra se hicieron diluciones seriadas de la proteína eBG, de 300 ng hasta 18.5 ng para las dos diluciones mas grandes y de 30 ng a 3.75 ng para la dilución más pequeña (1:6000). Para todos los casos se usó un carril sin muestra como control negativo. Número de experimentos= 2

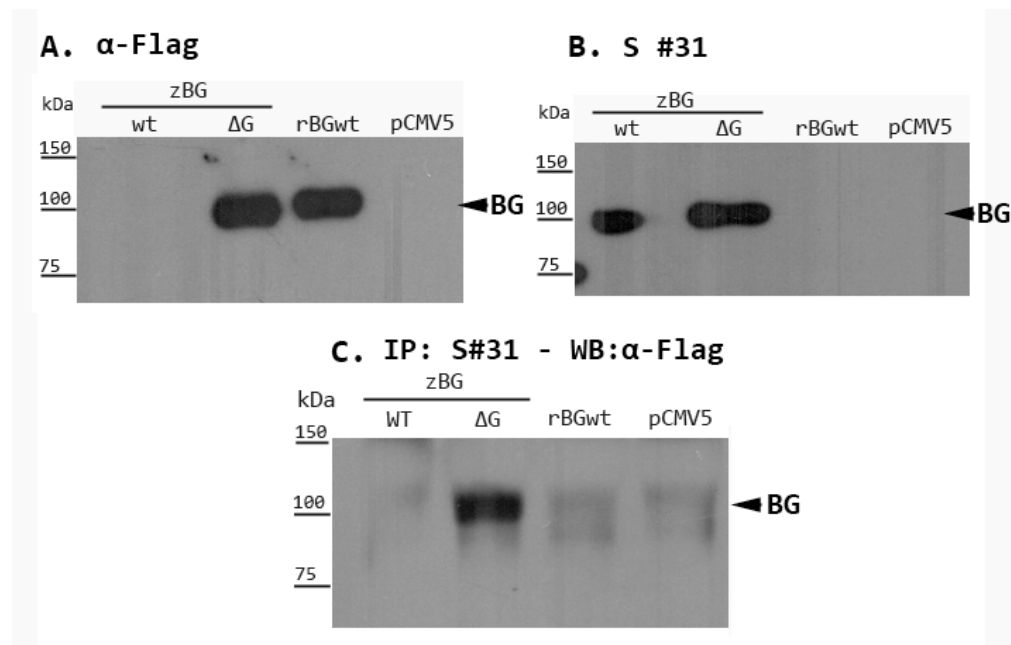


Figura 19. Sobreexpresión del receptor de BG de pez cebra en células COS-1. Los lisados totales de Células COS-1 transfectadas con los plásmidos indicados se usaron en ensayos de WB e IP para probar la especificidad del suero #31. Plásmidos: BG de zebra silvestre (wt) y mutada Ser522Ala (ΔG), así como la versión de rata de BG (rBGwt) y el vector vacío como control negativo (pCMV5). Panel A con α -Flag (1:2000), panel B contra S #31 (1:6000) y. Panel C, IP S #31 (1:6000) y WB α -Flag (1:2000). Número de experimentos= 2

En todos los ensayos anteriores, los sueros obtenidos se retaron contra la proteína recombinante del ectodominio de BG, por lo cual, nos preguntamos si los anticuerpos obtenidos serían capaces de reconocer al receptor endógeno, pues dentro de la secuencia del ectodominio de BG se encuentra también la secuencia para el epítipo Flag. Para responder esta pregunta se decidió realizar la sobreexpresión, en células COS-1, del receptor de BG de pez cebra, tanto silvestre (FLT17wt), como su versión ΔG (FLT17gl, mutado en la Ser 522, incapaz de unir a las cadenas GAG's) con epítipo Flag. Como control negativo se usó el vector pCMV5 vacío, y como control positivo para Flag el receptor silvestre de BG de rata (HA-rBG-Flag, que contiene epitopes de HA y Flag en los extremos amino y carboxilo, respectivamente, ver figura 1A de Velazco-Loyden). El resultado de

los ensayos de WB mostró primero que el anticuerpo contra Flag solo reconoce a los receptores zBG Δ G y rBG como era de esperarse; mientras que el suero 31 solo detecta a las dos formas del receptor de zBG y no al de rata (Figura 19). Este ensayo permitió descartar la presencia de anticuerpos contra la secuencia Flag en el suero 31, el cual reconoce específicamente al ectodominio de zBG. Con los resultados obtenidos, se decidió utilizar los anticuerpos en ensayos de inmunoprecipitación (IP), y los resultados mostraron nuevamente que los anticuerpos solo reconocen a BG de pez cebra silvestre y mutada Δ GAG (Figura 19, panel C).

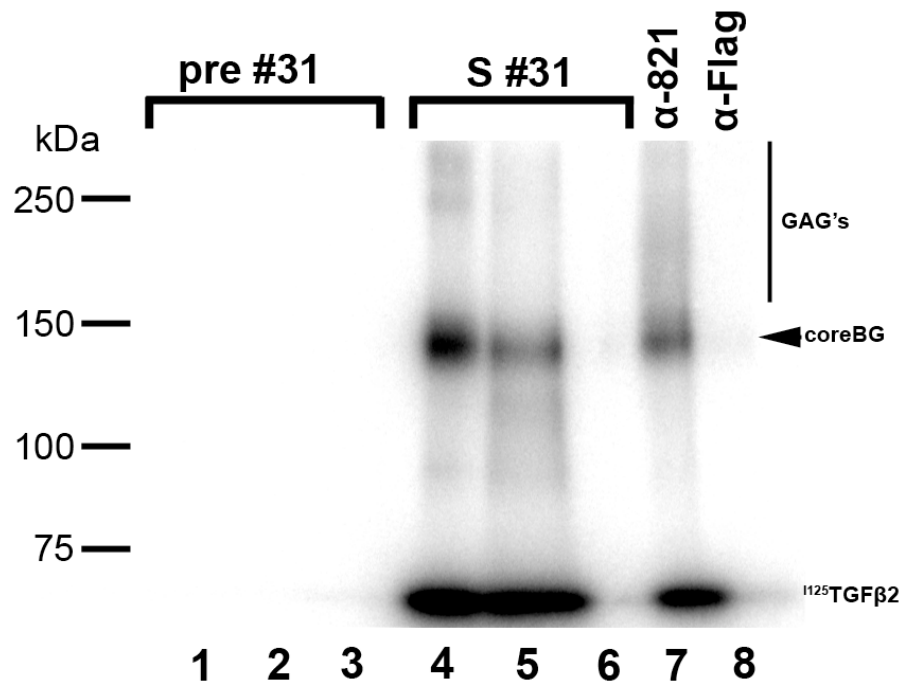


Figura 20. Ensayo de unión por marcado por afinidad en células COS-1. Las células se transfectaron con plásmidos para las versiones zBG silvestre (carriles 1 y 4), zBG Δ GAG (carriles 2,5,7 y 8) y BG de rata (carriles 3 y 6). Se sometieron a IP contra el suero preinmune (pre#31), el suero #31 (S #31), α -821 o α -Flag en una dilución 1:100 para todos los casos. El S #31 es capaz de inmunoprecipitar a las versiones wt y Δ GAG de zBG (carriles 4 y 5) pero no a BG de rata. El anticuerpo α -821 fue igual capaz de inmuprecipitar a zBG (carril 7). Número de experimentos= 1

Como parte de los ensayos realizados con el suero 31, se realizó por igual el ensayo de unión por marcado por afinidad en placa, en células COS-1 transfectadas con los vectores FLT17wt, FLT17gl y HArBGFlag. Se usaron como controles del ensayo el suero pre-inmune (pre #31), el anticuerpo α -Flag para verificar la correcta realización del experimento y el anticuerpo 821 diseñado contra el dominio citoplasmático de BG de rata. El resultado del experimento muestra que el suero pre-inmune no precipita nada (Figura 21, carriles 1-3), y que el suero 31 precipita a los receptores zBGwt, zBG Δ GAG y no así a rBG (Figura 20, carriles 4,5 y 6 respectivamente) como ya se había mostrado anteriormente; pero para nuestra sorpresa el anticuerpo 821 precipitó a zBG Δ G casi tan bien como el anticuerpo obtenido específicamente para zBG y más que el anticuerpo α -Flag (Figura 20) , esto debido a que la región citoplasmática de ambos receptores tienen una similitud del 90% en su secuencia primaria.

7.4 Detección del Betaglicano endógeno de pez cebra (zBG).

Dirigiéndonos al objetivo inicial de la obtención de los anticuerpos, se realizó la obtención de proteína total de embriones de pez cebra de 72 hpf con diferentes tipos de detergentes para los buffers de lisis, Triton 0.5% (TNTE), NP40 0.5% y Triton 0.5% + ácido deoxicólico (RIPA). Se cargaron hasta 80 μ g de proteína total de embrión para los ensayos de WB, y como control positivo se usó el receptor zBG silvestre, sobreexpresado en células COS-1. Sin embargo, bajo ninguna de las tres condiciones fue posible observar la presencia del receptor endógeno. Este resultado nos llevó a proponer que la cantidad de BG presente en los embriones era muy baja y las cantidades usadas de proteína para el WB no permitían alcanzar el límite de detección del suero #31, aunado al hecho de que el receptor de BG es un proteoglicano y las cadenas GAG's interfieren con el proceso de transferencia. Lo que decidimos a continuación fue encontrar otro método por el cual se pudiera detectar al receptor de BG endógeno de pez cebra, con base en los hallazgos obtenidos anteriormente, como la especificidad del anticuerpo y su capacidad de inmunoprecipitar al receptor.

Para poder detectar al BG endógeno de pez cebra, recurrimos a la capacidad de unir con alta afinidad a TGF- β 2 descrita para el BG de mamíferos y a la especificidad del suero #31 para detectar a zBG. Debido a la sensibilidad que tienen los ensayos de unión por marcado por afinidad se decidió realizar modificaciones al protocolo que se tenía para placas de cultivo celular, y se realizó el ensayo en solución utilizando I^{125} -TGF β 2. Ver apartado 6.11.

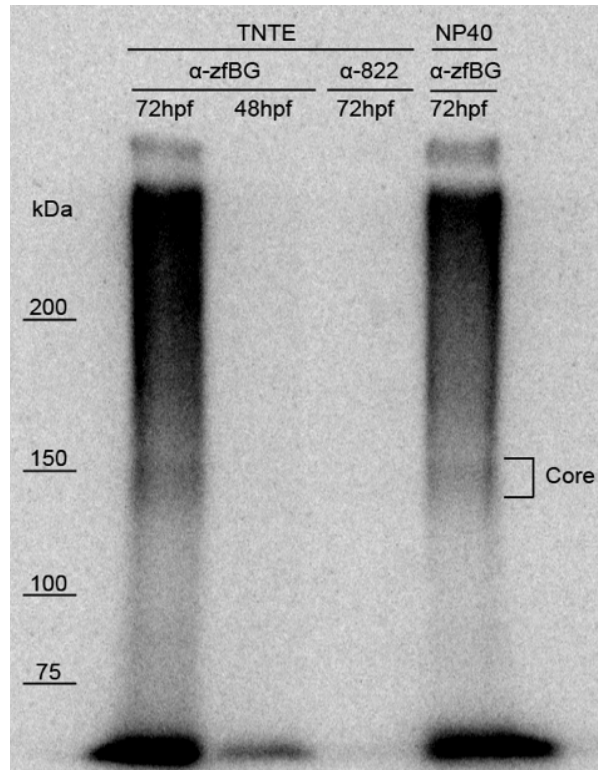


Figura 21. Ensayo de unión por marcado por afinidad con I^{125} -TGF- β 2. Para este ensayo se usó proteína de 2 estadios del desarrollo del pez cebra 48hpf y 72hpf. Los embriones se lisaron con Buffer TNTE y para un grupo de embriones se sustituyó el detergente Triton X-100 por NP40. Para la inmunoprecipitación se usó el suero #31 (α -zfBG) o el anticuerpo α -822 contra el BG de rata. Número de experimentos= 1

El primer ensayo realizado demostró por primera vez la presencia del receptor tipo III de TGF β en el pez cebra; así también, demostró la capacidad del receptor de BG de pez cebra para unir TGF β 2, y la especificidad del suero #31 para detectar a zBG silvestre. La imagen del ensayo mostró el típico patrón de corrimiento para

los BG de otras especies: un core, o receptor sin cadenas GAG's, N-glicosilado de aproximadamente 140 kDa y un proteoglicano con GAGs que le confieren una alta heterogeneidad de tamaño, lo cual quedó demostrado con el barrido en la señal por arriba del marcador de 200 kDa (Figura 21). También en este experimento se pudo observar, que los niveles de proteína de BG presentes a las 72 hpf son mucho mayores a los presentes a las 48 hpf.

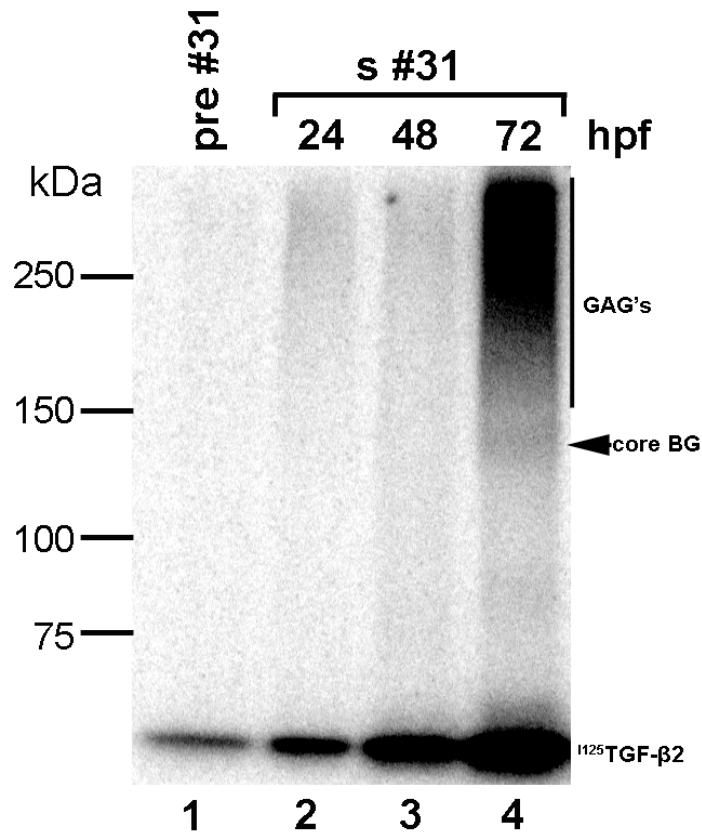


Figura 22. Niveles de la proteína de BG durante el desarrollo del pez cebra. Los niveles de BG a las 72 hpf son al menos 4 veces mayores a los presentes a las 24 y 48 hpf, lo cual dificulta su detección. Se analizaron 3 estadios diferentes del desarrollo del pez cebra, 24hpf (carril 2), 48hpf (carril 3) y 72hpf (carril 1 y 4). Para la IP se usó el suero #31 (S #31) y como control negativo el suero preinmune (pre #31, carril 1), ambos en una dilución 1:100. Número de experimentos= 2

Nuestro siguiente objetivo fue determinar los niveles de expresión del receptor de BG durante el desarrollo del pez cebra; para esto se decidió realizar el ensayo en tres etapas del desarrollo 24hpf, 48hpf y 72hpf. El resultado mostró que los niveles de BG a las 24hpf y 48hpf son muy bajos a comparación de los presentes a las 72hpf (Figura 22). Los niveles de expresión obtenidos por este método son cualitativos, pero la cuantificación de la intensidad de la señal en la región del core así como la de las cadenas GAG's de dos experimentos independientes, arrojaron que a las 72hpf se expresa al menos 4 veces más BG que en los estadios anteriores.

7.5 Determinación del tipo de GAGs en BG endógeno de pez cebra.

Para identificar las cadenas de GAG's presentes en el BG de pez cebra, se decidió realizar un tratamiento enzimático a los receptores con Heparitinasa y Condroitinasa, y liberar las cadenas del receptor. Se eligieron estas enzimas, debido a que el heparán sulfato y el condroitin sulfato son los glicosaminoglicanos presentes en el BG de rata. Para la caracterización de las cadenas GAG's se decidió comenzar con la caracterización del receptor en condiciones de sobreexpresión en células COS-1 (Figura 23). El receptor inmunoprecipitado se incubó con Heparitinasa, Condroitinasa o ambas enzimas y como control se tuvo al receptor sin tratamiento; además se tuvieron otros controles como la transfección con el vector vacío (Figura 23, carriles 1-4) y la transfección con zBGΔG (Figura 23, carriles 9-12), bajo las mismas condiciones de tratamiento enzimático. El resultado del experimento, muestra que el receptor silvestre con el tratamiento de condroitinasa presenta un muy sutil aumento de la intensidad en la banda correspondiente al core de BG, y principalmente en la banda de aproximadamente 240 kDa, que está presente igualmente en la construcción de zBGΔG y que corresponde a un dímero de BG resultado del proceso de entrecruzamiento realizado durante el proceso del marcado por afinidad. Por el contrario el receptor silvestre tratado con heparitinasa presenta un claro aumento en la intensidad de la bandas correspondientes al core y dímero de BG. El

tratamiento con ambas enzimas mantiene la intensidad de ambas bandas, por lo que demuestra que en el caso del BG de pez cebra expresado en cultivo celular, el principal componente de las cadenas GAG's es el heparan sulfato, como ya se había reportado para rBG; sin embargo a comparación de este último presenta una disminuida cantidad de condroitin sulfato.

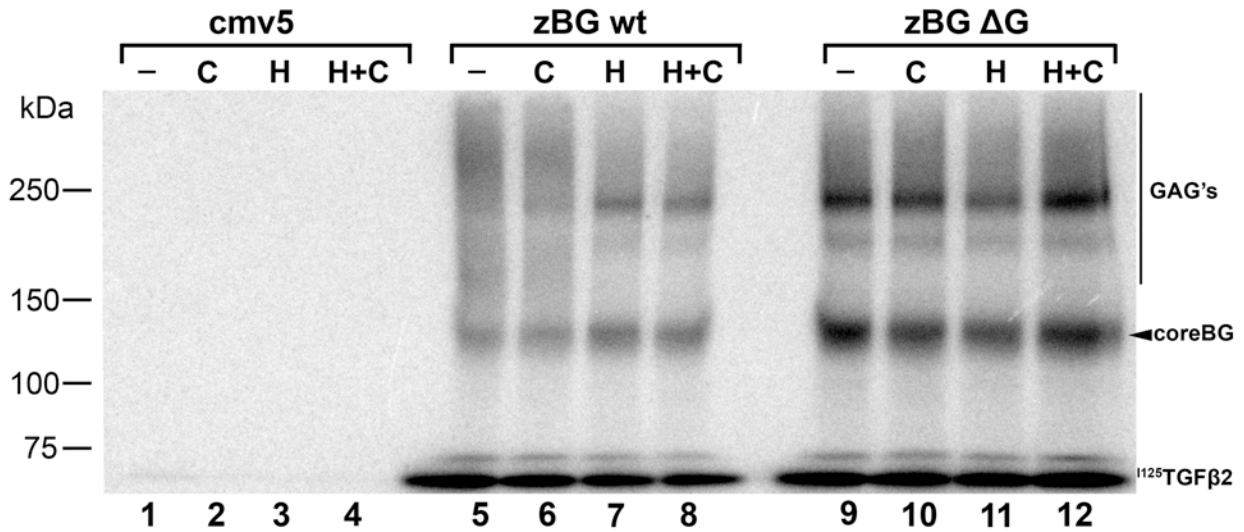


Figura 23. Tratamiento enzimático con Heparitinasa y Condroitinasa de las construcciones de zBG. Se realizaron tratamientos enzimáticos para determinar la identidad de los glicosaminoglucanos presentes en el BG de pez cebra. Se transfectaron células COS-1 con el vector vacío (cmv5), zBG silvestre (zBG wt) o con zBG Δ GAG (zBG Δ G). El inmuprecipitado para los tres casos se trató con Condroitinasa (carriles 2,6,10), heparitinasa (carriles 3,7,11), ambas (carriles 4,8,12) o solo con buffer de digestión como control negativo (carriles 1,5,9). Número de experimentos= 2

Debido a la posibilidad en la falta de actividad de la enzima de condroitinasa, durante los ensayos, se decidió realizar nuevamente el experimento, pero esta vez, teniendo como controles positivos a rBG transfectado en células COS-1 (Figura 24) y al BG endógeno de la línea celular Rat-1 (Figura 25).

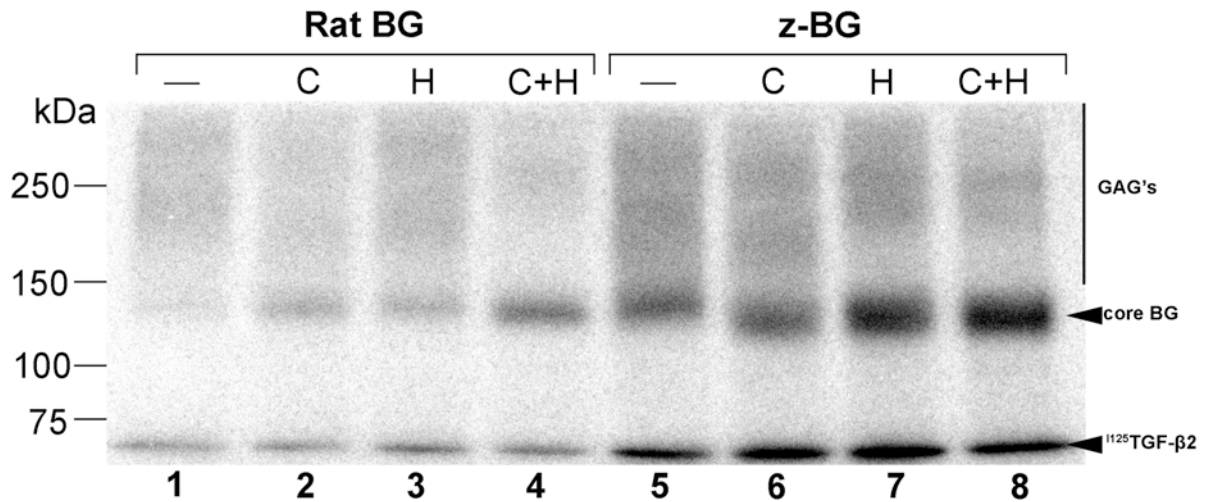


Figura 24. Tratamiento enzimático de los receptores de rBG y zBG. Tratamientos enzimáticos a los BG's de rata y de pez cebra sobreexpresados en células COS-1 para comparar la composición de las cadenas GAG's presentes en cada uno de los receptores en ensayos de marcado por afinidad. Los inmunoprecipitados fueron tratados con Condroitinasa (carriles 2,6), heparitinasa (carriles 3,7), ambas (carriles 4,8) o solo con buffer de digestión como control negativo (carriles 1,5). Número de experimentos= 1

Los experimentos muestran que con el tratamiento de condroitinasa, el core de BG de rata aumenta visiblemente tanto en el experimento de transfección (Figura 24, carril 2) como con el rBG endógeno (Figura 25, carril 2), pero se mantiene igual en el caso del BG de pez cebra. Como puede observarse, el tratamiento con heparitinasa sigue teniendo el mismo efecto tanto con el BG de rata como el BG de pez cebra, donde se ve más pronunciado el aumento de la banda del core (Figura 24, carriles 3 y 7; Figura 25, carril 3). Para el caso del tratamiento con ambas enzimas, el aumento de la intensidad de banda del core corresponde a la adición de la intensidad de banda de los tratamientos con las enzimas por separado con el rBG, mientras que, para el caso de zBG el aumento no muestra un incremento substancial con respecto al tratamiento solo con heparitinasa. Estos experimentos demuestran que el BG de pez cebra sobreexpresado en células COS-1, presenta cadenas GAG's formadas principalmente por heparán sulfato.

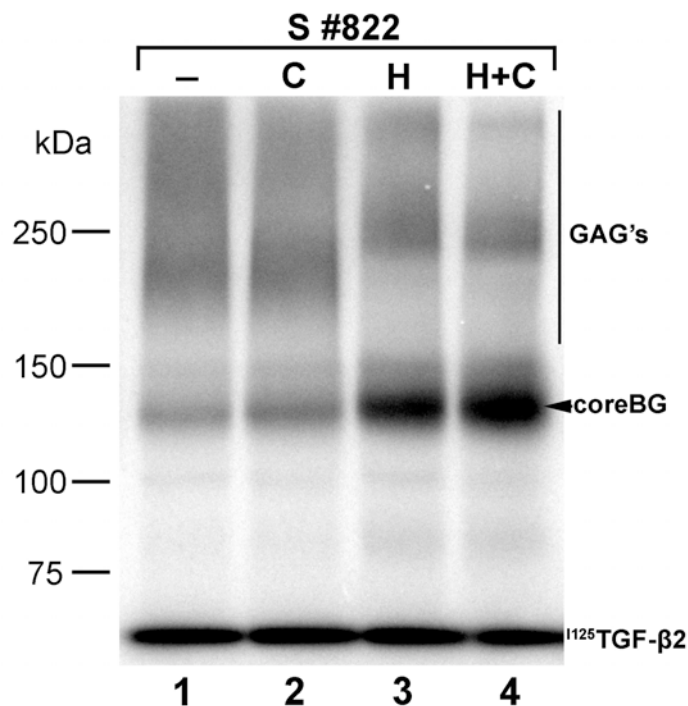


Figura 25. Tratamiento enzimático para el BG de células Rat-1. Tratamiento enzimáticos al BG endógeno de células en cultivo para determinar la composición de las cadenas GAG's presentes en el receptor. El BG se inmunoprecipitó con el anticuerpo α -822, y se trató con Condroitinasa (carril 2), heparitinasa (carril 3), ambas (carril 4) o solo con buffer de digestión como control negativo (carril 1). Número de experimentos= 1

Una vez analizadas las cadenas GAG's presentes en el BG sobreexpresado en células en cultivo, continuamos con la caracterización de las cadenas GAG's presentes en el BG endógeno de pez cebra. El experimento mostró que al igual que en células en cultivo, el BG de pez cebra parece no presentar condroitin sulfato en sus cadenas GAG's, pero si una gran cantidad de heparán sulfato, como se puede ver en el aumento sustancial de la banda del core de BG, con el tratamiento con heparitinasa (Figura 26, carril 7). Este resultado demuestra que al igual que el BG de otras especies el principal componente de las cadenas GAG's, del BG de pez cebra, es el heparán sulfato, lo que supone una conservación sustancial de sus funciones. Sin embargo, cabe resaltar que el tratamiento enzimático no logró liberar todas las cadenas GAG's, pues aún en presencia de

las dos enzimas se mantiene un barrido de alto peso molecular; lo que sugiere que el zBG presenta otro tipo de cadenas GAG's. Este experimento nos permitió comparar el tipo de cadenas que se añaden a zBG in vivo en comparación a las que se añaden en un sistema in vitro como las células COS-1 y que pertenecen a otra especie.

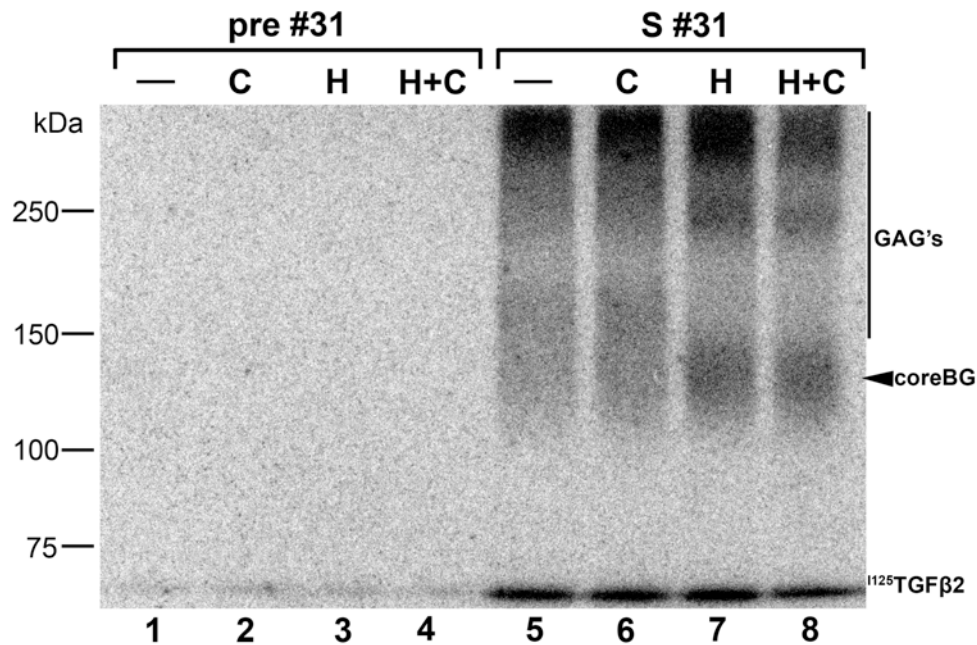


Figura 26. Tratamiento enzimático del BG endógeno de pez cebra. Se caracterizó la presencia de Condroitin sulfato y Heparán sulfato en las cadenas de GAG's presentes en el BG endógeno de pez cebra. Se usó el S #31 para inmunoprecipitar al receptor, y como control se usó pre #31. Ambos inmunoprecipitados fueron sometidos a digestión con condroitinasa (carriles 2 y 6), heparitinasa (carriles 3 y 7), ambas enzimas (carriles 4 y 8) ó solo buffer de digestión como control (carriles 1 y 5). Número de experimentos= 2

Una de las ventajas de tener un sistema para medir el BG del pez cebra, es que nos permitiría demostrar la efectividad de los morfolinos anti-BG para bloquear la expresión del producto genico. De ahí que usamos nuestro ensayo para detectar los niveles de BG en embriones inyectados con mo-2 y mo-3. Estos morfolinos están diseñados para afectar el splicing correcto del mensajero y producir RNAs incapaces de traducir una proteína funcional. Estos morfolinos han revelado un

fenotipo angiogénico (Kamaid et al, manuscrito sometido a publicación) que no se discutirá aquí. Para estos experimentos se inyectaron los morfolidos 02 y 03, así como sus respectivos controles mismatch, en el estadio de 1 célula, y los embriones se dejaron desarrollar hasta las 72 hpf para poder extraer proteína y RNAm.

El primer paso fue determinar a través de RT-PCR el efecto de los morfolidos en el procesamiento del RNAm. Para esto se utilizaron oligonucleótidos localizados en el exón 1 y 5 que flanquean el sitio de unión de ambos morfolidos. El resultado mostró que el morfolino 02 produce 4 bandas diferentes de procesamiento alternativo del RNAm, lo que revela sitios críticos de splicing; mientras que el morfolino 03 solo 1 banda diferente a la silvestre. Todas las bandas producto del splicing fueron secuenciadas. Las bandas principales del procesamiento alternativo para ambos morfolidos dan un producto de 585 pb (Figura 27A, carriles 3-4, asterisco) que corresponde a un RNAm que carece del exón 2. El resto de las bandas corresponden a splicing anómalos que no codifican para proteínas funcionales. En cambio los morfolidos controles no alteran el procesamiento del RNAm, y producen un RNAm silvestre (Figura 27A, carriles 2 y 5).

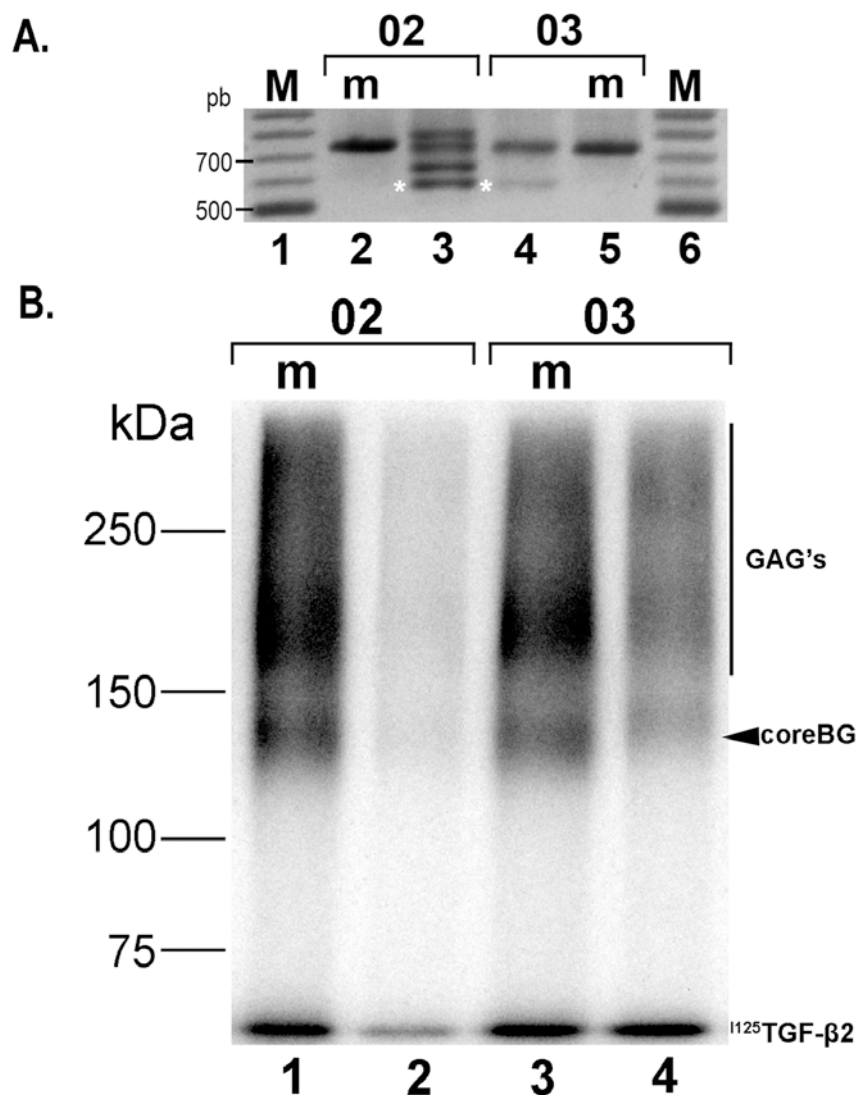


Figura 27. Efectos del uso de morfolinos en el transcrito y nivel de proteína de BG en el pez cebra. **A.** Se realizaron experimentos de RT-PCR para conocer el procesamiento del RNAm de BG en presencia de morfolinos. Se obtuvo una banda única correspondiente a la esperada de 738pb para los embriones inyectados con los morfolinos mismatch (carriles 2 y 5), mientras que los morfolinos producen diversas bandas correspondientes a splicings alternativos, la principal de ellas de 585pb (carriles 3 y 4 *) **B.** Se analizaron los niveles de proteína de BG en embriones de 72hpf microinyectados con morfolinos y morfolinos mismatch. Los embriones inyectados con los morfolinos mismatch muestran gran cantidad de BG (carriles 1 y 3), mientras que los inyectados con los morfolinos 02 y 03 muestran una clara disminución de zBG (carriles 2 y 4). Imagen representativa de al menos 3 experimentos independientes.

Una vez comprobado el efecto del morfolino en el procesamiento del transcrito primario de BG, el siguiente paso fue comprobar la disminución del receptor de BG. El resultado del ensayo de marcado por afinidad mostró que los niveles de la proteína disminuyeron significativamente (90% menos) para el caso de los embriones microinyectados con el morfolino 02, lo que correlaciona con la producción de RNAm's anómalos. Sin embargo para el caso del morfolino 03, el nivel de BG disminuye solo un 40% con respecto a su control (Figura 27B, carril 3 y 4); esto debido quizás a que los embriones presentaban transcrito silvestre de BG (Figura 27A, carril 4). Con estos experimentos pudimos demostrar la efectividad del morfolino 02 y validar en parte, los fenotipos presentes en los embriones morfantes carentes de BG.

8. Discusión

Expresión del RNAm de Betaglicano.

El receptor tipo 3 de TGF- β , se encuentra conservado en todos los vertebrados, tanto en su arreglo exónico, como en su secuencia de aminoácidos. De los receptores de TGF- β es el de mayor expresión en la membrana celular y se ha demostrado en ratón que su deficiencia durante el desarrollo embrionario provoca un fenotipo letal (Stenvers et al., 2003). Durante este proyecto de investigación, se logró identificar al receptor durante el proceso de desarrollo embrionario del pez cebra (*Danio rerio*), se desarrolló un anticuerpo policlonal contra el ectodominio del receptor y se realizó su caracterización bioquímica.

En ensayos de RT-PCR y qRT-PCR se detectó la presencia del RNAm mensajero de betaglicano a partir de las 8 hpf hasta las 144 hpf. La presencia del transcrito de betaglicano a las 8hpf nos indicó que se trataba de un transcrito de origen cigótico, pues el desarrollo del embrión hace su transición del control materno al control cigótico a las 2hpf aproximadamente (Kimmel et al., 1995). A las 14 hpf los niveles del transcrito aumentan, y coincide con la aparición de la vesícula ótica en el embrión (Kimmel et al., 1995), y que por experimentos de hibridación *in situ* (ISH) realizados en el laboratorio, se sabe que es uno de los sitios de expresión del transcrito de BG a las 36 hpf, por lo que el receptor de BG podría estar participando durante el proceso de determinación del órgano. Para las 24 hpf y hasta las 48 hpf el nivel del transcrito de BG se mantiene constante y se detecta a partir de las 22 hpf en la notocorda y el mesénquima, y para las 36 y 48 hpf en los arcos branquiales, aletas pectorales, vesícula ótica, mesénquima posterior periótico, los límites intersomáticos ventrales y la vasculatura del tronco y la cabeza (Kamaid et al, manuscrito sometido a publicación).

Para las 72 hpf y 144 hpf, se observó el mayor aumento significativo en la expresión del RNAm de betaglicano. Esto en parte debido quizás, al aumento del número de células expresando al receptor en un proceso normal de crecimiento del embrión, pero también por su necesidad en procesos importantes en los

cuales el receptor pudiera estar participando. El primer dato que sugiere esto es el fenotipo letal durante esta etapa de embriones con knock-down del receptor. Por otra parte unos de los fenotipos más visibles en estos embriones es el edema cardiaco que presentan y que se relaciona con los defectos cardiacos presentes en embriones de pollo y ratón carentes del receptor de BG (Brown et al., 1999; Stenvers et al., 2003). Específicamente se ha observado que TGF β 2 y TGF β 3 son efectores importantes en el desarrollo de las válvulas atrioventriculares (Combs and Yutzey, 2009), y que TGF β 2 y BG son importantes para la activación de células endoteliales y el proceso de separación de células endoteliales en el inicio de la transición epitelio-mesénquima (EMT) (Boyer and Runyan, 2001; Camenisch et al., 2002). Este proceso de EMT comienza aproximadamente a las 60 hpf en el corazón del pez cebra y se extiende hasta las 96 hpf (Peal et al., 2011).

Anticuerpo policlonal contra el ectodominio de BG.

Se logró sobreexpresar y purificar el ectodominio de BG de pez cebra de forma recombinante y la proteína purificada se utilizó para inmunizar a 2 conejas y obtener anticuerpos policlonales contra el fragmento purificado. De los 2 anticuerpos obtenidos (30 y 31), ambos son capaces de detectar 30 ng del epitopo en ensayos de WB. Además se determinó la especificidad de los anticuerpos, comparando los anticuerpos con el suero pre-inmune de las conejas. Los ensayos de titulación mostraron que el mejor anticuerpo fue el #31, el cual proviene de la coneja inoculada cada 30 días, lo que permitió que su producción de anticuerpos IgG fuera mayor y de mayor especificidad como se ha reportado anteriormente (Harlow, 1988).

Los experimentos de WB y marcado por afinidad con extractos de células COS-1 transfectadas con las diferentes versiones de Betaglicano y embriones de pez cebra, mostraron que el anticuerpo #31 es capaz de reconocer específicamente al BG de pez cebra con o sin cadenas GAG's, a pesar del 43-52% de identidad de la secuencia de aminoácidos entre los dominios E y U del BG de rata y de pez cebra. Para nuestra sorpresa, los ensayos de unión por marcado por afinidad, nos permitieron comprobar que el anticuerpo #821, diseñado contra el dominio

intracelular de BG de rata, es capaz de reconocer al dominio intracelular del BG de pez cebra, pues comparten un 83.3% de similitud en su secuencia de aminoácidos. Con estos 2 anticuerpos, fuimos capaces de determinar la expresión del receptor de BG en embriones de pez cebra y caracterizarlo bioquímicamente.

Expresión y caracterización del BG de pez cebra.

Los experimentos de unión por marcado por afinidad mostraron en ensayos de transfección de células COS-1 con el cDNA del BG de pez cebra el patrón de corrimiento tipo de BG, con dos especies, la primera correspondiente al core de la proteína sin cadenas GAG's de aproximadamente 120 kDa y la segunda, un barrido de aproximadamente 200-250 kDa, que corresponde a la proteína unida a cadenas GAG's. En comparación con el BG de rata, la intensidad del barrido del receptor con cadenas GAG's es menor, esto quizás debido a que la versión del pez cebra solo cuenta con un sitio de unión a cadenas GAG's (Ser 522) y no dos como el ortólogo de rata (Lopez-Casillas et al., 1994). Por otro lado se comprobó que la Ser 522 es el sitio de unión de las cadenas GAG's, ya que la versión mutada (Ser522Ala) solo presenta la banda correspondiente al core de 120 kDa.

En embriones de pez cebra, el BG presenta el mismo patrón de corrimiento que el de otras especies, se expresa en muy bajas cantidades a las 24 y 48 hpf, y aumenta su expresión a las 72 hpf, lo que concuerda con los experimentos de qRT-PCR. La inyección de morfolinós que afectan el splicing del mRNA del gen de BG, provoca la disminución de la cantidad de la proteína presente a las 72 hpf. Estos experimentos nos permitieron comprobar que el BG endógeno de pez cebra es capaz de unir a TGF β 2, además en experimentos preliminares hemos podido probar que el receptor es capaz de unir inhibina A; por lo que es muy probable que se encuentren conservadas la mayoría de las funciones descritas para el receptor tipo 3 de TGF- β in vitro y durante el desarrollo.

En el BG de rata se describió que las cadenas de GAG's presentes, correspondían a cadenas de heparán sulfato y condroitin sulfato (Lopez-Casillas et al., 1994), por lo que se incubó al BG de pez cebra en enzimas que cortan estos dos tipos de

cadena, y se demostró que tanto en el receptor sobreexpresado en células COS-1 como el presente en los embriones contienen Heparán sulfato, pero muy poco, condroitin sulfato. Sin embargo el corte de las cadenas de heparán sulfato no es suficiente para concentrar todo el BG en la banda de 120 kDa, que corresponde al receptor sin cadenas GAG's, por lo que es muy probable que el receptor endógeno contenga otro tipo de cadenas de glicosaminoglicanos como queratán sulfato o dermatán sulfato. La importancia de la identidad de las cadenas GAG's unidas a BG recae en la importancia que tienen éstas en procesos fisiológicos, así como una de las funciones descritas para BG, como la unión de FGF (Andres et al., 1992).

En resumen, se determinó la expresión del mRNA y la proteína de BG durante los primeros estadios de desarrollo del pez cebra; se obtuvieron 2 anticuerpos específicos contra el BG de pez cebra que sirvieron de herramienta fundamental para la caracterización bioquímica preliminar del receptor tipo 3 de TGF- β de pez cebra.

9. Conclusiones

1. El RNAm de Betaglicano es de origen cigótico y se expresa a partir de las 8hpf en el pez cebra.
2. Se obtuvieron anticuerpos policlonales capaces de reconocer de forma específica al ectodominio del BG de pez cebra.
3. El Betaglicano de pez cebra es capaz de unir TGF β 2 y se expresa en mayor cantidad a las 72hpf
4. Las cadenas GAG's del Betaglicano de pez cebra tienen cuando menos heparán sulfato, pero su composición puede incluir otro tipo de GAGs.
5. El morfolino BG02 afecta el procesamiento del RNAm, eliminando el exón 2 y reduciendo la cantidad de BG presente en los embriones y el morfolino BG03 lo hace sólo parcialmente.

10. Perspectivas

1. Realizar inmunohistoquímicas en cortes histológicos para definir los sitios de expresión de BG durante el desarrollo del pez cebra.
2. Determinar si el BG de pez cebra es capaz de unir todos los ligandos reportados para otras especies, lo que serviría de indicio para la conservación de funciones del receptor entre especies.
3. Determinar si existen otro tipos de azúcares sulfatados en las cadenas de GAG's presentes en el BG de pez cebra endógeno.

11. Bibliografía

1. Andres, J. L., DeFalcis, D., Noda, M. and Massague, J. (1992) 'Binding of two growth factor families to separate domains of the proteoglycan betaglycan', *J Biol Chem* 267(9): 5927-30.
2. Bilandzic, M., Chu, S., Farnworth, P. G., Harrison, C., Nicholls, P., Wang, Y., Escalona, R. M., Fuller, P. J., Findlay, J. K. and Stenvers, K. L. (2009) 'Loss of betaglycan contributes to the malignant properties of human granulosa tumor cells', *Mol Endocrinol* 23(4): 539-48.
3. Bilandzic, M. and Stenvers, K. L. (2012) 'Reprint of: Betaglycan: a multifunctional accessory', *Mol Cell Endocrinol* 359(1-2): 13-22.
4. Boyer, A. S. and Runyan, R. B. (2001) 'TGFbeta Type III and TGFbeta Type II receptors have distinct activities during epithelial-mesenchymal cell transformation in the embryonic heart', *Dev Dyn* 221(4): 454-9.
5. Brown, C. B., Boyer, A. S., Runyan, R. B. and Barnett, J. V. (1999) 'Requirement of type III TGF-beta receptor for endocardial cell transformation in the heart', *Science* 283(5410): 2080-2.
6. Camenisch, T. D., Molin, D. G., Person, A., Runyan, R. B., Gittenberger-de Groot, A. C., McDonald, J. A. and Klewer, S. E. (2002) 'Temporal and distinct TGFbeta ligand requirements during mouse and avian endocardial cushion morphogenesis', *Dev Biol* 248(1): 170-81.
7. Cheah, F. S., Winkler, C., Jabs, E. W. and Chong, S. S. (2010) 'Tgfbeta3 regulation of chondrogenesis and osteogenesis in zebrafish is mediated through formation and survival of a subpopulation of the cranial neural crest', *Mech Dev* 127(7-8): 329-44.
8. Chen, W., Kirkbride, K. C., How, T., Nelson, C. D., Mo, J., Frederick, J. P., Wang, X. F., Lefkowitz, R. J. and Blobel, G. C. (2003) 'Beta-arrestin 2 mediates endocytosis of type III TGF-beta receptor and down-regulation of its signaling', *Science* 301(5638): 1394-7.
9. Combs, M. D. and Yutzey, K. E. (2009) 'Heart valve development: regulatory networks in development and disease', *Circ Res* 105(5): 408-21.
10. Compton, L. A., Potash, D. A., Brown, C. B. and Barnett, J. V. (2007) 'Coronary vessel development is dependent on the type III transforming growth factor beta receptor', *Circ Res* 101(8): 784-91.
11. Cooley, J. R., Yatskievych, T. A. and Antin, P. B. (2014) 'Embryonic expression of the transforming growth factor beta ligand and receptor genes in chicken', *Dev Dyn* 243(3): 497-508.
12. Daniel, C., Wiede, J., Krutzsch, H. C., Ribeiro, S. M., Roberts, D. D., Murphy-Ullrich, J. E. and Hugo, C. (2004) 'Thrombospondin-1 is a major activator of TGF-beta in fibrotic renal disease in the rat in vivo', *Kidney Int* 65(2): 459-68.
13. Daopin, S., Piez, K. A., Ogawa, Y. and Davies, D. R. (1992) 'Crystal structure of transforming growth factor-beta 2: an unusual fold for the superfamily', *Science* 257(5068): 369-73.
14. Delolme, F., Anastasi, C., Alcaraz, L. B., Mendoza, V., Vadon-Le Goff, S., Talantikite, M., Capomaccio, R., Mevaere, J., Fortin, L., Mazzocut, D. et al. (2014) 'Proteolytic control of TGF-beta co-receptor activity by BMP-1/tolloid-like proteases revealed by quantitative iTRAQ proteomics', *Cell Mol Life Sci*.
15. Derynck, R., Lindquist, P. B., Lee, A., Wen, D., Tamm, J., Graycar, J. L., Rhee, L., Mason, A. J., Miller, D. A., Coffey, R. J. et al. (1988) 'A new type of transforming growth factor-beta, TGF-beta 3', *EMBO J* 7(12): 3737-43.
16. Derynck, R. and Zhang, Y. E. (2003) 'Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling', *Nature* 425(6958): 577-84.

17. Dickson, M. C., Martin, J. S., Cousins, F. M., Kulkarni, A. B., Karlsson, S. and Akhurst, R. J. (1995) 'Defective haematopoiesis and vasculogenesis in transforming growth factor-beta 1 knock out mice', *Development* 121(6): 1845-54.
18. Dunker, N. and Kriegelstein, K. (2000) 'Targeted mutations of transforming growth factor-beta genes reveal important roles in mouse development and adult homeostasis', *Eur J Biochem* 267(24): 6982-8.
19. Esparza-Lopez, J., Montiel, J. L., Vilchis-Landeros, M. M., Okadome, T., Miyazono, K. and Lopez-Casillas, F. (2001) 'Ligand binding and functional properties of betaglycan, a co-receptor of the transforming growth factor-beta superfamily. Specialized binding regions for transforming growth factor-beta and inhibin A', *J Biol Chem* 276(18): 14588-96.
20. Groppe, J., Hinck, C. S., Samavarchi-Tehrani, P., Zubieta, C., Schuermann, J. P., Taylor, A. B., Schwarz, P. M., Wrana, J. L. and Hinck, A. P. (2008) 'Cooperative assembly of TGF-beta superfamily signaling complexes is mediated by two disparate mechanisms and distinct modes of receptor binding', *Mol Cell* 29(2): 157-68.
21. Grunwald, D. J. and Eisen, J. S. (2002) 'Headwaters of the zebrafish -- emergence of a new model vertebrate', *Nat Rev Genet* 3(9): 717-24.
22. Harlow, E. L., D. (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual*: CSHL Press.
23. 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', *Nat Genet* 11(4): 415-21.
24. Kimmel, C. B., Ballard, W. W., Kimmel, S. R., Ullmann, B. and Schilling, T. F. (1995) 'Stages of embryonic development of the zebrafish', *Dev Dyn* 203(3): 253-310.
25. Kingsley, D. M. (1994) 'The TGF-beta superfamily: new members, new receptors, and new genetic tests of function in different organisms', *Genes Dev* 8(2): 133-46.
26. 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 U S A* 90(2): 770-4.
27. Lander, E. S. Linton, L. M. Birren, B. Nusbaum, C. Zody, M. C. Baldwin, J. Devon, K. Dewar, K. Doyle, M. FitzHugh, W. et al. (2001) 'Initial sequencing and analysis of the human genome', *Nature* 409(6822): 860-921.
28. Lewis, K. A., Gray, P. C., Blount, A. L., MacConell, L. A., Wiater, E., Bilezikjian, L. M. and Vale, W. (2000) 'Betaglycan binds inhibin and can mediate functional antagonism of activin signalling', *Nature* 404(6776): 411-4.
29. Lopez-Casillas, F., Payne, H. M., Andres, J. L. and Massague, J. (1994) 'Betaglycan can act as a dual modulator of TGF-beta access to signaling receptors: mapping of ligand binding and GAG attachment sites', *J Cell Biol* 124(4): 557-68.
30. Lopez-Casillas, F., Wrana, J. L. and Massague, J. (1993) 'Betaglycan presents ligand to the TGF beta signaling receptor', *Cell* 73(7): 1435-44.
31. Mahlawat, P., Ilangovan, U., Biswas, T., Sun, L. Z. and Hinck, A. P. (2012) 'Structure of the Alk1 extracellular domain and characterization of its bone morphogenetic protein (BMP) binding properties', *Biochemistry* 51(32): 6328-41.
32. Makanji, Y., Walton, K. L., Wilce, M. C., Chan, K. L., Robertson, D. M. and Harrison, C. A. (2008) 'Suppression of inhibin A biological activity by alterations in the binding site for betaglycan', *J Biol Chem* 283(24): 16743-51.
33. Massague, J. (2000) 'How cells read TGF-beta signals', *Nat Rev Mol Cell Biol* 1(3): 169-78.
34. Mendoza, V., Vilchis-Landeros, M. M., Mendoza-Hernandez, G., Huang, T., Villarreal, M. M., Hinck, A. P., Lopez-Casillas, F. and Montiel, J. L. (2009) 'Betaglycan has two

- independent domains required for high affinity TGF-beta binding: proteolytic cleavage separates the domains and inactivates the neutralizing activity of the soluble receptor', *Biochemistry* 48(49): 11755-65.
35. Munger, J. S., Huang, X., Kawakatsu, H., Griffiths, M. J., Dalton, S. L., Wu, J., Pittet, J. F., Kaminski, N., Garat, C., Matthay, M. A. et al. (1999) 'The integrin alpha v beta 6 binds and activates latent TGF beta 1: a mechanism for regulating pulmonary inflammation and fibrosis', *Cell* 96(3): 319-28.
 36. Myhre, K. and Blobe, G. C. (2009) 'The type III TGF-beta receptor regulates epithelial and cancer cell migration through beta-arrestin2-mediated activation of Cdc42', *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(20): 8221-6.
 37. Neumann, C. J. (2002) 'Vertebrate development: a view from the zebrafish', *Semin Cell Dev Biol* 13(6): 469.
 38. Oklu, R. and Hesketh, R. (2000) 'The latent transforming growth factor beta binding protein (LTBP) family', *Biochem J* 352 Pt 3: 601-10.
 39. Olivey, H. E., Barnett, J. V. and Ridley, B. D. (2003) 'Expression of the type III TGFbeta receptor during chick organogenesis', *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol* 272(1): 383-7.
 40. Oshima, M., Oshima, H. and Taketo, M. M. (1996) 'TGF-beta receptor type II deficiency results in defects of yolk sac hematopoiesis and vasculogenesis', *Dev Biol* 179(1): 297-302.
 41. Peal, D. S., Lynch, S. N. and Milan, D. J. (2011) 'Patterning and development of the atrioventricular canal in zebrafish', *J Cardiovasc Transl Res* 4(6): 720-6.
 42. Sanford, L. P., Ormsby, I., Gittenberger-de Groot, A. C., Sariola, H., Friedman, R., Boivin, G. P., Cardell, E. L. and Doetschman, T. (1997) 'TGFbeta2 knockout mice have multiple developmental defects that are non-overlapping with other TGFbeta knockout phenotypes', *Development* 124(13): 2659-70.
 43. Sarraj, M. A., Chua, H. K., Umbers, A., Loveland, K. L., Findlay, J. K. and Stenvers, K. L. (2007) 'Differential expression of TGFBR3 (betaglycan) in mouse ovary and testis during gonadogenesis', *Growth Factors* 25(5): 334-45.
 44. Sarraj, M. A., Escalona, R. M., Umbers, A., Chua, H. K., Small, C., Griswold, M., Loveland, K., Findlay, J. K. and Stenvers, K. L. (2010) 'Fetal testis dysgenesis and compromised Leydig cell function in Tgfbr3 (beta glycan) knockout mice', *Biol Reprod* 82(1): 153-62.
 45. Shi, Y. and Massague, J. (2003) 'Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus', *Cell* 113(6): 685-700.
 46. Shull, M. M., Ormsby, I., Kier, A. B., Pawlowski, S., Diebold, R. J., Yin, M., Allen, R., Sidman, C., Proetzel, G., Calvin, D. et al. (1992) 'Targeted disruption of the mouse transforming growth factor-beta 1 gene results in multifocal inflammatory disease', *Nature* 359(6397): 693-9.
 47. Stenvers, K. L., Tursky, M. L., Harder, K. W., Kountouri, N., Amatayakul-Chantler, S., Grail, D., Small, C., Weinberg, R. A., Sizeland, A. M. and Zhu, H. J. (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(12): 4371-85.
 48. Wang, X. F., Lin, H. Y., Ng-Eaton, E., Downward, J., Lodish, H. F. and Weinberg, R. A. (1991) 'Expression cloning and characterization of the TGF-beta type III receptor', *Cell* 67(4): 797-805.
 49. Wiater, E., Harrison, C. A., Lewis, K. A., Gray, P. C. and Vale, W. W. (2006) 'Identification of distinct inhibin and transforming growth factor beta-binding sites on betaglycan: functional separation of betaglycan co-receptor actions', *J Biol Chem* 281(25): 17011-22.