



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO  
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS  
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTENIA  
CENTRO MULTIDISCIPLINARIO DE ESTUDIOS EN BIOTECNOLOGÍA

**OBTENCIÓN DE ANTICUERPOS POLICLONALES CONTRA EL  
DOMINIO DE UNIÓN A SUPRESOR DE HAIRLESS DE LA  
PROTEÍNA HAIRLESS DE *Drosophila melanogaster***

Tesis que presenta

M.V.Z HUMBERTO CONTRERAS CORNEJO

Para obtener el grado de

MAESTRO EN CIENCIAS

Opción en

BIOTECNOLOGÍA PECUARIA

Asesor

DR. ALEJANDRO BRAVO PATIÑO

CO-ASESOR:

DR. VICTOR MANUEL BAIZABAL AGUIRRE

Morelia, Michoacán, México. Septiembre de 2010

*“Verba volant scripta manent”*

## **AGRADECIMIENTOS**

Muchas personas han estado implicadas en este trabajo, algunas de ellas me han apoyado incondicionalmente. Si cito a un nombre, tengo que citarlos a todos, pero alguno se me puede olvidar.

Cada uno de ustedes sabe el lugar que ocupa en mi vida, en mi trabajo, en mi estudio, en los momentos de diversión y en cada instante de mi existencia...

... y para agradecerte he aprovechado cada momento.

## **DEDICATORIA**

Y obviamente el trabajo está dedicado a cada una de estas personas, implícitas en el agradecimiento y presentes en mi pensamiento, en mi recuerdo...

... es ahí donde deben de estar.

# Índice

<i>Índice</i> .....	<i>i</i>
<i>Lista de Abreviaciones</i> .....	<b>1</b>
<i>Resumen</i> .....	<b>3</b>
<i>Summary</i> .....	<b>4</b>
<b>1. Introducción</b> .....	<b>5</b>
<b>1.1. Importancia de la comunicación:</b> .....	<b>5</b>
<b>1.2. Vías de Transducción de Señales:</b> .....	<b>6</b>
<b>1.3. La vía de Notch</b> .....	<b>8</b>
<b>1.4. Hairless, el gran desconocido</b> .....	<b>14</b>
<b>1.5. Funcionamiento de la Vía de N</b> .....	<b>16</b>
<b>1.6. Tres mecanismos de diferenciación, múltiples destinos celulares</b> .....	<b>18</b>
<b>1.7. El modelo de “switch” ¿represión o activación? ¿Represión y activación?</b> .....	<b>20</b>
<b>1.8. De los Anticuerpos</b> .....	<b>22</b>
<b>2. Justificación</b> .....	<b>26</b>
<b>3. Hipótesis</b> .....	<b>27</b>
<b>4. Objetivos</b> .....	<b>28</b>
<b>4.1. Objetivo general:</b> .....	<b>28</b>
<b>4.2. Objetivos particulares:</b> .....	<b>28</b>
<b>5. Material y Métodos</b> .....	<b>29</b>
<b>6. Resultados y Discusión</b> .....	<b>30</b>
<b>6.1. Capítulo I</b> .....	<b>30</b>
<b>6.2. Capítulo II</b> .....	<b>49</b>
<b>6.3. Capítulo III</b> .....	<b>51</b>
<b>7. Discusión general y conclusiones</b> .....	<b>55</b>
<b>8. Bibliografía</b> .....	<b>57</b>
<b>9. Apéndice</b> .....	<b>62</b>

## Lista de Abreviaciones

aa: Aminoácidos  
Ac: Anticuerpos  
APC: Célula presentadora de antígeno  
AS-C: Complejo de genes Achaete-Scute  
bHLH: Proteínas básicas del tipo hélice-lazo-hélice  
CBF-1 o RBPJ $\kappa$ : Homólogos de Supresor de Hairless en mamíferos  
CDR: Región hipervariable o regiones determinantes de la complementariedad  
CIR: CBF-Interacting Protein  
CR: Región rica en Cisteínas  
CSL: Familia de proteínas CBF1/Supresor de Hairless/Lag-1  
CtBP: Proteína de unión a carboxilo terminal  
*D.m: Drosophila melanogaster*  
DA: Dominio de unión a Groucho  
DC: Dominio de unión a CtBP  
DI: Delta  
DS: Dominio de unión a Supresor de Hairless  
DSL: Familia de proteínas Delta/Serrate/Lag-2  
Dx: Deltex  
E(spl): Genes del complejo Enhancer of Split  
E1: Enzima activadora de la ubiquitina  
E2: Enzima que conjuga la ubiquitina  
E3: Enzima ubiquitina-ligasa  
EBD: Dominio de unión extramembranal  
EGF: Factores de crecimiento epidérmico  
Fng: Fringe  
Gal: Galactosa  
GlcNAc: N-acetilglucosamida  
Gro: Groucho  
*H.A.m: Hairless de Apis mellifera*  
*H.D.m: Hairless de Drosophila melanogaster*  
H: Hairless  
HAT: Acetilinasas de Histonas, Acetil-transferasas de Histonas  
HDAC: Desacetilasas de histonas  
Hh: Hedgehog  
Hp150 y Hp120: Hairless de 150 y 120 kDa  
IFN- $\gamma$ : Interferón gama  
Ig: Inmunoglobulina

IL: Interleucina  
Jak/STAT: Receptor nuclear  
kDa: Kilo Daltones  
Kuz: Kuzbanian  
LNG: Familia de proteínas Lin-12/Notch/GLP-1  
M1, M2, M3: Codones de inicio en Hairless  
MAL: Marco abierto de lectura  
Mam. Mastermind  
MHC II: Complejo mayor de histocompatibilidad tipo II  
Mib: Mind Bomb  
MNC: Membrana de nitrocelulosa  
N: Notch  
NECD: Dominio extracelular de Notch  
Neur: Neuralized  
NIC: Notch intracelular  
NICD: Dominio intracelular de Notch  
nls: Señales de localización nuclear  
N $\beta$ :  $\beta$ -Notch  
O-FucT-1: O-fucosiltransferasa  
pb: Pares de bases  
PCR: Reacción en cadena de la polimerasa  
PEST: región rica en Prolina, Glutamato; Serina y Treonina  
RIP: Corte proteolítico regulado intramembranalmente  
RTK: Receptor de tirosina Cinasa  
S1, S2, S3, S4: Cortes proteolíticos realizados sobre el receptor Notch  
Ser: Serrate  
Sia: Ácido Siálico  
SKIP: Ski-Interacting Protein  
SMRT Silencing Mediator of Retinoid and Thyroid Receptor  
SOP: Células precursoras de órganos sensoriales  
Su(dx): Supresor de Deltex  
TAD: Dominio activador de la transcripción  
TBS: Solución amortiguadora a base de Tris  
TCR: Receptor de las células T  
TGF- $\beta$ : Factor de crecimiento transformante beta  
TH: Linfocitos T auxiliares  
TTBS: Solución amortiguadora a base de Tris y Tween  
Wnt: Wingless

## Resumen

La vía de señalización Notch es una de las rutas de comunicación celular, que se utiliza principalmente durante el desarrollo temprano de los individuos, ya que participa en la diferenciación celular y por lo tanto en la organogénesis, y en conjunto con otras vías de transducción de señales, permite las complejas organizaciones espacio-temporales que orquestan y diseñan a los organismos multicelulares. La proteína Hairless es el principal regulador negativo de esta vía y por lo tanto funciona como un antagonista de la misma. Si bien ha sido caracterizada en *Drosophila melanogaster* y otros insectos, esta proteína de vital importancia para la vía, no cuenta con un homólogo reportado en mamíferos. Hairless cuenta con varios dominios conservados entre los diferentes homólogos conocidos en insectos y uno de estos dominios en particular, le sirve como sitio de enlace a Supresor de Hairless, factor transcripcional de la vía, que cuenta con un homólogo en mamíferos, CBF-1 (RBPJ $\kappa$ ). Mediante PCR se amplificó el dominio de unión a Supresor a Hairless de la proteína Hairless de *Drosophila melanogaster* para producir un péptido *in vitro* que se usó como antígeno en la inmunización de conejos y gallinas y producir anticuerpos policlonales contra esta región. Posteriormente los sueros se probaron en proteína total de *Drosophila melanogaster* para detectar Hairless mediante Western Blot. Estos anticuerpos serán probados en proteína total de mamífero con la intención de identificar alguna proteína que conserve la función de Hairless de *Drosophila melanogaster* o se una a los homólogos de Supresor de Hairless conocidos en estas especies.

## Summary

The functions of different types of cells that constitute a multicellular organism are regulated by signal transduction pathways, whose final goal is target genes regulation. The Notch signaling pathway is mainly involved in early and late embryo development, and recently, has been described its participation in the adult organism proper function. Hairless, a protein member of the Notch signaling pathway, modulates negatively this transduction signal pathway. Despite efforts to detect Hairless in higher animals, it has not been able to identify a homologue protein. The identification of a homologue protein is essential for the understanding of the regulatory processes during embryo development and other pathological processes where Notch pathway is involved. The Hairless counterparts described in insects have at least three highly conserved domains, where the suppressor of Hairless binding domain is the most conserved. Using analysis *in silico* and molecular biology techniques was identified and delimited a potentially immunogenic peptide from the Suppressor of Hairless binding domain of Hairless protein from *Drosophila melanogaster*. This peptide was used as antigen to generate polyclonal antibodies in rabbits and chickens. The sera were tested against total protein extract from embryos of the fruitfly.

# 1. Introducción

## ***1.1. Importancia de la comunicación:***

La comunicación es importante en todos los niveles conocidos donde se involucra el flujo de información. En un esquema convencional de comunicación existen una fuente, receptores (que no necesariamente deben ser dos entidades inteligentes), transmisores del mensaje, canales por los cuales fluye la información, “ruidos” producidos por el mismo sistema o su entorno, la información misma o mensaje con su significante y su significado (que son los que finalmente permiten su codificación) y por último los efectos que éste pueda producir.

Si bien estos esquemas de comunicación se han teorizado a lo largo de muchos años y han sido empleados prevalentemente en sistemas útiles a los seres humanos, las investigaciones sobre la forma en que las células se comunican muestran algo muy parecido, donde se pueden identificar los elementos antes mencionados; la comunicación celular se establece por vías de transducción de señales, también conocidas como vías de señalización, que permiten intercambiar información entre células, aún a gran distancia, donde la respuesta de la célula receptora puede variar desde la síntesis de una proteína o adoptar un destino celular diferente, hasta la muerte misma de la célula.

Dada la complejidad de las vías de transducción de señales, en los últimos años se ha hecho uso de programas computacionales sofisticados, que permiten comprender mejor cómo los diferentes elementos que participan en la señalización interaccionan entre sí, ya que se ha demostrado que las vías cruzan información entre ellas para un correcto funcionamiento de los organismos multicelulares (Bauer-Mehren *et al*, 2009). Por lo tanto, es importante comprender que lo decisivo para sistemas de este tipo, no es aquello que sus elementos puedan significar en particular, sino lo que los hace una totalidad, es decir el orden y la unidad del sistema. Podemos decir que las partes están subordinadas a un todo en su carácter parcial, existen en virtud del sistema; lo cual no excluye que posean valor propio.



Un organismo multicelular, está expuesto a un sin número de estímulos, a los cuales debe responder de manera adecuada. Estos estímulos pueden provenir del medio ambiente (luz, temperatura) o generarse en el mismo organismo (hormonas por ejemplo). Si por algún motivo llegase a ocurrir algún error en el proceso de transducción de una señal, éste podría acarrear consecuencias graves, desde apoptosis celular, hasta enfermedades y la muerte del organismo.

El desarrollo y mantenimiento de las funciones en un organismo multicelular son procesos regulados por las vías de transducción de señales. La activación de las vías se inicia cuando existe intercambio de información bioquímica y ciertas proteínas, una que tiene la función de efectora del mensaje y otra que funciona como receptora, interactúan. Se ha demostrado que esta interacción coordina una amplia variedad de procesos durante el desarrollo temprano y tardío del embrión, principalmente en la citodiferenciación y la organogénesis (Artavanis-Tsakonas *et al*, 1999), dando origen a un organismo complejo y funcional con células altamente especializadas.

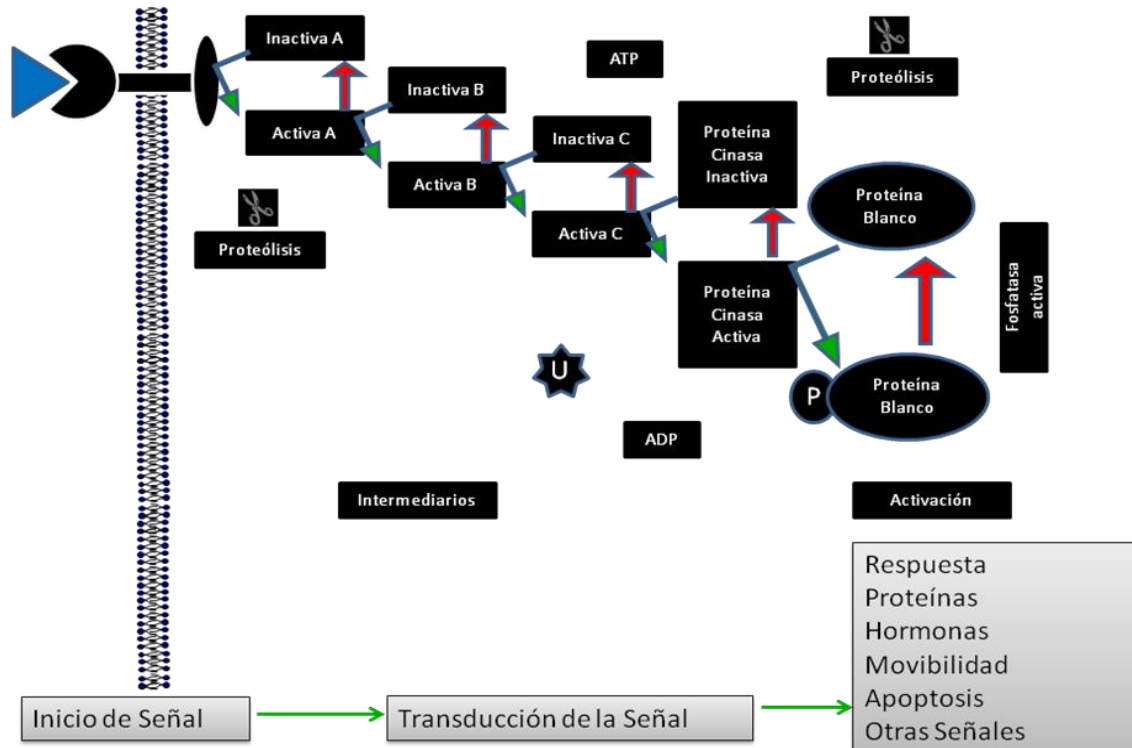
La vía de señalización de Notch (N) es una de las siete grandes vías de señalización conocidas que regulan la gran mayoría de los destinos celulares durante el desarrollo, junto con Wingless (Wnt), Factor de Crecimiento Transformante beta (TGF- $\beta$ ), Hedgehog (Hh), Receptor de Tirosina Cinasa (RTK), Receptor Nuclear y Jak/STAT. Cada vía es usada de manera reiterada durante el crecimiento de los organismos de acuerdo al contexto o estadio de desarrollo. Estas siete vías difieren notablemente tanto en su complejidad como en su mecanismo bioquímico de señalización transduccional. Sin embargo, el objetivo final de la señalización es el mismo: regular la expresión de genes blanco específicos por factores de transcripción regulados por señales (Barolo y Posakony, 2002). Ésta activación, en el desarrollo y funcionamiento fisiológico de los metazoarios incluye, proliferación celular, secreción, movilidad, transcripción y apoptosis (Gerhart, 1999).

## ***1.2. Vías de Transducción de Señales:***

La comunicación celular es una característica típica de los organismos multicelulares; sin ella, las complejas organizaciones celulares en términos espacio-temporales de los organismos vivientes no serían posibles, así como el funcionamiento

correcto de los mismos. Al parecer, esta característica se comparte desde hace 1.2 billones de años, como herencia de antepasados unicelulares (Gerhart, 1999; Baron *et al*, 2002).

Si bien las vías de transducción difieren entre sí, se pueden reconocer características comunes entre ellas. En la figura 1 se muestra un esquema general de señalización: la señalización inicia cuando se activa un receptor específico mediante su ligando, en ese momento se inicia una cascada de eventos propios de cada vía, que culmina con una respuesta de la célula. Algunos de estos procesos pueden ser: la activación o inactivación de proteínas mediante fosforilación, procesamientos proteolíticos, pueden involucrar la vía endocítica y ubiquitinas (que en la mayoría de los casos degradan las proteínas), además de interacciones entre más de una vía, entre otros. Pero el objetivo de todas las vías es el mismo, la activación o inactivación de genes blanco. Esta respuesta, a su vez, dependerá del contexto celular, es decir: el grado de especialización celular y la topografía nuclear (eucromatina/heterocromatina) entre otros (Gerhart, 1999; Mumm y Kopan, 2000; Courey y Jia, 2001; Baron *et al*, 2002; Rida *et al*, 2004; Schweisguth, 2004; Bray, 2006).



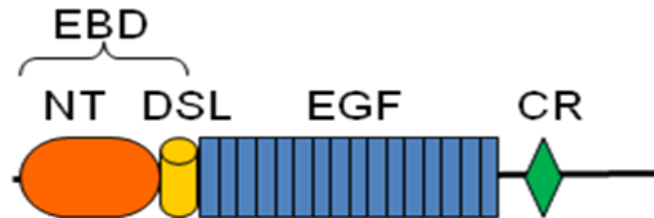
**Figura 1:** Esquema general de la transducción de una señal. El triángulo azul representa un ligando, que después de activar al receptor, inicia la transducción de la señal mediante la activación (flechas verdes) o inactivación (flechas rojas) de elementos involucrados en la vía, mediante proteólisis, fosforilación o ubiquitinación, para finalmente promover una respuesta por parte de la célula (Modificado de Gerhart, 1999).

### ***1.3. La vía de Notch***

La función de la señalización N (figura 6) involucra una gran variedad de procesos celulares incluyendo el mantenimiento de células troncales, especificación del destino celular, diferenciación, proliferación y apoptosis, por lo que posee efectos pleiotrópicos en diferentes órganos (Maier *et al*, 2002), por lo tanto, esta vía es importante tanto en el funcionamiento fisiológico adecuado del feto, como de organismos jóvenes y adultos (Mumm y Kopan, 2000; Santos *et al*, 2006).

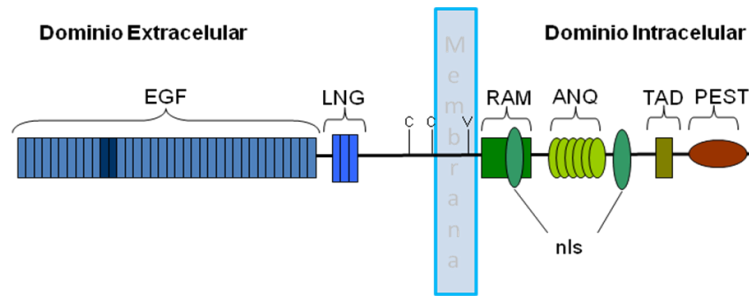
***Elementos involucrados en la Vía de N; activación y niveles de regulación:*** La vía de N se compone por un número relativamente pequeño de proteínas, que se pueden dividir en dos grandes grupos: un primer grupo de las proteínas, que forman el núcleo de la vía, y son las encargadas de la transducción de la señal propiamente dicha, está integrado por los ligandos, receptores, represores, co-represores y factores de transcripción; un segundo grupo de proteínas, que regulan la activación o inactivación de los elementos del primer grupo y, por lo tanto, modulan la respuesta de la célula, la intensidad y duración de la señal recibida (Bravo y Baizabal, 2005; Bray, 2006).

***Ligandos, la Familia Delta-Serrate-Lag2 (DSL):*** las proteínas de este grupo se caracterizan por tener un solo cruce transmembranal (proteínas de tipo I). Son expresadas por las células encargadas de promover el estímulo para el inicio de la señal en las células receptoras. Toman su nombre por un dominio común, localizado en el extremo C-terminal, de la familia de proteínas Delta (en *Drosophila melanogaster* [D.m.] y mamíferos) Serrate (en D.m.) y Lag-2 (en *Caenorhabditis elegans*), conocido como DSL, el cual tiene la función de unirse al receptor de las células blanco (Figura 2) (Baron *et al*, 2002; Baron, 2003; Bravo y Baizabal, 2005; Bray, 2006; Gazave *et al*, 2009).



**Figura 2.** Representación de un Ligando, Delta, característico de *Drosophila melanogaster*. Hacia la región N-terminal poseen un péptido señal que permite el transporte por la membrana celular, seguido de un dominio extracelular (NT, naranja) de 100-165 aa. Hacia la región C-terminal, se encuentra el dominio común a los miembros de esta familia, DSL (en amarillo). Después una serie de repetidos homólogos al factor de crecimiento epidérmico (EGF, por sus siglas en inglés), excepto por la ausencia de los seis residuos de cisteína que lo caracterizan. Los dominios NT y DSL conforman el dominio de enlace con los motivos EGF del receptor N (EBD), cuya función es iniciar la señal. Se han identificado de 2 a 16 dominios EGF completos (en azul) adyacentes a DSL, un dominio transmembranal y un dominio intracelular poco conservado en estas proteínas. En algunos casos se puede identificar una región rica en cisteína (CR, en verde), localizada entre los elementos repetidos EGF y el dominio transmembranal (Bravo y Baizabal, 2005; Gazave et al, 2009).

**Receptores, la Familia LIN-12/Notch:** está constituida por un grupo de proteínas conservadas de ~300 kilodaltones (kDa) que atraviesan una sola vez la membrana citoplásmica (proteínas de tipo I) y tienen la función de servir como receptores de los ligandos DSL (Figura 3). Estas proteínas cuentan con un dominio Extramembranal (NECD) que contiene de 10 a 36 elementos repetidos de EGF. Se ha demostrado que esta variación en los elementos repetidos de EGF, y las modificaciones postranscripcionales que sufren estas proteínas, así como las glicosilaciones catalizadas por la O-fucosil-transferasa 1 (O-FucT-1) y Fringe (Fng), determinan la afinidad ligando-receptor y confieren niveles de regulación tejido-específicos adicionales, de esta manera, la activación de la vía puede generar señales intracelulares diferentes, que determinen el uso preferencial de cualquiera de los mecanismos mediante los cuales se establecen las rutas de diferenciación; también le confieren estabilidad a la estructura de la proteína. Esta familia de proteínas cuenta también con un dominio intramembranal (NICD), que después de una serie de procesos proteolíticos, se transloca al núcleo para generar una respuesta específica, según el contexto celular en el que se encuentre la célula que recibió el estímulo (Munro y Freeman, 2000; Baron *et al*, 2002; Baron, 2003; Haines e Irvine, 2003; Bray, 2006; Stanley, 2007; Okajima *et al*, 2008).



**Figura 3.** Dominios en la proteína N de *Drosophila melanogaster*. La región extracelular contiene de 10 a 36 elementos repetidos EGF (en azul), los repetidos 11 y 12 (marcados en color más oscuro) son importantes porque se ha demostrado que son necesarios y suficientes para la interacción con los ligandos (Baron et al, 2002; Baron, 2003; Bray, 2006; Okajima et al, 2008). Cerca de la región extramembranal hay tres zonas CR, conocidas como secuencias repetidas LNG (conservadas en LIN-12, Notch y GLP-1) que confieren estabilidad y una correcta conformación del dominio extracelular (Shi y Stanley, 2003; Schweisguth, 2004; Gazave et al, 2009). El dominio intracelular de LIN12/Notch está altamente conservado entre los homólogos de la familia. Un primer dominio reconocido en la región intracelular de N (NIC) es RAM, el cual interacciona con los factores transcripcionales de la familia CSL (CBF1, Supresor de Hairless [Su(H)] y Lag-1), que le sirven de puente para unirse a ADN. Hacia C-terminal hay seis repetidos de anquirina, encargados de reclutar las proteínas del complejo de transcripción y un Dominio Activador de la Transcripción (TAD, por sus siglas en inglés), que recluta acetilasas de histonas; estos dominios son los encargados de regular la expresión de los diferentes genes blanco de la vía, por ejemplo las proteínas bHLH (proteínas básicas asa-helice-asa) o HES, entre otros. Finalmente, flanqueando las anquirinas hay dos Señales de Localización Nuclear (nls, por sus siglas en inglés), que le permitirán a NIC entrar al núcleo (Artavanis-Tsakonas et al, 1999; Bravo y Baizabal, 2005; Bray, 2006). Por último cerca de TAD se encuentra una región rica en prolina (P), glutamato (E), serina (S) y treonina (T), el dominio PEST, que es esencial para la interacción de NIC con las ubiquitin-ligasas E3, las cuales promueven la ubiquitanación de la proteína para su ingreso en la vía endocítica o para la degradación de la misma (Artavanis-Tsakonas et al, 1999; Bray, 2006; Gazave et al, 2009).

Estas proteínas cuentan con otras regiones importantes, que son las de unión a diferentes factores reguladores de la transcripción como la proteína Ski-Interacting Protein (SKIP) y Mastermind (Mam), que con las regiones antes mencionadas y sus respectivas proteínas formarán complejos que permitirán la transcripción de genes que el contexto celular requiera al momento de la activación de la vía (Bray y Furriols, 2001; Bray, 2006; Lai, 2002; Kopan e Ilagan, 2009).

**Represores y co-represores:** este grupo de proteínas se encargan de la regulación negativa de la vía. Hairless (H) es el antagonista principal de la vía N, en esta proteína se distinguen varios dominios de unión, algunos de ellos bastante conservados entre los diferentes homólogos de H, entre los que destacan el dominio de unión a supresor de Hairless (Su[H]) en la región N-terminal (DS), que le sirve de puente para unirse al ADN y formar los complejos de represión. Al centro de la proteína se encuentra la región denominada DA (con la secuencia consenso YSIXXLLG, donde X es cualquier aminoácido [aa]) que es el sitio de unión a la proteína co-represora Groucho (Gro), utilizada en varios complejos de represión de todas las especies, y un sitio denominado DC

(con la secuencia consenso PLNLSKH) que sirve de unión para la Proteína de Unión a C-terminal (CtBP, por sus siglas en inglés) (Lai, 2002; Bray, 2006). Para detalles estructurales de H y los complejos de represión ver la sección 1.5.

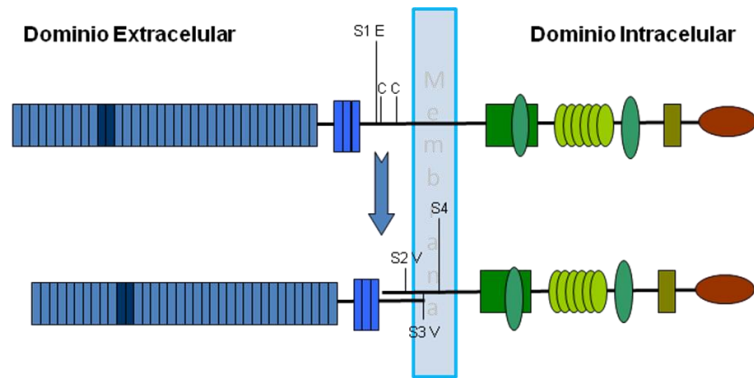
**Factores de Transcripción:** inicialmente la familia de proteínas CSL (CBF1, Supresor de Hairless [Su(H)] y Lag-1) fueron identificadas como represores transcripcionales en vertebrados y activadores de la transcripción en invertebrados. Si bien este proceso de activación-represión no se ha esclarecido del todo, se han propuesto algunos modelos para explicarlo, como veremos más adelante. Su(H) es una de las proteínas más importantes de este grupo, ya que su función es unirse a los factores en *cis* para servir de puente entre NIC, H y otros elementos en *trans*; de este modo la vía puede regular la transcripción de los genes que el contexto celular requiera y así modular la intensidad de la señal y la respuesta celular. Un ejemplo de genes que contienen secuencias consenso para este tipo de factores de transcripción son los que codifican para las proteínas bHLH, que son blanco de la vía N y son expresadas de modo selectivo, actuando como represores para los genes proneurales del complejo *Achaete-Scute* (AS-C) (Dou et al, 1994; Waltzer et al, 1995; Brennan y Gardner, 2002).

**Glicosil-transferas:** como ya se mencionó, la región extramembranal de N está conformada por varios EGF que, además de estabilizar la proteína, tienen la función de conferir diferentes grados de afinidad para interactuar con su ligando. En varios experimentos de mutación de éstos elementos repetidos en animales superiores, se ha demostrado que algunos son esenciales para discriminar entre los ligandos. Pero no sólo la posición de los EGF genera especificidad, también la glicosilación de ciertos repetidos hace más fina esta selección. Inicialmente una enzima O-FucT-1 agrega una fucosa en los EGF 11 y 12, que son esenciales para la generación de un receptor funcional; después, la cadena de carbohidratos se sigue extendiendo por la acción de Fng, y otras glucosil-transferasas, que adicionan residuos de N-acetilglucosamida (GlcNAc) a los grupos 3'-OH de las fucosas unidas a los repetidos de EGF. En mamíferos los residuos de galactosa (Gal), y ácido siálico (Sia) son agregados consecutivamente con enlaces  $\beta$ -1,4 y  $\alpha$ -2,3 respectivamente. Varios de los elementos repetidos de EGF tienen el potencial de ser modificados, por ejemplo los EGF en posiciones 21, 24, 25 y 26 confieren niveles de regulación tejido-específica adicional, dando la posibilidad de generar un gran repertorio de receptores modificados (Haltiwanger, 2002; Haltiwanger y Stanley, 2002; Haines e

Irvine, 2003; Shi y Stanley, 2003; Schweisguth, 2004, Rampa *et al*, 2005; Bray, 2006; Stanley, 2007; Gazave *et al*, 2009)

Recientemente se han identificado otras dos funciones de la O-Fucosil-transferasa, que podrían hacer reconsiderar los niveles de activación de los receptores N, ya que se ha demostrado que esta enzima tiene actividad de chaperona, por lo que participa en el plegamiento de la forma activa de las proteínas, y está implicada en la endocitosis y tráfico de las mismas (Rampa *et al*, 2005; Bray, 2005; Stanley, 2007; Okajima *et al*, 2008)

**Proteasas y metaloproteasas:** el receptor N es sintetizado, inicialmente, como una proteína inactiva. En el complejo de Golgi es procesado por una convertasa, Furina, con un primer corte proteolítico (S1), en un glutamato en posición 1,655, que produce NECD (de aproximadamente 180 kDa) y NICD (de aproximadamente 120 kDa), lo que da por resultado la dimerización y exposición de un péptido maduro en la membrana (Figura 4). Una vez que interaccionan el ligando y el receptor, los cambios conformacionales de la proteína exponen una valina en posición 1,711 donde ocurrirá un segundo corte proteolítico (S2, Figura 6), realizado por una metaloproteasa, Kuzbanian (Kuz), de la familia ADAM (TACE), que libera la región extracelular de N. Un tercer evento proteolítico (S3, Figura 6) regulado intramembranalmente (RIP por sus siglas en inglés), catalizado por una  $\gamma$ -secretasa presenilina, que ocurre en un valina en posición 1,744, libera la forma intracelular de N (NIC), que es la que finalmente se transloca al núcleo. Por último un cuarto corte (S4, Figura 6), también regulado intramembranalmente y realizado por una  $\gamma$ -secretasa presenilina, libera al espacio extracelular un pequeño péptido llamado  $\beta$ -Notch (N $\beta$ ), que hasta el momento no se sabe cual sea su función (Figura 3) (Munro y Freeman, 2000; Baron *et al*, 2002; Schweisguth, 2004; Gazave *et al*, 2009).



**Figura 4.** Sitios donde se realizan los cortes proteolíticos de N. El corte “S1 E” es realizado en un residuo de Glutamato, por una Furina y los fragmentos resultantes interaccionan y se unen en dos Cisteínas. El corte “S2 V” es realizado en un residuo de Valina por una enzima del tipo ADAM/TACE/Kuzbanian. Finalmente, el corte “S3 V”, sobre un residuo de Valina, y el corte “S4” son catalizados por una enzima  $\gamma$ -secretasa presenilina (Baron et al, 2002; Schweisguth, 2004; Gazave et al, 2009).

**Ubiquitinación:** las ubiquitinas son polipéptidos de 76 aa que se unen covalentemente a un sustrato, en un proceso de varios pasos, que involucra una enzima activadora de la ubiquitina (E1), una enzima que conjuga la ubiquitina (E2) y una enzima ubiquitina-ligasa (E3), esta última encargada de reconocer regiones conservadas específicas y catalizar la transferencia de ubiquitinas a su proteína blanco. Una serie de ubiquitin-ligasas se han asociado a la actividad de la vía. Neuralized (Neur) y Mind Bomb (Mib) se han asociado en la activación de los ligandos de la vía N. Estas dos proteínas regulan la actividad del ligando Dl en *D.m.*; por ejemplo Mib regula un subconjunto de eventos en la señalización N, entre los que se incluyen la formación de las alas, la segmentación de las patas y la formación de las venas, que difieren a los efectos donde se involucra la actividad de Neur (Le Borgne *et al*, 2005).

La actividad de Supresor de Deltex (Su[dx]) y Deltex (Dx) se han asociado al tráfico, endocitosis y degradación del receptor N. Cuando el receptor es ubiquitinado por Su(dx) éste entra a la vía endocítica para ser degradado. Dx por el contrario, antagoniza la actividad de Su(dx) y promueve el ingreso del receptor N a la vía endocítica para regular su tiempo y localización en la membrana. Es importante señalar que la ubiquitinación participa tanto en la degradación de los péptidos blanco, como en la activación, transporte y localización membranal de los mismos. (Le Borgne y Schweisguth, 2003; Le Borgne *et al*, 2005; Bray, 2006; Gazave *et al*, 2009).

La vía endocítica es un mecanismo que se ha relacionado con la ubiquitinación, como se mencionó anteriormente. Este complejo mecanismo involucra el reclutamiento de



proteínas y modificaciones de lípidos con transformaciones dramáticas de la membrana plasmática. La formación de vesículas se emplean para reorganizar la exposición en membrana de las proteínas involucradas en la señal de N, su activación y en los casos necesarios la degradación de las proteínas endocitadas (Bray, 2006; Liu *et al*, 2009).

#### **1.4. *Hairless*, el gran desconocido**

El gen *Hairless* de *D. melanogaster* (*H.D.m*) tiene cinco intrones, cuatro de ellos dentro de la región codificante (Figura 5); un solo marco abierto de lectura (MAL) que codifica una proteína de 1,077 aa con un peso molecular  $\approx$ 110 kDa; con tres codones de inicio (M1, M2, M3), donde uno de los intrones separa los codones M2 y M3. Si bien M1 no se ajusta al sitio de inicio de la transcripción del gen en *D.m.*, M2 (en posición 19) y M3 (en posición 148) parecen tener como consecuencia la traducción diferencial del gen (Marquart *et al.*, 1999) y, por tanto, la expresión de dos isoformas de la proteína: H<sup>p150</sup> y H<sup>p120</sup>, respectivamente (Figura 5). Existen evidencias de que la regulación adecuada de la vía Notch depende de que las dos isoformas actúen de manera sinérgica (Maier *et al.*, 2002, Paz-Gómez, 2008).

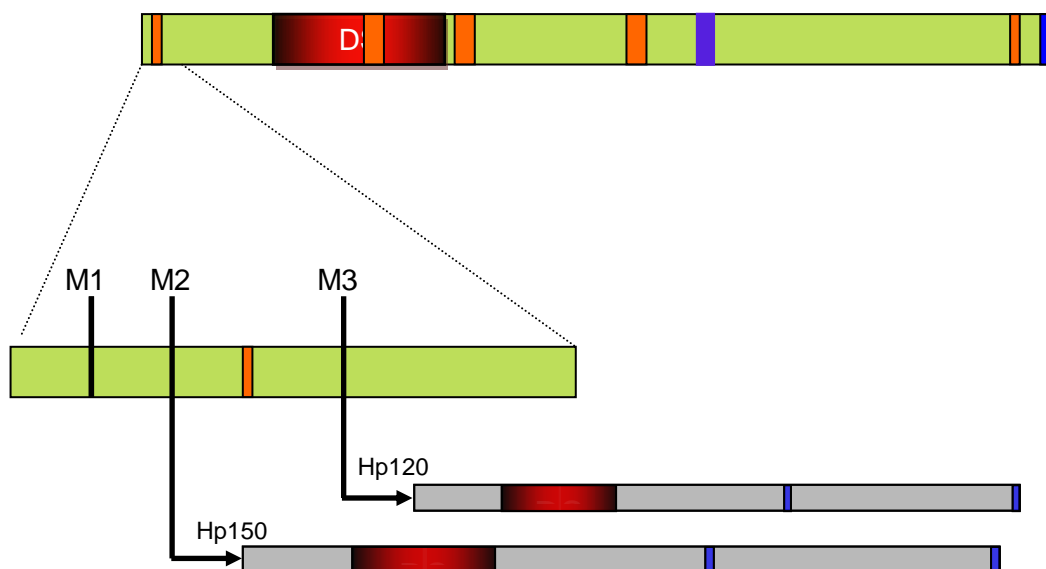
Los estudios comparativos, realizados por Maier y col. (1997), entre la proteína H de *D. hidei* y *D. melanogaster*, especies con 50 millones de años de divergencia, revelan una baja conservación de H con una identidad de aproximadamente 69%. Lo mismo ocurre con sus dominios, de los cuales, el más conservado es el DS (aproximadamente 85%) y el menos conservado es el DA (aproximadamente 33%). Cabe resaltar que la función de DA se debe a la naturaleza de los aa que la componen y no a una secuencia definida (Maier *et al.*, 1992).

El ortólogo de H recientemente estudiado en *Apis mellifera* (*H.A.m*) muestra una proteína que mide sólo un tercio (44.5 kDa) del tamaño de la proteína de los Drosófilidos (110 kDa). A pesar de su tamaño, *H.A.m* contiene tres de los dominios característicos (DS, DA, DC) bien conservados (Maier *et al*, 2008). En la tabla 1 se hace una comparación entre la Similitud (se refiere a la naturaleza de los aa) y la Identidad entre ortólogos de H.

Tabla 1: Comparación de los ortólogos de H en diferentes insectos		
	<i>Drosophila melanogaster</i>	
	% Similitud	% Identidad
<i>Anopheles gambiae</i>	66	60
<i>Culex pipiens</i>	67	61
<i>Aedes aegypti</i>	66	60
<i>Bombix mori</i>	68	61
<i>Tribolium castaneum</i>	73	65
<i>Apis mellifera</i>	70	63
<i>Nasonia vitripennis</i>	66	59
<i>Pediculus humanus corporis</i>	67	57

Tomado de Maier *et al.*, 2008

La proteína H juega un papel importante como el mayor antagonista de la vía de señalización de Notch. En *Drosophila* H se une a Su(H) (Marquart *et al.*, 1999), que es un factor de transcripción que funciona como activador de la vía, y, reclutando los co-represores Groucho (Gro) y la proteína de enlace a C-terminal (CtBP, por sus siglas en inglés), convierte a Su(H) en un represor de los genes blanco de la vía. En este contexto, H actúa como una molécula de unión entre Su(H) y los co-represores (Brennan y Gardner, 2002; Brody, 2002; Nagel *et al.*, 2005; Maier, 2008).



**Figura 5.** Gen Hairless. En verde representación del gen; en naranja los 5 intrones; en rojo los sitios DS; en azul los sitios DA y DC. M1, M2, M2 Codones de inicio; Hp150 inicio de la transcripción de la proteína de 150 kDa y Hp 120 inicio de la transcripción de la proteína de 120 kDa. En gris las dos isoformas de H; (Marquart *et al.*, 1999. Maier *et al.*, 2002)

H es esencial en la regulación del proceso de señalización de N en *Drosophila* y por lo tanto importante para la diferenciación celular y el desarrollo de tejidos en la mosca (descrito adelante). A pesar de los esfuerzos, ningún ortólogo de H se ha encontrado en

vertebrados (Marquart *et al*, 1999). Un conocimiento detallado de la proteína H en invertebrados es requisito para identificar los homólogos u ortólogos funcionales en mamíferos. La no identificación de una proteína con funciones semejantes a H en animales superiores, explica por qué este gen sea ampliamente ignorado en el desarrollo embrionario de los mamíferos. Sin embargo, una vez que los detalles de la regulación negativa en vía de señalización de N se clarifiquen, se espera encontrar un homólogo u ortólogo funcional en animales superiores (Maier, 2006).

### ***1.5. Funcionamiento de la Vía de N***

Notch es sintetizado como un péptido inmaduro en el retículo endoplásmico de donde pasa a la red trans-Golgi para ser procesado proteolíticamente y glicosilado inicialmente por una enzima O-Fucosil Transferasa-1 en los residuos de EGF y posteriormente por Fringe (Fgn). Notch es procesado con un primer corte proteolítico (S1) por una Furina, generando el Dominio Notch Extra-Celular (NECD) y el Dominio Notch Intra-Celular (NICD), que interactúan entre ellos de manera no covalente, en una forma dependiente de  $Ca^{2+}$ , en cuya asociación participan dos cisteínas (Figura 3) de este modo se genera un péptido maduro, que finalmente es expuesto en la membrana celular (Haines e Irvine, 2003).

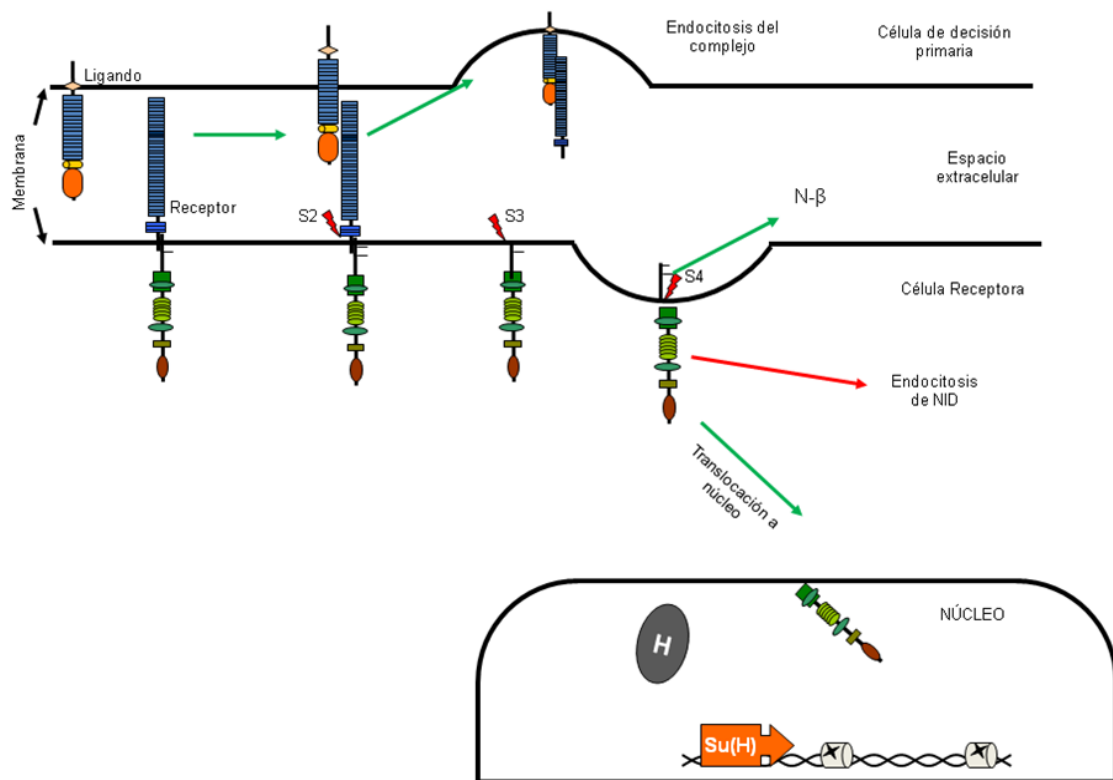
Una vez en la membrana, el receptor Notch se une a los ligandos Delta-Serrate-Lag2 (DSL) de la célula de decisión primaria. El patrón de glicosilación (descrito arriba) de los EGF sirve para discriminar entre ligandos, ya que la unión de Delta (Dl) es promovida por las modificaciones de Fng, pero inhibe la habilidad de Serrate (Ser) para unirse al receptor. En este momento tiene inicio la señal. El cambio conformacional que sufre Notch al interactuar con su ligando, expone una valina donde ocurre un segundo corte proteolítico (S2) liberando a NECD y el complejo ligando-NECD es endocitado por la célula de decisión primaria (Figura 5) (Le Borgne y Schweisguth, 2003; Le Borgne *et al*, 2005).

Se ha sugerido que NICD es ubiquitinado por las ligasas E3, Supresor de deltex (Su[dx]) y Deltex (Deltex), y atrapado en compartimentos intracelulares que contienen la actividad de  $\gamma$ -secretasa del complejo proteico Presenilina-nicastrina, una vez ahí ocurren

los cortes S3 y S4, donde NICD es llevado a núcleo o degradado y Notch- $\beta$  (N $\beta$ ) es liberado al espacio extracelular (Schweisguth, 2004; Fortini, 2001; Bray, 2006; Kopan, R. y Ilagan, 2010).

Una vez en núcleo NICD se une a CSL (CBF1, Supresor de Hairless, Lag1) y forma complejos de activación con acetilasas de histonas, Master mind y/o SKIP, entre otras proteínas, para activar e iniciar la transcripción de los genes blanco (Schweisguth, 2004; Fortini, 2001; Bray, 2006; Kopan, R. y Ilagan, 2010).

El proceso de activación, en *D.m.*, es modulado por Hairless, que forma complejos con Supresor de Hairless para reprimir la transcripción de los genes blanco de la vía, dentro de los cuales están *single minded*, *vestigial*, *pax2/sparkling*, el mismo *Supresor de Hairless* y principalmente los genes del locus *Enhancer of Split (E[spl])*, que codifican para las proteínas nucleares básicas de tipo hélice-lazo-hélice (bHLH), que funcionan, a su vez como factores de transcripción de genes como los del complejo de *Achaete-Scute*, que contienen genes proneurales. La expresión de dichos genes estimula a la célula receptora hacia un destino celular distinto al de la célula de decisión primaria (Artavanis-Tsakonas *et al.*, 1995; Kopan y Turner, 1996; Artavanis-Tsakonas *et al.*, 1999; Bray y Furriols, 2001; Brennan y Gardner, 2002; Lai, 2004).



**Figura 6.** Una vez que el ligando y el receptor se exponen en la membrana y entran en contacto, se inicia la transducción mediada por N. La interacción ligando-receptor producen un cambio conformacional en N, exponiendo S2 lo que permite a Kuz realizar un corte proteolítico en ese sitio y liberar NECD. El complejo ligando-receptor es endocitado por la célula de decisión primaria, mientras una  $\gamma$ -secretasa libera NICD que es endocitado y translocado a núcleo, o en su defecto atrapado en vesículas. En núcleo NICD y H regulan la expresión de genes blanco propios de la vía.

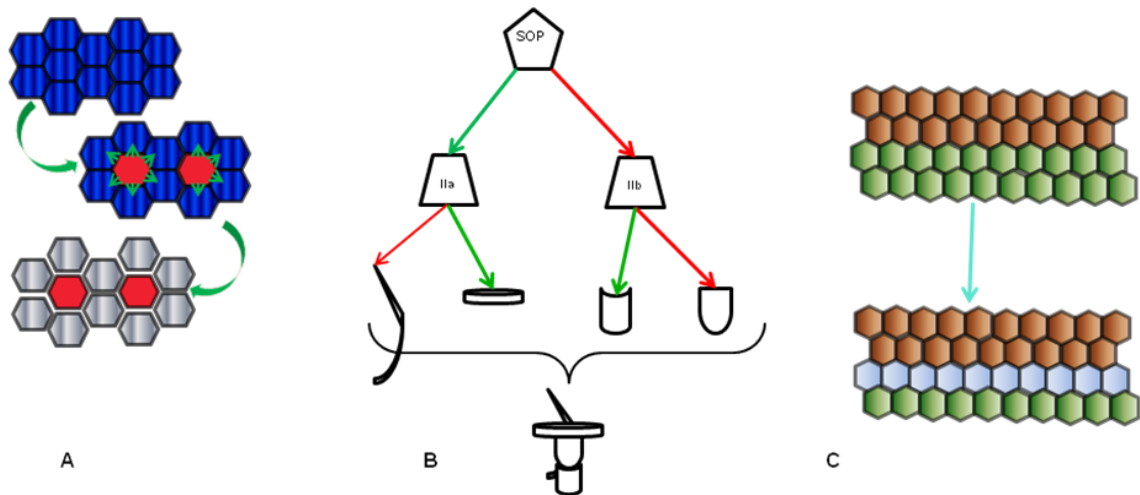
### 1.6. Tres mecanismos de diferenciación, múltiples destinos celulares

Una vez que la señal da inicio y los genes blanco son inhibidos o expresados, N utiliza tres mecanismos para dirigir el destino celular:

**Inhibición lateral:** En un grupo de células equipotenciales una célula con una localización específica, actúa como célula de decisión primaria y es la encargada de enviar la señal a las células vecinas para evitar que estas tomen su mismo destino celular (Figura 7). Un ejemplo de esta inhibición lo presentan las células ordenadas en líneas muy delgadas y localizadas en posiciones precisas a lo largo del ala en formación de *D.m.*, las cuales se diferencian en células formadoras de las venas de las alas. Las células que las rodean siguen proliferando para organizar la estructura del ala de la mosca (Greenwald, 1998; Bravo y Baizabal, 2005; Bray, 2006).

**Decisión asimétrica o decisión de linaje:** Este mecanismo está regulado al momento de la división celular ya que cada célula hija, después la división celular de una precursora tomará un destino celular diferente (Figura 7). El mecanismo se regula por la secreción asimétrica de factores como Numb, que es una E-ubiquitinligasa, que participa en el ingreso de NICD en la vía endocítica; de este modo, una de las células hijas dispondrá de NICD y en la otra será atrapado en vesículas para su degradación evitando de este modo la expresión de las proteínas bHLH. Por ejemplo, las células precursoras de órganos sensoriales (SOP) de *D.m.*, que conforman su sistema nervioso periférico, experimentan un primer proceso de división para dar origen a los tipos celulares IIa (NICD activo) y IIb (NICD atrapado en vesículas). A su vez, IIa da origen a la célula sensorial (NICD atrapado en vesículas) y soporte (NICD activo), mientras que IIb da origen al par celular neurona (NICD atrapado en vesículas) y cubierta (NICD activo) (Greenwald, 1998; Barolo *et al*, 2000; Bravo y Baizabal 2005; Brennan y Gardner, 2002; Bray, 2006).

**Señalización Inductiva:** Cuando dos poblaciones celulares diferentes subsisten la interacción célula-célula da como resultado la generación de una interfase que les permite distinguirse y separarse (Figura 7). Por ejemplo, en las alas de *D.m.* en desarrollo, las células del compartimiento dorsal estimulan al receptor Notch en las células adyacentes del compartimiento ventral mediante el ligando Ser. Esta interacción causa que las células ventrales sinteticen los ligandos Dl o Ser, que estimulan al receptor Notch localizado en las células dorsales. Como resultado, las células que existen entre la zona ventral y dorsal se diferencian y forman una interfase que funciona como un centro organizador director del crecimiento y posición correcta de las células estructurales de un ala madura funcional (Artavanis-Tsakonas, 1999; Baron, 2002; Bravo y Baizabal, 2005; Bray, 2006).

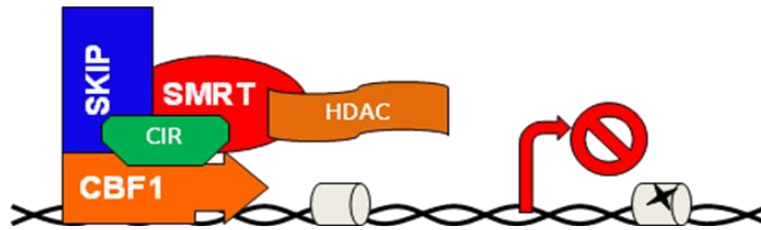


**Figura 7.** Mecanismos de diferenciación celular mediados por Notch. A) Inhibición lateral: en un grupo de células con estados de diferenciación equivalentes (hexágonos azules), dos de ellas (hexágonos rojos) activan al receptor Notch localizado en las células vecinas con lo que evitan que tomen el mismo destino celular y, por tanto, adquieren un destino celular diferente (hexágonos grises). B) División asimétrica o decisión de linaje: Notch se activa en las dos células hijas después de cada división celular; sin embargo, en una de estas células (líneas rojas), NIC es atrapado en vesículas, evitando que llegue al núcleo. Esto trae como consecuencia los destinos celulares diferentes. SOP, célula precursora de órganos sensoriales. (C) Señalización inductiva: un grupo de células (hexágonos café) induce a las células vecinas (hexágonos verdes) a diferenciarse para crear una interfase entre ambas (hexágonos blancos). (Modificado de Gerhart, 1999; Haines e Irvine, 2003).

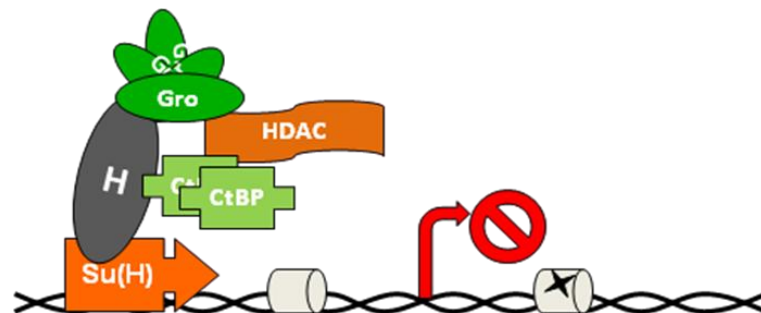
### 1.7. El modelo de “switch” ¿represión o activación? ¿Represión y activación?

Un punto crítico de la señalización es regulado por la acción de las proteínas de la familia CLS, inicialmente clasificadas como factores de represión en vertebrados, pero como activadores transcripcionales en invertebrados. Los estudios realizados para esclarecer el funcionamiento de estas proteínas revelan que los modelos de represión y activación, se presentan tanto en vertebrados como en invertebrados, y están relacionados con el reclutamiento de diferentes co-activadores y co-represores, respectivamente. Al parecer, este elegante sistema de regulación de genes está íntimamente ligado a la capacidad de los complejos de contener actividad de acetilación, reclutando enzimas Acetil-transferasas de Histonas (HAT), para la transcripción de genes; o la capacidad del complejo de remover grupos acetilo, reclutando enzimas Desacetilasas de Histonas (HDAC) para la represión de genes (Schweisguth y Posakony, 1992; Schweisguth y Posakony, 1994; Dou *et al*, 1994; Waltzer *et al*, 1995; Bray y Furriols, 2001; Lai, 2002; Nagel *et al*, 2005; Bray, 2006).

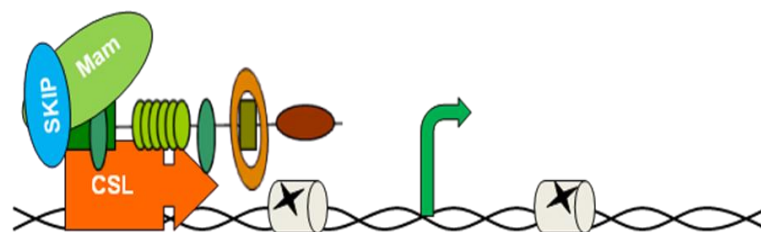
En las siguientes figuras (8, 9 y 10) se esquematizan los modelos de expresión de genes regulada por N derivados de los estudios de interacciones proteína-ADN y proteína-proteína de los diferentes factores de transcripción de la vía.



**Figura 8.** Modelo de represión en mamíferos: Una vez que CBF1 se une a su sitio consenso, YRTGDGAD, ésta tiene la capacidad de interaccionar con co-represores como SMRT (Silencing Mediator of Retinoid and Throid Receptor), CIR (CBF-Interacting Protein). SKIP (Ski-Interacting Protein, que parece participar también en los complejos de activación). La capacidad de adquirir actividad de HDAC se relaciona con los estadios transcripcionalmente inactivos de la cromatina.



**Figura 9.** Modelo de represión en *D.m.* En ausencia de señal Su(H) recluta una serie de proteínas co-represoras. H es el antagonista por excelencia de la vía N y sirve de puente para reclutar un tetrámero de Gro, que es un co-represor universal, y un dímero de CtBP, que funcionan, a su vez, como proteínas de enlace para reclutar HDAC y mantener, de esta manera, una estructura de cromatina transcripcionalmente inactiva.



**Figura 10.** Modelo de activación en *D.m.*: En presencia de señal CSL recluta proteínas para formar complejos de transcripción. CSL es secuestrado por NICD y a su vez, ésta recluta activadores como Mam y SKIP. Es importante resaltar que NICD tiene la capacidad de reclutar HAT (anillo naranja), que le ayudarán a mantener un estado abierto y transcripcionalmente activo de la cromatina.

Los complejos de represión en mamíferos están relacionados con el reclutamiento, por parte de CBF1, de CIR, que a su vez se une a SMRT que suplente la actividad de los co-represores Gro (que cuentan con homólogos en todas las especies) y CtBP de *D.m.* para interactuar con HDAC y mantener de este modo los estadios inactivos de la cromatina.

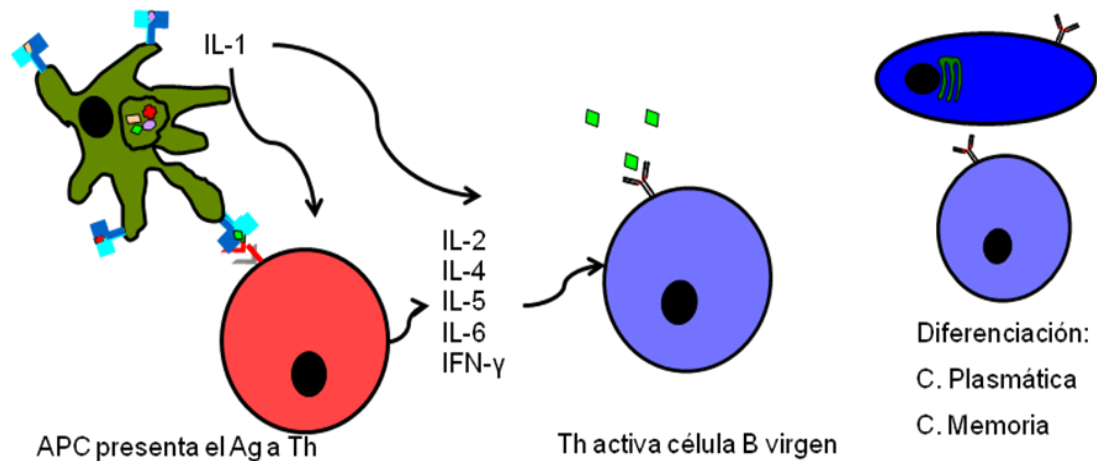


Aunque las evidencias son insuficientes, este modelo no excluye la existencia de un homólogo de H, pero podría explicar la presencia de otra proteína con funciones similares a H en mamíferos (Lai, 2002; Courey y Jia, 2009).

Otra evidencia a favor del modelo del “switch” es presentada por Nagel y col. (2005) que proponen la posibilidad de que H compita, dependiendo de la cantidad de proteína que se exprese en el momento de la señal, con NICD por secuestrar a Su(H) y formar los complejos necesarios para la regulación de genes.

### ***1.8. De los Anticuerpos***

Los anticuerpos (Ac) son moléculas evolutivamente diseñadas para reconocer y combatir una serie de patógenos a los cuales los organismos deben enfrentarse a lo largo de su vida. Durante la producción de los anticuerpos se ven implicados gran número de procesos, pero los elementos básicos los constituyen los linfocitos B, linfocitos T auxiliares (TH) y las células presentadoras de antígeno (APC). Los primeros presentan receptores para antígenos en su membrana (Igs de superficie para las células B y el receptor para las células T [TCR] para los linfocitos T) que pueden reconocer de manera específica virtualmente cualquier molécula biológica. Esta gran diversidad de receptores se genera durante el desarrollo de las células con la participación de una cantidad relativamente pequeña de genes que mediante recombinación genética, la asociación de los diferentes dominios, la diversidad de unión, la hipermutación somática y otros mecanismos se puede llegar a cifras en el orden de al menos  $10^7$  combinaciones posibles de anticuerpos diferentes (Gavilondo, 1995; Abbas y Litchman, 2003; Mayer, 2009).

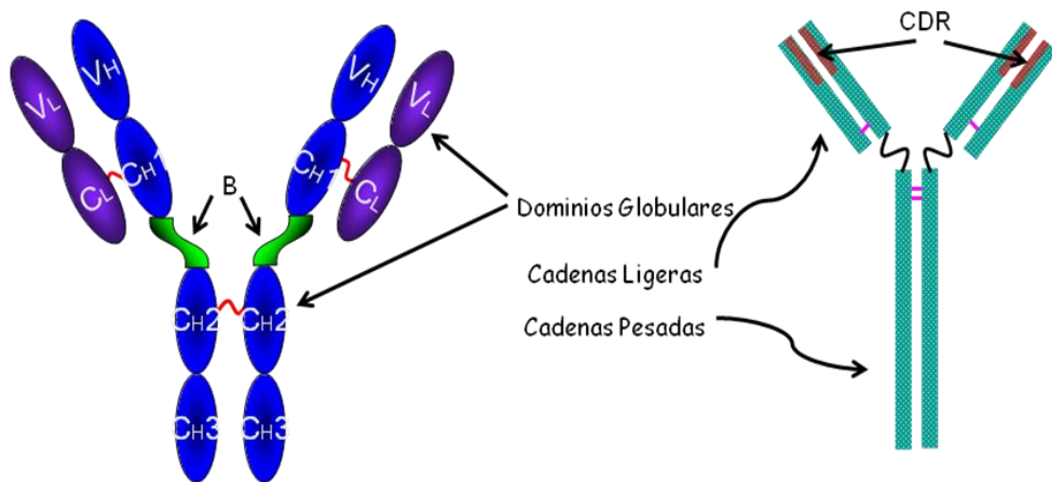


**Figura 11.** Cuando algún patógeno o molécula extraña (antígeno [Ag]) es detectada en el organismo (una proteína por ejemplo) las APC se encargan de procesarlo en péptidos y los presentan en la superficie celular asociados al complejo mayor de histocompatibilidad tipo II (MHC II). Las células TH reconocen específicamente la asociación péptido-MHC II mediante sus TCR, en interacción con la molécula CD4. Este reconocimiento específico activa a las TH que producen las citocinas necesarias para el proceso de proliferación y diferenciación de las células B. Las células B reconocen específicamente el Ag en solución mediante su receptor de superficie (Igs de superficie), y su activación y diferenciación posteriores lleva a la producción de células plasmáticas, que secretan Ac específicos o células de memoria (Gavilondo, 1995; Abbas y Litchman, 2003; Mayer, 2009).

**Estructura de las Igs:** los Ac son proteínas glicosiladas, constituidas de varios dominios de globulinas, de donde reciben el nombre de Inmunoglobulinas. Constan de dos cadenas pesadas (H) y dos ligeras (L) y cada una tiene regiones constantes (C) y variables (V), dentro de estas últimas hay secuencias de aa llamadas hipervariables o regiones determinantes de la complementariedad (CDR, por sus siglas en inglés) que son las encargadas (si bien no las únicas) de la unión específica al Ag (Gavilondo, 1995; Abbas y Litchman, 2003; Mayer, 2009).

Las cadenas H están constituidas por varias regiones constantes (CH), de 3-5 según el Isotipo, unidas entre sí por una región de bisagra que le confiere flexibilidad a la estructura y son estabilizadas por enlaces disulfuro. Estas regiones tienen funciones efectoras, como la unión a la membrana celular u otras moléculas de sistema inmune. También tienen una región variable (VH) con sus CDRs para la unión al Ag (Gavilondo, 1995; Abbas y Litchman, 2003; Mayer, 2009).

Las cadenas L están constituidas por una región CL y una VL, dentro de la cual se encuentran los CDRs y se unen a las cadenas H por enlaces disulfuro (Gavilondo, 1995; Abbas y Litchman, 2003; Mayer, 2009).



**Figura 12.** Representación gráfica de Igs. En la figura se representan las regiones globulares en las posiciones de cada dominio CH y VH para las cadenas Pesadas; CL y VL para las cadenas Ligeras. La Región de Bisagra (B, en verde en la el esquema de la izquierda) es una región rica en prolina y cisteínas, que le dan flexibilidad a la molécula. Las regiones Determinantes de la Complementariedad (CDR, en rojo en el esquema de la derecha) se encuentran la mayoría de los aa que interaccionan con el antígeno (Mayer, 2009).

**Uso y producción de Ac:** El uso de de estas moléculas se ha mostrado como una herramienta versátil en varios campos del quehacer del hombre, por ejemplo en la investigación, como en la medicina, a modo de terapia o diagnóstico entre otros (Leenaars *et al*, 1999; Karp, 1999; Polson *et al*, 1980).

La utilidad en los diferentes campos, se debe a su capacidad de reconocer y unirse a moléculas que le son específicas. Cada Ac reconoce un epítipo antigénico específico, posiblemente tan pequeño como 5-6 aa o entre una o dos glucosas u otras unidades de monosacáridos. Según Karp (1999) tienen la capacidad de distinguir una secuencia de aa con una diferencia de 2 residuos de aa o una modificación post-traduccional simple (Leenaars *et al*, 1999).

La obtención de Ac a nivel experimental e industrial ha hecho uso sobre todo de mamíferos de diferentes especies (ratón, rata, cobayo, cabra, caballo). En la década de los 80's Polson (1980) propone un modelo biológico diferente, introduciendo a las gallinas como alternativa, si bien ya Petterson y col. (1962) encontraron que las concentraciones de inmunoglobulinas en la yema del huevo eran iguales o mayores a las del suero (Wasif *et al*, 2006).

En mamíferos, las madres confieren inmunidad pasiva al feto durante la gestación. Este fenómeno se logra mediante el paso de cierto isotipo de Igs a través de la placenta (específicamente las IgG). En las gallinas esto ocurre mediante la presencia de un cierto tipo de Ab, convencionalmente conocidos como IgY, que tienen la función, de las IgG, en el huevo (Leenaars, *et al*, 1999; Patterson, *et al*, 1962; Polson, *et al*, 1980)

## 2. Justificación

Todos los metazoarios, desde insectos hasta el hombre, necesitan de la vía de Notch a fin de poder llevar a cabo con éxito la diferenciación celular durante la embriogénesis. H es una de las proteínas de la vía que no han logrado identificarse en animales superiores, pero es clara la intervención de una proteína con funciones similares en la embriogénesis de estos animales. Un conocimiento detallado de esta regulación ofrece específicamente puntos susceptibles de intervención con fines terapéuticos, puesto que actúa como un controlador maestro del destino celular, de la proliferación, diferenciación y muerte celular. Implica que su conocimiento ayudaría a comprender mejor algunos aspectos de la inmunología, la neurobiología y la biología tumoral (Bravo y Baizabal, 2005; Santos *et al*, 2006).

La proteína H conserva el dominio de unión a Su(H) en los diferentes homólogos conocidos en insectos y, en modelos como *Drosophila melanogaster*, este dominio es esencial para el correcto funcionamiento de la vía. Se sabe también que, dentro de los homólogos de la vía Notch conocidos en mamíferos, Su(H) tiene una contraparte bien identificada en mamíferos (CBF-1/RBPJ $\kappa$ ), por lo que se supone, podría haber una proteína con funciones similares a H, que se una al homólogo mamífero de Su(H) y cumpla sus funciones en la regulación de la vía en estas especies.

Por tanto es posible que, generando anticuerpos policlonales contra el dominio conservado de unión a Su(H), se obtengan resultados concretos en la identificación de un homólogo u ortólogo de la proteína H en embriones de animales superiores.

### **3. Hipótesis**

Los anticuerpos policlonales obtenidos de conejo y gallinas permitirían identificar un homólogo ortólogo o parálogo, de la proteína H en animales superiores mediante la detección del dominio de unión a Su(H) de la proteína H de *D. melanogaster*.

## 4. Objetivos

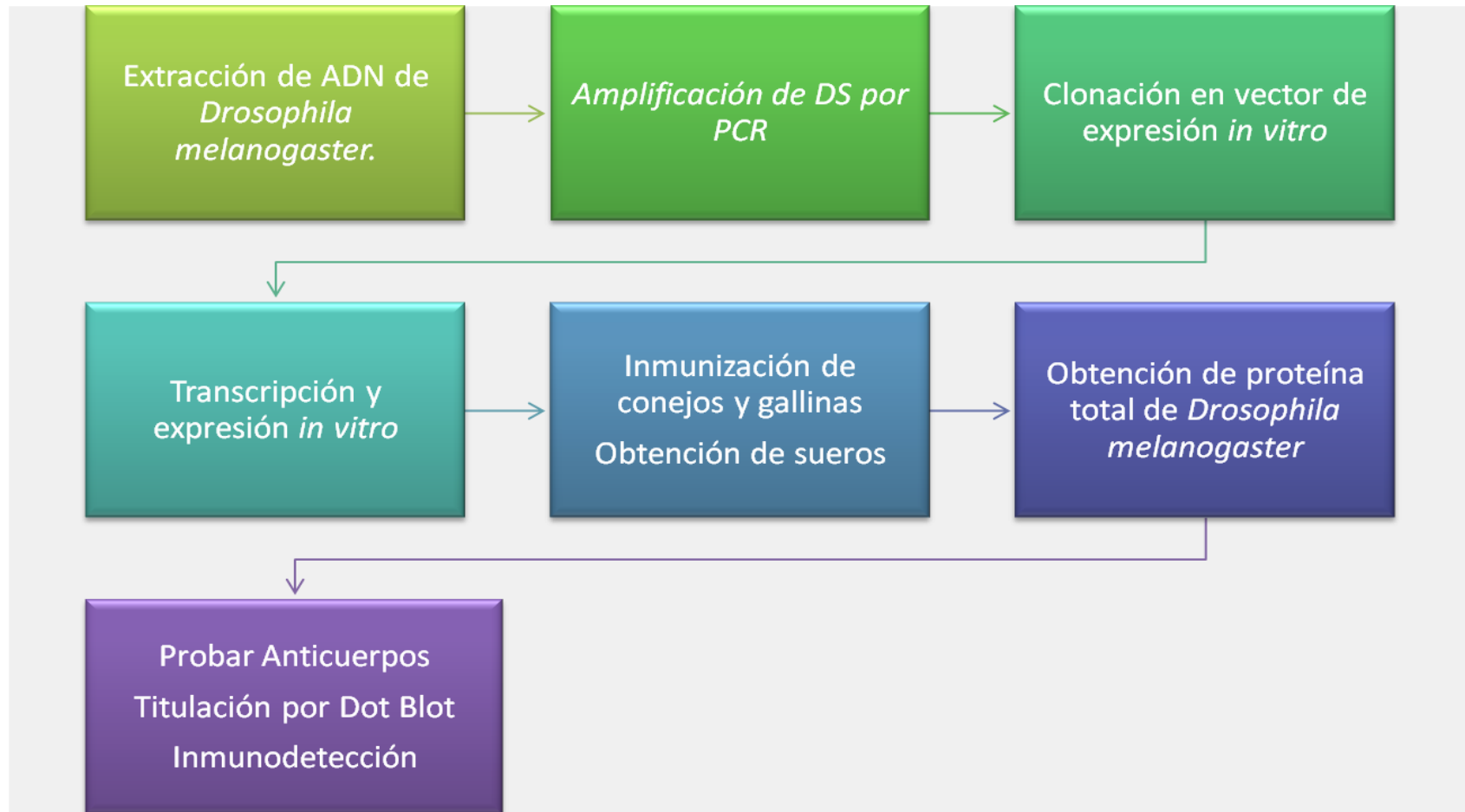
### 4.1. *Objetivo general:*

- Obtener anticuerpos policlonales contra el dominio de unión a Su(H) de *D. melanogaster*.

### 4.2. *Objetivos particulares:*

- Clonar y amplificar el dominio de unión a Su(H) (DS) de la proteína H de *D. melanogaster*.
- Transcribir y sintetizar *in vitro* el péptido para el que codifica el dominio de unión DS.
- Generar el anticuerpo policlonal contra el péptido sintetizado *in vitro* usando conejos y gallinas.
- Probar el anticuerpo en extracto total de proteína de embriones de *D. melanogaster*.

## 5. Material y Métodos



**Figura 11.** Estrategia experimental para generar anticuerpos policlonales contra el dominio de unión a Su(H) en conejos y gallinas.



## 6. Resultados y Discusión

### 6.1. Capítulo I

La comparación entre proteínas homologas en diferentes especies, es un trabajo que, a lo largo de tiempo, ha arrojado valiosos datos sobre la conservación y función de estas moléculas. Esta útil herramienta ha permitido, en este caso, identificar las regiones funcionales y mejor conservadas de la proteína H, para sintetizar un péptido *in vitro*, que nos permita generar anticuerpos policlonales contra un dominio de particular importancia en esta proteína de *D.m.* En esta sección se presentan los resultados y las técnicas que se emplearon para generar un polipéptido con potencial inmunogénico, que permitió obtener Ac contra la proteína H de *D.m.*

---

**Status: Escrito enviado a la “REVISTA MEXICANA DE CIENCIAS PECUARIAS”  
con fecha 3 de Agosto 2010 y dictamen aprobatorio con fecha 31 de Agosto 2010.**

Título:

DISEÑO Y CONSTRUCCIÓN DE UN PÉPTIDO CON POTENCIAL  
INMUNOGÉNICO A PARTIR DEL DOMINIO DE UNIÓN A SUPRESOR DE  
HAIRLESS DE LA PROTEÍNA HAIRLESS DE *Drosophila melanogaster*

Autores:

Humberto Contreras Cornejo [hccbert@hotmail.com](mailto:hccbert@hotmail.com); Víctor Manuel Baizabal Aguirre  
[baizabal@umich.mx](mailto:baizabal@umich.mx); Juan José Valdez Alarcón [jvaldez@umich.mx](mailto:jvaldez@umich.mx); Marco Cajero Juarez  
[cajeromarco@hotmail.com](mailto:cajeromarco@hotmail.com); Alejandro Bravo Patiño [abravo@umich.mx](mailto:abravo@umich.mx)

Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología (CMEB), Facultad de Medicina Veterinaria y  
Zootecnia, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Posta Veterinaria, Km. 9.5  
Carretera Morelia-Zinapécuaro. Tarímbaro, Mich. Teléfono y Fax: (443) 295-80-29.

A quien debe ser dirigida la correspondencia: Dr. Alejandro Bravo Patiño

Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología (CMEB) Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo Posta Veterinaria, Km. 9.5 Carretera Morelia-Zinapécuaro. Tarímbaro, Mich. Teléfono y Fax: (443) 295-80-29.

Apoyos para la realización del proyecto: CONACYT proyecto 25922 CB-2005-01-49402, PROMEP proyecto PTC-49.

**Resumen:** Las funciones de los diferentes tipos de células que constituyen un organismo multicelular, son reguladas mediante vías de transducción de señales, cuyo objetivo final es la regulación de genes blanco. La vía de señalización Notch participa principalmente en el desarrollo temprano y tardío del embrión, y en menor grado en el funcionamiento correcto del individuo. Hairless es una proteína involucrada en la vía de señalización Notch y su papel es modular negativamente la vía. A pesar de los esfuerzos realizados para detectar a Hairless en animales superiores, no se ha logrado identificar un homólogo de la misma. Su identificación es fundamental para entender mejor los procesos de regulación de la vía, del desarrollo embrionario y de otros procesos patológicos que involucran a Notch. Los homólogos de Hairless en insectos poseen al menos tres dominios altamente conservados, de los cuales el dominio de unión a Supresor de Hairless, una proteína propia de la vía, es el más conservado. Mediante análisis *in silico* y técnicas de biología molecular se identificó y delimitó un péptido con potencial inmunogénico del dominio de unión a Supresor de Hairless de la proteína Hairless de *Drosophila melanogaster*. Este péptido se usó como antígeno en gallinas, para generar anticuerpos policlonales. Los sueros se probaron contra extracto total de proteína de embriones de la mosca de la fruta.

**Palabras clave:** Desarrollo embrionario, Notch, Hairless, péptidos inmunogénicos.

En los últimos años, los avances biotecnológicos en la producción animal se han enfocado a la obtención de embriones *in vitro*, tanto para su transferencia a hembras receptoras, como para su manipulación genética. Sin embargo, la baja supervivencia de este tipo de embriones impacta negativamente su viabilidad para la transferencia, lo cual representa un problema para la implementación de estas técnicas. Las metodologías biotecnológicas en la producción animal implican el conocimiento de la composición y tipo de medios de cultivo empleados, la clonación por transferencia nuclear, el sexado de embriones, la producción de animales transgénicos y la determinación de la viabilidad misma de los embriones, entre otras.

Actualmente, y dado que la comunicación celular es la encargada de regular las complejas organizaciones espacio-temporales de los organismos vivientes, es esencial un conocimiento detallado a nivel molecular del desarrollo embrionario para ayudar a esclarecer los mecanismos reguladores de las vías de comunicación celular, lo que a su vez ayudaría a proponer estrategias más finas de manipulación de embriones *in vitro* (1), para impactar de manera favorable en la producción animal. La comunicación celular, una característica común de los organismos multicelulares complejos, es regulada mediante vías de transducción de señales, cuyo fin es la activación o inactivación de genes blanco.

Las vías de transducción de señales conocidas en animales pueden contarse por decenas, pero de manera particular en el desarrollo embrionario temprano y tardío de los metazoarios, ha sido posible identificar siete vías que aseguran el correcto destino celular: Wingless (Wnt), Factor de Crecimiento Transformante beta (TGF- $\beta$ ), Hedgehog (Hh), Receptor de Tirosina Kinasa (RTK), Receptor Nuclear, Jak/STAT y Notch (N). Cada vía es usada de manera reiterada durante el

crecimiento de los organismos de acuerdo al contexto o estadio de desarrollo (2, 3, 4, 5).

De estas siete vías, Notch tiene un papel muy importante durante el desarrollo embrionario de los metazoarios, ya que toma el control del desarrollo embrionario, especialmente durante la formación de somites. Dentro de los elementos de la vía N, la proteína Hairless (H) juega un papel importante como el mayor antagonista de la vía, definiendo los destinos celulares. Sin embargo, su actividad es prácticamente desconocida en mamíferos ya que no se ha logrado detectar ningún ortólogo o parólogo de esta proteína (6). En *Drosophila melanogaster* (*D.m.*), H posee varios dominios de unión bien conservados. En el extremo N-terminal se encuentra el dominio de unión DS que sirve de enlace a la proteína Supresor de Hairless (Su[H]), un factor de transcripción propio de la vía. En la región central de la proteína se encuentra el dominio DA, de enlace a Groucho (Gro) y, finalmente, en la región C-terminal se encuentra el dominio DC, al que se une la Proteína de Unión a C-terminal (CtBP, por sus siglas en inglés). Gro y CtBP son dos co-represores necesarios para regular la expresión de los genes blancos de N. En este contexto, H actúa como una molécula de unión entre Su(H) y los co-represores (2, 3, 5, 7, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16).

Estudios comparativos entre las proteínas H de *D. hidei* y *D.m.*, especies con 50 millones de años de divergencia, revelan una baja conservación de los dominios DS, DA y DC, donde el más conservado es DS ( $\approx 85\%$ ) y el menos conservado es el DA ( $\approx 33\%$ ) (16, 18).

La proteína H no solo muestra variación en sus dominios funcionales, sino también en su tamaño, lo cual se evidencia en el hecho de que un ortólogo de H recientemente estudiado en *Apis mellifera* (*H.A.m.*), muestra una proteína con un

peso molecular de 44.5 kDa que corresponde a un tercio del tamaño respecto a la proteína H de *D.m.* de 110 kDa, pero que contiene los dominios conservados DA, DS y DC, que son esenciales para su funcionamiento (18).

El conocimiento detallado de la proteína H en invertebrados es requisito para identificar los homólogos funcionales en mamíferos donde, a pesar de los esfuerzos, no se ha encontrado ningún homólogo de H en vertebrados (9, 18). La falta de identificación de una proteína con funciones semejantes a H, que no excluye la presencia de un parálogo u ortólogo, en animales superiores, explica por qué este gen sea ampliamente ignorado en el desarrollo embrionario de los mamíferos. Sin embargo, una vez que los detalles de la regulación negativa en la vía de señalización de N se clarifiquen, se espera identificar una proteína funcional con las características de H, en animales superiores (6), sobre todo si se sabe que todos los metazoarios, desde insectos hasta el hombre, necesitan de N para llevar a cabo con éxito la diferenciación celular durante la embriogénesis (18, 19).

Por tanto, es posible que generando péptidos con potencial inmunogénico para producir anticuerpos policlonales contra DS, partiendo de un análisis *in silico* para identificar las zonas más antigénicas de dicho dominio de H de *D.m.*, se avance en la identificación de una proteína funcional similar a H en embriones de animales superiores, con la finalidad de poder establecer estrategias biotecnológicas más finas a nivel molecular, que aseguren la supervivencia de embriones de mamíferos *in vitro* y se logre un mayor impacto en la aplicación de la biotecnología en la producción animal.

A fin de delimitar el dominio de interés de la proteína H y poder generar una construcción que nos permitiera obtener un péptido *in vitro*, para ser utilizado

como antígeno en gallinas y así poder generar anticuerpos policlonales contra este dominio, se utilizaron las siguientes técnicas:

Análisis de hidrofobicidad y antigenicidad del dominio DS de *D.m.*: Se partió de la comparación hecha por Maier y col. (2008) (18) de los homólogos de H en invertebrados, donde se reporta a DS como la región mejor conservada de la proteína. Con el programa CLC Main Workbench 5.6.1 (CLC bio, Aarhus, Dinamarca) se realizó un análisis de antigenicidad e hidrofobicidad de la secuencia reportada por Maier y col. (2008) para delimitar las zonas con mayor inmunogenicidad.

Obtención del fragmento DS y clonación en el vector pF1A T7 Flexi®: Se diseñaron dos oligonucleótidos par amplificar DS. El DSFLEXI01 (5'-gACCgCGATCgCC**ATg**TCCACCgCCTCAAATggCTT-3'), que inserta en el extremo 5' un codón de inicio (**ATg en negritas**), el sitio de restricción para *Sgf I* (subrayado) y cuatro bases aleatorias (en *cursivas*). El DSFLEXI02 (5'-CTTg**TTTAAAC**gTCTCCATTTTCCgCCTTgATTgC-3'), que inserta en el extremo 3' el sitio de restricción para *Pme I* (subrayado) que incluye el codón de valina (**negritas y subrayado**), un codón de paro (subrayado y cursivas) y cuatro bases aleatorias (*cursivas*). El fragmento DS se obtuvo mediante la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) a partir de ADN de *D.m.* silvestre y ADNc de la variante *rucuca* de *D.m.* del laboratorio de D. Maier y A. Preiss (Instituto de Genética de la Universidad de Hohenheim, Stuttgart, Alemania), y agregando a concentración final los siguientes reactivos: 150 ng de ADN genómico, amortiguador para PCR (Tris-HCl 200 mM, KCl 500 mM), 2 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM de dNTP's, 0.2 µM de cada oligonucleótido, 1.0 U de *Taq* DNA polimerasa (Gibco BRL®, Gaithersburg, MD, USA) y agua destilada desionizada

estéril para un volumen final a 50 µl. La reacción de PCR se llevó a cabo en un termociclador GeneAmp® PCR System 2700 (Applied Biosystems), empleando el siguiente programa: 1 ciclo a 94°C por 3 min., 2 ciclos a 94°C por 30 seg, 55°C por 45 seg, 72°C por 90 seg; 35 ciclos a 94°C por 20 seg., 61.3°C por 30 seg y 72°C por 90 seg; un ciclo a 72°C por 7 min y un ciclo sostenido a 4°C. El producto de PCR se clonó en el vector pF1A T7 Flexi® (siguiendo las instrucciones del fabricante) empleando el Kit de clonación Flexi® Vector Systems y las enzimas de restricción correspondientes (PROMEGA™, USA).

Transcripción y expresión del fragmento DS: Para la transcripción y expresión del fragmento DS se empleó el kit TnT® Coupled Reticulocyte Lysate System® (PROMEGA™, USA), se siguieron las indicaciones del fabricante, ya que permite realizar transcripción, procesamiento de intrones y traducción *in vitro* en una sola reacción. Después de las reacciones se verificó la presencia del péptido en un gel de acrilamida SDS-Page al 10%.

Uso y actividad inmunogénica del péptido generado como antígeno: El péptido generado *in vitro* se empleó para inmunizar gallinas de acuerdo al siguiente programa: el péptido de interés obtenido con el kit TnT® Coupled Reticulocyte Lysate System se identificó en un gel SDS-PAGE. La banda se cortó y homogenizó en 500 µl de solución salina isotónica. Se añadió un volumen de adyuvante Completo (en la primera inmunización) o Incompleto (en las siguientes inmunizaciones) de Freund® (Sigma™, USA), se llevó a un volumen de 1.5 ml con solución salina isotónica y se inyectó vía intramuscular a los largo de la quilla en gallinas en etapa productiva. El procedimiento se repitió una vez por semana durante 4 semanas. Se obtuvieron 2 ml de sangre antes de cada inmunización y una semana después de la última, para determinar el título de anticuerpos

generados. Para separar el suero, de las gallinas se dejó formar el coágulo y se incubó a 4°C toda la noche, después de la incubación se centrifugó a 10'000 rpm durante 10 min, se recuperó el sobrenadante en tubos eppendorf de 1.5 ml estériles y se congeló a -20°C.

Obtención de proteína de embriones de *D. melanogaster*: Las moscas se colocaron en placas con medio de manzana (se agregaron 12 gr. de Agar en 375 ml de agua y se esterilizó; se agregaron 125 ml de jugo de manzana y 12.5 gr. de azúcar, se calentó a 60 °C; se mezcló el agar y el jugo de manzana, se mantuvieron a 60 °C; se agregaron 5 ml de Nipagina al 15% en etanol absoluto, se mezcló y se vertió en cajas petri [60x15 mm. SyM Laboratorios, México]) a fin que ovipositen. Los embriones se colectaron cada 30 minutos. El corion de los embriones se eliminó lavando, sobre la placa de medio de manzana, con una solución de cloro al 50% durante 30 segundos. Los embriones se pasaron a una malla fina para eliminar la solución de cloro y se enjuagaron con solución de lavado (NaCl al 0.7%, Tritón x100 al 0.02%). Se colectaron 100 embriones y se colocaron en un tubo eppendorf de 1.5 ml estéril. Se adicionaron 100 µl de amortiguador de homogenizado (10 mM de HEPES pH 7.6, 5 mM de EGTA, 5 mM de EDTA y 1 a 2 µl de PMSF a una concentración final de 0.5 mM). Se incubaron a 90-95°C durante 5 min. Se centrifugaron durante 30 min a 14,000 rpm a 4°C. El sobrenadante se recuperó en un tubo eppendorf de 1.5 ml esteril y se almacenó a -20°C.

Titulación del suero: Para la titulación del suero se utilizó la técnica de Dot Blot de acuerdo al siguiente protocolo: Se cortaron cuadros de membrana de nitrocelulosa (MNC) de 2 cm<sup>2</sup>, se impregnaron en TBS (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7.5) durante 15 min. y se dejaron secar los cuadros. Se agregó 1µg de



antígeno (extracto total de proteína de embriones de *D.m.*) sobre la MNC y se dejó secar de 5-10 min. Los cuadros de MNC se transfirieron a cajas de cultivo celular de seis pozos (Corning Incorporated, NY, USA) y se agregó 1 ml de solución bloqueadora al 5% (Blotting Grade Blocker Non-Fat Dry Milk®, BIORAD™ en TTBS [TBS más 0.1% de Tween 20®, BIORAD™]) por 45 min en agitación constante (todos los procedimientos se realizan en agitación constante a menos que se indique lo contrario); el bloqueo se repitió durante 45 min. La MNC se lavó con agua destilada estéril durante 10 min, después se lavó con TBS durante 10 min y por último se lavó con TTBS durante 10 min. El suero obtenido de las gallinas (anticuerpo primario) se añadió, por separado, en diluciones de 1:200, 1:500, 1:1000, 1:2000, 1:3000 y 1:5000 en un volumen de 1 ml en solución bloqueadora al 5% y se dejó en agitación a 4°C por lo menos 12 hrs. Después de la incubación, la membrana se dejó con la dilución del suero a temperatura ambiente por aproximadamente 1 h, sin agitación. La MNC se lavó con agua destilada estéril durante 10 min, después se lavó con TBS durante 10 min y por último se lavó con TTBS durante 10 min. Se agregó el anticuerpo secundario, cabra anti-IgY de pollo, conjugado a peroxidasa de rábano (Santa Cruz, Inc. CA. USA.) en solución bloqueadora al 5%, a una dilución de 1:5000 y se dejó en agitación 1 hr; se eliminó la solución. Se agregó el reactivo de Luminol (Western Blotting Luminol Reagent®, Santa Cruz Biotechnology, Inc. CA. USA.), se incubó 1 min. La MNC se dejó en contacto con placas radiográficas (ORTHO T2, JUAMA, México) a tiempos de exposición variables de 3 a 10 min y se reveló.

Inmunodetección de H en extracto total de embriones de *D.m.* mediante Western Blot: La separación de las proteínas del extracto de embriones de *D.m.* (15-20 µg) se realizó mediante electroforesis en geles de poliacrilamida al 10% y se

transfirieron a una MNC mediante electroforesis a 250 mA durante 1.5 hrs con agitación constante de amortiguador de transferencia. La MNC colocó en solución bloqueadora al 5% durante 45 min, con un cambio de esta solución y bloqueo durante 45 min adicionales. La MNC se lavó tres veces (10 min/lavado) con agua destilada desionizada esteril, TBS y TTBS respectivamente. El suero obtenido de la gallina GN (anticuerpo primario) se añadió a una dilución de 1:3000 y se dejó incubando a 4°C por lo menos 12 hrs. Posteriormente, la membrana se dejó en reposo a temperatura ambiente durante 1 hr y se lavó tres veces (10 min/lavado) con agua destilada desionizada esteril, TBS y TTBS respectivamente. Se agregó el anticuerpo secundario, cabra anti-IgY de pollo, conjugado a peroxidasa de rábano (Santa Cruz, Inc. CA. USA.) en solución bloqueadora al 5%, a un título de 1:5000 y se dejó en agitación 1 hr; se eliminó la solución. Se agregó el reactivo de Luminol (Western Blotting Luminol Reagent®, Santa Cruz Biotechnology, Inc. CA. USA.), se incubó 1 min. La MNC se dejó en contacto con placas radiográficas (ORTHO T2, JUAMA, México) a tiempos de exposición variables de 3 a 10 min y se reveló.

Con la estrategia descrita arriba se obtuvieron los siguientes resultados:

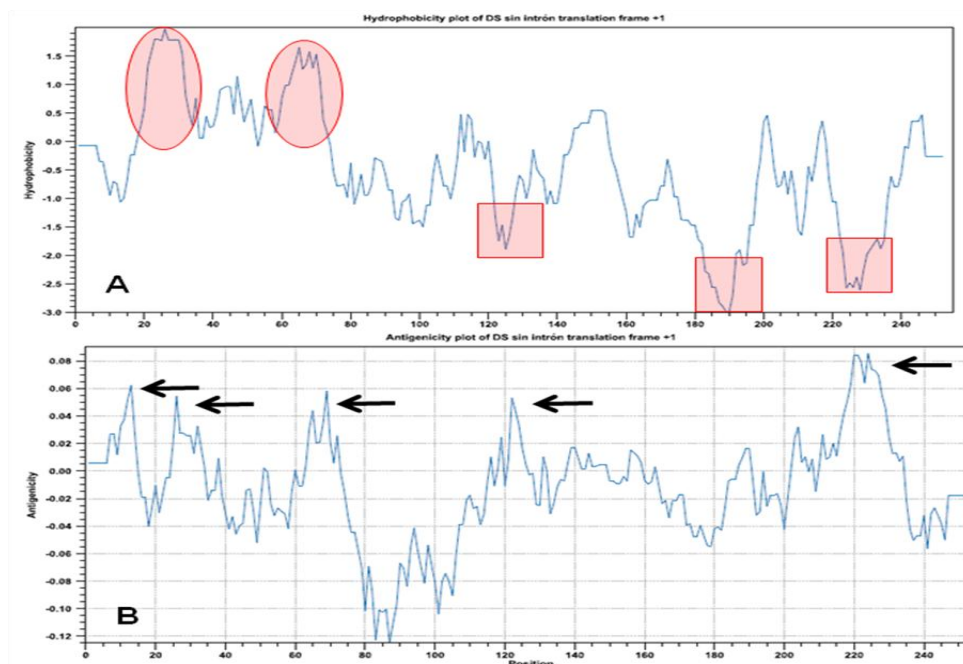
Análisis *in silico* de DS: Su(H) es una proteína que forma parte del núcleo principal de los componentes de la vía de señalización N en *D.m.* y cuenta con un homólogo en mamíferos, identificado como CBF1 (RBPJk), lo que sugiere la existencia de una proteína con una función similar a H, necesaria para formar complejos de represión transcripcional en mamíferos, ya que en drosófilidos se requiere de H para reclutar proteínas necesarias para este tipo de complejos. Recientemente, Kopan y col. (2009) (21), destacan que la proteína SHARP/MINT/SPEN forma parte de los complejos de represión reportados en

mamíferos y por lo tanto antagonizan la activación de la señalización de Notch/RBP-Jk, quedando abierta la posibilidad que esta proteína sea considerada como parólogo de H en estas especies. Sin embargo, no ha habido estudios concluyentes al respecto, ya que dichas proteínas no han sido caracterizadas funcionalmente.

Al realizar un análisis de los homólogos en H reportados en invertebrado, Maier y col. (2008) observaron que la región mejor conservada de la proteína era precisamente el dominio DS. Tomando en cuenta lo anterior, y utilizando el programa CLC Main Workbench 5.6.1, en el presente trabajo se realizó un análisis de antigenicidad e hidrofobicidad de DS, con el algoritmo de Kyte-Doolittle (20), con la finalidad de determinar si además de ser el dominio mejor conservado de H, el péptido que pudiera ser generado a partir de su secuencia de ADN tenía la capacidad antigénica suficiente como para ser empleado en la generación de anticuerpos policlonales capaces de reconocerlo formando parte de una proteína funcional completa.

Como resultado de este análisis, en la figura 1 se observa que existen varias zonas hidrofóbicas, siendo las más representativas las localizadas entre los aminoácidos (aa) 25-35 y 65-75 (Panel A). Así mismo, se muestran las zonas hidrofílicas más representativas, localizadas entre los aa 185-195, 120-125 y 222-230 (Panel A). Al comparar los resultados anteriores con el análisis de antigenicidad donde se observa que los picos hidrofóbicos e hidrofílicos corresponden, en general, con las zonas más inmunogénicas de DS las cuales se localizan entre los aa 10-15, 25-30, 63-72, 120-125 y 220-230 (Figura 1, Panel B). Estos resultados en conjunto, sugieren que el péptido que se genere a partir del fragmento de gen *H* que contenga codificado el dominio DS, tiene amplias

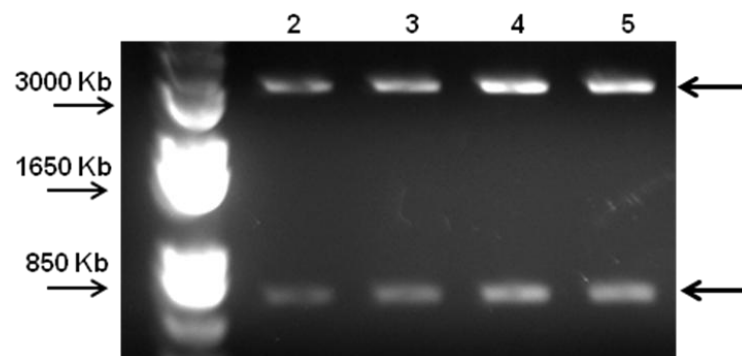
posibilidades de ser utilizado para generar anticuerpos policlonales dirigidos contra el dominio más conservado de la proteína H.



**Figura 1:** Perfiles de Hidrofobicidad y antigenicidad del dominio DS de la proteína H, generados con el algoritmo de Kyte-Doolittle (CLC Main Workbench 5.6.1). Panel A, perfil hidrofóbico: en círculos se delimitan las zonas hidrofóbicas representativas, en recuadros se delimitan las zonas hidrofílicas representativas. Panel B, Perfil de antigenicidad: las flechas indican las zonas con mayor capacidad antigenicidad del dominio DS.

Obtención del dominio DS y generación de la construcción pF1A: Para amplificar la región correspondiente al dominio DS del gen *H*, se utilizó ADN genómico proveniente de *D. m. rucuca* y ADN genómico de *D.m. silvestre* (como control), para llevar a cabo la reacción de PCR. Como resultado se obtuvo la amplificación de dos bandas, una de aproximadamente 758 pb, proveniente de *D.m rucuca* y otra de aproximadamente 1416 pb proveniente de *D.m.* Las bandas de ADN obtenidas corresponden a los tamaños esperados en cada caso, y la diferencia en el tamaño de los mismos se debe al hecho de que el gen de *H* proveniente de

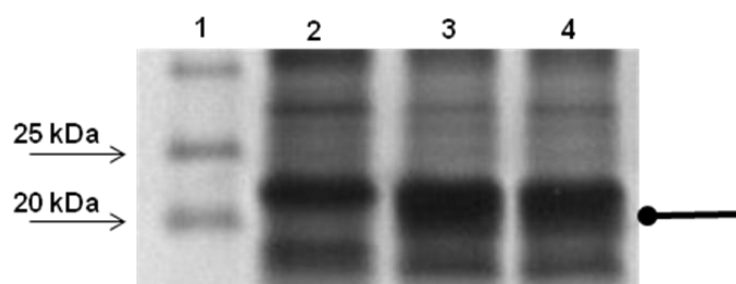
*D.m rucuca* no contiene intrones. El producto de PCR, obtenido de *D.m. rucuca*, se ligó en el vector pF1A T7 Flexi® siguiendo las instrucciones del Kit, y se obtuvo la construcción pF1A-DS, que se clonó en la cepa de *Escherichia coli* TOP10®. Para corroborar la presencia del fragmento en el vector se realizó una digestión con la enzima *Sph* I que tiene un sitio de restricción en la secuencia del vector y otra en el inserto DS. En la figura 2 se muestran los fragmentos obtenidos después de la restricción; los cortes liberaron un fragmento de aproximadamente 800 pb, que corresponde al inserto más una pequeña parte del plásmido, y un fragmento de aproximadamente 3100 pb que corresponde al resto del vector. En ausencia del inserto el plásmido solo se hubiera linearizado mostrando una sola banda de aproximadamente 3100 pb. Cabe mencionar que también se realizó la secuenciación del inserto en este vector y se confirmó que se trataba de la secuencia correspondiente al dominio DS (datos no mostrados).



**Figura 2.** Muestra los fragmentos esperados de aproximadamente 3100 y 800 pb. Carril 1 Marcador de peso molecular 1 kb plus. Carriles 2-5 digestiones, con *Sph* I, de los plásmidos obtenidos en eventos de clonación independientes.

Transcripción y traducción de DS: Para la transcripción y expresión de DS se empleó el kit TnT® Coupled Reticulocyte Lysate System®, según las instrucciones

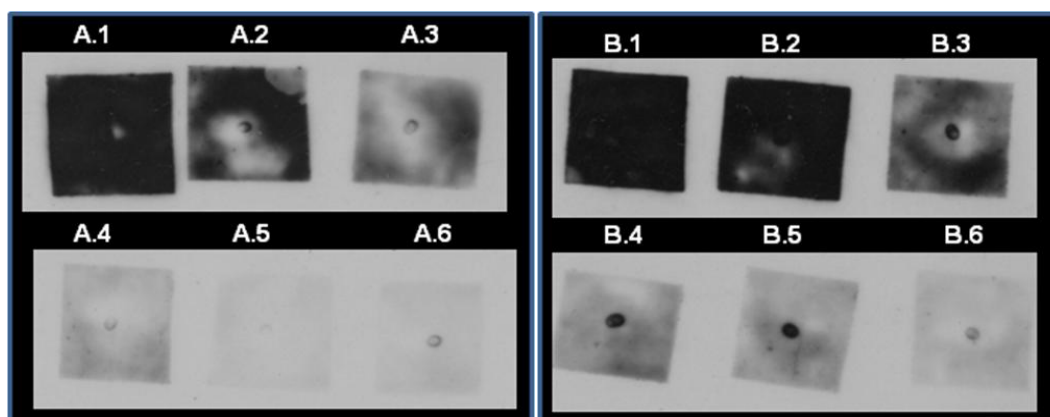
del fabricante. Los productos obtenidos de las reacciones se analizaron en geles de poliacrilamida al 10%. En la figura 3 se observa en los carriles 3 y 4 la presencia de un péptido de aproximadamente 21 kDa, que corresponde al peso esperado para el péptido DS. Además, dicha banda no aparece en el carril 2, que corresponde al control negativo de expresión. Por lo anterior suponemos que el péptido DS se expresa a partir del plásmido pF1A-DS.



**Figura 3:** Expresión *in vitro* del péptido DS. Carril 1 marcador de peso molecular; carril 2, control negativo; carriles 3 y 4 reacción de TNT con el plásmido pF1A-DS. La flecha con punta redonda indica la banda del peso molecular aproximado (21 kDa) esperado para el péptido DS.

Uso y actividad inmunogénica del fragmento DS, inmunización, titulación mediante Dot Blot: Se inmunizó una gallina (GN) en producción con los procedimientos antes descritos. Como ya se mencionó se obtuvieron los sueros correspondientes después de cada inmunización y estos se titularon mediante la técnica de Dot Blot, usando como antígeno 1  $\mu\text{g}$  de extracto de proteína total de embriones de *D. m*. En la figura 4 se muestran los resultados obtenidos con suero proveniente de la gallina GN; el suero preinmune, de esta gallina, muestra una señal débil a los diferentes títulos (Panel A), sin embargo, esta señal se intensifica con las inmunizaciones, como se puede apreciar en la señal detectada con los sueros obtenidos a la tercera semana del inmunización (Panel B, título 1:5000) lo

que indica que el péptido DS obtenido *in vitro*, promueven respuesta ante el antígeno.

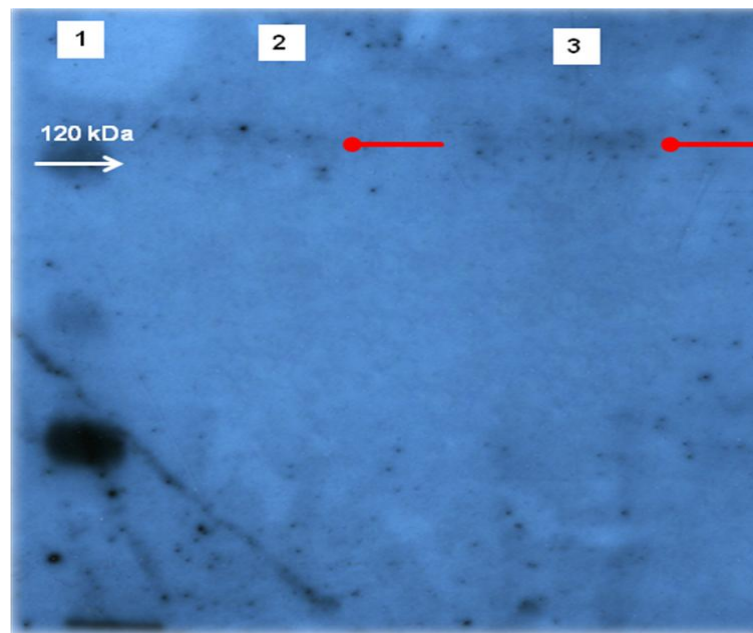


**Figura 4:** Titulación de los sueros de la gallina GN inmunizada con el péptido DS obtenido *in vitro*. Panel A corresponde al suero preinmune. Panel B corresponde al suero obtenido a la tercera semana del programa de inmunización. Los números indican los títulos de los sueros como sigue: para 1, título de 1:200; para 2, título de 1:500, para 3, título de 1:1000; para 4, título de 1:2000, para 5, título de 1:3000; para 6, título de 1:5000.

Immunodetección de la proteína H de *D.m*: Para probar que efectivamente los anticuerpos detectan la proteína H en su dominio DS, contra la cual fueron dirigidos, el suero inmune de la gallina GN se utilizó en un Western Blot, con la técnica antes descrita. H es una proteína producida en cantidades ínfimas y su pico más alto de expresión es durante la organogénesis. Si bien no se tienen reportes de la cuantificación de esta proteína, los intentos que se han realizado para detectarla en la mosca de la fruta mediante Western Blot se han encontrado con la limitante de una baja intensidad de la señal en extractos de proteína total de embriones y larvas de esta especie (15, comunicación personal).

En la figura 5 se muestra la inmunodetección de H con los anticuerpos generados en la gallina GN. Si bien la señal es muy tenue, los anticuerpos revelan una banda con la

migración relativa esperada a la proteína contra la cual se dirigieron. Maier y col. en 2002 (15), dirigen Ac contra dos regiones de H, usando como antígeno proteínas recombinantes; de los dos sueros obtenidos sólo uno logra reconocer H en extractos de proteína de embriones silvestres. El otro suero identifica sólo las proteínas obtenidas de cultivos celulares donde H es sobrexpresado y regulado mediante promotores de choque térmico. La señal obtenida en los Western Blot, del trabajo antes mencionado, donde se usa antígeno de embriones silvestres está bien definida para las dos isoformas de H. En este trabajo los anticuerpos se obtuvieron inmunizando animales con el dominio DS de H de *D.m.* y los extractos de proteína usados para los Dot Blot y Western Blot se obtuvieron de embriones silvestres con niveles normales de expresión de proteína.



**Figura 5:** Western Blot. Suero de la gallina GN a un título de 1:3000. En el carril 1 marcador. Carril 2 extracto de proteína total de embriones de mosca de la fruta. Carril 3 extracto de proteína total de lavas de mosca de la fruta. Los Ac contra DS reconocen una banda a la altura de 120 kDa (flecha con punta redonda) que corresponde a una de las isoformas de H en mosca de la fruta. Cabe resaltar que los sueros se unen sólo a una banda del extracto, lo que indica que son específicos y no cruzan con ninguna otra proteína de los extractos de *D.m.*



Si bien, y a pesar de que la señal es muy débil, los anticuerpos obtenidos en este trabajo logran identificar una sola proteína de aproximadamente 120 kDa, la cual presumimos se trata de la isoforma más pequeña de de H, entre las múltiples bandas de proteínas que se visualizan mediante el análisis SDS-Page realizado al extracto proteico total obtenido de embriones de *D. m.*, demostramos que utilizando las comparaciones entre proteínas homólogas e instrumentos informáticos se pueden identificar y generar péptidos, con alto potencial inmunogénico, para utilizarlos como antígenos en la generación de anticuerpos policlonales, que son utilizados en la investigación por su alta afinidad para reconocer moléculas, aún con pocas diferencias entre ellas.

Estos anticuerpos policlonales nos dan la capacidad de reconocer un dominio altamente conservado entre los homólogos conocidos de H y considerando que DS sirve como dominio de unión a una proteína esencial para el funcionamiento de N en invertebrados, proteína que cuenta con un homólogo en metazoarios, se espera que los anticuerpos generados en el presente trabajo puedan reconocer también una proteína con funciones similares a H en células de animales superiores, quedando abierta la posibilidad de que se confirme que las proteínas SHARP/MINT/SPEN sean reconocidas por los anticuerpos aquí reportados.

Un conocimiento detallado de los elementos de regulación, tanto positiva como negativa, de las vías de transducción de señales, es indispensable para implementar estrategias que mejoren la manipulación y supervivencia de embriones de mamíferos *in vitro* y se logre una mayor penetración de las técnicas moleculares en la producción pecuaria, donde es indispensable incrementar el porcentaje de partos exitosos a partir de embriones generados ya sea por

fertilización in vitro, partenogénéticos, y/o manipulados genéticamente implantados en madres sustitutas, con la finalidad de producir animales de interés humano que aporten mayor calidad nutricional o sirvan de bioreactores para producir biomoléculas de interés farmacéutico y/o industrial.

### **Agradecimientos**

A CONACYT por el financiamiento otorgado para la realización del presente trabajo mediante el proyecto 25922 CB-2005-01-49402 y por la beca de Maestría otorgada a H. Contreras-Cornejo; A PROMEP por el financiamiento otorgado mediante el proyecto PTC-49.

### **Bibliografía**

1. Bosch P, Blanch MS, Ferrero S, Díaz H, Piccato F, Bosh RA. Desarrollo de Embriones Caprinos *In Vitro*: Efecto del Co-Cultivo con Células Epiteliales de Oviducto. Rev Cient (Maracaibo). 2006. 16(3): 273-281
2. Bravo, P. A. Baizabal. A. V. M. La vía de señalización Notch y el desarrollo embrionario animal. 2005. REB 24(3,4):87-96.
3. Artavanis-Tsakonas S, Rand MD, Lake RJ. Notch Signaling: Cell Fate Control and Signal Integration. Development Science 1999. 284:770-776.
4. Gerhart J. Signaling pathways in development. Teratology 1999. 60:226-239.
5. Mumm JS, Kopan R. Notch signaling: from the outside. Dev Biol 2000. 228:151-165.
6. Maier D. Hairless: the ignored antagonist of the Notch signalling pathway. Hereditas. 2006. 143: 212-221.
7. Paz-Gómez, D. Baizabal-Aguirre, V. M. Valdez-Alarcón, J. J. Cajero-Juárez, M. Nagel, A. C. Preiss, A. Maier, D. Bravo-Patiño, A. Structural analysis of point mutations in the *Hairless* gen and their association with the activity of the Hairless protein. 2008. Int. Jour. Biol. Macromolecules. 43:426-432.

8. Barolo S, Stone T, Bang AG, Posakony JW. Default repression and Notch signaling Hairless acts as an adaptor to recruit the corepressors Groucho and dCtBP to Suppressor of Hairless. *Genes Develop* 2002. 16:1964-1976.
9. Marquart J, Alexief-Damianof C, Preiss A, Maier D. Rapid divergence in the course of *Drosophila* evolution reveals structural important domains of the Notch antagonist Hairless. *Dev Genes Evol* 1999. 209:155-164.
10. Brody T. 2002. The Interactive Fly. Hairless. Available from: <http://www.sdbonline.org/fly/hjmuller/hairles1.htm>. Accesed Nov. 10, 2007.
11. Baron M. An overview of the Notch signaling pathway. *Sem Cell Devel Biol*. 2003. 14:113-119.
12. Schweisguth F. Regulation of Notch signaling Activity. *Current Biology* 2004. 14;R129–R138
13. Nagel AC, Krejci A, Tenin G, Bravo-Patiño A, Bray S, Maier D, Preiss A. Hairless-Mediated repression of Notch target genes requires the combined activity of Groucho and CtBP corepressors. *Molec and Cell Biol* 2005. 25(23):10433-10441.
14. Bray S. J. Notch signalling: a simple pathway becomes complex. *Nature* 2006. 7:678-689.
15. Maier D, Anja CN, Preiss A. Two isoforms of the Notch antagonist Hairless produced by differential translation initiation. *Proc Natl Acad Sci*. 2002. 24:15480-15485.
16. Maier D, Stumm G, Kuhn K, Preiss A. Hairless, a *Drosophila* gene involved in neural development, encodes a novel, serine rich protein. *Mech Develop*. 1992. 38:143-156.
17. Maier D, Marquart J, Thompson-Fontaine A, Beck I, Wurmbach E, Preiss A. In vivo structure-function analysis of *Drosophila* Hairless. *Mech Develop* 1997. 67:97-106.
18. Maier D, Chen A.X, Preiss A, Ketelhut M. The tiny Hairless protein from *Apis mellifera*: a potent antagonist of Notch signaling in *Drosophila melanogaster*. *BMC Evolutionary Biology* 2008, 8:175. This article is available form: <http://www.biomedcentral.com/1471-2148/8/175>
19. Santos L, León-Galván MF, Marino-Marmolejo. Vía de señalización Notch y nuevas estrategias para el tratamiento de cáncer. *Salud Publica Mex* 2006. 48:155-165.
20. Kyte, J. and Doolittle, R. (1982). A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J. Mol. Biol.* 157: 105-132
21. Kopan R. y Ilagan M. X. (2009) The Canonical Notch Signaling Pathway: Unfolding the Activation Mechanism. *Cell.*; 137(2): 216–233

## 6.2. Capítulo II

Los resultados que determinan las conclusiones de este trabajo se presentaron en el primer capítulo de resultados. Al inicio de las inmunizaciones se decidió trabajar con al menos dos animales de cada especie, para descartar la posibilidad de perder el material biológico por causas ajenas al experimento, por este motivo se destina una sección para presentar los experimentos que se obtuvieron de los otros animales inmunizados y se explica el por qué no fueron presentados como resultados decisivos en el capítulo anterior

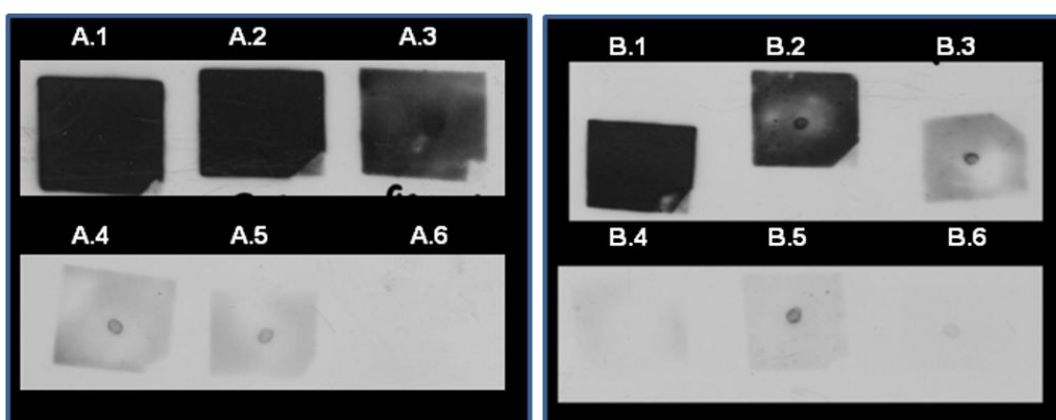
---

### **Material y métodos:**

Como descritos en la sección anterior.

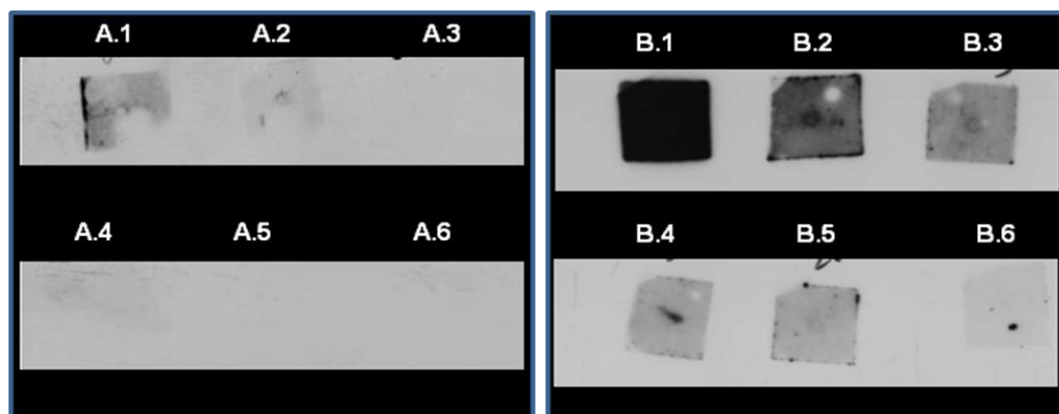
### **Resultados y discusión:**

El conejo C02 se inmunizó con el protocolo antes mencionado. Como se puede apreciar en la Figura 1 los sueros preinmunes (panel A) presentan una señal intensa frente al extracto total de embriones de *D.m.*, mientras que en los sueros inmunes (panel B) la señal disminuye notablemente, si bien se decidió descartar estos sueros para los resultados decisivos del trabajo, el conejo se siguió inmunizando, ya que se han logrado generar Ac contra H en conejos según se reportó por Maier y col. (2002) y, en pruebas posteriores, se encuentre una señal mas favorable para emplear los sueros en un Western Blot.



**Figura 1:** Titulación de los sueros del conejo C02 inmunizado con el péptido DS obtenido *in vitro*. Panel **A** corresponde al suero preinmune. Panel **B** corresponde al suero obtenido a la tercera semana del programa de inmunización. Los números indican los títulos de los sueros como sigue: para 1, título de 1:200; para 2, título de 1:500, para 3, título de 1:1000; para 4, título de 1:2000, para 5, título de 1:3000; para 6, título de 1:5000.

Del conejo C01 se obtuvieron la misma cantidad de sueros, pero el animal murió durante el experimento. En la figura 3 se presentan los resultados de la titulación con Dot Blot y apreciamos que la señal del suero preinmune (panel A) respecto al suero inmune (panel B) tiene un ligero aumento en la señal para el título de 1:1000 (B.3). Lo que podría indicar, para el caso de los conejos, una respuesta inmune más lenta al péptido usado como antígeno con respecto a las gallinas.



**Figura 3:** Titulación de los sueros del conejo C01 inmunizado con el péptido DS obtenido *in vitro*. Panel **A** corresponde al suero preinmune. Panel **B** corresponde al suero obtenido a la tercera semana del programa de inmunización. Los números indican los títulos de los sueros como sigue: para 1, título de 1:200; para 2, título de 1:500, para 3, título de 1:1000; para 4, título de 1:2000, para 5, título de 1:3000; para 6, título de 1:5000.

De la gallina GR, los sueros inmunes no presentaron ningún aumento en la intensidad de la señal respecto a los sueros preinmunes, ni una disminución de la misma como en el caso de los conejos.

Los animales inmunizados respondieron frente al péptido obtenido del plásmidos pFA1-DS pero al parecer las gallinas tienen un tiempo de respuesta más rápido que los conejos. Si bien, esto no indica que el sistema inmune de los conejos no responda al péptido usado como antígeno, por alguna razón la respuesta fue poca hasta el momento de concluir este trabajo, por lo que se decidió seguir inmunizando a todos los animales, esperando obtener una mayor respuesta, por parte del conejo, y más especificidad de los sueros de la gallina que se usa para la inmunodetección de H.

### **6.3. Capítulo III**

En los capítulos anteriores se presentaron los resultados de la titulación e inmunodetección con los sueros obtenidos del péptido derivado de la construcción pF1A-DS. En este capítulo se presenta el diseño *in silico* de tres péptidos, que delimitan las tres zonas con mayor potencial inmunogénico dentro de DS. Estos péptidos se diseñaron con la intención dirigir Ac a zonas más pequeñas de H, intentado, de este modo, mejorar la especificidad en la detección de la proteína de interés.

---

#### ***Material y Métodos***

***Construcción pF1A-DS:*** Se partió de la construcción pF1A-DS descrita en el capítulo I de resultados.

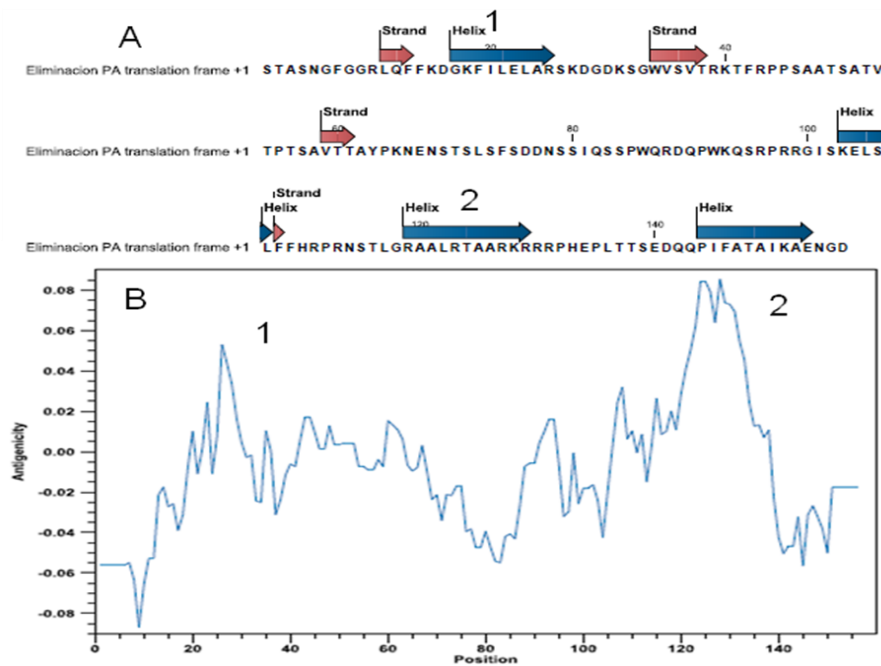
***Análisis bioinformático de DS:*** se partió de los resultados obtenidos en el primer capítulo (Figura 1, Capítulo I) y con el programa CLC Main Workbench 5.6.1 (CLC bio, Aarhus, Dinamarca) se delimitaron las zonas de interés en DS para generar los perfiles de antigenicidad de los nuevos péptidos.

***Diseño de oligonucleótidos para las PCR de eliminación:*** Se diseñaron 3 pares de oligonucleótidos para generar el mismo número de eliminaciones en la construcción pF1A-DS. Se intentarán 3 eliminaciones en las regiones N-terminal, C-terminal y central del fragmento, obteniendo así los fragmentos PA, PB y PC respectivamente. Las secuencias se diseñaron para permitir que el oligonucleótido 5' se una a la cadena complementaria y el oligonucleótido 3' se una a la cadena líder, obligando de este modo a las polimerasas a ignorar, y por lo tanto eliminar, la secuencia entre los dos oligonucleótidos. Para evitar cambios en las secuencias se utilizará una polimerasa de alta fidelidad.

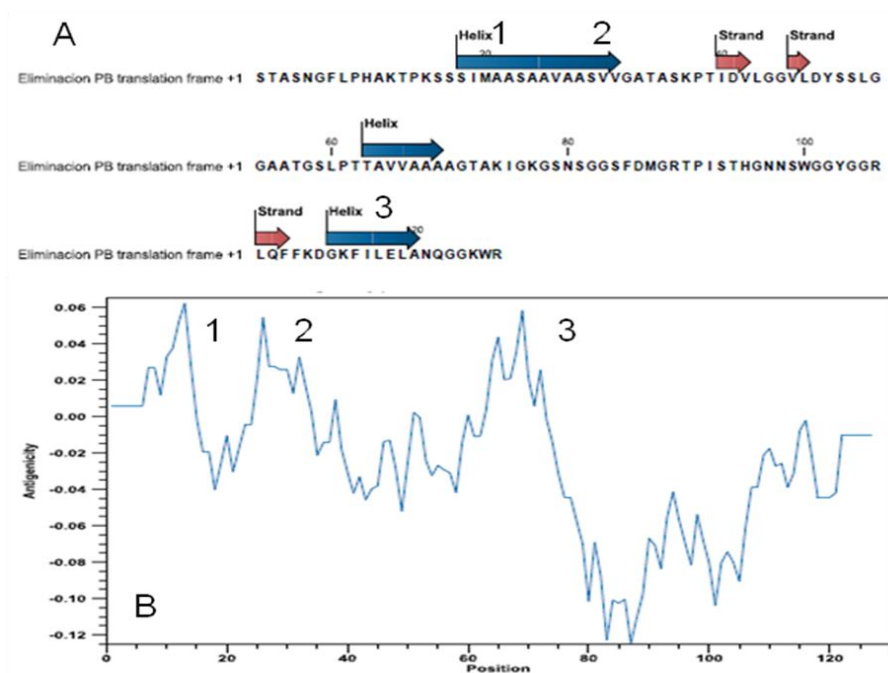
#### ***Resultados y discusión***

***Análisis bioinformático de DS:*** se partió de la secuencia ya conocida de DS sin intrones, para generar, en el programa CLC Main Workbench 5.6.1, un análisis de antigenicidad de los péptidos diseñados *in silico* sobre DS usando el algoritmo de Kyte-Doolittle. En el capítulo anterior (Figura 1, Capítulo 1) observamos cómo las zonas con mayor potencial inmunogénico coincidían con las zonas de mayor hidrofobicidad de la

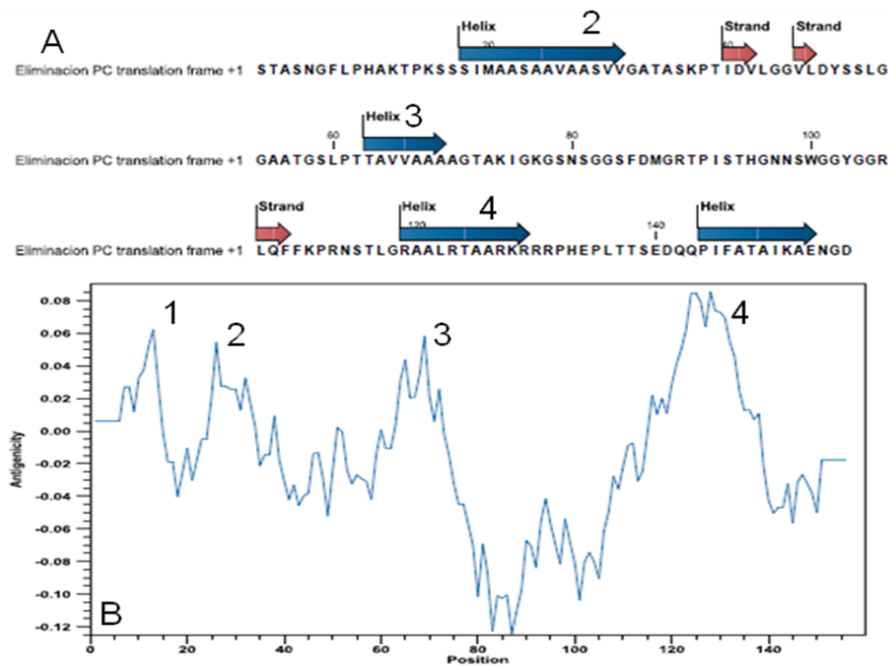
proteína. En este capítulo comparamos los resultados de antigenicidad contra una predicción de estructuras secundarias realizadas con el mismo algoritmo.



**Figura 1.** Perfil de antigenicidad de péptido PA. El panel A muestra una predicción de estructuras secundarias sobre la secuencias del PA, donde se observan cuatro posibles láminas  $\beta$  (Strand, en café) y cuatro posibles hélices  $\alpha$  (Helix, en azul). El panel B muestra el perfil de antigenicidad, donde se observan dos zonas antigénicas importantes dentro del péptido, que coinciden con dos hélices  $\alpha$  (1 y 2).



**Figura 2.** Perfil de antigenicidad del péptido PB. El panel A muestra una predicción de estructuras secundarias sobre la secuencias del PB, donde se observan tres posibles láminas  $\beta$  (Strand, en café) y tres posibles hélices  $\alpha$  (Helix, en azul). El panel B muestra el perfil de antigenicidad, donde se observan tres zonas antigénicas importantes dentro del péptido, que coinciden con dos hélices  $\alpha$  (1 y 2).



**Figura 3.** Perfil de antigenicidad del péptido PC. El panel A muestra una predicción de estructuras secundarias sobre la secuencias de PC, donde se observan tres posibles láminas  $\beta$  (Strand, en café) y cuatro posibles hélices  $\alpha$  (Helix, en azul). El panel B muestra el perfil de antigenicidad, donde se observan cuatro zonas antigénicas importantes dentro del péptido (1-4), que coinciden con al menos tres hélices  $\alpha$  (2, 3 y 4).

Comparando estos resultados con los del Capítulo I de resultados, se observa que la antigenicidad está relacionada a la hidrofobicidad/polaridad de los aa, siendo las zonas hidrofóbicas las más antigénicas. Al parecer la predicción de las hélices que coinciden con zonas antigénicas en estos resultados, se debe más a la participación de aa hidrofóbicos en la conformación de las hélices, que a la estructura por sí misma.

**Diseño de Oligonucleótidos para las PCR de eliminación sobre DS:** Los oligonucleótidos se diseñaron sobre la secuencia DS, presente en pF1A-DS, de tal modo que no se modifique el marco abierto de lectura. En la Tabla 1 se muestran los detalles de los oligonucleótidos.



<b>Oligonucleótidos para eliminación</b>			
pF1A-PA/ PA Elimina región N-terminal	DS01PA1	5'GGTGGTCGTTTGCAGTTCTTT	62.3
	DS01PA2	3' AAAGCCATTTGAGGCGGTGGA	
pF1A-PB/ PB Elimina región C-terminal	DS02PB1	5' AATCAAGGCGGAAAATGGAGACGA	61.4
	DS02PB2	3' CGCCAGTTCCAATATGAATTT	
pF1A-PC/ PC Elimina región central	DS03PC1	5' CCCAGGAACAGTACGCTTGGC	62.3
	DS03PC2	3' TTAAAGAACTGCAAACGACCACC	

Tabla 1

La construcción pF1A-PA elimina una región de 288 pb en la región N-terminal, permitiendo la expresión de un péptido de  $\approx 17.2$  kDa; pF1A-PB elimina una región de 374 pb en la región C-terminal, permitiendo la expresión de un péptido de  $\approx 14.08$  kDa; pF1A-PC elimina una región de 288 pb en la región C-terminal, permitiendo la expresión de un péptido de  $\approx 17.2$  kDa.

## 7. Discusión general y conclusiones

El conocimiento siempre más preciso de las vías de señalización permite comprender mejor los procesos mediante los cuales los organismos funcionan en su complejidad total y en su intrincada particularidad.

Un conocimiento detallado de los elementos de regulación de las vías de transducción de señales es indispensable para implementar estrategias que mejoren la manipulación y supervivencia de cultivos celulares, embriones de mamíferos *in vitro* y otro tipo de técnicas que den mejores posibilidades de éxito a nivel terapéutico o una mayor incidencia en las técnicas moleculares en la producción pecuaria.

La regulación de la vía Notch ofrece específicamente puntos susceptibles de intervención con fines terapéuticos, puesto que al actuar como un controlador maestro del destino celular, de la proliferación, diferenciación y muerte, implica que su conocimiento integral ayudaría a comprender mejor algunos aspectos de la inmunología, la neurobiología y la biología tumoral (Santos *et al*, 2006).

Con la modulación de la vía Notch en puntos específicos, empleando modelos tanto *in vitro*, originando líneas celulares específicas, como *in vivo*, produciendo animales “*knock out*”, se lograría una mejor comprensión de los aspectos moleculares de la biología del desarrollo y de ciertas enfermedades (Bravo y Baizabal, 2006)

En el presente trabajo se identificaron y generaron péptidos con potencial inmunogénico que se utilizaron como antígenos para la obtención de anticuerpos que reconocen una región particular de la proteína Hairless de mosca de la fruta, con la intención de identificar esta misma región en animales superiores y poder determinar si alguna proteína en estas especies juega un papel similar o igual a Hairless.

Comparando nuestros resultados con los publicados por Maier y col. (2002), la respuesta inmune hasta el momento ha sido muy baja ya que la señal es muy débil, si bien la especificidad de los sueros parece alta porque no revelan mas bandas en el extracto de

embriones y larvas de mosca. Esto aunado a los niveles de expresión de H muestran cierta dificultad, aunque no imposibilitan, en la detección de la proteína.

Si los mamíferos cuentan con una proteína con funciones similares que conserven un dominio similar a la secuencia del dominio DS esto nos dará la oportunidad de identificarla con los sueros generados en gallina, ya que el dominio DS es una región que le sirve de unión a Hairless para unirse a Supresor de Hairless, una proteína, al parece, exclusiva de la vía de señalización Notch, que cuenta con su homólogo en mamíferos, lo que supone la existencia de un ortólogo o parálogo de Hairless en animales superiores, en particular mamíferos.

La siguiente etapa de este proyecto es probar los sueros en extractos de proteína de embriones de diferentes especies, tanto de insectos para probar la capacidad de los anticuerpos de identificar los homólogos conocidos, como en mamíferos para identificar y caracterizar alguna proteína que llegue a identificarse.

Se perfila también la posibilidad de aislar los genes de las células del bazo de las gallinas inmunizadas, para buscar la posibilidad de generar anticuerpos monoclonales, que nos permitan mayor especificidad de los anticuerpos para descartar y reducir el número de posibilidades de reacciones cruzadas en las pruebas con extractos de proteína de especies donde no se ha identificado Hairless.

## 8. Bibliografía

1. Abbas, A. K. y Litchman, A. 2005. **Cellular and molecular immunology**. Saunders. 1-366 pp.
2. Artavanis-Tsakonas, S., Rand, M. D. y Lake, R. J. 1999. **Notch Signaling: Cell Fate Control and Signal Integration in Development**. Science 284:770-776.
3. Barolo, S., Walter, R., Polyanovsky, A., Freschi, G., Keil, T. y Posakony, J. W. 2000. **A Notch-independent activity of Suppressor of Hairless is required for normal mechanoreceptor physiology**. Cell. 103, 957-969.
4. Barolo, S., Stone, T., Bang, A. G. y Posakony, J. W. 2002. **Default repression and Notch signaling Hairless acts as an adaptor to recruit the corepressors Groucho and dCtBP to Suppressor of Hairless**. Genes Develop. 16:1964-1976.
5. Barolo, S. y Posakony, J. W. 2002. **Three habits of highly effective signaling pathways: principles of transcriptional control by developmental cell signaling**. Genes&Development 16:1167-1181.
6. Baron, M., Aslam, H., Flasz, M., Fostier M., Higgs, J. E., Mazaleyrat, S. L. y Wilkin, M. B. 2002. **Multiple levels of Notch signal regulation**. Molec Membrane Biol 19:27-38
7. Baron M. 2003. **An overview of the Notch signaling pathway**. Sem Cell Devel Biol 14:113-119.
8. Bauer-Mehren, A., Furlong. L. I. y Sanz, F. 2009. **Pathway databases and tools for their exploitation: benefits, current limitations and challenges**. Molecular Systems Biology 5:290.
9. Bravo, P. A. y Baizabal. A. V. M. 2005. **La vía de señalización Notch y el desarrollo embrionario animal**. REB 24(3,4):87-96.
10. Bray, S. y Furriols, M. 2001. **Making sense of the Suppressor of Hairless**. Curr. Biol. 11: R217-R221.
11. Bray, S. J. 2006. **Notch signalling: a simple pathway becomes complex**. Nature 7:678-689.
12. Brennan, K. y Gardner, P. 2002. **Notching up another pathway**. Bioessays. 24(5):405-410.

13. Brody, T. 2002. **The Interactive Fly.** Hairless  
<http://www.sdbonline.org/fly/hjmuller/hairles1.htm> (Consultada en noviembre de 2007).
14. Brown, M. S., Ye, J., Rawson R. B., y Goldstein, J. L. 2000. **Regulated Intramembrane Proteolysis: A Control Mechanism Conserved from Bacteria to Humans.** Cell. 100:391–398.
15. Dou, S. Zeng, X., Cortes, P., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Honjo, T. y Vales L. D. 1994. **The Recombination Signal Sequence-Binding Protein RBP-2N Functions as a Transcriptional Repressor.** Mol. Cell. Biol. 14, 3310-3319.
16. Gavilondo, C. J. V. 1995. Anticuerpos monoclonales. Elfos. 11-38 pp.
17. Gazave, E., Lapébie, P., Richards, G. S., Brunet, F., Ereskovsky, A. V., Degnan, B. M., Borchiellini, C., Vervoort, M y Renard, E. 2009. **Origin and evolution of the Notch signalling pathway: an overview from eukaryotic genomes.** BMC Evolutionary Biology 2009, 9:249
18. Gerhart J. 1999. **Signaling pathways in development.** Teratology 60:226-239.
19. Gordon, W. R., Arnett, K. L. y Blacklow S. C. 2008. **The molecular logic of Notch signaling a structural and biochemical perspective.** Journal of Cell Science. 121:3109-3119.
20. Greenwald, I. 1998. **LIN-12/Notch signaling: lessons from worms and flies.** Genes Develop. 12:1751-1762.
21. Haltiwanger, R. S. 2002. **Regulation of signal transduction pathway in development by glycosylation.** Curr. Opin. in Structural Biology. 12:593-598.
22. Haltiwanger. R. S. y Stanley, P. 2002. **Modulation of receptor signaling by glycosylation: fringe is an O-fucose- $\beta$ 1,3N-acetylglucosaminyl-transferase.** Biochem. Biophys. Acta 1573:328-335.
23. Haines, N. e Irvine, K. D. 2003. **Glycosylation regulates Notch signalling.** Nature Rev Molec Cell Biol 4:786-797.
24. Karp, G. 1998. **Biología Celular y Molecular.** McGraw-Hill Interamericana. 744-746 pp.
25. Katoh, M y Katoh, M. 2006. **Notch ligand, JAG1, is evolutionarily conserved target of canonical WNT signaling pathway in progenitor cells.** International Journal of Molecular Medicine 17: 681-685.
26. Kopan, R. y Ilagan, M. X. G. 2009. **The canonical Notch Signaling Pathway: Unfolding the activation Mechanism.** Cell. 137(2): 216-233.

27. Lai, E. C. 2002. **Keeping a good Pathway down: Transcriptional repression of Notch pathway target genes by CSL proteins.** EMBO. 3.9: 840-845.
28. Le Borgne, R. y Schweisguth, F. 2003, **Notch Signaling: Endocytosis Makes Delta Signal Better.** Current Biology. 13, R273–R275.
29. Le Borgne, R., Remaud, S., Hamel, S. y Schweisguth, F. 2005. **Two Distinct E3 Ubiquitin Ligases Have Complementary Functions in the Regulation of Delta and Serrate Signaling in Drosophila.** PLoS Biology. 3(4):688-696.
30. Leenaars, M., Hendriksen, C. F. M., de Leeuw, W. A., Carat, F., Delahaut, F., Fischer, R., Halder, M., Hanly, W. C., Hartinger, J., Hau, J., Lindblad, E. B., Nicklas, W. Outschoorn, I. M. y Stewart-Tull, D. E. S. 1999. **The Production of Polyclonal Antibodies in Laboratory Animals.** The Report and Recommendations of ECVAM Workshop 35. ATLA. 27:79-102.
31. Liu J., Sun Y., Drubin, D. G. y Oster, G. F. 2009. **The Mechanochemistry of Endocytosis.** PLoS Biol 7(9): e1000204.
32. Maier, D., Stumm, G. y Preiss, A. 1992. **Hairless, a Drosophila gene involved in neural development, encodes a novel, serine rich protein.** Mech. Develop. 38(2):143-156.
33. Maier, D., Marquart, J., Thompson-Fontaine, A., Beck, I., Wurmbach, E. y Preiss, A. 1997. **In vivo structure-function analysis of Drosophila Hairless.** Mech. Develop. 67(1):97-106.
34. Maier, D., Nagel, A. C. y Preiss, A. 2002. **Two isoforms of the Notch antagonist Hairless produced by differential translation initiation.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 99(24):15480-15485.
35. Maier, D. 2006. **Hairless: the ignored antagonist of the Notch signalling pathway.** Hereditas 143: 212-221.
36. Maier, D., Chen, A. X., Preiss, A. y Ketelhut, M. 2008. **The tiny Hairless protein from *Apis mellifera*: a potent antagonist of Notch signaling in *Drosophila melanogaster*.** BMC Evolutionary Biology. <http://www.biomedcentral.com/1471-2148/8/175>
37. Marquart, J., Alexief-Damianof, D., Preiss, A. y Maier, D. 1999. **Rapid divergence in the course of Drosophila evolution reveals structural important domains of the Notch antagonist Hairless.** Dev. Genes. Evol. 209:155-164.

38. Mayer, G. 2009. **Microbiology and immunology On-line. Part One: Immunology** <http://pathmicro.med.sc.edu/book/immunol-sta.htm> (Consultada en julio de 2010).
39. Mumm, J. S. y Kopan, R. 2000. **Notch signaling: from the outside in.** *Dev. Biol.* 228:151-165.
40. Munro, S. y Freeman, M. 2000. **The Notch signalling regulator Fringe acts in the Golgi apparatus and requires the glycosyltransferase signature motif DxD.** *Curr. Biol.* 10:813–820
41. Nagel, A. C., Krejci, A., Tenin, G., Bravo-Patiño, A., Bray, S., Maier, D. y Preiss, A. 2005. **Hairless-Mediated repression of Notch target genes requires the combined activity of Groucho and CtBP corepressors.** *Molec. and Cell. Biol.* 25(23):10433-10441.
42. Okajima, T., Reddy B. V. V. G., Matsuda, T. e Irvine, K. D. 2008. **Contributions of chaperone and glycosyltransferase activities of O-fucosyltransferase 1 to Notch signaling.** *BMC Biology* 6:1
43. Patterson, R., Younger, J. S., Weigle, W. O. y Dixon, F.J. 1962. **Antibody production and transfer to egg yolk in chicken.** *J Immunol.* 89:272-278.
44. Paz-Gómez, D., Baizabal-Aguirre, V. M., Valdez-Alarcón, J. J., Cajero-Juárez, M., Nagel, A. C., Preiss, A., Maier, D. y Bravo-Patiño, A. 2008. **Structural analysis of point mutations in the Hairless gene and their association with the activity of the Hairless protein.** *Int. J. Biol. Macromolecules.* 43:426-432.
45. Polson, A., von Wechmar, M. B. y van Regenmortel, M. H. 1980. **Isolation of viral IgY antibodies from yolks of immunized hens.** *Immunol Commun.* 9(5):475-93.
46. Rida, P. C., Le Minh, N. y Jiang, Y. J. 2004. **A Notch feeling of somite segmentation and beyond.** *Devel. Biol.* 265(1): 2-22.
47. Rampal, R., Arboleda-Velasquez, J. F., Nita-Lazar, A., Kosik, K. S. y Haltiwanger, R. S. 2005. **Highly Conserved O-Fucose Sites Have Distinct Effects On Notch1 Function.** *J Biol Chem.* 280(37): 32133–32140
48. Santos L., León-Galván M. F., y Marino-Marmolejo E. N. 2006. **Vía de señalización Notch y nuevas estrategias para el tratamiento de cáncer.** *Salud Publica Mex.* 48:155-165.

49. Schägger, H. y von Jagow, G. 1987. **Tricine-sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of protein in the range from 1 to 100 kDa.** Anal Biochem. 166:368-379.
50. Schreiber, S. L., Preiss, A. Nagel, A. C., Wech, I. y Maier, D. 2002. **Genetic screen for modifiers of the rough eye phenotype resulting from overexpression of the Notch Antagonist Hairless in Drosophila.** Genesis. 33(3):141-152.
51. Schweisguth, F. y Posakony, J. W. 1992. **Suppressor of Hairless, the Drosophila homolog of the mouse recombination signal-binding protein gene, controls sensory organ cell fates.** Cell. 69. 1199-1212
52. Schweisguth, F. y Posakony, J. W. 1994. **Antagonistic activities of Suppressor of Hairless and Hairless control alternative cell fates in the Drosophila adult epidermis.** Development, 120:1433-1441
53. Schweisguth, F. 2004. **Regulation of Notch signaling Activity.** Current Biology. 14:R129–R138
54. Shi, S. y Stanley, P. 2003. **Protein O-fucosyltransferase 1 is an essential component of Notch signaling pathways.** Proc. Natl Acad. Sci. USA 100:5234–5239.
55. Stanley, P. 2007. **Regulation of Notch Signaling by Glycosylation.** Curr Opin Struct Biol. 17(5): 530–535.
56. Waltzer, L., Bourillot, P. Y., Sergeant, A. y Manet, E. 1995. **RBP-J $\kappa$  repression activity is mediated by a co-repressor and antagonized by the Epstein-Barr virus transcription factor EBNA2.** Nucleic Acids Res. 23, 4939-4945.
57. Wasif, M. M., Ayub, N. y Zia, I. Q. 2006. **Passive immunization using purified IgYs against infectious bursal disease of chickens in Pakistan.** J. Vet. Sci. 7(1):43–46



## 9. Apéndice

**9.1. Preparación de células competentes para choque térmico (cepa *Escherichia coli* DH5aF'; Cepa *E. coli* XL1Blue; *Escherichia coli* TOP10):** Plaquear en Agar la cepa a propagar e incubar toda la noche a 37°C. Al día siguiente preparar un pre-inóculo de la cepa en 3 ml de medio LB e incubar toda la noche a 37°C con agitación constante (250 rpm). El día siguiente, vaciar el pre-inóculo a un matraz de 2 Lt con 500 ml de medio LB e incubar a 37°C con agitación constante (250 rpm) durante una hora y media. Tomar una muestra del medio de cultivo y medir a una DO<sub>550</sub>. Registrar los datos. Detener el crecimiento incubando en hielo al momento que la lectura alcance un valor aproximado de 0.5 (0.35 a 0.45). Incubar en hielo 5 min. Distribuir el cultivo en dos botellas para centrífuga de 250 ml de capacidad estériles, y centrifugar a 4,600 rpm durante 10 min a 4°C. Retirar sobrenadante. Resuspender cada pastilla en 15 ml de TFb1 (Acetato de potasio 30 mM; Cloruro de potasio 100 mM; Cloruro de calcio 10 mM, Cloruro de manganeso 50 mM; glicerol 15%, esterilizado por filtración) frío y dejar reposar 20 min en hielo. Transferir a tubos para centrífuga estériles de 50 ml de capacidad y centrifugar a 11,600 rpm durante 10 min a 4°C. Retirar sobrenadante. Resuspender cada pastilla en 2 ml de TFb2 (MOPS 75 mM; Cloruro de potasio 10 mM; Cloruro de calcio 100 mM; glicerol 15%, esterilizado por filtración) frío e incubar 15 min en hielo. Alicuotar en tubos Eppendorf de 1.5 ml estériles, 100 µl de la suspensión bacteriana, congelar en Nitrógeno líquido y almacenar a -80° C. Probar eficiencia de las bacterias preparadas.

## 9.2. Reactivos

### Acrilamida/Bisacrilamida 40%

Compuesto	Cantidad
Acrilamida (w/v)	38.93 g
Bis-acrilamida (w/v)	1.07 g
Agua destilada desionizada	Cbp 100 ml

### Agar Luria-Bertani

Compuesto	Cantidad
Triptona	10 g
Cloruro de sodio	10 g
Extracto de levadura	5 g
Agar	10 g
Agua destilada desionizada (dd)	cbp 1 L

Mezclar, ajustar el pH a 7.2 con NaOH 1N y esterilizar en autoclave. Cuando se necesario agregar 1 ml de ampicilina (100 mg/ml) cuando el medio esté  $\approx 42^{\circ}\text{C}$ , mezclar y verter en cajas petri

### Ampicilina (100 mg/ml)

Compuesto	Cantidad
Ampicilina	500 mg
Agua dd esteril (dde)	cbp 5 ml

### Bromuro de Etidio (5 mg/ml)

Compuesto	Cantidad
Bromuro de etidio	500 mg
Agua dd esteril (dde)	cbp 100 ml

### Buffer TAE 50X

Compuesto	Catidad
Tris base	242 g
Ácido acético glacial	57.1 ml

EDTA 0.5M pH 8.0	100 ml
Agua dd	Cbp 1 L

---

Mezclar y esterilizar

Buffer TBE 10X

Compuesto	Cantidad
Tris base	108 g
Ácido bórico	55 g
EDTA 0.5M pH 8.0	40 ml
Agua dd	Cbp 1 L

---

Mezclar y esterilizar

CTAB (Bromuro de hexadeciltrimetilamonio) al 10 % (w/v)

Compuesto	Cantidad
CTAB	5 mg
Agua dd esteril (dd)	cbp 50 ml

EDTA 0.5 M pH 8.0

Compuesto	Cantidad
EDTA	186.126 g
Agua dde	cbp 1 L

Etanol al 70%

Compuesto	Cantidad
Etanol absoluto	700 ml
Agua dd	300 ml

Gel de agarosa 1%

Compuesto	Cantidad
TAE 1X	30 ml
Agarosa	0.3 g
Bromuro de etidio	3 µl

---

Mezclar la agarosa con el TAE y calentarlo hasta solubilizarla, atemperar la mezcla,

---

agregar el bromuro de etidio y verter en el molde de la cámara de electroforesis

#### Lisozima (20 mg/ml)

Compuesto	Catidad
Lisozima	0.2 g
Agua dde	cbp 10 ml

Dividir en alícuotas de 1 ml y conservar a -20°C

#### Medio Luria-Bertani (LB)

Compuesto	Cantidad
Triptona	10 g
Cloruro de sodio	10 g
Extracto de levadura	5 g
Agua dd	cbp 1 L

Mezclar, ajustar pH a 7.2 con NaOH 1 N y esterilizar en autoclave

#### Persulfato de aminio 10%

Compuesto	Cantidad
Persulfato de amonio	100 mg
Agua dde	cbp 1 ml

#### STET

Compuesto	Cantidad
EDTA 0.5 M pH 8.0 estéril	1 ml
Tritón X-100 al 10% estéril	0.5 ml
Tris-HCL 1 M pH 8.0 estéril	0.5 ml
Sacarosa	0.08 g
Agua dde	8 ml

#### Solución TFb1

Compuesto	Concentración
Cloruro de potasio	100 mM
Cloruro de manganeso	50 mM

Acetato de potasio	30 mM
Cloruro de calcio	10 mM
Glicerol	15%

---

Ajustar pH a 5.8 con ácido acético 0.2 M y esterilizar por filtración en filtro de 0,22  $\mu$ m.  
Almacenar a 4°C

#### Solución TFb2

Compuesto	Concentración
Cloruro de calcio	100 mM
MOPS	75 mM
Cloruro de potasio	10 mM
Glicerol	15%

---

Ajustar pH a 6.5 con KOH y esterilizar por filtración en filtro de 0.22 $\mu$ m. Almacenar a 4°C

#### Tris-HCL 1 M pH 8.0

Compuesto	Cantidad
Tris base	12.114 g
Agua dd	cbp 100 ml

---

Ajustar pH a 8.0 con ácido clorhídrico concentrado y esterilizar

#### Tritón x100 al 10%

Compuesto	Cantidad
Tritón X100	10 ml
Agua dd	cbp 100 ml

---

Mezclar y esterilizar