

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*

Design and construction of a polypeptide with immunogenic potential from suppressor of hairless binding domain from *Drosophila melanogaster* hairless protein

Humberto Contreras Cornejo^a, Víctor Manuel Baizabal Aguirre^a, Juan José Valdez Alarcón^a, Marco Cajero Juárez^a, Alejandro Bravo Patiño^a

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.

ABSTRACT

Signal transduction pathways regulate the functions of different types of cells that constitute a multicellular organism; with the final goal of to regulate of target genes. 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 signal transduction pathway. Despite efforts to detect Hairless in higher animals, it has not been able to identify a homolog protein. The identification of a Hairless homolog 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 peptide with immunogenic potential from the Suppressor of Hairless binding domain from *Drosophila melanogaster* Hairless protein. This peptide was used as antigen to generate polyclonal antibodies in hens. Sera were tested against total protein extract from fruit fly embryos.

KEY WORDS: Embryo development, Notch, Hairless, Immunogenic peptides.

En los últimos años, los avances biotecnológicos en la producción animal se han enfocado a la

During the last years, biotechnological advances in animal production have been focused on obtaining

Recibido el 3 de agosto de 2010. Aceptado el 9 de diciembre de 2010.

^a 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. abravo@umich.mx. Correspondencia al último autor.

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

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- β), 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⁽²⁻⁵⁾.

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

in vitro embryos, either for their transfer into receptor females or genetic manipulation. However, *in vitro* low survival of this type of embryo negatively impacts their viability for transfer, which represents a problem for the implementation of these techniques. Biotechnology methodologies in animal production imply knowledge of composition and use of types of culture medium, cloning by nuclear transfer, embryo sexing, and transgenic animal production and embryo viability determination, among others.

At present, and by the fact that cellular communication is in charge of regulating complex spatio-temporal organizations of living organisms, detailed knowledge at molecular level of embryo development is essential for explaining the regulatory mechanisms of cellular communication pathways, which would also help to propose better strategies of *in vitro* embryo manipulation⁽¹⁾ and have a favorable impact on animal production. Cellular communication, a common trait of complex multicellular organisms, is regulated by signal transduction pathways, with the final goal of to activate or to inactivate target genes.

Several signal transduction pathways have been described in animals; in particular, seven pathways have been identified in early and late embryo development of metazoans, which assure correct cell-fate: Wingless (Wnt), transforming growth factor beta (TGF- β), Hedgehog (Hh), receptor tyrosine kinase (RTK), nuclear receptor, Jak/STAT, and Notch (N). Each pathway is repeatedly used during organism growth according to the development context⁽²⁻⁵⁾.

Of these seven pathways, Notch has a very important role during metazoan embryo development, since it takes control of embryo development, mainly in somite formation. Within N pathway elements, Hairless (H) protein plays an important role as major antagonist of the pathway, defining cell-fate. However, its activity is practically unknown in mammals, since it has not been possible to detect any orthology or paralogy of this protein⁽⁶⁾. In *Drosophila melanogaster* (D.m.), H possesses several well-conserved binding domains. DS domain

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 parálogo 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⁽⁷⁻¹⁶⁾.

Estudios comparativos entre las proteínas H de *D. hydei* 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 (H"85%) y el menos conservado es el DA (H"33%)^(16,17,18).

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

is located at N-terminus end and provides a binding site for Suppressor of Hairless [Su(H)] protein, a transcription factor. DA domain is found in the central region of the protein, and is the binding site for Groucho (Gro) and, finally, CD domain is found at C-terminal region, which binds to C-terminal binding protein (CtBP). Gro and CtBP are two co-repressors needed for regulating N target gene expression. In this context, H acts as a binding molecule between Su(H) and co-repressors⁽⁷⁻¹⁶⁾.

Comparative studies between H proteins from *D. hydei* and *D.m.*, species with a divergence of 50 million years, reveal low conservation of DS, DA and DC domains, where DS is the most conserved (H"85%) and DA is the least conserved (H"33%)^(16,17,18).

H protein not only shows variation in its functional domains, but also in its size, which is evident due to the fact that an ortholog of H, recently studied in *Apis mellifera* (*H.A.m*), shows a protein with a molecular weight of 44.5 kDa that corresponds to a third of the size in regard to *D.m.* H protein of 110 kDa, but contains the conserved DA, DS and DC domains, which are essential for its function⁽¹⁸⁾.

Detailed knowledge of H protein in invertebrates, is required for identification of functional homologs in mammals, where in spite of efforts, until now no homolog of H protein has been found in vertebrates^(9,18). The lack of identification of a protein with similar functions to H, does not exclude the presence of a paralog or ortholog in higher animals, but explains why this gene is widely ignored in mammal embryo development. However, once negative regulatory details in N signaling pathway are explained in higher animals, it is expected that a functional protein with characteristics of H will be identified⁽⁶⁾, because is known that metazoans, from insects to human, need N pathway to successfully carry out cellular differentiation during embryogenesis^(18,19).

Therefore it is possible that, by an analysis *in silico* to identify the most antigenic zones of DS, we can generate peptides with immunogenic potential to produce polyclonal antibodies against this

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 *et al.*⁽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 los mismos autores 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'-*gACCgCGATCgCCATgTC* CACCgCCTCAAATggCTT-3'), que inserta en el

domain, to achieve the identification of a functional protein similar to H in higher animal embryos with the aim to be able to establish more sophisticated biotechnical strategies at molecular level, which assure get a higher survival rate of mammal embryos *in vitro*, and a great impact can be achieved on application of biotechnology in animal production.

With the aim to delimit DS domain from H protein and to generate a construction that allows us the obtaining an *in vitro* peptide, to be used as hen antigen, and be able to generate polyclonal antibodies against this domain, the following techniques were used:

Hydrophobicity and antigenicity analysis of DS domain from D.m.

Based on the comparison conducted by Maier *et al.*⁽¹⁸⁾ among homologs of H protein in invertebrates, DS is reported as the best-conserved region of the protein. An analysis of antigenicity and hydrophobicity was carried out using CLC Main Workbench 5.6.1 software (CLC bio, Aarhus, Denmark) of the sequence reported by Maier to identify the zones with higher immunogenic capacities.

Obtainment of fragment DS and cloning in pF1A T7 Flexi® vector

Two oligonucleotides were designed to amplify DS. The DSFLEXI01 (5'-*gACCgCGATCgCCATgT* CCAC CgCCTCAAATggCTT-3'), which inserts a start codon at the 5' end (ATg are in bold letters), the restriction site for *Sgf* I (underlined) and four random bases (*cursive*). The DSFLEXI02 (5'-*CTTgTTTAAACgTCTCCATTTCCgCCTTgATTgC*-3'), which inserts the restriction site for *Pme* I at the 3' end (underlined), which includes the valine codon (**bold and underlined**), a stop codon (*underlined and cursive*) and four random bases (*cursive*). Fragment DS was obtained by polymerase chain reaction (PCR) from wild-type *D.m.* DNA and cDNA ϵ from *D.m. rucuca* variant obtained from D. Maier and A. Preiss laboratory (Genetic Institute, Hohenheim University, Stuttgart, Germany), and the following reactive was added to

extremo 5' un codón de inicio (ATg en negritas), el sitio de restricción para *Sgf* I y cuatro bases aleatorias. El DSFLEXI02 (5'- **CTTg**TTTAAACg TCTCCATTTTCCgCCTTgATTgC-3'), que inserta en el extremo 3' el sitio de restricción para *Pme* I que incluye el codón de valina, un codón de paro y cuatro bases aleatorias. 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 MgCl₂, 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:

final concentration: 150 ng of genomic DNA, PCR buffer (Tris-HCl 200 mM, KCl 500 mM), 2 mM of MgCl₂, 0.2 mM of dNTP's mix, 0.2 μM of each oligonucleotide, 1.0 U of *Taq* DNA polymerase (Gibco BRL®, Gaithersburg, MD, USA) and sterile, distilled, deionized water for a final volume of 50 μl. PCR was carried out by a GeneAmp® PCR System 2700 (Applied Biosystems) thermal cycler, using the following program: 1 cycle at 94 °C for 3 min; 2 cycles at 94 °C for 30 sec, 55 °C for 45 sec, 72 °C for 90 sec; 35 cycles at 94 °C for 20 sec, 61.3 °C for 30 sec and 72 °C for 90 sec; one cycle at 72 °C for 7 min, and a prolonged cycle at 4 °C. PCR product was cloned into pF1A T7 Flexi® vector (following the manufacturer's instructions) using Promega Flexi Cloning System and Vectors and corresponding restriction enzymes (PROMEGA™, USA).

Transcription and expression of DS fragment

For transcription and expression of DS fragment, kit TnT® Coupled Reticulocyte Lysate System® (PROMEGA™, USA) was used, following the manufacturer's instructions, since it allows to carry out transcription, intron processing and *in vitro* translation in a single reaction. After reactions were performed, presence of the peptide in 10% acrylamide gel for SDS-Page was verified.

Use and immunogenic activity of the peptide generated as antigen

The peptide generated *in vitro* was used to hens immunization according to the following program: the peptide on interest, obtained using the kit TnT® Coupled Reticulocyte Lysate System, was identified in a SDS-Page gel. The band was cut out and homogenized in 500 μl of isotonic saline solution. A volume of complete (first immunization) or incomplete (following immunizations) Freund's adjuvant [Freund® (Sigma™, USA)] was added; it was taken up in 1.5 ml with isotonic saline solution and intramuscularly injected along the breastbone in productive stage hens. The procedure was repeated once per week for 4 wk. In order to determine titration of generated antibodies, 2 ml of hen blood were obtained, before each immunization and one week after the last immunization. For

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 μ l 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 cuatro 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 g de Agar en 375 ml de agua y se esterilizó; se agregaron 125 ml de jugo de manzana y 12.5 g 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 min. El corion de los embriones se eliminó lavando, sobre la placa de medio de manzana, con una solución de cloro al 50 % durante 30 seg. 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 μ l de amortiguador de homogenizado (10 mM de HEPES pH 7.6, 5 mM de EGTA, 5 mM de EDTA y 1 a 2 μ l 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.

hen's sera separation, a clot was allowed to form and incubated over-night at 4 °C, then it was centrifuged at 10,000 rpm for 10 min; supernatant was recovered in sterile 1.5 ml Eppendorf tubes and was frozen at -20 °C.

Obtainment of D. melanogaster embryo protein

Flies were placed in apple medium plates (12 g of agar were added to 375 ml of water and sterilized; 125 ml of apple juice and 12.5 g of sugar were added and heated at 60 °C; agar and apple juice were mixed and kept at 60 °C; 5 ml of Nipagin at 15 % in absolute ethanol were added, mixed and poured into Petri dishes [60 × 15 mm SyM Laboratories, Mexico]) to permit oviposition. Embryos were collected each 30 min. Embryo chorion was eliminated by washing, in the apple juice agar plate, with chloride solution at 50 % for 30 sec. Embryos were passed through a fine mesh for eliminating chloride solution and rinsed with washing solution (NaCl at 0.7%, Triton ×100 at 0.02 %). A hundred embryos were collected and placed in 1.5 ml sterile Eppendorf tubes. A hundred microliters of homogenization buffer (10 mM HEPES, pH 7.6; 5 mM EGTA; 5 mM EDTA and 1 to 2 μ l PMSF at a final concentration of 0.5 mM) were added. They were incubated at 90 to 95 °C for 5 min and centrifuged for 30 min at 14,000 rpm at 4 °C. The supernatant was recovered in a sterile Eppendorf tube and kept at -20 °C.

Sera titration

Dot Blot technique was used for sera titration according to the following protocol: two square cm of nitrocellulose membrane (NCM) were cut and impregnated in TBS (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7.5) for 15 min and squares were allowed to dry. One microgram of antigen was added on (total extract of *D.m.* embryo protein) NCM and was allowed to dry for 5 to 10 min. NCM squares were transferred into 6-well cellular culture cluster (Corning Incorporated, NY, USA) and 1 ml blocking solution at 5% was added (Blotting Grade Blocker Non-Fat Dry Milk[®], BIORAD[™] in TTBS [TBS plus 0.1% Tween 20[®], BIORAD[™]]) for 45 min with constant agitation (all procedures are done with constant agitation unless otherwise specified);

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 cm², 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 1 µg de antígeno (extracto total de proteína de embriones de *D.m.*) sobre la MNC y se dejó secar de 5 a 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 h. 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 h; 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

blocking was repeated for 45 min. The NCM was washed with sterile distilled water for 10 min, then it was washed with TBS for 10 min and, finally, it was washed with TTBS for 10 min. Sera obtained from hens (primary antibody) were added separately, diluted at 1:200, 1:500, 1:1,000, 1:2,000, 1:3,000 and 1:5,000, in 1 ml blocking solution at 5 % and were kept with agitation at 4 °C for at least 12 h. After incubation, the membrane was kept in serum dilution at room temperature for approximately 1 h, without agitation. The NCM was washed with sterile distilled water for 10 min, then it was washed with TBS for 10 min and, finally, it was washed with TTBS for 10 min. Goat anti-hen IgY secondary antibody conjugated to horseradish peroxidase was added (Santa Cruz, Inc. CA, USA) in 5 % blocking solution, diluted at 1:5,000 and was kept with agitation 1 h; solution was eliminated. Luminol reagent (Western Blotting Luminol Reagent®, Santa Cruz Biotechnology, Inc. CA, USA) was added, and incubated for 1 min. The NCM was kept in contact with radiographic plates (ORTHO T2, JUAMA, Mexico) at variable exposure times of 3 to 10 min and was developed.

Immunodetection of H in total extract of D.m. embryos by Western Blot

Separation of proteins from *D.m.* embryo extract (15-20 µg), was carried out by electrophoresis in 10 % polyacrylamide gels and were transferred to a NCM by electrophoresis at 250 mA for 1.5 h, in transfer buffer with constant agitation. The NCM was placed in 5 % blocking solution for 45 min, with a solution and blocking change for 45 additional min. The NCM was washed three times (10 min/wash) with sterile, distilled, deionized water; TBS and TTBS, respectively. Serum obtained from GN hen (primary antibody) was added to a 1:3,000 dilution and was incubated at 4 °C for at least 12 h. Later, the membrane was left at room temperature for 1 h and washed three times (10 min/wash) with sterile, distilled, deionized water; TBS and TTBS, respectively. Goat anti-hen IgY secondary antibody conjugated to horseradish peroxidase was added (Santa Cruz, Inc., CA, USA) at 5 % blocking solution, at a titer of 1:5,000 and left with agitation for 1 h; the solution was eliminated. The Luminol

electroforesis en geles de poliacrilamida al 10% y se transfirieron a una MNC mediante electroforesis a 250 mA durante 1.5 h 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 h. Posteriormente, la membrana se dejó en reposo a temperatura ambiente durante 1 h 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 h; 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 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 drosophilidos se requiere de H para reclutar proteínas necesarias para este tipo de complejos. Recientemente⁽²⁰⁾, se ha destacado que las 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 parálogo de H en estas especies. Sin embargo, no han habido estudios concluyentes al respecto, ya que dichas proteínas no han sido caracterizadas funcionalmente.

reagent was added (Western Blotting Luminol Reagent®, Santa Cruz Biotechnology, Inc., CA, USA), it was incubated for 1 min. The NCM was left in contact with the radiographic plates (ORTHO T2, JUAMA, Mexico) at variable exposure times of 3 to 10 min and it was developed.

The following results were obtained from the aforementioned strategy:

Analysis *in silico* of DS: Su(H) is a protein that forms part of the main components of Notch signaling pathway in *D.m.* and counts with a homolog in mammals, identified as CBF1 (RBPJK), which suggests the existence of a protein with similar function as H protein, necessary for transcriptional repression complex formation in mammals, since drosophilids require H protein to recruit proteins essential for these type of complexes. Currently, it has been pointed up⁽²⁰⁾, by Kopan et al, that SHARP/MINT/SPEN proteins form part of repression complexes reported on mammals; therefore, they antagonized activation of Notch/RBP-Jk signaling, leaving open the possibility that this protein may be considered as paralog of H protein in these species. However, there have been no concluding studies in this aspect, since these proteins have not been functionally characterized.

Carrying out invertebrates H protein homologs analysis, it was observed⁽¹⁸⁾ that the protein best conserved region was precisely DS domain. Taking into consideration the aforementioned, an antigenicity and hydrophobicity analysis of DS was performed using CLC Main Workbench 5.6.1, using the Kyte-Doolittle algorithm⁽²¹⁾, with the aim to determine that besides that DS domain is the best conserved domain of H protein, the peptide that could be generated from its DNA sequence had sufficient antigenic capacity to be used for polyclonal antibody production capable to recognize it, forming part of a complete functional protein.

As result of this analysis, Figure 1 shows that there are several hydrophobic zones; the most representatives are the ones localized between amino acids (aa) 25-35 and 65-75 (Panel A). Likewise, the most representative hydrophilic zones are shown, localized between aa 185-195, 120-125 and 222-

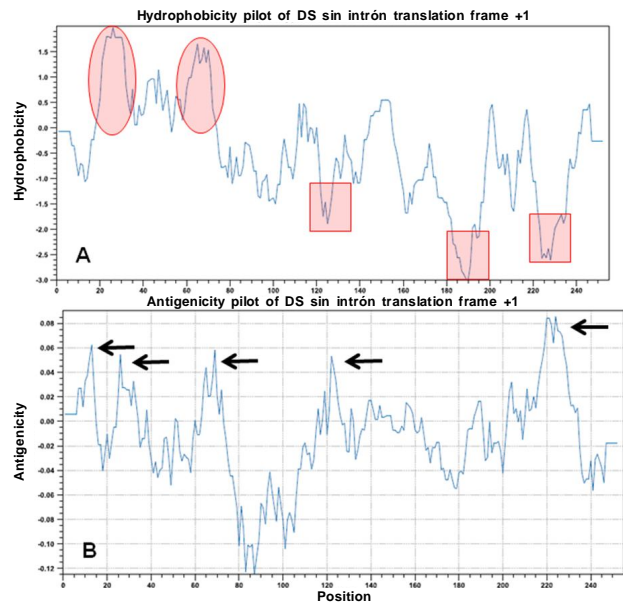
Al realizar un análisis de los homólogos en H reportados en invertebrados, se observó⁽¹⁸⁾ que la región mejor conservada de la proteína era precisamente el dominio DS. Tomando en cuenta lo anterior, y utilizando el programa CLC Main Workbench 5.6.1, en el presente trabajo se realizó un análisis de antigenicidad e hidrofobicidad de DS, con el algoritmo de Kyte-Doolittle⁽²¹⁾, 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, 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.

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 testigo), 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

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)

Figure 1. Hydrophobicity and antigenicity profiles of DS from Hairless protein, generated by Kyte-Doolittle algorithm (CLC Main Workbench 5.6.1)



Panel A, hydrophobic profile: representative hydrophobic zones are delimited by circles, representative hydrophilic zones are delimited by boxes.

Panel B, antigenicity profile: arrows show the zones with greater antigenicity capacity of DS domain

230 (Panel A). Comparing the latter results with antigenicity analysis, it is observed that the hydrophobic and hydrophilic peaks correspond, in general, to the most immunogenic zones of DS, which are localized between aa 10-15, 25-30, 63-72, 120-125 and 220-230 (Figure 1, Panel B). Taken together, these results suggest that the peptide generated from the fragment of the *H* gene that encodes DS domain has wide possibilities to be used for polyclonal antibody production against the best-conserved H protein domain.

Obtainment of DS domain and generation of pF1A construction. In order to amplify the corresponding DS domain region from the *H* gene, genomic DNA from *D.m. rucuca* and genomic DNA from wild *D.m.* (as control) were used to carry out PCR. As

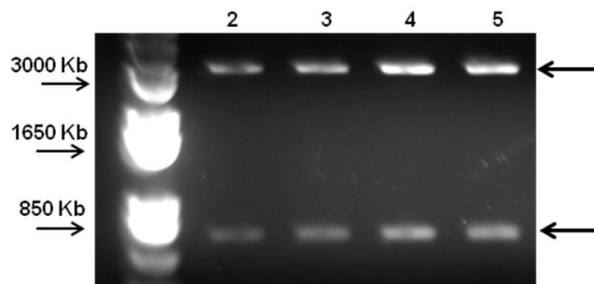
al hecho de que el gen de *H* proveniente de *D. m. rucuca* no contiene intrones. El producto de PCR, obtenido de *D. m. rucuca*, se ligó en el vector pF1A T7 Flexi® siguiendo las instrucciones del Kit, y se obtuvo la construcción pF1A-DS, que se clonó en la cepa de *Escherichia coli* TOP10®.

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 3,100 pb que corresponde al resto del vector. En ausencia del inserto el plásmido sólo se hubiera linearizado mostrando una sola banda de aproximadamente 3,100 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).

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

Figura 2. Muestra los fragmentos esperados de aproximadamente 3,100 y 800 pb

Figure 2. Shows the expected fragments of approximately 3,100 and 800 pb



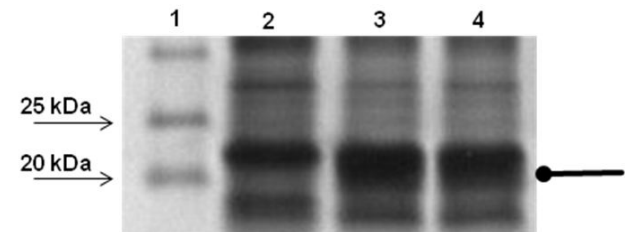
Lanes: 1) molecular weight marker (1 kb plus); 2-5) digestions, with *Sph* I, of plasmids obtained in independent cloning events.

result, amplification of two bands, one of approximately 758 bp, from *D.m rucuca* and another of approximately 1 416 bp from *D.m.*, were obtained. The PCR products correspond to the expected sizes in each case, and the difference in size of the same is due to the fact that gene H from *D.m. rucuca* has no introns. PCR product, obtained from *D.m rucuca*, bond to pF1A T7 Flexi® vector following kit's instructions, and pF1A-DS construction was obtained, which was cloned in *Escherichia coli* TOP10® strain. In order to corroborate the presence of the fragment in the vector, a restriction enzyme analysis using *Sph* I was carried out, this enzyme has two restriction sites, one in vector sequence and another in DS insert. Figure 2 shows the obtained fragments after restriction; a fragment of approximately 800 bp that correspond to insert plus a small part of plasmid, and a fragment of approximately 3,100 bp, which corresponds to the rest of the vector. In absence of the insert, plasmid would be only linearized showing one band of approximately 3,100 bp. It is worth mentioning that sequencing of insert in this vector was carried out and it was confirmed that it corresponded to DS domain sequence (data not shown).

Transcription and translation of DS. Kit TnT® Coupled Reticulocyte Lysate System® was used for transcription and expression of DS, according to manufacturer's instructions. The obtained peptides were analyzed in 10% polyacrylamide gels. Figure 3 shows presence of a peptide of

Figura 3: Expresión *in vitro* del péptido DS

Figure 3. *In vitro* expression of DS peptide



Lanes: 1) molecular weight marker; 2) negative control; 3 and 4) TNT reaction with plasmid pF1A-SD. Arrow with rounded point shows the band of the approximate molecular weight (21 kDa) expected for DS peptide.

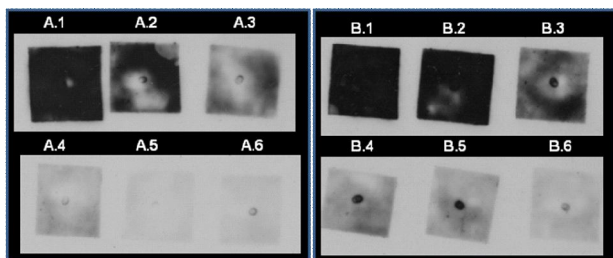
4 la presencia de un péptido de aproximadamente 21 kDa, que corresponde al peso esperado para el péptido DS. Además, dicha banda no aparece en el carril 2, que corresponde al testigo negativo de expresión. Por lo anterior suponemos que el péptido DS se expresa a partir del plásmido pF1A-DS.

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 μg 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*, promueve respuesta ante el antígeno.

Inmunodetección de la proteína H de *D. m.*: Para probar que efectivamente los anticuerpos detectan la proteína H en su dominio DS, contra la cual

Figura 4: Titulación de los sueros de la gallina GN inmunizada con el péptido DS obtenido *in vitro*

Figure 4. Titration of sera from GN hen immunized with DS peptide obtained *in vitro*



Panel A corresponds to pre-immune serum. Panel B corresponds to the obtained serum at the third week of the immunization program. Numbers indicate serum titers as follows: for 1, titer is 1:200; for 2, 1:500; for 3, 1:1,000; for 4, 1:2,000; for 5, 1:3,000; for 6, 1:5,000

approximately 21 kDa in lanes 3 and 4, which corresponds to the expected weight for DS peptide. Also, such band does not appear in lane 2, which corresponds to negative expression control. Therefore, it is supposed that DS peptide is expressed from plasmid pF1A-DS.

Immunogenic activity of DS fragment; immunization and titration by Dot Blot. A productive hen (GN) was immunized as was described. Corresponding sera were obtained after each immunization and they were titered by Dot Blot technique, using as antigen 1 μg of *D.m.* embryo protein total extract. Figure 4 shows the results with serum from GN hen; pre-immune serum from this hen shows weak signaling in different titers (Panel A); however, signaling intensifies with immunizations, as can be observed in the detected signal with the obtained sera at third week immunization (Panel B, 1:5,000 titer), which shows that peptide SD obtained *in vitro*, promotes response in presence of the antigen.

Immunodetection of H D.m. protein: Western blot was used to test hen GN serum, as was previously described, to prove that antibodies do detect H protein by the DS domain. H is a protein produced in lowest quantities and its higher expression peak is during organogenesis. Although there are no protein quantification reports, attempts carried out to detect it in the fruit fly by Western Blot test have been positive, with the limitation of low intensity signaling from total protein extracts of embryos and larvae of this species (Maier, personal communication).

Figure 5 shows immunodetection of H protein using antibodies generated from GN hen. Although signal is weak, antibodies reveal a band with the expected relative migration towards the protein to which it was directed. Maier *et al*⁽¹⁵⁾ directed Ac against two regions of H, using as antigen recombinant proteins; out of the two obtained sera only one achieves to recognize H in wild embryo protein extracts. The other serum only identifies proteins obtained from cellular cultures where H is overexpressed and regulated by heat-shock promoters. Western Blot signal, obtained from the aforementioned study, where a wild embryo antigen

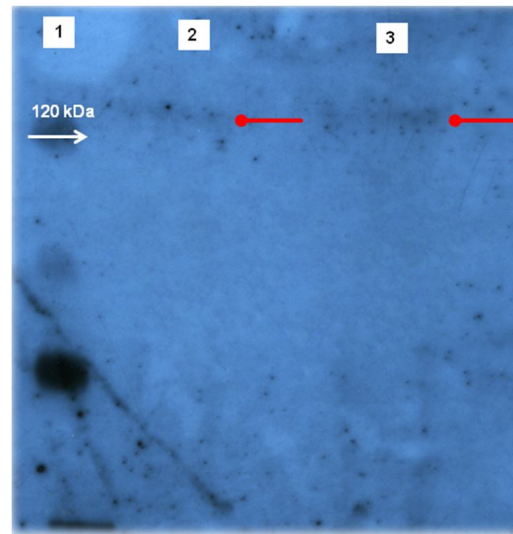
fueron dirigidos, el suero inmune de la gallina GN se utilizó en un Western Blot, con la técnica antes descrita. H es una proteína producida en cantidades ínfimas y su pico más alto de expresión es durante la organogénesis. Si bien no se tienen reportes de la cuantificación de esta proteína, los intentos que se han realizado para detectarla en la mosca de la fruta mediante Western Blot han sido positivos, con la limitante de una baja intensidad de la señal en extractos de proteína total de embriones y larvas de esta especie (Maier, 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 *et al.*⁽¹⁵⁾, dirigieron 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 sobreexpresado 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.

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 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

Figura 5: Western Blot. Suero de la gallina GN a un título de 1:3000

Figure 5. Western blot. Serum from GN hen at a titer of 1:3000



Lane 1, marker. Lane 2, total protein extract of fruit fly embryos. Lane 3, total protein extract of fruit fly larvae. Ac versus DS recognize a band at 120 kDa (round point arrow) that corresponds to an isoform H of the fruit fly.

is used, is well defined for both isoforms of H. In this study, antibodies were obtained from animals immunized by DS from *D.m.* H, and the extracts of proteins used for Dot blot and Western blot were obtained from wild embryos with normal protein expression levels.

Although the signal is weak, antibodies obtained in this study identified only one protein of approximately 120 kDa, which is presumed to be the smaller isoform of H protein; among the multiple protein bands observed by SDS-Page analysis carried out on total protein extracts obtained from *D.m.* embryos. It was demonstrated that by comparing homolog proteins is possible to design and to generate peptides, after their identification as peptides with high immunogenic potential, to be used as antigens in polyclonal antibody generation, which are used in research for their high affinity recognizing molecules, even with few differences between them.

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 al 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*, partenogénicos, y 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 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.

LITERATURA CITADA

1. Bosch P, Blanch MS, Ferrero S, Díaz H, Piccatto F, Bosh RA. Desarrollo de embriones caprinos *in vitro*: Efecto del co-cultivo

These polyclonal antibodies give us the capacity to recognize a highly conserved domain between homolog proteins known as H, and considering that DS serves as protein binding domain to a essential protein from the N signaling pathway function in invertebrates. H protein probably counts with a homolog in metazoon, it is expected that the generated antibodies in this study may also recognize a protein with similar functions to H in higher animal cells, giving option to the possibility to confirm that SHARP/MINT/SPEN proteins can be recognized by the antibodies here reported.

A detailed knowledge of the elements of regulation, either positive or negative, of the signal transduction pathways, is fundamental for implementing strategies that improve handling and survival of *in vitro* mammal embryos and achieve greater penetration of molecular techniques in animal production, where it is necessary to increase the percentage of successful births from embryos generated by *in vitro* fertilization, partenogenetics, and genetically manipulated and implanted into substitute mothers, with the objective to produce animals of human interest that provide higher nutritional quality or be used as bioreactors to produce biomolecules of pharmaceutical or industrial interest.

ACKNOWLEDGEMENTS

Special thanks to Conacyt for granting financial support to the present study by project 25922 CB-2005-01-49402 and for the post-graduate master's degree scholarship granted to H. Contreras-Cornejo, and also to Promep for financial support granted by project PTC-49.

End of english version

con células epiteliales de oviducto. Rev Cient (Maracaibo) 2006;16(3):273-281.

2. Bravo PA, Baizabal AVM. La vía de señalización Notch y el desarrollo embrionario animal. REB 2005;24(3,4):87-96.
3. Artavanis-Tsakonas S, Rand MD, Lake RJ. Notch signaling: Cell fate control and signal integration. Develop Sci 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 VM, Valdez-Alarcón JJ, Cajero-Juárez M, Nagel AC, Preiss A, Maier D, Bravo-Patiño A. Structural analysis of point mutations in the *Hairless* gene and their association with the activity of the Hairless protein. *Int J Biol Macromol* 2008;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 CtBP 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. [on nine]. <http://www.sdbonline.org/fly/hjmuller/hairles1.htm>. Accessed 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 Biol* 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 Cell Biol* 2005;25(23):10433-10441.
14. Bray SJ. 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 AX, Preiss A, Ketelhut M. The tiny Hairless protein from *Apis mellifera*: a potent antagonist of Notch signaling in *Drosophila melanogaster*. *BMC Evolutionary Biol* 2008;8:175.
19. Santos L, León-Galván MF, Marino-Marmolejo. Vía de señalización Notch y nuevas estrategias para el tratamiento de cáncer. *Salud Pub Mex* 2006;48:155-165.
20. Kopan R, Ilagan M X. The canonical Notch signaling pathway: Unfolding the activation mechanism. *Cell* 2009;137(2):216-233.
21. Kyte J, Doolittle R. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J Mol Biol* 1982;157:105-132.