



**UNIVERSIDAD MICHOCANA DE SAN NICOLÁS
DE HIDALGO**

ESCUELA DE QUÍMICO FARMACOBIOLOGÍA

TESIS

**“Caracterización de mutaciones en el gen *Hairless* de
Drosophila melanogaster”**

QUE PRESENTA

DANIEL PAZ GÓMEZ

PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO-FARMACOBIOLOGO

Morelia, Mich., Enero, 2006

AGRADECIMIENTOS

A mi asesor el Dr. Alejandro Bravo Patiño por permitirme trabajar con él.

A mis sinodales Dr. Joel E., Dr. Juan José, Dr. Carlos y Dr. Víctor M. por sus valiosas aportaciones para mejorar el presente trabajo.

A mis padres Raquel y Rafael por darme la vida y la oportunidad de tener una carrera universitaria así como por el amor que siempre recibí de ellos.

A mis hermanos Rafael, Fco. José, Eva y Margarita por su apoyo y cariño.

A mis amigos por su compañía y motivación.

A Haydee por aguantarme y por ser una fuente de inspiración y amor en todo este proceso.

A todos los que se me olvidaron y a los que creen merecer un lugar en estos agradecimientos, para evitar futuros reclamos.

ÍNDICE

GLOSARIO DE ABREVIATURAS UTILIZADAS	IV
RESUMEN	V
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Niveles estructurales de las proteínas.....	1
1.2 Tipos de estructura secundaria de las proteínas.....	2
1.3 Importancia de la vía Notch.....	4
1.4 Estructura de N.....	6
1.5 Funcionamiento de la vía N.....	8
1.6 Hairless y sus co-represores.....	13
1.7 Dominios conservados de <i>Hairless</i>	18
1.8 Mutagénesis.....	19
1.9 Análisis de mutantes <i>Hairless</i>	20
1.10 Análisis PCR-SSCP.....	21
1.11 Métodos para la predicción de la estructura secundaria.....	24
2. JUSTIFICACIÓN	26
3. HIPÓTESIS	27

4. OBJETIVOS	27
4.1 Objetivo general.....	27
4.2 Objetivos específicos.....	27
5. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	28
6. MATERIALES Y MÉTODOS	28
6.1 ADN de líneas de <i>Drosophila</i>	29
6.2 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de los fragmentos del gen <i>H</i>	29
6.3 Análisis SSCP de los fragmentos amplificados.....	29
6.4 Tinción de geles de acrilamida con nitrato de plata.....	31
6.5 Reamplificación de las regiones con posibles mutaciones.....	31
6.6 Purificación en columna del producto de PCR.....	31
6.7 Ligación del producto de PCR.....	32
6.8 Preparación de células competentes de <i>E. coli</i> con CaCl ₂	32
6.9 Transformación de <i>E. coli</i>	32
6.10 Distribución de las células transformadas.....	33
6.11 Minipreparaciones.....	33
6.12 Limpieza con bromuro de etidio y fenol : cloroformo : alcohol isoamílico (25:24:1).....	34

6.13 Digestión de plásmidos con <i>EcoRI</i>	34
6.14 Secuenciación	34
6.15 Análisis de las secuencias.....	35
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	36
7.1 Diseño de oligonucleótidos.....	36
7.2 Amplificación del gen <i>Hairless</i>	36
7.3 Análisis SSCP	37
7.4 Clonación de las regiones del gen <i>Hairless</i> en <i>E. coli</i>	39
7.5 Digestión del plásmido con <i>EcoRI</i>	39
7.6 Secuenciación y análisis de estructuras.....	39
8. CONCLUSIONES	47
9. PERSPECTIVAS	47
10. REFERENCIAS	48
APÉNDICE I. REACTIVOS	54

GLOSARIO DE ABREVIATURAS UTILIZADAS

- aa.** aminoácidos.
- bHLH.** Proteínas nucleares básicas de tipo hélice-lazo-hélice.
- CSL.** CBF1/RBP-J, Supresor de Hairless y Lag-1.
- dCtBP.** Proteína de enlace C-terminal de *Drosophila*.
- DI.** Delta.
- DSL.** Familia Delta-Serrate-Lag-2.
- Dx.** Deltex.
- Dyn.** Dinamina.
- E(spl).** Enhancer of split.
- EGF.** Factor epidérmico de crecimiento.
- Fng.** Fringe (EGF-O-fucosa β 1,3 N-acetil-glucosaminiltransferasa)
- Gro.** Co-represor Groucho.
- H.** Hairless.
- HAT.** Acetilasa de histona.
- HDAC.** Desacetilasa de histona.
- LNG.** LIN-12-Notch-GLP-1.
- Mam.** Mastermind.
- Mib.** Mindbomb.
- N.** Notch.
- NECD.** Dominio extracelular de Notch.
- Neu.** Neuralized.
- NEXT.** Truncado extracelular de Notch.
- NICD.** Dominio intracelular de Notch.
- nt.** nucleótido
- NTM.** Notch transmembranal.
- pb.** Pares de bases.
- PCR.** Reacción en cadena de la polimerasa.
- PEST.** Prolina, Glutamato, Serina y Treonina
- Ser.** Serrate.
- Shi.** Shibire.
- SOP.** Célula precursora de los órganos sensoriales
- SSCP.** Polimorfismo en la conformación de cadenas sencillas.
- Su(dx).** Supresor de Deltex.
- Su(H).** Supresor de Hairless.
- TAD.** Dominio activador transcripcional.

RESUMEN

La vía de señalización Notch, altamente conservada en metazoarios, dirige la diferenciación celular. La proteína Hairless, su principal antagonista caracterizada en *Drosophila melanogaster*, no tiene homólogos conocidos en vertebrados y presenta un bajo grado de conservación aún entre Drosófilidos. Sin embargo Hairless tiene regiones estructurales que se conservan y que presumiblemente son indispensables para su funcionamiento.

Algunas regiones del gen *Hairless* de líneas de *D. melanogaster* mutantes generadas con rayos X se analizaron mediante la técnica de polimorfismo en la conformación de cadenas sencillas (SSCP). Posteriormente, las regiones con posibles mutaciones se secuenciaron y se analizaron con el software DNASTar. Se obtuvo su correspondiente traducción a aa y las diferentes predicciones de la estructura secundaria para las proteínas mutantes obtenidas con el objeto de compararlas con la silvestre.

Se caracterizaron cuatro cambios en igual número de mutantes. En la mutante H¹³³, se localizó una mutación puntual, C por T, dentro de la secuencia del primer intrón, en la posición 631, que aparentemente no afecta la estructura de la proteína. En la mutante H^{w11}, hubo la eliminación de 18 pb, en posición 1429 a 1446, que elimina 6 aa de la proteína (posición 222 a 227) en el dominio de unión a Su(H) que podría repercutir en su interacción con este factor transcripcional. La mutante H³, presentó un cambio de T por C (posición 4648) que se traduce en la sustitución de S por P en la región C-terminal (posición 1050) donde se encuentra el sitio de unión al co-represor dCtBP, lo que también podría modificar la interacción de H con Su(H). La mutante H¹⁰⁷, presentó un cambio de A por G (posición 3664), que se traduce en la sustitución de T por A (posición 722), que genera una hélice α que no existe en la proteína silvestre, lo que podría afectar su interacción con otras proteínas de la vía.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Niveles estructurales de las proteínas

Las proteínas son tan diversas funcionalmente debido a que los aa que las integran son diferentes químicamente. Secuencias distintas de aa producen, de esta forma, diferentes combinaciones de reactividades químicas. Estas combinaciones establecen no sólo la estructura tridimensional de la proteína resultante sino también la posición de los grupos reactivos que determinan las propiedades de la misma (Brown, 2002). Esta estructura puede analizarse en cuatro diferentes niveles (Brown, 2002; Mathews y van Holde, 2001; Lodish *et al.*, 2000; Laguna y Piña, 1994):

1. Primaria. Está formada por la secuencia de unión de los aa en un polipéptido. Los aa se unen por enlaces peptídicos que se forman por una reacción de condensación entre el grupo carboxilo de un aa y el grupo amino de un segundo aa
2. Secundaria. La estructura planar del enlace peptídico restringe las posibilidades del arreglo espacial de la cadena del polipéptido. Cada enlace peptídico planar forma un ángulo en relación al siguiente enlace peptídico, también planar, y se desplaza en relación al carbono α de cada uno de los aa, lo que influye en el plegamiento del polipéptido. El plegamiento es estabilizado por puentes de hidrógeno formados entre diferentes aa en el polipéptido.
3. Terciaria. Resulta del plegamiento de la estructura secundaria del polipéptido en una configuración tridimensional llamada estructura nativa que constituye la conformación activa de la proteína. La estructura terciaria se estabiliza por varias fuerzas químicas como puentes de hidrógeno, fuerzas hidrofóbicas, fuerzas de Van der Waals, atracción electrostática y puentes disulfuro. Una estructura se pliega normalmente en una estructura compacta conocida como proteína globular, un término

asociado tradicionalmente con las proteínas solubles en agua. La secuencia de aa de una proteína y el solvente en el que se encuentra determinan su plegamiento nativo. Los aa polares pueden hidratarse mientras que los aa no polares se unen entre sí y a menudo constituyen el núcleo de la proteína, formando un núcleo hidrofóbico que estabiliza el plegamiento de las proteínas globulares.

4. Cuaternaria. Involucra la asociación de dos o más polipéptidos (subunidades), cada uno plegado en su estructura terciaria, en un complejo proteico. No todas las proteínas forman estructuras cuaternarias pero es una característica de varias proteínas con funciones complejas como las involucradas en la expresión del genoma. Algunas estructuras cuaternarias se mantienen unidas por puentes disulfuro y otras tienen asociaciones débiles como puentes de hidrógeno y fuerzas hidrofóbicas, y pueden modificar su composición de subunidades, de acuerdo a sus requerimientos funcionales.

1.2 Tipos de estructura secundaria de las proteínas

En una proteína promedio, el 60% de la cadena existe como dos estructuras secundarias regulares: hélices α y láminas β ; el resto de la molécula consta de giros y regiones al azar (Lodish *et al.*, 2000):

Hélice α . En esta estructura, el oxígeno del carbonilo de cada enlace peptídico forma un puente de hidrógeno con la amina del cuarto aminoácido hacia la región C-terminal (ver **Figura 6**). Este arreglo uniforme le confiere una polaridad sobre la hélice ya que todos los donantes del hidrógeno para el enlace tienen la misma orientación. El esqueleto peptídico se tuerce en una hélice con 3.6 aa por giro. La característica hidrofóbica o hidrofílica de la hélice está determinada completamente por las cadenas laterales porque los grupos polares del esqueleto peptídico están involucrados en los puentes de hidrógeno y son incapaces de afectar su hidrofobicidad o hidrofiliidad. En muchas hélices α las cadenas

laterales hidrofílicas se extienden en un lado de la hélice y las hidrofóbicas lo hacen en el lado opuesto haciendo a la estructura anfipática.

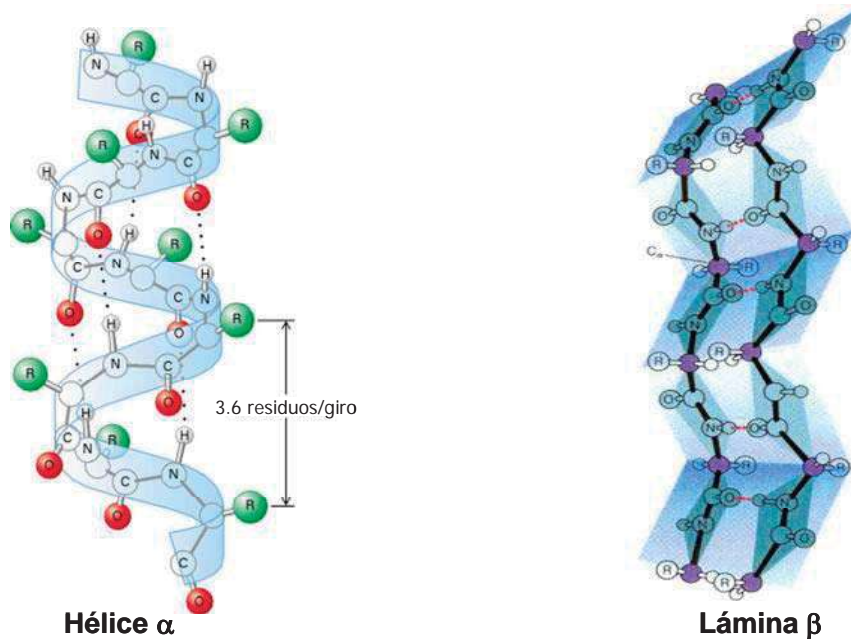


Figura 6. Estructuras secundarias más comunes. Hélice α con 3.6 residuos de aa por giro en la que los puentes de hidrógeno se forman dentro de una única cadena polipeptídica (Tomada de Lodish *et al.*, 2000). Lámina β , en la que los puentes de hidrógeno se forman entre cadenas adyacentes (Tomada de Mathews y van Holde, 2001).

Lámina β . Consiste de cadenas empacadas lateralmente (ver **Figura 6**). Cada cadena β consta de 5 a 8 residuos de aa y está casi totalmente extendida. Los puentes de hidrógeno entre átomos en las cadenas β adyacentes, ya sea en la misma o en diferentes cadenas polipeptídicas, forman una lámina β .

Giros. Están compuestos de tres o cuatro residuos de aa y son estructuras compactas en forma de U estabilizadas por puentes de hidrógeno entre los residuos terminales. Se localizan en la superficie de la proteína formando un plegamiento cerrado que dirige el esqueleto polipeptídico hacia el interior. Sin giros, una proteína estaría extendida y pobremente empaquetada.

Una estructura secundaria se forma alrededor de un grupo de aa que la promuevan, luego se extiende para incluir los aa adyacentes que favorezcan esa estructura o que no tengan una fuerte tendencia contra ella, y finalmente termina

cuando alcanza uno o más aa que no pueden participar en ése tipo particular de estructura bloqueándola. Este proceso de nucleación, extensión y delimitación se repite a lo largo del polipéptido hasta que cada segmento de la misma haya adoptado su estructura secundaria preferida (Brown, 2002).

1.3 Importancia de la vía Notch

Los procesos celulares complejos que se llevan a cabo durante el desarrollo de los eucariontes multicelulares (i.e. crecimiento celular, proliferación, supervivencia, destino, diferenciación y morfogénesis) están coordinados por un grupo de vías de transducción de señales evolutivamente conservadas, que activan o reprimen diferentes genes en patrones temporales y espaciales precisos en el organismo. En los metazoarios se conocen 17 de estas vías, de las cuales 5 actúan predominantemente en el desarrollo temprano del embrión (Wnt, TGF- β , Hedgehog, RTK y Notch), 5 lo hacen durante el desarrollo tardío del embrión (receptor de citosina, NF κ B, receptor hormonal nuclear, apoptosis y receptor de fosfotirosina fosfatasa) y las 7 restantes participan en el funcionamiento de las células diferenciadas (Gerhart, 1999).

Las vías de transducción de señales parten de una señal extracelular liberada por alguna célula del organismo. A esta señal se le conoce como ligando, ya que eventualmente se une a una proteína receptora específica en la misma célula o en otra. Los ligandos pueden ser desde proteínas complejas hasta moléculas pequeñas, como los esteroides. Algunos requieren de procesamiento en el espacio extracelular antes de unirse al receptor y otros requieren la presencia de componentes de la matriz extracelular. La mayoría de las vías de transducción involucran a una proteína transmembranal receptora que se une al ligando que no puede atravesar por sí solo la membrana plasmática. Cuando un ligando se une al receptor transmembranal, este último cambia su conformación y transduce una señal hacia el interior de la célula. Esto “dispara” una serie de cambios de estado sucesivos en los intermediarios de la vía pasando cada uno de

inactividad a actividad, o viceversa, hasta llegar al núcleo donde promueven o reprimen la transcripción de genes (Gerhart, 1999).

Uno de los mecanismos más importantes de señalización celular está mediado por Notch (N), una proteína transmembranal de ~3,000 residuos de aa y ~300 kDa de peso, que coordina la vía de señalización del mismo nombre. N fue identificado hace casi 100 años en una línea mutante de *Drosophila melanogaster* haploinsuficiente (la inactivación del gen produce un cambio en el fenotipo del organismo mutante) con muescas (*notch*, en inglés) en sus alas (Morgan, 1917), lo que indicaba la participación de N en el desarrollo de éstas. Desde entonces se ha encontrado que N es fundamental en el desarrollo embrionario de los metazoarios permitiendo que la diferenciación celular se lleve a cabo de manera correcta. Por ello, no es de sorprender que la vía N se conserve en grupos taxonómicos tan diferentes como gusanos y mamíferos (ver **Tabla 1**).

Las proteínas principales que componen a la vía N pueden dividirse en los siguientes grupos (ver **Tabla 1**):

- a) Ligandos. Proteínas responsables de activar la vía de señalización N en la célula receptora (Fleming, 1998; Greenwald, 1998).
- b) Receptores. Proteínas transmembranales que al unirse al ligando sufren un rompimiento proteolítico activando la vía N en la célula receptora (Gerhart, 1999).
- c) Factores transcripcionales. Proteínas que se unen directamente al ADN y activan la transcripción de los genes específicos de la vía (Gerhart, 1999).
- d) Represores y co-represores. Proteínas nucleares que antagonizan la actividad transcripcional de los receptores (Morel *et al.*, 2001).
- e) Enzimas. En este grupo se encuentran las glicosiltransferasas, proteasas, metaloproteasas y ubiquitina-ligasas involucradas en las modificaciones postraduccionales del receptor.

Tabla 1. Componentes de la vía de señalización Notch en diferentes especies

GEN	ORGANISMO	PROTEÍNA	HOMÓLOGO EN MAMÍFEROS
A. Ligandos.			
<i>apx-1</i> <i>lag-2</i> Delta Serrate	<i>C. elegans</i> <i>C. elegans</i> <i>Drosophila</i> <i>Drosophila</i>	Familia DSL (Delta-Serrate-Lag-2)	Delta-like 1, 2, 3 Jagged 1, 2
B. Receptores.			
<i>lin-12</i> Notch <i>glp-1</i>	<i>C. elegans</i> <i>Drosophila</i> <i>C. elegans</i>	Familia LIN-12/Notch	Notch1, 2, 3, 4
C. Represores y co-represores.			
<i>Hairless</i> Groucho CtBP	<i>Drosophila</i> <i>Drosophila</i> <i>Drosophila</i>	Enlaza a Su(H) Co-represor Co-represor	TLE
D. Factores de la transcripción.			
Supresor de <i>Hairless</i> <i>lag-1</i> <i>emb-5</i>	<i>Drosophila</i> <i>C. elegans</i> <i>C. elegans</i>	Factor de transcripción Relacionada a la proteína de control de la cromatina en levadura.	CBF1 (RBPJκ) D79984
Complejo <i>E(spl)</i> Complejo <i>a-c</i> CBF1	<i>Drosophila</i> <i>Drosophila</i> <i>Xenopus</i>	Factores de transcripción bHLH Factores de transcripción bHLH Factor de transcripción	Hairy/ <i>E(spl)</i> (HES) MASH
E. Glucosiltransferasas.			
<i>fringe</i>	<i>Drosophila</i>	Glucosiltransferasa	Manic, Radical, Lunatic Fringe (Lfng) POFUT1
<i>O-Fuct-1</i> <i>C15C7.1</i>	<i>Drosophila</i> <i>C. elegans</i>	Glucosiltransferasa Glucosiltransferasa	
F. Proteasas y metaloproteasas.			
<i>Nrarp</i> <i>kuz</i>	<i>Xenopus</i> <i>Drosophila</i>	Proteasa Metaloproteasa	ADAM10 (TACE)
<i>sip-17</i> <i>sel-12</i> <i>hop-1</i>	<i>C. elegans</i> <i>C. elegans</i> <i>C. elegans</i>	Proteína transmembranal de paso múltiple <i>Drosophila</i>	Presenilina 1,2
G. Ubiquitinaligasas.			
<i>sel-1</i> <i>sel-10</i> <i>neuralized</i> <i>deltex</i> Supresor de <i>deltex</i>	<i>C. elegans</i> <i>C. elegans</i> <i>Drosophila</i> <i>Drosophila</i> <i>Drosophila</i>	Similar a HRD3 en levadura Caja F/repetido WD40 Ubiquitinaligasa clase E3 Ubiquitinaligasa clase E3 Ubiquitinaligasa clase E3	IBD2 SEL-10 Itch

Bravo-Patiño y Baizabal-Aguirre (2005)

1.4 Estructura de N

La proteína N está constituida por dos dominios (ver **Figura 1**). El dominio extracelular (NECD) presenta de 34 a 36 elementos repetidos del factor epidérmico de crecimiento (EGF); de los cuales los EGF 11 a 13, 23 a 27 y 31 a 34 están conservados en distintas especies y le confieren a N niveles adicionales

de regulación tejido-específicos (Baron *et al.*, 2002). Los EGF 11 y 12 son necesarios y suficientes para interactuar con los ligandos Delta (DI) y Serrate (Ser), mientras que la O-fucosilación de los EGF 24, 25 y 26 es un proceso crítico para la señalización dependiente del ligando Serrate (Baron *et al.*, 2002). Siguiendo a estos EGF, se encuentran tres regiones ricas en cisteína (CR), conocidas como secuencias repetidas LIN-12-Notch-GLP-1 (LNG), esenciales para la estabilidad y correcta conformación de este dominio. Inmediatamente después, y en la zona que existe entre los dos dominios, se encuentran dos residuos de cisteína importantes para el ensamble de la forma biológicamente activa de esta proteína.

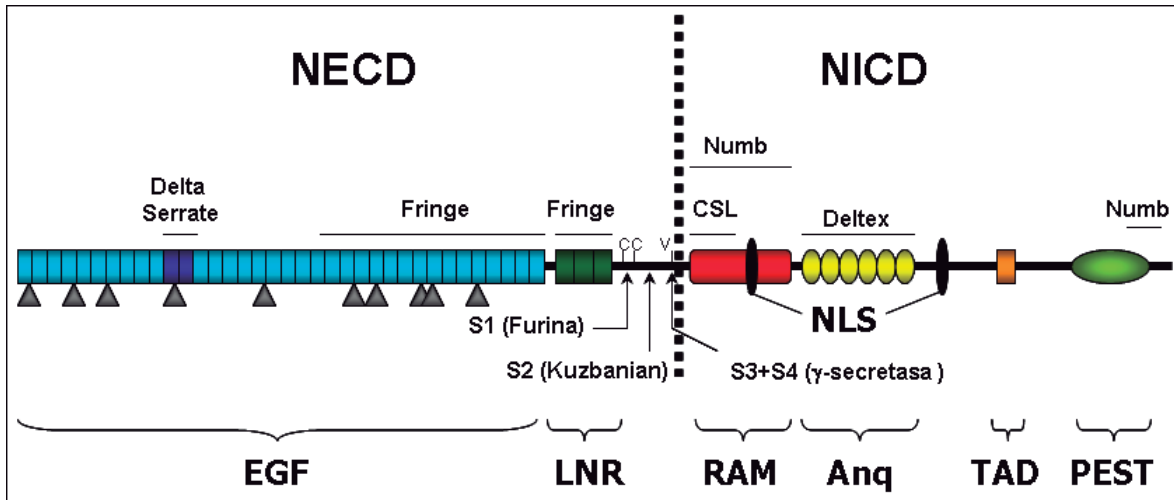


Figura 1. Diagrama estructural de Notch. La línea punteada divide el dominio extracelular (NECD) del intracelular (NICD). EGF repetidos de factor de crecimiento epidérmico, los EGF 11 y 12 están señaladas en azul oscuro; LNG secuencias repetidas LIN-12-Notch-GLP-1 ricas en cisteína; dominio RAM; Anq repetidos de anquirina; TAD dominio activador transcripcional; PEST secuencia de Prolina, Glutamato, Serina y Treonina; NLS señales de localización nuclear. Los triángulos indican los sitios de O-fucosilación. Las líneas indican las regiones de interacción con los ligandos DI y Ser, las enzimas Fringe y Deltex, el factor transcripcional CSL y la proteína Numb. Se indican también las 2 cisteínas conservadas (C), la valina (V) donde ocurre el procesamiento proteolítico y la posición de los sitios de rompimiento (S1-S4), así como las enzimas implicadas en dichos rompimientos entre paréntesis. (Modificada de Schweisguth, 2004)

El dominio intracelular de esta proteína se encuentra conservado en el reino animal. Cerca de la zona transmembranal y hacia la región N-terminal, se encuentra un residuo de valina, que es donde ocurre el procesamiento proteolítico que libera a Notch intracelular activo (NICD). Después, y hacia la región C-terminal, se localizan el dominio RAM y seis repetidos de anquirina, mediante los

cuales NICD interactúa con los factores activadores de la transcripción. Los repetidos de anquirina se encuentran flanqueados por dos señales de localización nuclear (NLS), que le permiten a NICD entrar a núcleo. Enseguida se hallan el dominio activador transcripcional (TAD), cuya función es reclutar acetilasas de histonas para generar una conformación abierta de la cromatina en la doble cadena del ADN; y una secuencia PEST (Prolina, Glutamato, Serina y Treonina) relacionada con proteínas de vida corta, ya que es el sitio de ubiquitinación de NICD (Mathews y van Holde, 2001; Baron *et al.*, 2002; Baron, 2003).

1.5 Funcionamiento de la vía N

Para que N sea biológicamente funcional, necesita de un procesamiento complejo (ver **Figura 2**). Primero, toda proteína N sintetizada *de novo* en retículo endoplásmico, pasa a la red trans-Golgi donde es glicosilada por dos enzimas. La enzima O-FucT-1, fucosila en los residuos de Serina o Treonina de sus repetidos de EGF y la enzima Fringe (Fng; EGF-O-fucosa β 1,3 N-acetilglucosaminiltransferasa), adiciona residuos de N-acetilglucosamina (GlcNAc) a los grupos 3'-OH de las fucosas unidas a los repetidos de EGF (Haltiwanger, 2002; Haines e Irvine, 2003). En mamíferos los residuos de galactosa (Gal) y ácido siálico (Sia) son adicionados consecutivamente con enlaces β -1,4 y α -2,3, respectivamente, formándose así el tetrasacárido $\text{Sia}\alpha$ 2,3Gal β 1,4GlcNAc β 1,3Fuc (Haltiwanger, 2002; Haltiwanger y Stanley, 2002). Posteriormente, N es procesado por proteasas de la familia de la Furina en el sitio S1 (Logeat *et al.*, 1998). Este último proceso, al parecer indispensable en mamíferos, no es estrictamente necesario en mosca (Kidd *et al.*, 2002) y ocasiona que N procesado se acumule en la membrana plasmática como un heterodímero formado por NECD y por un dominio transmembranal llamado NTM. NECD y NTM interactúan no covalentemente en una forma dependiente de Ca^{2+} (Rand *et al.*, 2000), en cuya asociación participan 2 cisteínas (Baron *et al.*, 2002).

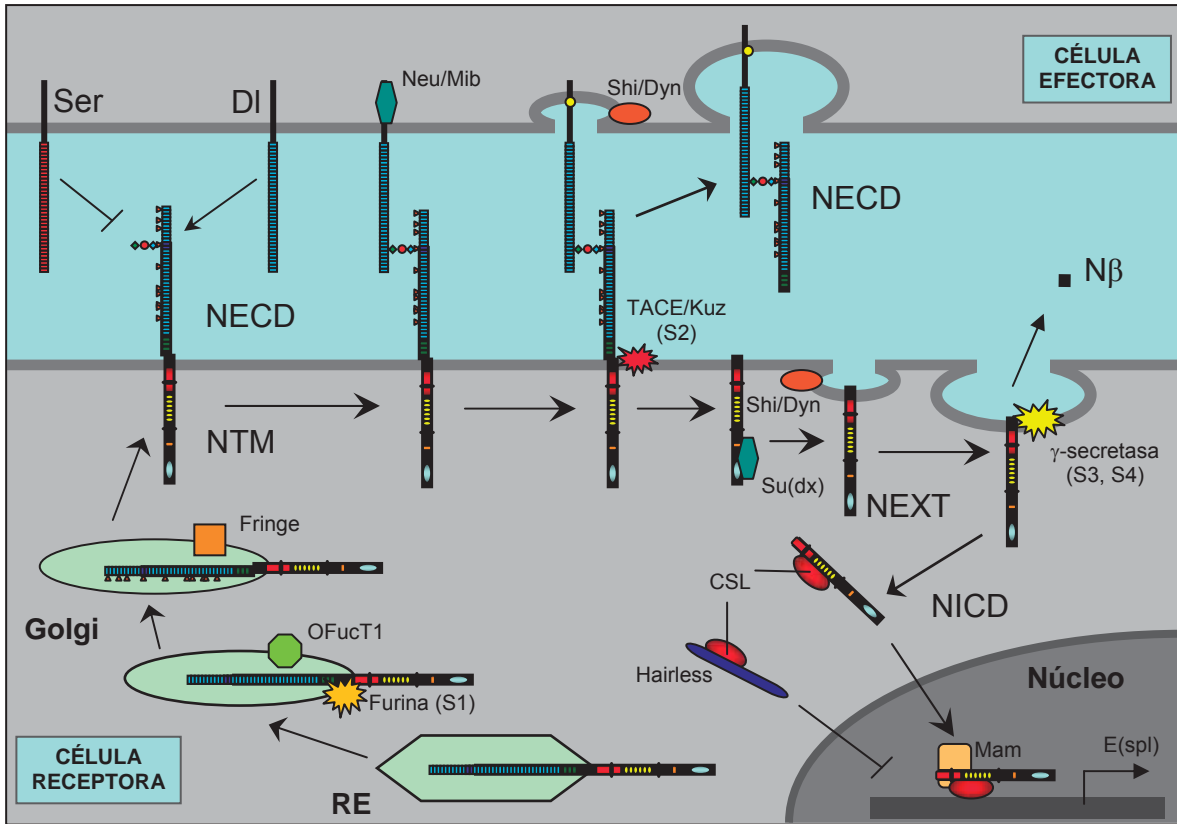


Figura 2. La vía Notch. Notch, producida en el retículo endoplásmico, pasa a la red trans-Golgi donde es escindido en S1 por Furina y O-fucosilado por O-FucT-1. Fringe puede adicionar N-acetilglucosamina a la cadena de O-fucosa favoreciendo la señalización por Delta (DI) e inhibiendo la de Serrate (Ser). El ligando es ubiquitinado por neuralized/mindbomb (Neu/Mib) lo que lleva a su endocitosis vía shibire/dinamina (Shi/Dyn). Esto produce un cambio conformacional en NECD/NTM que permite que ADAM/TACE/Kuzbanian haga un segundo corte en S2 liberando a NECD para que sea endocitado junto con DI. NEXT es endocitado a un compartimento que contiene la actividad de γ -secretasa en un proceso similar al del ligando previa ubiquitinación por Supresor de deltex [Su(dx)]. Una vez ahí, NEXT es escindido en 2 sitios (S3 y S4) separándose en un péptido pequeño (N β , que es liberado) y en NICD. NICD migra al núcleo formando un complejo con CSL y Mastermind (Mam) activando la transcripción de los genes blanco de la vía como Enhancer of split [E(spl)]. Este último proceso es antagonizado por el complejo formado por Hairless y CSL (Baron *et al.*, 2002; Lai, 2002; Haltiwanger, 2002; Haines e Irvine, 2003; Le Borgne y Schweisguth, 2003; Schweisguth, 2004).

En este punto, N se encuentra listo para que cualquiera de los ligandos Delta (DI) y Ser (Jagged en vertebrados), de una célula pluripotencial, definida como célula de decisión primaria, lo active. Esta activación es un proceso modulado diferencialmente por la glicosilación que ocurre en los repetidos EGF de N modificados por Fng, ya que este proceso potencializa la habilidad de DI para activar N y al mismo tiempo inhibe la unión de Ser con N en la célula estimulada (Haltiwanger y Stanley, 2002; Haines e Irvine, 2003).

Un paso crítico para la señalización eficiente por DI y Ser es su ubiquitinación, regulada por los genes *neuralized (neu)* en *Drosophila* y *mind-bomb (mib)* en pez cebra (Le Borgne *et al.*, 2005). La ubiquitina es un polipéptido de 76 aa que se une covalentemente a proteínas en una reacción de varios pasos que involucra una enzima activadora (E1) y una conjugadora (E2) de la ubiquitina; así como una ubiquitina-proteína ligasa (E3). Las E3 catalizan la transferencia de ubiquitina a un sustrato proteico, etiquetándolo para su degradación proteolítica. Sin embargo, recientemente se ha demostrado que la ubiquitinación también sirve como una señal para la endocitosis mediada por Clatrina que requiere de las GTPasas Dinamina (Dyn) en vertebrados y Shibire (Shi) en *Drosophila* (Schweisguth, 2004; Le Borgne *et al.*, 2005).

Neur y Mib son dos E3-ligasas evolutivamente conservadas que interactúan físicamente con DI y Ser mediando su ubiquitinación. Se postula que ambas promueven la internalización del ligando como un requisito para la activación de N (Schweisguth, 2004). El cambio conformacional causado por esta endocitosis sensibiliza a NTM para que sea escindida en el sitio S2 por proteasas extracelulares de la familia ADAM/TACE/Kuzbanian (Brou *et al.*, 2000; Mumm *et al.*, 2000; Lieber *et al.*, 2002), liberando a NECD y generando una forma activa ligada a la membrana llamada NEXT. Es posible que la ubiquitinación promueva también la posterior degradación de los ligandos.

Se ha sugerido que NEXT es endocitado después en un proceso posiblemente regulado por las E3-ligasas Supresor de Deltex [Su(dx); Itch en vertebrados] y Deltex (dx) para llevarlo a un compartimiento intracelular que contiene la actividad de γ -secretasa del complejo proteico Presenilina-Nicastrina-Aph1-Pen2 (Schweisguth, 2004; Fortini, 2001; De Strooper, 2003). Una vez ahí, NTM es escindido en dos sitios, S3 y S4 (Jarriault *et al.*, 1995; Okochi *et al.*, 2002; Schroeter *et al.*, 1998), lo que libera a NICD hacia el interior de la célula y N β , un péptido pequeño, hacia el exterior (Okochi *et al.*, 2002). Luego NICD se une, por medio del dominio RAM y las repeticiones de anquirina, directamente a CSL

(CBF1/RBP-J en mamíferos, Supresor de Hairless [Su(H)] en *Drosophila* y *Xenopus*, y Lag-1 en *Caenorhabditis elegans*) y migra al núcleo formando un complejo con las proteínas Mastermind (Mam) y/o SKIP (Le Gall y Giniger, 2004; Schweisguth, 2004).

Este último proceso es antagonizado, en *D. melanogaster*, por la proteína Hairless (H) que forma un complejo con Su(H) para reprimir la transcripción de los genes blanco de la vía N, dentro de los cuales están *single minded*, *vestigial*, *pax2/sparkling*, el mismo *Su(H)* y, principalmente, los genes del locus *Enhancer of split* [*E(spl)*], que codifican para las proteínas nucleares básicas de tipo hélice-lazo-hélice (bHLH): M δ , M β , M γ , M3, M5, M7 y M8. Estas proteínas bHLH son factores que regulan, a su vez, la transcripción de genes tales como los del complejo *Achaete-Scute*, que contiene genes proneurales (Bray y Furriols, 2001; Artavanis-Tsakonas *et al.*, 1999). La expresión de dichos genes estimula a la célula receptora hacia una diferenciación distinta a la de la célula de decisión primaria (Artavanis-Tsakonas *et al.*, 1995; Kopan y Turner, 1996; Lai, 2004).

La vía Notch controla el destino de las células que se encuentran en proceso de diferenciación, mediante tres mecanismos (Lai, 2004; ver **Figura 3**):

- a) Inhibición lateral. Un grupo de células equipotenciales inicialmente envían y reciben señales Notch (inhibición mutua). Después, una célula toma un destino celular e inhibe a las que la rodean forzándolas a tomar un destino celular alterno. Este mecanismo se presenta en la selección de una célula de entre un grupo de células para convertirse en precursora de los órganos sensoriales (SOP).

- b) División asimétrica o decisión de linaje. En cada división celular, N está activo en una célula hija pero no en la otra, a pesar de que ambas expresan N y Dl. Esto debido a la segregación asimétrica de factores como Numb, una proteína que se une directamente a N impidiendo que

se active con lo que se producen los distintos tipos celulares. Un ejemplo clásico de esto es la formación del órgano mecanosensorial de la mosca.

- c) Señalización inductiva. En muchos casos, la señalización N crea un nuevo tipo celular como resultado de interacciones célula-célula en la interfase entre poblaciones celulares diferentes. El ejemplo más estudiado ocurre durante el desarrollo del ala en *Drosophila*.

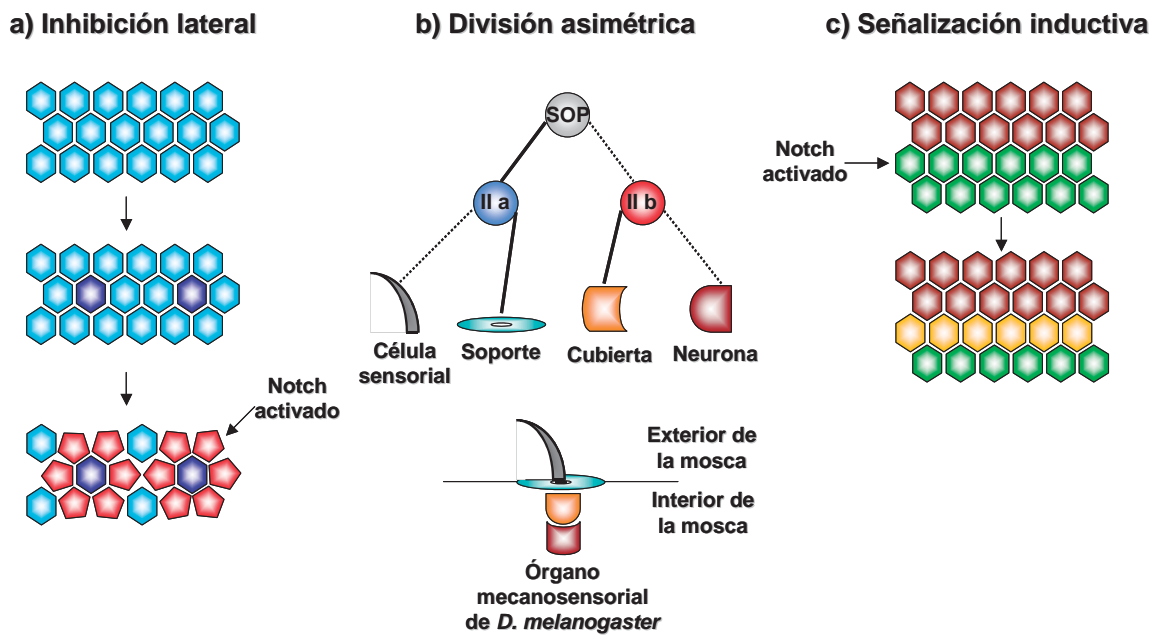


Figura 3. Mecanismos de acción de Notch. **Inhibición lateral** De un grupo de células precursoras equivalentes (azul cielo), unas de ellas toman un destino celular (azul oscuro) activando Notch en las células adyacentes obligándolas a tomar un destino celular alternativo (pentágonos rojos). **División asimétrica** Formación del órgano mecanosensorial de la mosca a partir de una célula precursora (SOP). En cada división celular Notch está activo en una célula (línea continua) pero inactivo en la otra (línea punteada) dando como resultado distintos tipos celulares. **Decisión de linaje** En dos grupos celulares adyacentes completamente diferenciados, uno de ellos (marrón) activa la señalización Notch en el otro grupo (verde) obligándolo a formar un grupo celular diferente (oro) en la interfase entre ellos (Bravo-Patiño y Baizabal-Aguirre, 2005).

Las alteraciones en la señalización por Notch en humanos están relacionadas con varias enfermedades (**Tabla 2**) y en embriones de *D. melanogaster* son generalmente letales.

Tabla 2. Patologías producidas por alteraciones en la vía Notch

Enfermedad	Alteración	Síntomas
Alzheimer ¹	Mutaciones en presenilinas asociadas con precursores β -amiloides	Demencia senil arteriosclerosa
Leucemia de células T ²	Traslocación cromosómica t(7;9) que lleva a la producción de un dominio intracelular activo de Notch1 constitutivo	Proliferación anormal de células madres hematopoiéticas
Síndrome de Alagille ³	Mutaciones en el ligando Jagged1	Deficiencias en el desarrollo de órganos como hígado, esqueleto, corazón y ojo
CADASIL ⁴	Mutaciones en las repeticiones extracelulares de EGF en Notch3	Demencia, migrañas e infartos
Disostosis espondilocostal ⁵	Mutaciones en el ligando Delta-like3	Fusión de costillas y subdesarrollo del tronco

¹ Artavanis - Tsakonas *et al.*, 1995; Nye, 1997; Greenwald, 1998. ² Ellisen *et al.*, 1991; Campese *et al.*, 2003; ³ Li *et al.*, 1997; Oda *et al.*, 1997; ⁴ Joutel *et al.*, 1996; ⁵ Bulman *et al.*, 2000.

1.6 Hairless y sus co-represores

Hairless (H) es una proteína básica de más de 1,000 residuos de aa con una inusual abundancia de los aa serina, treonina, alanina y prolina que constituyen ~50% de la proteína (Marquart *et al.*, 1999). H actúa como un potente antagonista de la vía Notch y de la función de activador transcripcional de Su(H) (ver **Figura 4**) y se requiere para la especificación de muchos destinos celulares (Bang *et al.*, 1995; Bang y Posakony, 1992; Schweisguth y Posakony, 1994; Lyman y Yedvobnick, 1995). Además, se ha demostrado que la pérdida de H aumenta la expresión de genes blanco de la vía de señalización N (Barolo *et al.*, 2000; Klein *et al.*, 2000; Morel *et al.*, 2001). La actividad de H aumenta durante la

embriogénesis, donde se acumula principalmente en endodermo y mesodermo, y disminuye durante las etapas larvales (Maier *et al.*, 1992).

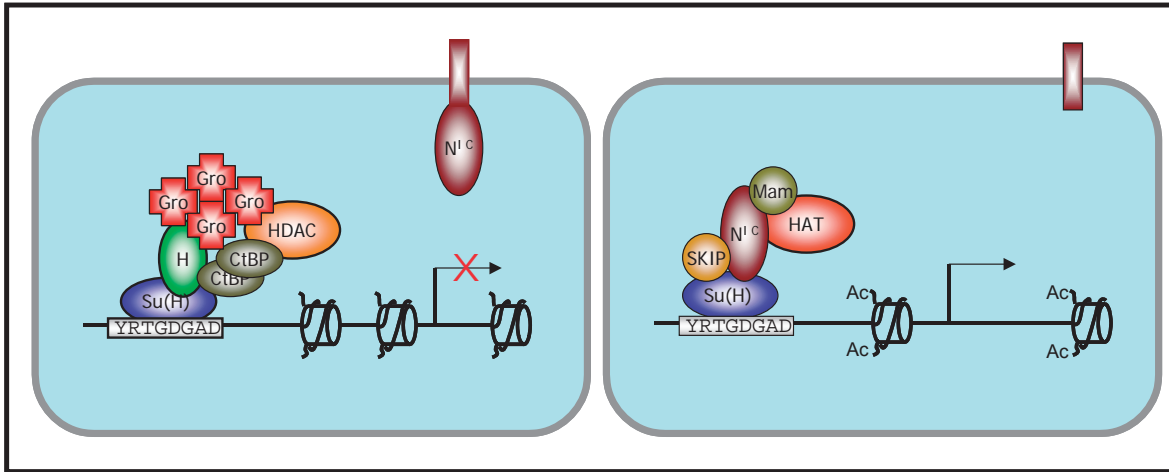


Figura 4. Función de Hairless. En ausencia de señalización Notch (izquierda), el complejo represor formado por Hairless, sus co-represores (Groucho y dCtBP) y las desacetilasas de histonas (HDAC) se unen al complejo Supresor de Hairless-ADN impidiendo la transcripción de los genes blanco de la vía. Cuando hay señalización N (derecha), Notch intracelular (NIC) desplaza al complejo represor de Hairless y forma uno propio con SKIP, Mastermind y acetilasas de histona, promoviendo la expresión de los genes blanco de la vía, lo que se observa en la acetilación de las histonas. (Modificado de Lai, 2002; Nagel *et al.*, 2005)

En un principio se pensó que H podría impedir que Su(H) se uniera al ADN, sin embargo, experimentos posteriores demostraron que H podía unirse al complejo Su(H)-ADN en ensayos de retardo en gel (EMSA) y reclutar co-represores transcripcionales para reprimir la transcripción de los genes blanco de la vía N especificando un destino celular primario (Morel *et al.*, 2001; Barolo *et al.*, 2002).

Uno de los dos co-represores transcripcionales necesarios para el correcto funcionamiento de H es el co-represor dCtBP (proteína de enlace C-terminal de *Drosophila*) que interacciona con la secuencia C-terminal de H (PLNLS) puesto que la eliminación de dicha secuencia interfiere con su capacidad de antagonizar la señalización Notch (Barolo *et al.*, 2000; Nagel *et al.*, 2005).

Groucho (Gro) es el otro co-represor que se une a H. Los embriones mutantes *gro* presentan un exceso de diferenciación neural, lo que indica una falla en la inhibición lateral mediada por N (Barolo *et al.*, 2002). Gro funciona como un co-represor para las siete proteínas represoras bHLH codificadas por el complejo *Enhancer of split* [*E(spl)*-C], que se encuentran entre los objetivos transcripcionales mejor caracterizados de la vía Notch. Gro se une directamente a los motivos WRPW y YSIHSLLG localizados en el extremo C-terminal de los represores bHLH y en la secuencia de H, respectivamente. Como en el caso de dCtBP, las mutantes *gro* aumentan los fenotipos H y reprimen los N durante el desarrollo de los órganos sensoriales (Barolo *et al.*, 2000). Estas observaciones sugieren un papel doble para Gro, ya que funciona como un componente positivo de los procesos regulados por N cuando la señalización está activa [como un co-represor para las proteínas *E(spl)*/bHLH], y como un antagonista de los mismos procesos en ausencia de señalización [como un co-represor para el complejo Su(H)-H, que reprime la expresión de *E(spl)*/bHLH].

Tanto dCtBP como Gro interactúan directamente con una gran variedad de factores de transcripción en *Drosophila* para regular la represión transcripcional. Dos de estos factores, Hairy y Brinker, se unen a ambos (Paroush *et al.*, 1994; Poortinga *et al.*, 1998; Hasson *et al.*, 2001). La utilización de múltiples co-represores podría permitir una flexibilidad en la regulación de diferentes promotores.

Gro es un co-represor de largo alcance que silencia la transcripción de los promotores, puede silenciar un locus completamente sin importar dónde se una con relación al promotor o al activador unido al ADN. Esto contrasta con dCtBP que reprime la transcripción sólo si está a menos de 100 pb del promotor o del activador (Song *et al.*, 2004).

El complejo formado por estos co-represores recluta desacetilasas de histona (HDAC). La acetilación de la cromatina se correlaciona con su

competencia transcripcional: mientras que una hipoacetilación de las histonas por HDAC está ligado a una cromatina reprimida e inactiva transcripcionalmente; su hiperacetilación promueve un estado de la cromatina transcripcionalmente activo (Lai, 2002). Aunque el mecanismo por el cual la acetilación de las histonas controla la actividad genética no está claro, se cree que ésta interrumpe los contactos internucleosomales, produciendo una forma menos compacta de cromatina que es más accesible a la maquinaria transcripcional (Courey y Jia, 2001).

Las enzimas que modifican a las histonas, tales como las HDAC, normalmente actúan de manera local para modificar únicamente regiones de entre 100 y 200 pb alrededor del sitio de unión. Gro de *Drosophila* presenta interacciones genéticas y físicas con la enzima HDAC Rpd3 (Lai, 2002); sin embargo, como se señaló antes, Gro tiene un rango de acción mayor. Song *et al.* (2004) demostraron que Gro puede formar oligómeros de orden mayor y que esto es esencial para su actividad represora, lo que podría explicar el alcance de Gro. Los represores de largo alcance poseen generalmente la habilidad de polimerizarse, lo que posiblemente les permite propagarse a lo largo de la estructura de la cromatina estableciendo un dominio transcripcionalmente silenciado. Además de tener la habilidad de oligomerizarse, Gro se une a los extremos hipoacetilados de histonas y tiene la habilidad de reclutar HDAC de forma que aumenta su afinidad. Esto trae como consecuencia el establecimiento de un estado silenciado transcripcionalmente que se autorrefuerza (Song *et al.*, 2004).

dCtBP contiene regiones de homología elevada con una familia de deshidrogenasas que se cree actúan como dominios de dimerización. Consistente con el hecho de que puede interactuar consigo misma (Poortinga *et al.*, 1998), Lai (2002) sugirió que dímeros de dCtBP podrían formar un puente entre el complejo Su(H)-H y HDAC.

Es importante notar que algunos aspectos de la represión mediada por CSL o sus co-represores podrían ser independientes de HDAC. Se ha sugerido que algunos miembros de la familia Gro pueden también interactuar directamente con la maquinaria de transcripción basal e inhibirla (Courey y Jia, 2001). La similitud de dCtBP con deshidrogenasas y el hecho de que su homólogo en rata presente actividad de acil transferasa, sugieren que podría ejercer parte de su efecto a través de una actividad enzimática intrínseca (Lai, 2002).

Algunos estudios indican que la reacción opuesta, la acetilación de las histonas, es un mecanismo intrínseco característico de la activación transcripcional por el complejo CSL/NICD. De hecho, NICD de mamíferos es capaz de asociarse con múltiples acetiltransferasas de histonas (HAT), incluyendo p300/CBP y PCAF/GCN5. Estudios posteriores mostraron que PCAF/GCN5 de mamíferos también interactúa con NICD de *Drosophila*, sugiriendo que esta interacción se conserva en los complejos coactivadores de CSL. Los mecanismos exactos de unión de HAT no están completamente resueltos, los estudios anteriores sugieren una interacción física directa con NICD, mientras que estudios recientes sugieren que HAT se une a NICD vía la proteína Mam. Tampoco se sabe si múltiples HAT se unen simultáneamente al complejo coactivador de CSL o son utilizados individualmente en diferentes condiciones. Estos resultados en conjunto proponen que la represión y activación transcripcional de los genes por proteínas CSL está ligado coordinadamente a la hipo e hiperacetilación de las histonas, respectivamente (revisado en Lai, 2002).

Además se han reportado experimentos que sugieren una actividad de H independiente de Su(H) en la vía de señalización EGF durante la formación de las venas del ala en *Drosophila* (Johannes y Preiss, 2002). A esto se suma la observación de dos isoformas de la proteína H^{p120} y H^{p150} de ~120 y ~150 kDa, respectivamente, que son indispensables para el desarrollo normal de *D. melanogaster*. H^{p120} es producida debido a un segundo codón de iniciación en la posición 19 del gen *H*. En larvas de *D. melanogaster*, la traducción de las

isoformas está regulada por el ciclo celular, H^{p150} se traduce durante la interfase, mientras que H^{p120} lo hace durante la mitosis (Maier *et al.*, 2002).

1.7 Dominios conservados de *Hairless*

El gen *Hairless* (*H*) fue descrito por Bridges y Morgan (1923) como una mutación haploinsuficiente en *Drosophila melanogaster*. En moscas heterocigóticas estaban ausentes un gran número de cerdas en cabeza y tórax, y se acortaban las venas del ala, en especial la cuarta y quinta longitudinales (Maier *et al.*, 1992). Desde entonces y a pesar de que se conocen los homólogos del resto de los componentes de la vía (**Tabla 1**), el gen *H* sólo ha sido identificado en tres miembros del orden Díptera: *D. melanogaster* (Bang y Posakony, 1992), *D. hydei* (Marquart *et al.*, 1999), y recientemente en el mosquito *Anopheles gambiae* (Celera Genomics/NIAID). A nivel de aa, la proteína H está poco conservada entre estas tres especies: comparte un 63% de identidad entre *D. melanogaster* y *D. hydei*, y un 33% entre *Drosophila* y *Anopheles* (Barolo *et al.*, 2002; ver **Figura 5**).

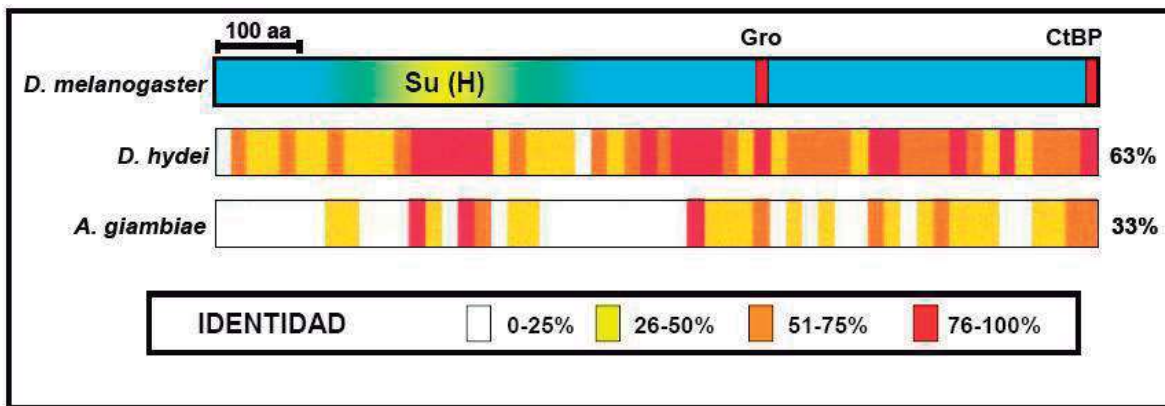


Figura 5. Homólogos de Hairless en diferentes especies. En la representación de H de *D. melanogaster* se muestran los dominios de interacción con el factor transcripcional Su(H) y con los co-represores Gro y CtBP, mismos que se encuentran conservados en *D. hydei* y *A. gambiae* a pesar del bajo grado de identidad de la proteína completa (Modificado de Barolo *et al.*, 2002).

La manera tan evidente en que esta proteína diverge, ha permitido identificar pequeñas zonas que se conservan y que presumiblemente son importantes en su función (Marquart *et al.*, 1999). A estas regiones conservadas

que son las responsables de parte de la actividad de una proteína se les conoce como dominios funcionales (Lodish *et al.*, 2000). Dos de estos dominios se localizan en la región de interacción de H con Su(H). Otro dominio lo constituye el motivo de unión a Gro, que se conserva en *Drosophila* y *Anopheles*. La región C terminal posee el motivo PLNLSKH, el cual se encuentra conservado en *Drosophila* y *Anopheles*, y coincide exactamente con las regiones encontradas en factores de transcripción que se unen a CtBP en cuatro vertebrados (Turner y Crossley, 2001). Contiene también tres dominios ricos en residuos de alanina, las cuales comúnmente son dominios de represión transcripcional. Sin embargo, estas repeticiones están reducidas o ausentes en Hairless de *D. hydei* y *A. gambiae*, lo que sugiere que no son esenciales para su función (Barolo *et al.*, 2002).

Los dominios funcionales suelen identificarse experimentalmente reduciendo una proteína a su fragmento activo más pequeño con ayuda de proteasas. Otra forma consiste en someter a mutagénesis el ADN que codifica para la proteína, de tal forma que algunos segmentos de la misma sean removidos o cambiados. La actividad de la proteína alterada, producto del gen mutante es posteriormente monitoreada (Lodish *et al.*, 2000).

1.8 Mutagénesis

Son varios los tipos de cambios que puede sufrir el ADN, y estos pueden alterar desde un solo nucleótido (nt), hasta cromosomas completos. Alteraciones en la secuencia de los nt de un gen pueden ocasionar un cambio en la fase de lectura del gen, a nivel del ARN mensajero, y por ello generarse una proteína con su secuencia de aa diferente, la cual ya no sea capaz de realizar su función original (Bolívar-Zapata, 2004). Los mutágenos inducen mutaciones al menos por 3 mecanismos diferentes (Griffiths *et al.*, 1999, Mathews y van Holde, 2001):

- 1. Incorporación de análogos.** Algunos compuestos químicos son similares a las bases nitrogenadas que ocasionalmente se incorporan al ADN;

dichos compuestos son conocidos como análogos. Una vez ahí tienen la propiedad de aparearse con bases diferentes produciendo mutaciones debido a que durante la replicación se insertan los nucleótidos incorrectos. El análogo se encuentra sólo en una cadena pero puede provocar sustituciones de nucleótidos en todas las cadenas que provengan de ella. Dentro de este grupo se encuentran el 5-bromouracilo y la 2-aminopurina, que producen transiciones de GC a AT o de AT a GC.

2. Apareo incorrecto específico. Algunos mutágenos no se incorporan en el ADN sino que alteran una base produciendo un apareo incorrecto específico. Algunos agentes alquilantes como metilnitrosurea (MNU), etilmetilsulfóxido (EMS) y nitrosoguanidina (NG) operan adicionando oxígeno en la posición 6 de la guanina para formar O-6-alquilguanina, lo que tiene como consecuencia que se aparee con timina, produciendo transiciones de GC a AT.

3. Daño en las bases. Un gran número de mutágenos dañan una o varias bases, produciendo mutaciones al azar debidas a la replicación errónea de estas bases. En este grupo se incluyen la luz ultravioleta y las radiaciones ionizantes como los rayos X.

1.9 Análisis de mutantes *Hairless*

En 1992, Maier y colaboradores analizaron fenotípica, citogenética y molecularmente una serie de mutantes generadas con rayos X (ver **Tabla 3**) con el objeto de caracterizar el locus de *H*. *H* es una mutación dominante con pérdida de la función que afecta la formación de los órganos sensoriales adultos. Las mutantes *H* analizadas son letales durante las etapas larvales y muestran un fenotipo dominante de pérdida de cerdas y de venas en el ala, lo que coincide con un incremento en la actividad de señalización de la vía N (Bang *et al.*, 1991; Maier *et al.*, 1992).

Con la actividad *in vivo* de la proteína mutante estudiada, era necesario conocer la naturaleza de las mutaciones producidas. Como la mutagénesis con rayos X es inespecífica, es importante realizar una detección de las mutaciones producidas para identificarlas y caracterizarlas.

Tabla 3. Alelos de *Hairless*

Alelo	Citología	Fenotipo
H ³	Normal	Letal en > 40% de las pupas transheterocigóticas (hipomórfico)
H ^{57c}	Transposición no correlacionada con <i>H</i>	Letal recesivo
H ^{w11}	Normal	Letal recesivo
H ^{bob}	Normal	Amorfo
H ⁹⁹	Normal	Amorfo
H ¹⁰⁷	Normal	Letal recesivo
H ¹³³	Normal	Letal recesivo con esterilidad dominante femenina
H ¹³⁶	Normal	Letal recesivo
H ¹⁶⁹	Translocación no correlacionada con <i>H</i>	Letal recesivo con esterilidad dominante femenina

(Maier *et al.*, 1992)

1.10 Análisis PCR-SSCP

Aunque existen otros métodos para la detección de mutaciones (**Tabla 4**) el análisis de polimorfismo en la conformación de cadenas sencillas (SSCP, por sus siglas en inglés) es el método más rápido y sencillo para detectar mutaciones puntuales (Orita *et al.*, 1989). Es muy útil para analizar una serie de secuencias con el objeto de identificar mutaciones como polimorfismos de un sólo nucleótido (SNP, por sus siglas en inglés) en un escrutinio primario permitiendo secuenciar únicamente las mutaciones detectadas y no todas las muestras.

Tabla 4. Métodos para la detección de mutaciones puntuales

Método	Fundamento	Ventaja	Desventaja
Prueba de truncado de proteína (PTT)	Se utiliza para buscar mutaciones que producen una terminación prematura en la cadena de una proteína en particular	Es útil en segmentos de cADN amplificado de 1 a 2 kpb o en exones grandes de ADN genómico.	No localiza la mutación con precisión y no es útil para exones pequeños.
Electroforesis en gel desnaturalizante de gradientes (DGGE)	Cuando el ADN de doble cadena migra en concentraciones cada vez mayores de urea y formamida, la cadena complementaria se disocia. La disociación produce una disminución en la movilidad del fragmento en gel de poliacrilamida. La presencia de una mutación modifica su estabilidad alterando su patrón de migración	Se utiliza para analizar múltiples muestras en el mismo fragmento de ADN. La metodología ya está establecida.	Requiere equipo especializado y software de difícil manejo. No establece la posición exacta de la mutación.
RFLP (restriction fragment length polymorphisms)	El ADN es digerido con una o más enzimas de restricción y los fragmentos resultantes son separados de acuerdo a su peso molecular mediante electroforesis en gel. Las diferencias en el tamaño son debidas a mutaciones dentro de los sitios de reconocimiento de las enzimas de restricción.	Puede detectar mutaciones específicas con alta sensibilidad	Sólo se puede aplicar a secuencias que albergan un sitio conocido de restricción. El método no puede ser usado para establecer el espectro completo de las mutaciones en un gen.
ddF y Bi-ddF (dideoxy fingerprinting)	Es una combinación de SSCP y la secuenciación de didesoxianálogos de Sanger. Una reacción convencional de secuenciación se lleva a cabo con un terminador didesoxi y los productos son analizados por electroforesis. Las mutaciones, que se detectan comparando los patrones de las bandas generados de la referencia y las secuencias problema, pueden resultar en la pérdida o ganancia de un sitio de terminación, un cambio en la movilidad de los productos de reacción o ambos.	Provee información sobre la posición de la mutación en el fragmento bajo análisis. Las mutaciones se pueden localizar con una efectividad de ~10 pb cuando se analizan segmentos de 200 pb.	Requiere ~50% más de esfuerzo y costos que un análisis SSCP realizado bajo una condición.
Chemical Cleavage of Mismatch (CCM)	Una molécula heteroduplex etiquetada entre la secuencia silvestre y una mutante potencial es tratada con hidroxilamina (que modifica los residuos de citosina), tetraóxido de osmio (modifica timina), o ambos. Las bases químicamente modificadas son rotas con piperidina y los fragmentos resultantes de ADN son analizados mediante electroforesis en gel de poliacrilamida.	Los heteroduplex de >1 kpb de tamaño pueden analizarse y las mutaciones se pueden localizar con gran precisión.	Utiliza químicos peligrosos, requiere mucho trabajo y no puede automatizarse con facilidad.

(Modificado de Sambrook y Russell, 2001).

En un análisis PCR-SSCP se amplifica la región de interés por PCR y el ADN resultante es desnaturalizado. Posteriormente se diluye, enfría y/o adicionan agentes desnaturalizantes como NaOH, permitiendo que cada cadena forme puentes de hidrógeno consigo misma. Bajo condiciones no desnaturalizantes, una cadena de ADN adopta una conformación única dependiendo de su secuencia de

nucleótidos (confórmero). Dos cadenas que difieren entre sí en una sola base adoptan estructuras secundarias lo suficientemente diferentes como para ser detectadas por su movilidad electroforética en gel de poliacrilamida nativo (no desnaturalizante), incluso si tienen la misma carga neta (Bonner y Ballard, 1999).

Debido a que la movilidad de los confórmeros es altamente sensible a cambios relativamente pequeños en las condiciones de electroforesis, la optimización de la técnica de SSCP es necesaria y empírica para cada muestra. Las condiciones del gel que suelen manipularse son: temperatura de electroforesis (de 4 a 25°C); matriz del gel (poliacrilamida, Long Ranger, Mutation Detection Enhancement®); concentración del gel y presencia de aditivos (urea, formamida, 5-15% de glicerol, 10% de sacarosa). A pesar de que se puede obtener una mayor sensibilidad general al disminuir la temperatura del gel, un mayor contenido de GC se correlaciona con mayor sensibilidad a 20 - 25°C (Highsmith *et al.*, 1999).

La efectividad de detección del SSCP es generalmente mayor al 80%, en una sola corrida para fragmentos menores a 300 pb (Hayashi y Yandell, 1993). Su sensibilidad disminuye al aumentar la longitud de la cadena posiblemente debido a que presentan un menor cambio conformacional al sustituirse un solo nucleótido. Esta técnica se ha utilizado con éxito para detectar polimorfismos en estudios de biología evolutiva y ecología molecular (Sunnucks *et al.*, 2000), para caracterizar mutaciones en virus (Kovar *et al.*, 1991) y en humanos para distinguir entre diferentes alelos (Orita *et al.*, 1989) y en la detección de hipercolesterolemia (Humphries *et al.*, 1997).

Una vez que se identifican y se determina la secuencia de las mutaciones encontradas, las secuencias mutantes se traducen a proteína para conocer si la mutación tuvo algún efecto en la secuencia de aa. La secuencia de aa puede analizarse después para conocer algunos de los efectos que dichas mutaciones producen en la proteína.

1.11 Métodos para la predicción de la estructura secundaria

La secuencia de aa en una proteína determina su conformación estructural. Sin embargo, la predicción de la estructura tridimensional de una proteína a partir de su secuencia es bastante difícil. La secuencia local parece determinar entre 60 y 70% de la estructura secundaria mientras que las interacciones de largo alcance se requieren para complementar la estructura secundaria y la terciaria.

Existen varios métodos de predicción de la estructura secundaria de una proteína a partir de su secuencia de aa, entre los cuales están:

Chou-Fasman: predice la estructura secundaria de cualquier secuencia dada utilizando el algoritmo de Chou-Fasman. Este algoritmo se basa en una tabla que describe la predisposición de los aa a encontrarse en diferentes estructuras secundarias (**Tabla 5**). Los valores se calcularon midiendo las frecuencias de cada aa asociado con un estado conformacional determinado en una base de datos de 29 proteínas. Usando estos valores el algoritmo busca sitios de nucleación donde haya de 4 a 6 residuos de aa formadores de hélices α o de 3 a 5 residuos formadores de láminas β (Chou y Fasman, 1974 y 1978). Estos sitios de nucleación se extienden mientras la predisposición por dicha conformación se mantenga. Los autores reportaron que eran capaces de predecir las estructuras con ~80% de efectividad (Chou y Fasman, 1974 y 1978), sin embargo estudios posteriores revelaron una precisión menor al 55% (Nishikawa, 1983).

Garnier-Robson: predice la estructura secundaria de manera similar al utilizado por Chou-Fasman con la diferencia de que también toma en cuenta las interacciones entre los intermediarios de la cadena. Está compuesto de una matriz que contiene información para cada aa en una ventana de 17 residuos. A pesar de la enorme cantidad de parámetros que considera, el procedimiento es bastante rápido (cuando se realiza en computadora) y suele clasificarse entre los métodos

conocidos más efectivos con un nivel del 63.4%. Al igual que Chou-Fasman, el estudio de Nishikawa (1983) le otorgó un valor de efectividad menor al 55%.

Tabla 5. Probabilidades relativas de aparición de residuos de aminoácidos en distintas estructuras secundarias

Aminoácido	Hélice α (P_{α}) ¹	Lámina β (P_{β}) ¹	Giro (P_t) ¹	
Ala	1.29	0.90	0.78	Favorecen hélices α
Cys	1.11	0.74	0.80	
Leu	1.30	1.02	0.59	
Met	1.47	0.97	0.39	
Glu	1.44	0.75	1.00	
Gln	1.27	0.80	0.97	
His	1.22	1.08	0.69	
Lys	1.23	0.77	0.96	
Val	0.91	1.49	0.47	Favorecen láminas β
Ile	0.97	1.45	0.51	
Phe	1.07	1.32	0.58	
Tyr	0.72	1.25	1.05	
Trp	0.99	1.14	0.75	
Thr	0.82	1.21	1.03	
Gly	0.56	0.92	1.64	Favorecen giros
Ser	0.82	0.95	1.33	
Asp	1.04	0.72	1.41	
Asn	0.90	0.76	1.23	
Pro	0.52	0.64	1.91	
Arg	0.96	0.99	0.88	

Mathews y van Holde (2001). ¹ Valores > 1 se relacionan con predilección por la estructura mientras que valores < 1 indica que tienden a desestabilizarla.

Delèage-Roux: Llamado también método de predicción doble (DPM), consiste de una predicción inicial de la estructura secundaria con un algoritmo que utiliza los parámetros del tipo descrito por Chou-Fasman (1974) y de la predicción de la clase de la proteína a partir de su composición de aa en base a la predicción de Nakashima *et al.* (1986). Estas dos predicciones independientes son comparadas después para proveer la predicción de la estructura secundaria de la proteína. El método proporciona un 72% de efectividad en la predicción de la clase de la proteína, 61.3% para la predicción del estado del residuo de aa y una buena

concordancia entre la estructura secundaria observada y la predicha (Delèage y Roux, 1987).

2. JUSTIFICACIÓN

La vía Notch está implicada en el desarrollo de un organismo completo a partir de un óvulo fecundado y está altamente conservada en metazoarios. Las deficiencias en la vía están relacionadas con enfermedades en humanos, tales como el cáncer y el Alzheimer lo que hace importante comprender su funcionamiento.

La proteína Hairless, descubierta en *Drosophila*, es la principal antagonista de Notch en esta vía. Sin embargo, sólo se han identificado homólogos en Drosofilidos y *Anopheles*. Los intentos por encontrarlos en otras especies han fallado debido al bajo grado de conservación que presenta. Además, no están perfectamente definidas las regiones de interacción de Hairless con otras proteínas de la vía.

Un método común para identificar los dominios de interacción de una proteína consiste en inducir mutaciones en el gen que la codifica y posteriormente analizar la actividad de la proteína mutada. Un agente mutagénico que suele emplearse con cierta frecuencia lo constituyen los rayos X, aunque presenta la inconveniencia de que no puede controlarse la posición y características de la mutación producida.

Realizar un análisis de mutantes *Hairless* en *D. melanogaster* cuya actividad *in vivo* ya ha sido reportada nos permitirá conocer algunos aa esenciales para su funcionamiento adecuado así como los efectos que producen dichas mutaciones en la estructura secundaria de esta proteína.

El presente trabajo pretende, por lo tanto, contribuir al entendimiento del mecanismo por el que *Hairless* regula la vía Notch con el objetivo de sentar las bases para identificar sus homólogos en otras especies, así como las posibles interacciones aún no reportadas con otras proteínas.

3. HIPÓTESIS

Los alelos de *Hairless* en *D. melanogaster* generados con rayos X contienen mutaciones en su secuencia de nucleótidos que producen cambios en las proteínas para las que codifican.

4. OBJETIVOS

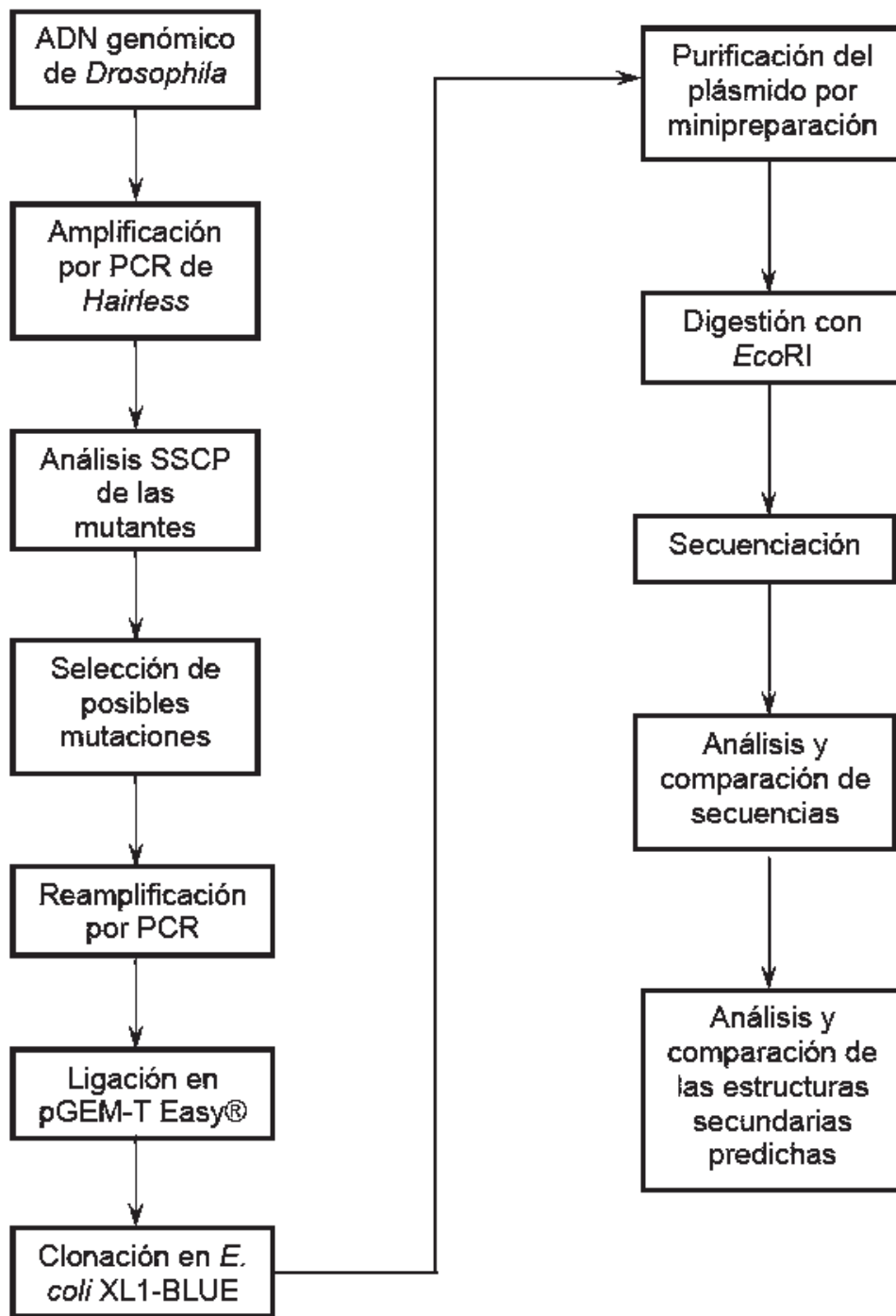
4.1 Objetivo General

Caracterizar las regiones mutadas en las diferentes mutantes de *Hairless* en *D. melanogaster* para compararlas con la secuencia silvestre.

4.2 Objetivos Específicos

1. Diseñar oligonucleótidos que permitan amplificar de manera selectiva el gen *Hairless*.
2. Identificar las mutaciones en las diferentes regiones del gen.
3. Caracterizar las mutaciones encontradas.
4. Predecir la estructura secundaria de las proteínas H mutantes para compararlas con la silvestre.

5. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 ADN de líneas de *Drosophila*

Se utilizaron los alelos mutados de *Hairless* H^G , H^{rucuca} , H^3 , H^{w11} , H^{57c} , H^{bob} , H^{99} , H^{107} , H^{133} , H^{136} y H^{169} reportados por Maier y col. (1992). El alelo H^{w11} fue obtenido por U. Tepass y D. Godt en el laboratorio de Campos-Ortega, y H^{bob} por R. Fleming. El resto pertenecen a la colección de S. Artavanis-Tsakonas. H^G corresponde al ADN de referencia de *Drosophila melanogaster* al que se le insertó el gen sin los intrones. H^{rucuca} corresponde al ADN silvestre de *Drosophila melanogaster rucuca*. El resto son alelos mutantes que fueron generados usando rayos X como mutágeno (Maier *et al.*, 1992).

6.2 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de los fragmentos del gen *H*

Para la reacción se utilizaron 150 ng de ADN genómico tanto de las moscas silvestres como de cada mutante, 5 μ l de amortiguador para PCR 10X (Tris-HCl 200 mM, KCl 500 mM), 2.5 μ l de $MgCl_2$ 50 mM, 300 μ M de dNTP's, 1 μ M de cada oligonucleótido, 1 μ l (3 U) de *Taq* ADN polimerasa (Gibco BRL) y el volumen se ajustó a 50 μ l con agua destilada desionizada estéril. La amplificación se llevó a cabo en un termociclador GeneAmp[®] PCR System 2700 (Applied Biosystems) durante 30 ciclos bajo las condiciones sugeridas por el programa DNAsis 2.0 (Hitachi Software Engineering Co.) para cada caso (ver **Tabla 6**). La amplificación se verificó por electroforesis en gel de agarosa al 1%.

6.3 Análisis SSCP de los fragmentos amplificados

Se mezclaron 10 μ l de producto de PCR con 10 μ l de amortiguador de carga (formamida 95%; NaOH 10 mM; EDTA 20 mM; azul de bromofenol 0.02%; xilen-cianol 0.02%). Se calentó en baño María a 100°C por 15 min y se enfriaron inmediatamente en agua con hielo. Las muestras se cargaron en geles de acrilamida:bisacrilamida (37.5:1) al 10% con glicerol desionizado en una cámara de electroforesis vertical (Dcode Universal Mutation Detection System; BioRad) a

5°C y 3 W durante 17 h utilizando Tris-Borato-EDTA 1X (TBE) como amortiguador (Orita *et al.*, 1989).

Tabla 6. Oligonucleótidos diseñados

Par	Nombre ¹	Secuencia	Temperatura de alineamiento
1	H225	5'- TTTGCGCGAGGAATTTACAACAAA -3'	52.7°C
	H358	5'- TTGTTGTTGTTGTTGCTGGAGTGA -3'	
2	H382	5'- CGGCAGCAGCAGCAATAACGACAA -3'	60.6 °C
	H623	5'- GCTGGAGGATGAGGGCGTTGTCTG -3'	
3	H647	5'- TCCACCGCCTCAAATGGCTTTTTG -3'	61.0°C
	H882	5'- ATCAAAGCTTCCGCCGAGTT -3'	
4	H906	5'- GGGCAGGACACCAATATCGACGCA -3'	58.5°C
	H1133	5'- TACAGCTCAGCGATGTGGAATTCT -3'	
5	H1194	5'- TGCAGTTTCGGACGACAACAGCTC -3'	61.1°C
	H1380	5'- TCGTCTCCATTTTCCGCCTTGATT -3'	
6	H1423	5'- GCAGAGGCCGTTGAAATTGAAAA -3'	53.6°C
	H1629	5'- CTCGTATTCATCTTCATCTCAACA -3'	
7	H1656	5'- GGATGAGGAACCCATGACAGAGCT -3'	57.7°C
	H1888	5'- GTGCGTCAAGGCGTGACTIONTAGACC -3'	
8	H1933	5'- GCGACAGCAGCCGGACGACTAGTC -3'	61.7°C
	H2159	5'- CGGGACTGGGGCTTGCTTTTCCTT -3'	
9	H2183	5'- GCTCCAGCTCATCCAGCACTTCGC -3'	61.6°C
	H2409	5'- GGCGACTTTGGCGAGGTGAGCAGG -3'	
10	H2433	5'- CGATGTGAGTGGCAGCAATGGCGG -3'	61.8°C
	H2659	5'- TCGGATCGATGCAGTCTTTTTGGG -3'	
11	H2666	5'- AGACTGCATCGATCCGACGCG -3'	63.3°C
	H2892	5'- GCCGCCGCTACTGCAGCTGCACTG -3'	
12	H2933	5'- CATAATTCCCTCGCCTTCGATAT -3'	59.6°C
	H3141a	5'- GCAACAGCCGCTCCCACTCCG -3'	
13	H3141b	5'- CGGAGTGGGAGCGGCTGTTGC -3'	63.5°C
	H3370	5'- GGAGGCCGATGCGCTCGAGCT -3'	
14	H3401	5'- CCACTTCGGGCGCCAGCTCCT -3'	56.6°C
	H3522	5'- AACTCGAATGGTTGGCCAGAAAC -3'	
15	H105	5'- ATGACCGATGAGCATAAAAAGTAAC -3'	48.7°C
	H352	5'- TAGCTGGTGTCTACTGCCGTTT -3'	
16	H352b	5'- AAACGGCAGTAGCAGCACCAGCTA -3'	60.8°C
	H731	5'- GGACGCAGTAGCTCCAACGACGCT -3'	

¹ Los números corresponden a la posición que ocupa el oligonucleótido en el gen

6.4 Tinción de geles de acrilamida con nitrato de plata

En un cuarto oscuro los geles se sumergieron en una solución fijadora (0.5% ácido acético glacial, 10% etanol absoluto) y se mantuvieron en agitación suave y constante por 15 min sobre un agitador orbital (Hoeffer, Red Rotor), posteriormente se enjuagaron dos veces con agua destilada desionizada agitando por 3 min. Enseguida se sumergieron en una solución de tinción con nitrato de plata al 0.2% por 15 min en agitación suave y constante, se enjuagaron nuevamente 2 veces con agua destilada desionizada y por último se sumergieron en una solución de revelado (3% de NaOH, 0.09% de formaldehído) hasta lograr ver la definición de las bandas del marcador (1 kb ladder plus, Invitrogen) como control en la tinción. Finalmente se enjuagaron con agua destilada desionizada por 2 min y se colocaron sobre un acetato para fotografiarlo (Lee *et al.*, 2000).

6.5 Reamplificación de las regiones con posibles mutaciones

Los fragmentos que presentaron diferencia en su migración con respecto a la secuencia silvestre se cortaron del gel con una espátula y se colocaron en un tubo Eppendorf de 1.5 ml con 75 μ l de TE_{1/10}. Se homogenizó, se tomó 1 μ l y se reamplificó por PCR con las mismas condiciones y ciclos de amplificación iniciales.

6.6 Purificación en columna del producto de PCR

El producto de PCR obtenido se cargó en un gel de agarosa al 1%. Las bandas obtenidas se cortaron con una espátula y se transfirieron a un tubo de 600 μ l previamente perforado, con filtro de Delcro®, que se encontraba dentro de un tubo Eppendorf de 1.5 ml. Se centrifugó durante 20 min a 6,000 rpm y 4°C. Se desechó el tubo que contenía el filtro y se completó el volumen del líquido colectado a 100 μ l con TE_{1/10}. El ADN se precipitó con 10% de acetato de sodio (2 M, pH 7.4-7.6) y 110 μ l de isopropanol; se mezcló e incubó 20 min a -80°C. Posteriormente se centrifugó por 15 min a 14,000 rpm y 4°C, se eliminó el sobrenadante y se lavó el precipitado con 50 μ l de etanol al 70%. El precipitado se secó en un concentrador (Centrivap, Labcono) a 36°C y se resuspendió en 10 μ l de TE_{1/10}.

6.7 Ligación del producto de PCR

Se utilizó el kit comercial pGEM-T Easy (Promega). Para la reacción se mezclaron 5 μ l de amortiguador (10X con ATP), 27 ng (0.5 μ l) del vector pGEM-T de 3 kpb, 1 μ l de producto de PCR y 3 U (1 μ l) de la enzima T4 ADN ligasa (Promega) y la mezcla se incubó a 4°C durante toda la noche.

6.8 Preparación de células competentes de *E. coli* con CaCl_2

Se tomó una asada de la cepa XL1-Blue de *E. coli* (Stratagene) (*recA1*, *endA1*, *gyrA96*, *thi-1*, *hsdR17*, *supE44*, *relA1*, *lac* [*F'**proAB*, *lacI9ZDM15*, *Tn10* (*tcr*)], se distribuyó en medio LB agar (triptona 1%, NaCl 1%, agar 1%, extracto de levadura 0.5%) e incubó toda la noche a 37°C. Se seleccionó una colonia joven (que tuviera un diámetro menor que el resto) y se inoculó en 2 ml de medio LB para incubarlo a 37°C toda la noche en agitación a 150 rpm. El cultivo se inoculó en un matraz de 1 L con 250 ml de medio LB y se incubó a 37°C a 150 rpm (LAB-LINE®, incubator-shaker) por ~2.5 h hasta alcanzar una $A_{620} = 0.35-0.40$, se incubó 5 min en hielo y se centrifugó a 4,600 rpm durante 10 min. Se eliminó el sobrenadante y las células se resuspendieron en 25 ml de solución TFb1 estéril fría (acetato de potasio 30 mM, KCl 100 mM, CaCl_2 10 mM, MnCl_2 50 mM, glicerol 15%). Se incubó 20 min en hielo y se centrifugó a 11,600 rpm durante 10 min a 4°C. La pastilla se resuspendió en 2.5 ml de solución TFb2 (MOPS 75 mM, KCl 10 mM, CaCl_2 100 mM, Glicerol 15%) y se distribuyó en alícuotas de 100 μ l en tubos Eppendorf de 1.5 ml. Finalmente se congelaron rápidamente con nitrógeno líquido y se almacenaron en un ultracongelador Revco a -86 °C (Sambrook y Russell, 2001).

6.9 Transformación de *E. coli*

Una alícuota de 50 μ l de células competentes de *E. coli* se descongeló y se mantuvo en hielo, una vez descongelada se le agregó 5 μ l de la mezcla de ligación. Se incubó 15 min en hielo y se sometió a un choque térmico a 42°C por 45 s en baño María colocándolas inmediatamente en hielo por 3 min. Se le agregó

1 ml de medio LB y se incubó a 37°C en agitación a 150 rpm durante 1 h (Sambrook y Russell, 2001).

6.10 Distribución de las células transformadas

Las células transformadas se centrifugaron a 1,000 rpm en una microcentrífuga Eppendorf 5415C por 5 s. En una campana de flujo laminar LabTech® se retiraron 750 µl del sobrenadante y se resuspendieron suavemente. Se distribuyeron 250 µl en cajas Petri con LB agar con ampicilina (100 µg/ml); 7 µl de IPTG (0.1 M) y 60 µl de X-Gal (2 mg/ml). Se incubaron durante toda la noche a 37°C en una incubadora SHEL-LAB®, 1545.

6.11 Minipreparaciones

Las colonias blancas se tomaron con un palillo estéril y se sembraron en tubos cónicos Corning® de 15 ml con 3 ml de medio LB con ampicilina (100 µg/ml). Se incubaron a una temperatura 37°C y con agitación constante a 150 rpm durante toda la noche. Se transfirieron luego 1.5 ml del cultivo a tubos Eppendorf de 1.5 ml y se centrifugaron a 14,000 rpm durante 30 s. Se eliminó el sobrenadante y el precipitado se resuspendió en 200 µl de solución STET (sacarosa 0.8%, tritón X-100 0.5%, EDTA 0.5 M 10%, tris-HCl 1M 5%) recién preparada. Se adicionaron 10 µl de lisozima (20 mg/ml) a cada tubo, se mezclaron en vortex (Vortex Genie 2, DAIGGER®) y se incubaron a temperatura ambiente. Una vez transcurridos 5 min se incubaron a 100°C durante 45 s y se centrifugaron a 14,000 rpm durante 10 min. La pastilla se removió con un palillo estéril, se agregaron 10 µl de bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB) al 10% y se centrifugó a 14,000 rpm por 5 min. Se eliminó el sobrenadante y el precipitado se resuspendió en 300 µl de NaCl (1.2 M). Posteriormente se adicionaron 600 µl de etanol absoluto a -20 °C, se mezcló y se centrifugó nuevamente a 14,000 rpm por 10 min. Se eliminó el sobrenadante y se lavó el precipitado con 50 µl de etanol al 70%. El precipitado se secó en un concentrador (Centrivap, Labcono) a 36°C y se resuspendió en 50 µl de TE_{1/10} (Sambrook y Russell, 2001).

6.12 Limpieza de ADN con bromuro de etidio y fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1)

Se ajustó el volumen de los tubos a 200 μ l con TE_{1/10}, se adicionaron 4 μ l de RNAsa (10 mg/ml; Sigma) y se incubó a temperatura ambiente 30 min. Posteriormente se agregó 1 μ l de bromuro de etidio (10 mg/ml) y un volumen de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1). Se mezcló manualmente y se centrifugó a 14,000 rpm durante 5 min. La fase acuosa se transfirió a otro tubo Eppendorf de 1.5 ml y se lavó con 1 volumen de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1). Nuevamente se mezcló, se centrifugó a 14,000 rpm por 5 min y se recuperó la fase acuosa. Se agregaron 300 μ l de NaCl (1.2 M) y 600 μ l de etanol absoluto a -20°C . Se centrifugó a 14,000 rpm por 10 min y se eliminó el sobrenadante. El precipitado se lavó con 50 μ l de etanol al 70%, se secó en un concentrador (Centrivap, Labcono) a 36°C y se resuspendió en 50 μ l de TE_{1/10} (Ausubel *et al.*, 1999).

6.13 Digestión de plásmidos con *EcoRI*

Se colocaron en un microtubo de 200 μ l: 7 μ l de agua grado biología molecular, 1 μ l de amortiguador 10X, 1 μ l de ADN plasmídico y 1 μ l (10 U) de enzima *EcoRI* (Invitrogen) y se mezcló perfectamente en vortex (Vortex Genie 2, DAIGGER®). Posteriormente se incubaron a 37°C durante 2 h y se revisaron por electroforesis en un gel de agarosa al 1%, eligiéndose para secuenciar las que tuvieran una movilidad electroforética diferente a la del plásmido sin el inserto (Sambrook y Russell, 2001).

6.14 Secuenciación

Se utilizó el método de terminación prematura de la polimerización con didesoxinucleótidos de Sanger y col. (1977) para la secuenciación. Para la generación de las extensiones de cadena sencilla marcada con fluorescencia se utilizó la siguiente mezcla: 1 μ l (200 ng) de ADN plasmídico, 4 μ l de amortiguador, 1 μ l del oligonucleótido universal (-21M13), 4 μ l de la mezcla Big Dye terminator cycle sequencing ready reaction v 2.0 (Applied Biosystems), y 10 μ l de agua

destilada desionizada. Se programaron las siguientes condiciones en el termociclador: 1 ciclo de 95°C por 5 min, 25 ciclos de: 96°C por 30 s, 50°C por 30 s, y 60°C por 4 min, finalizando con 1 ciclo sostenido de enfriamiento a 4°C.

Los productos de extensión se precipitaron agregando 2 µl de EDTA (125 mM, pH 8.0), 2 µl de acetato de sodio (3 M, pH 5.2) y 50 µl de etanol absoluto a 4°C, se agitaron ligeramente y se dejó reposar 15 min a temperatura ambiente; posteriormente se centrifugó por 20 min en una microcentrífuga a 14,000 rpm. El sobrenadante se retiró con una micropipeta y se agregaron 250 µl de etanol al 70%, se centrifugó 10 min a 14,000 rpm, el sobrenadante se retiró y se secaron en un ultraconcentrador (Centrivap, Labconco,) a 60°C. Luego se resuspendieron en 25 µl de amortiguador TSR (Applied Biosystems) mezclando en vortex (Vortex Genie 2, DAIGGER®) por 2 min, por último se calentó a 95°C durante 2 min y se transfirió inmediatamente a hielo.

Se utilizó el secuenciador automático ABI PRISM 310 Genetic Analyzer utilizando los siguientes parámetros de lectura: tiempo de inyección de 30 s, y la electroforesis se realizó a 15 kV, 50°C y 45 min de corrida; utilizando una columna capilar de 47 cm de longitud.

6.15 Análisis de las secuencias

El análisis de las secuencias se realizó utilizando el software Sequencing Analysis 3.0 (Applied Biosystems) y los programas de cómputo DNAsis 2.0 (Hitachi Software Engineering Co.), Clustal V del software MegAlign (DNASTar Inc.) Las secuencias fueron traducidas a proteína, prediciendo su estructura secundaria con el software Protean (DNASTar Inc).

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 Diseño de oligonucleótidos

Se diseñaron oligonucleótidos específicos (**Tabla 6**) para amplificar el gen en segmentos de 250 pb de acuerdo a la técnica de SSCP. Esto se hizo tomando como base la secuencia del gen *Hairless* reportada en el GenBank, con número de acceso AE003731, teniendo cuidado de que los fragmentos amplificados fueran continuos a fin de cubrir en su totalidad la secuencia a analizar. Además, de que también se cuidó que los oligonucleótidos cubrieran los requisitos necesarios, de acuerdo al programa DNAsis 2.0 (Hitachi Software Engineering Co.), para poder realizar las reacciones de amplificación en el termociclador GeneAmp® PCR System 2700.

7.2 Amplificación del gen *Hairless*

El gen *Hairless*, tanto de las líneas silvestres como de las mutantes, fue amplificado en segmentos de 250 pb empleando la técnica de PCR. Se seleccionaron los productos de PCR correspondientes a los pares de oligonucleótidos 1, 4, 10 y 14 que codifican para una región que contiene uno de los intrones, el dominio de unión a Su(H), una región que no tiene interacciones reportadas con otras proteínas y el dominio de unión a dCtBP, respectivamente ya que las consideramos regiones representativas de la proteína H. Para comprobar que se habían amplificado los fragmentos esperados, alícuotas de los productos de PCR seleccionados se cargaron en geles de agarosa al 1%. En la **Figura 7** se puede distinguir que en cada una de las muestras se amplificó un fragmento de entre 200 y 300 pb, lo que coincide con el tamaño de 250 pb esperado, por lo que se procedió al análisis SSCP.

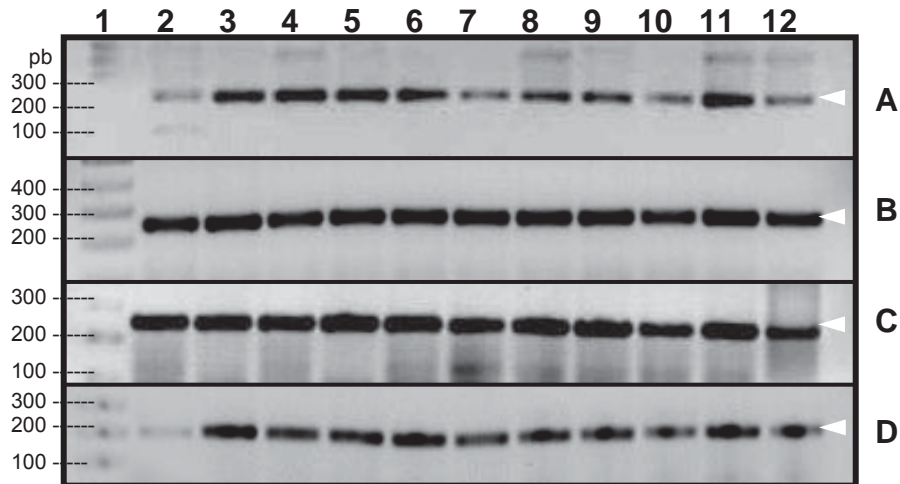


Figura 7. Amplificación de fragmentos del gen *Hairless* de *D. melanogaster* correspondiente a los pares de oligonucleótidos números A)1; B) 4; C) 10 y D) 14. Carril (1) Marcador molecular 1kb plus (Invitrogen); (2) *Drosophila melanogaster*; (3) H^{pob} ; (4) *D. melanogaster rucuca*; (5) H^{β} ; (6) H^{w11} ; (7) H^{57c} ; (8) H^{99} ; (9) H^{107} ; (10) H^{133} ; (11) H^{136} y (12) H^{169} . La cabeza de flecha señala el tamaño de 250 pb esperado.

7.3 Análisis SSCP

El análisis SSCP de los productos de PCR obtenidos con el par de oligonucleótidos 1, mostró que los fragmentos amplificados de los alelos H^{133} , H^{136} y H^{169} (ver **Figura 8A**, carriles 9, 10 y 11) presentaron un ligero retraso en la migración con respecto de los dos fragmentos amplificados a partir de los genomas silvestres (**Figura 8A**, carriles 1 y 3).

Para los fragmentos amplificados por PCR con el par de oligonucleótidos 4, el análisis SSCP mostró una movilidad electroforética ligeramente mayor para los segmentos de los alelos H^{w11} y H^{57c} (ver **Figura 8B**, carriles 4 y 5) con respecto a los fragmentos correspondientes de los genomas de referencia (**Figura 8B**, carriles 1 y 3).

El análisis SSCP efectuado para los fragmentos amplificados con el par de oligonucleótidos 10 presentó un ligero retraso en el corrimiento para los fragmentos correspondientes a los alelos H^{99} , H^{107} , H^{133} y H^{136} (ver **Figura 8C**

carriles 7, 8, 9 y 10) con relación a los genomas de referencia (ver **Figura 8C** carriles 1 y 3).

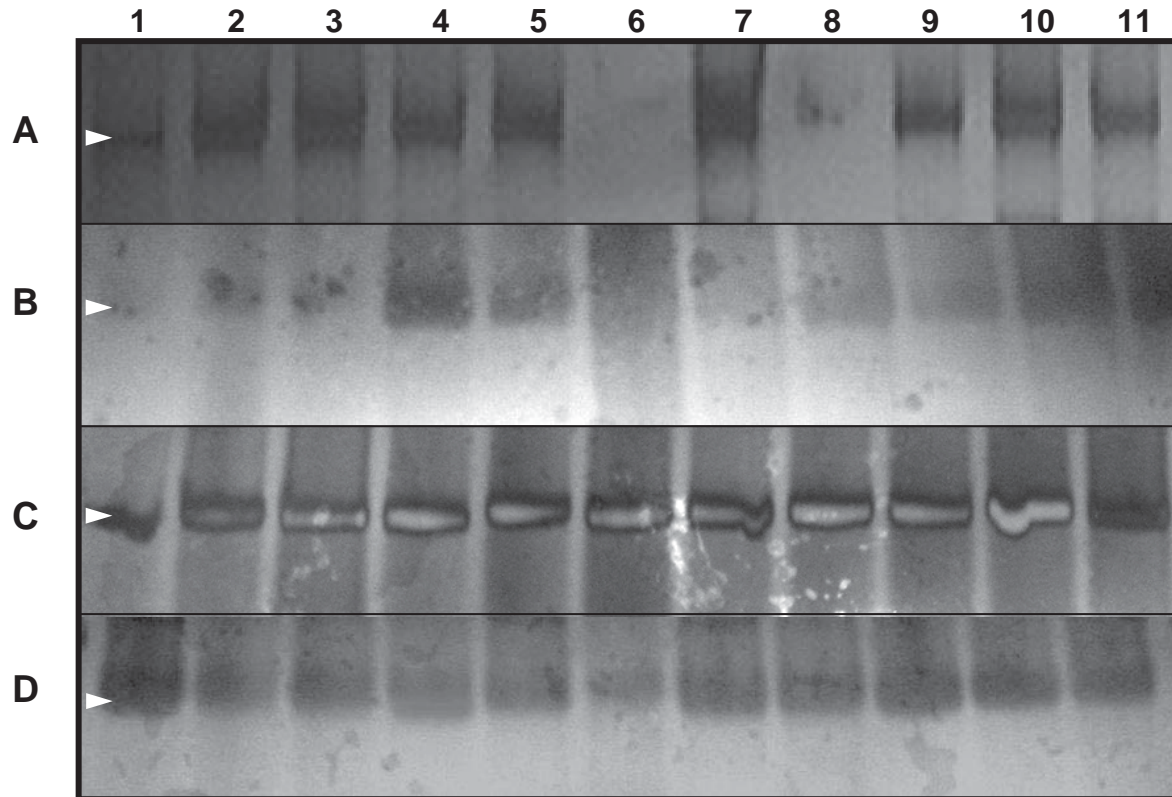


Figura 8. Geles de poliacrilamida correspondientes al análisis SSCP de los pares de oligonucleótidos números A)1; B) 4; C) 10 y D) 14. Carril (1) *Drosophila melanogaster*, (2) H^{bob} ; (3) *D. melanogaster rucuca*; (4) H^3 ; (5) H^{w11} ; (6) H^{57c} ; (7) H^{99} ; (8) H^{107} ; (9) H^{133} ; (10) H^{136} y (11) H^{169} .

Los fragmentos amplificados con el par de oligonucleótidos 14 fueron también analizados por SSCP y se observó una movilidad electroforética ligeramente mayor para los fragmentos correspondientes a los alelos H^3 y H^{w11} (ver **Figura 8D** carriles 4 y 7) con relación a los fragmentos de referencia (ver **Figura 8D** carriles 1 y 3).

Las diferencias en la movilidad electroforética de los fragmentos amplificados en los geles de poliacrilamida del análisis SSCP, con relación a los genomas de referencia de *Drosophila melanogaster*, se interpretaron como posibles mutaciones por lo que se eligieron estas secuencias para continuar con el trabajo.

7.4 Clonación de las regiones del gen *Hairless* en *Escherichia coli*

De las muestras que presentaron diferencias en su movilidad electroforética se seleccionaron al azar cuatro alelos: H^{133} del par de oligonucleótidos 1, H^{w11} del par 4, H^{107} del par 10 y H^3 del par de oligonucleótidos 14. Estas muestras se clonaron en *Escherichia coli* XL1-Blue utilizando el vector pGEM-T Easy® (Promega) de acuerdo con el protocolo indicado (ver Materiales y Métodos). Posteriormente el plásmido fue purificado por minipreparación y se verificó la integridad del ADN realizando electroforesis en gel de agarosa al 1%.

7.5 Digestión del plásmido con *EcoRI*

Un alícuota del plásmido obtenido se digirió con la enzima de restricción *EcoRI* para linealizarlo a fin de determinar su tamaño. Posteriormente se cargó en un gel de agarosa al 1% (ver **Figura 9**). Los plásmidos que presentaron un tamaño de 3250 pb que corresponde al tamaño del vector (3000 pb) más el del segmento del gen clonado (250 pb) fueron seleccionados para secuenciarlos.

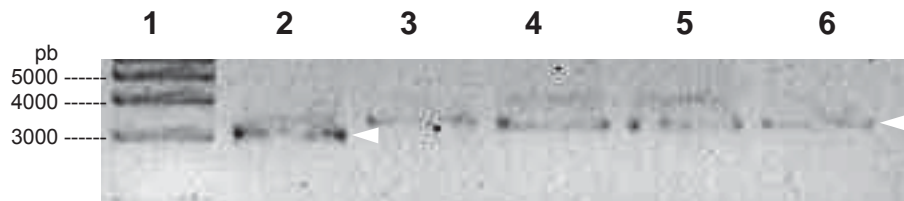


Figura 9. Gel de agarosa al 1% con los plásmidos recombinantes linealizados con *EcoRI*. Carril (1) marcador molecular 1kb plus (Invitrogen); (2) pGEM-T, Control; (3) H^{133} ; (4) H^{w11} ; (5) H^{107} ; (6) H^3 . Nótese el retraso en el corrimiento de las muestras problema con relación al control.

7.6 Secuenciación y análisis de estructuras

Los segmentos contenidos en los plásmidos se secuenciaron y las secuencias obtenidas se analizaron para identificar la presencia de mutaciones. Las regiones correspondientes a los marcos de lectura se tradujeron a proteína.

Posteriormente se realizó la predicción de la estructura secundaria de dichas proteínas a fin de compararlas con la secuencia silvestre para tratar de explicar los posibles efectos de las mutaciones encontradas en la conformación de la proteína.

En el alelo H^{133} se encontró una mutación puntual en la posición ⁶³¹T por C que corresponde a la región del primer intrón del gen *Hairless* (ver **Figura 10**) por lo que es una mutación silenciosa que no modifica la secuencia de la proteína. Este cambio podría no tener implicaciones en la función de la proteína, por lo que esta mutante podría presentar mutaciones en otras regiones aún no analizadas.

		620	630	640	650	
H133	5' -	GCCCAATGCA	AACGAATGTT	CCTCTTTGAA	GGCCCTGCTT	-3'
HWT	5' -	GCCCAATGCA	AACGAATGTT	TCTCTTTGAA	GGCCCTGCTT	-3'

Figura 10. Secuencias parciales de los fragmentos amplificados con el par de oligonucleótidos 1 para la mutante H^{133} y la secuencia silvestre (H^{wt}). La mutación puntual localizada en la posición 631 (T por C) del primer intrón del gen y su correspondiente en la secuencia silvestre se muestran en negrita.

En el caso del alelo H^{w11} (ver **Figura 11**) se encontró una eliminación de 18 pb (posiciones 1429 a 1446 del gen) que representan la pérdida de 6 aa (posiciones 222 a 227 de la proteína) en la región del dominio de unión al factor transcripcional Supresor de Hairless (Brou *et al.*, 1994). Esto podría significar que los seis aa eliminados son esenciales para que se dé correctamente la interacción entre las proteínas Hairless y Supresor de Hairless, y se pueda llevar a cabo una represión efectiva al momento de decidir el destino celular correcto de las células en proceso de diferenciación. Este descubrimiento contradice al ensayo con enzimas de restricción realizado por Maier *et al.* (1992) que sugiere que no existen eliminaciones en este alelo.

En las predicciones realizadas a la proteína mutante H^{w11} (ver **Figura 12**) la pérdida de los residuos ácido aspártico y glicina trae como consecuencia la pérdida de una región de giro, lo que hace continua la hélice α en las predicciones

de Chou-Fasman y Garnier-Robson. En ésta última, incluso se pierde una región de lámina β que estaba favorecida por las dos fenilalaninas, debido a la eliminación de 6 residuos en la proteína mutante y la proximidad con los aa alanina, lisina y ácido glutámico se promueve fuertemente una hélice α . También se pierde una zona de hidrofobicidad debido a la pérdida de los aa hidrofóbicos: glicina, fenilalanina, isoleucina y leucina quedando sólo los aa hidrofílicos lisina y ácido glutámico. Estos cambios significativos en la hidrofobicidad y la estructura secundaria de la proteína podrían ser los responsables de que la proteína mutante sea letal en las larvas (Maier *et al.*, 1992) al adoptar una conformación que le impida unirse al factor transcripcional Su(H).

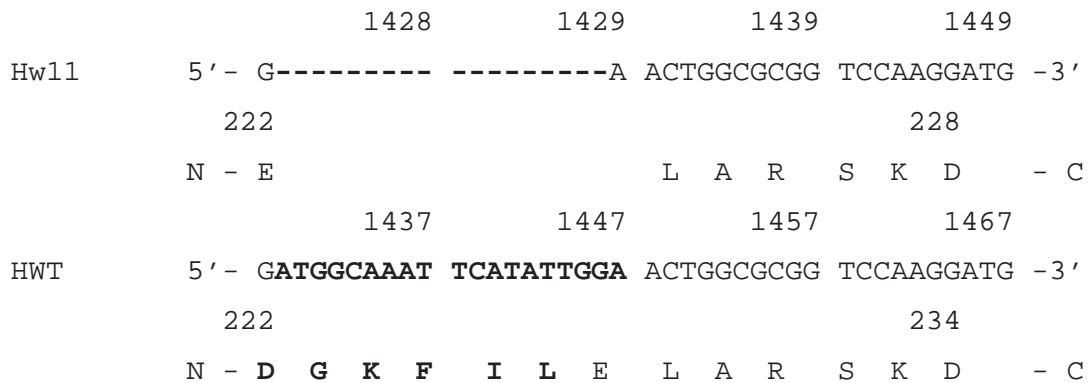


Figura 11. Análisis de las secuencias para el alelo mutante H^{w11} y el silvestre H^{wt} y su correspondiente traducción a aminoácidos. Los nucleótidos y aminoácidos eliminados se muestran en negrita.

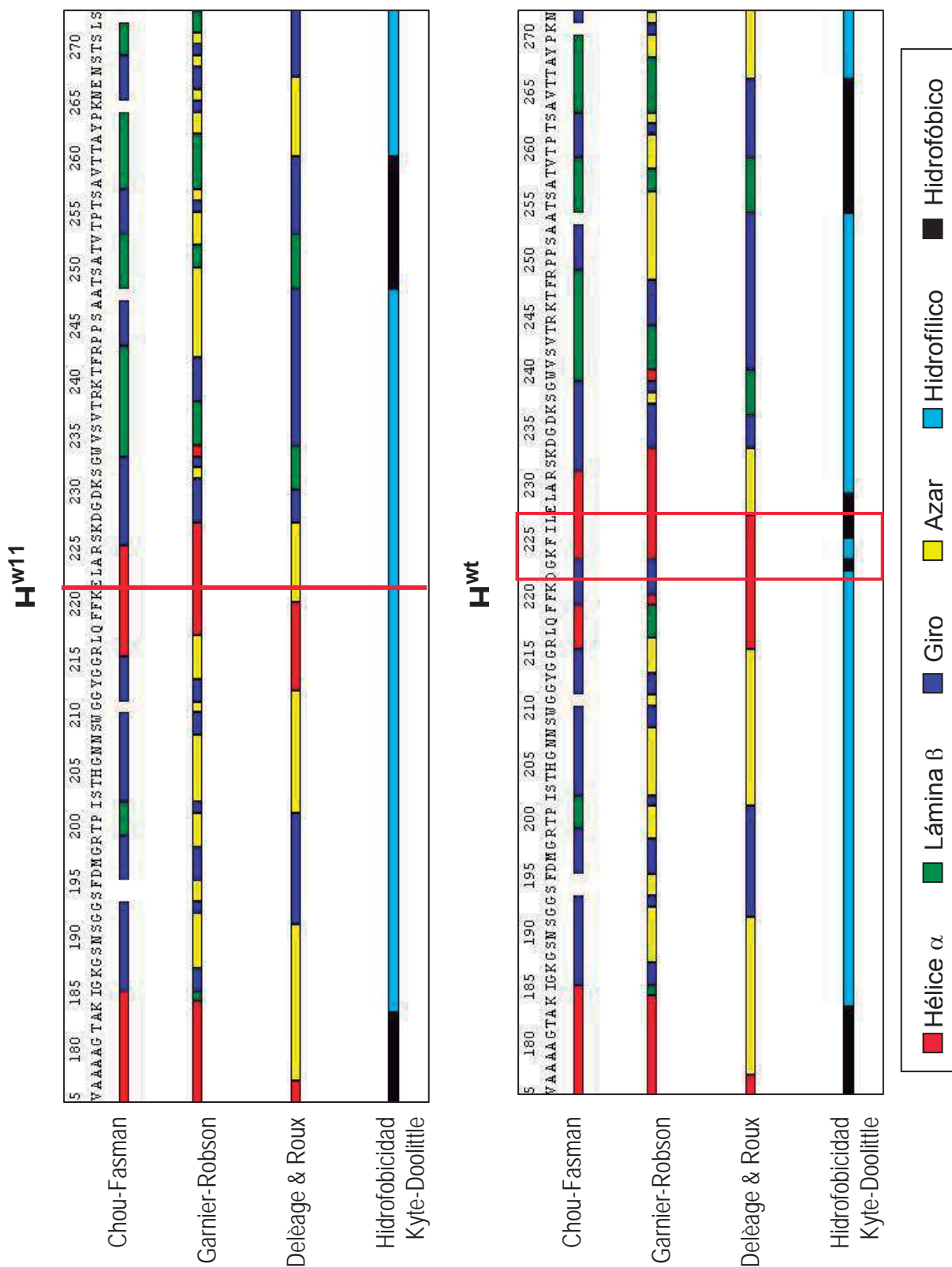


Figura 12. Predicciones de la estructura secundaria (Chou-Fasman, Garnier-Robson y Deleage-Roux) y de la hidrofobicidad para el segmento modificado de la proteína del gen mutante H^{w11} en comparación con la proteína silvestre (H^{wt}). La posición de los residuos eliminados y sus correspondientes en la proteína silvestre se muestran con el cuadro rojo.

El alelo H^{107} presentó una sustitución ³⁶⁶⁴A por G que se traduce en el cambio de alanina722 por treonina en una región en la que no se han reportado interacciones con otras proteínas de la vía (ver **Figura 13**). La treonina es uno de los aa más abundantes de H (Marquart *et al.*, 1999) y ya sea este aminoácido por sí sólo o la estructura secundaria que promueve, podrían ser necesarios para el correcto funcionamiento de la proteína. De ser esto cierto, esta región podría participar activamente en interacciones aún no reportadas de H con otras proteínas. El hecho de que en *D. hydei* esté presente de manera natural este cambio de alanina por treonina (Marquart *et al.*, 1999), posiblemente implique que existen cambios en otros sitios del gen.

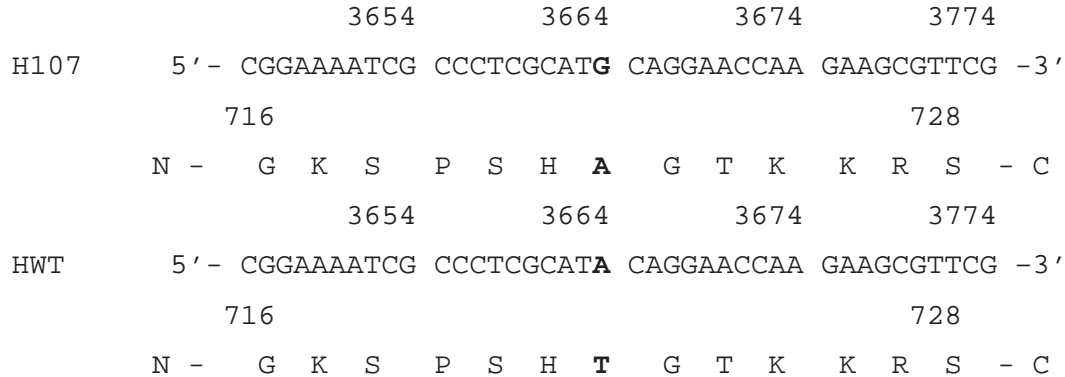


Figura 13. Análisis de las secuencias para el alelo mutante H^{107} y el silvestre H^{wt} y su correspondiente traducción a proteína. Los cambios de nucleótido (A por G) y de aa (T por A) se muestran en negritas.

Las predicciones para la proteína H^{107} (ver **Figura 14**) muestran la aparición de una hélice α de acuerdo a lo establecido por Garnier-Robson. La alanina pertenece al grupo de aa que promueven la formación de hélices α mientras que la treonina tiende a desestabilizarlas. El grupo hidroxilo que diferencia a ambos aa tiene como consecuencia que la treonina sea más hidrofílica que la alanina, aunque esto no se vea reflejado directamente en la escala de hidrofobicidad de la proteína completa. El hecho de que la mayoría de las predicciones no muestren cambios importantes en la estructura secundaria de la proteína parece reforzar la idea de que la mutación puntual que se encontró no es la única en esta mutante y

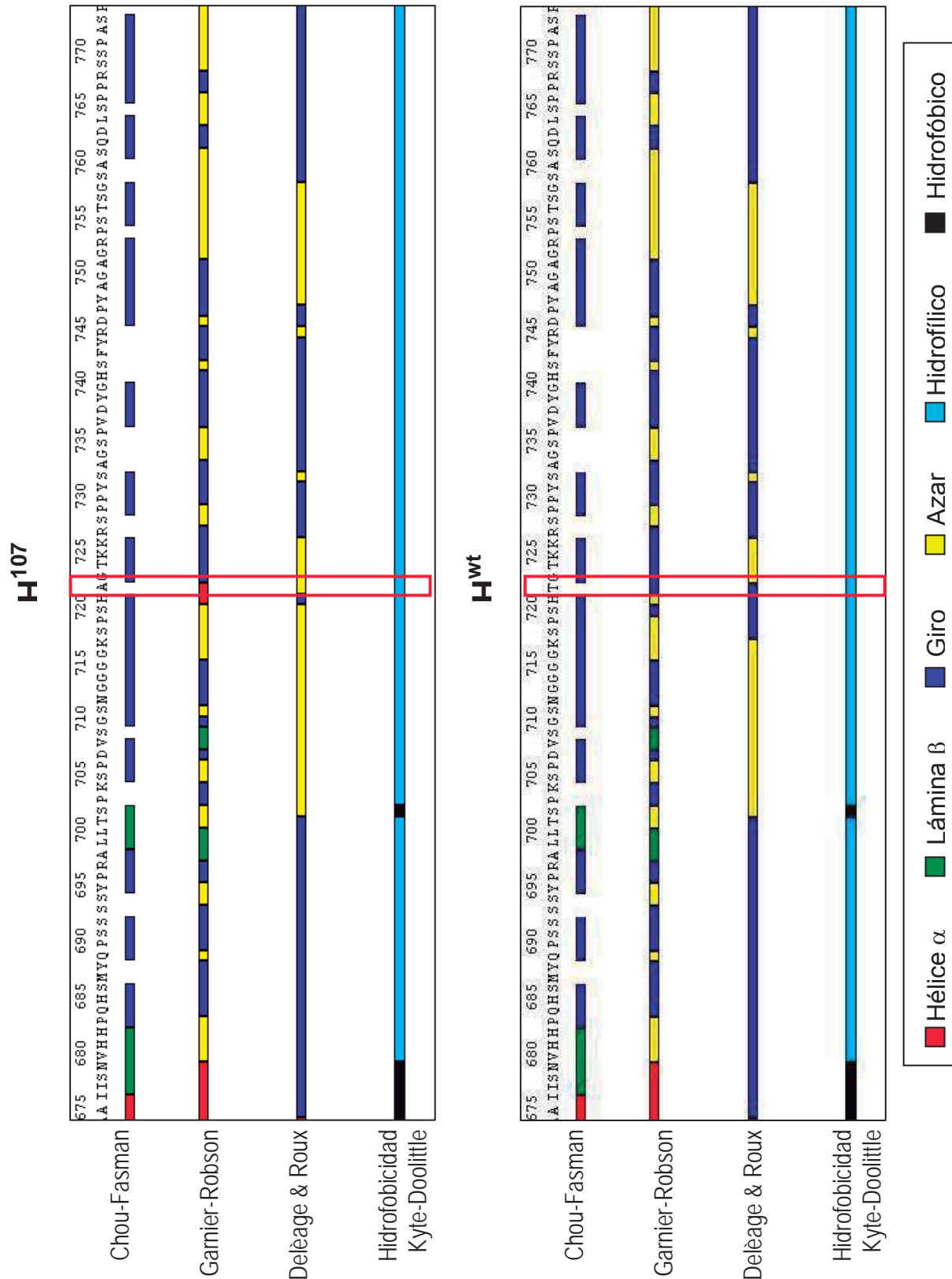


Figura 14. Predicciones de estructura secundaria e hidrofobicidad para el segmento modificado de la proteína del gen mutante H^{107} en comparación con la proteína silvestre (H^{wt}). El residuo mutado y su correspondiente en la proteína silvestre se muestran enmarcados en rojo.

que este cambio no es el responsable de su funcionamiento incorrecto (Maier *et al.*, 1992).

En el alelo H^3 se localizó una sustitución ^{4648}T por C que representan un cambio de serina1050 por prolina en el sitio de unión al co-represor dCtBP (ver **Figura 15**). La serina1050 podría ser un aa esencial para que se dé la interacción correcta entre la proteína H y este co-represor, misma que es necesaria para definir al destino de la célula en proceso de diferenciación. La conservación que presenta este aa en los distintos homólogos identificados de H explicaría la pérdida de la función causada por el cambio de este aminoácido en específico (Barolo *et al.*, 2002). Además, la serina es un aa abundante en H (17%) lo que le da una característica básica a la proteína (Maier *et al.*, 1992).

		4640		4650		4660		4670	
H3	5' -	TAAGGAATGA	ACAAAGT	CCA	GACTTACCAC	TGAATCTGTC	-3'		
		1045				1056			
	N -	R N E	Q S	P	D L P L	N L	- C		
		4640		4650		4660		4670	
HWT	5' -	TAAGGAATGA	ACAAAGT	TCA	GGTAAGCATT	CAATCAGTGC	-3'		
		1045				1056			
	N -	R N E	Q S	S	D L P L	N L	- C		

Figura 15. Fragmentos de las secuencias para el alelo mutante H^3 y el silvestre H^{wt} y su correspondiente traducción a proteína. Los cambios de nucleótido (T por C) y de aa (S por P) se muestran en negrita.

En el caso de la proteína mutante H^3 (ver **Figura 16**), la prolina está relacionada con giros en la estructura y suele desfavorecer las hélices α y las láminas β debido a que su grupo $-NH$ forma parte del anillo en la cadena lateral, lo que impide que tome parte en un puente de hidrógeno. En una hélice α , la prolina produce un plegamiento de 30° que rompe el siguiente puente de hidrógeno. En la predicción de Chou-Fasman podemos observar la pérdida de una hélice α debido a la presencia de prolina en la proteína mutante. Tanto en las predicciones de Garnier-Robson como en Delèage-Roux podemos observar que éste aminoácido

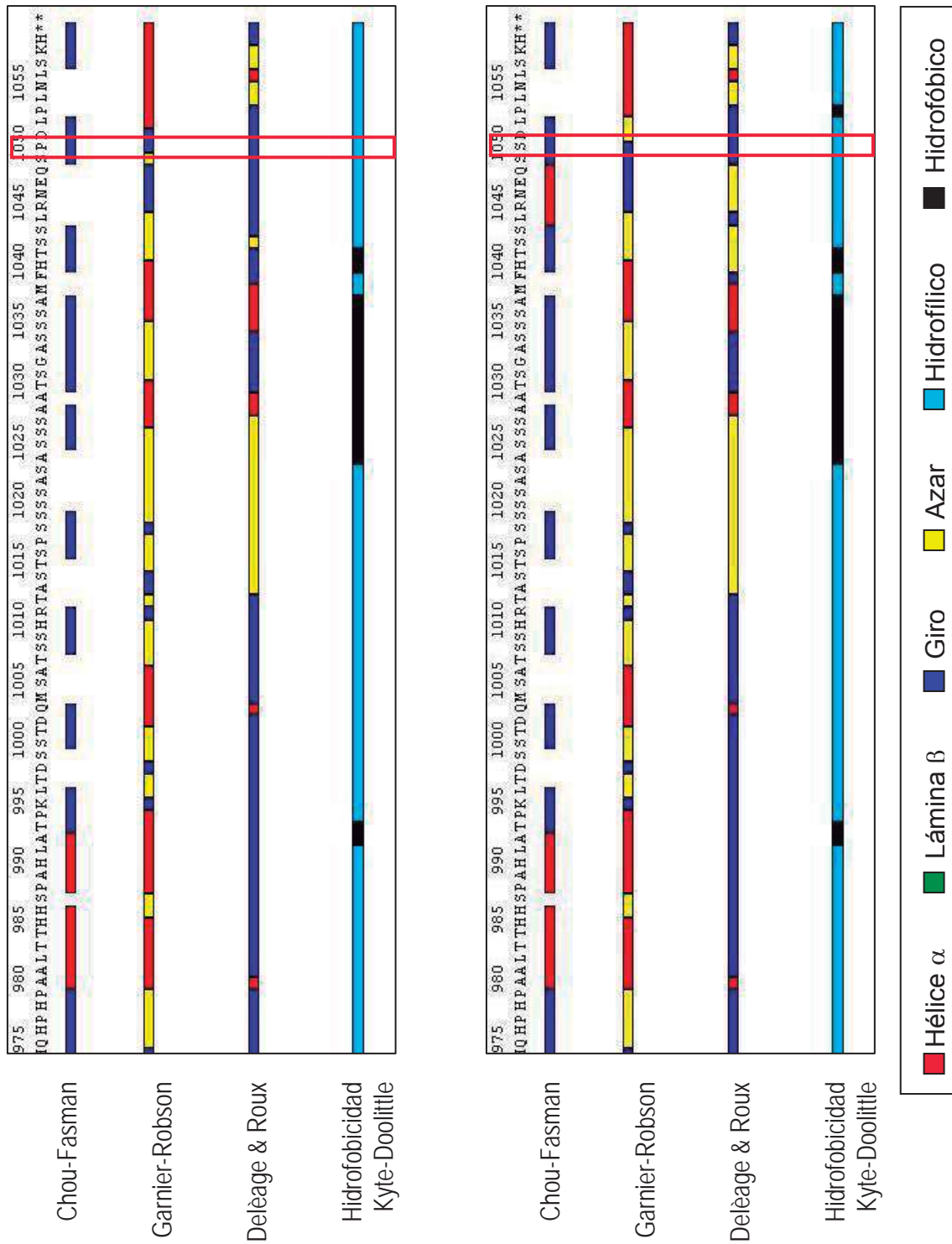


Figura 16. Predicciones de estructura secundaria e hidrofobicidad para el segmento modificado de la proteína del gen mutante H^3 en comparación con la proteína silvestre (H^{wt}). El residuo mutado y su correspondiente en la proteína silvestre se muestran enmarcados en rojo.

promueve giros en esa región. La serina también tiende a desestabilizar hélices α , lo que puede observarse en la posición 1049 en la predicción de Chou-Fasman, en donde en la proteína silvestre se observa la interrupción de la que estaba constituida del residuo 1044 al 1048. Aparentemente, el efecto desestabilizador de la prolina es mayor ya que en la proteína mutante ni siquiera aparece esta estructura. Estos cambios conformacionales podrían ser los responsables de que la proteína mutante sea incapaz de unirse al co-represor dCtBP, situación que le impide realizar su función de represor transcripcional y que da como resultado el fenotipo hipomórfico reportado por Maier *et al.* (1992).

8. CONCLUSIONES

Los alelos de *H* generados con rayos X presentaron mutaciones que fueron detectadas mediante la técnica de SSCP y corroboradas por el análisis de la secuencia.

El análisis de predicción de la estructura secundaria de las proteínas mutantes H reveló los posibles efectos conformacionales de las mutaciones encontradas y que podrían ser los responsables de los fenotipos de las líneas mutantes reportadas por Maier *et al.* (1992).

9. PERSPECTIVAS

- Comprender mejor las interacciones entre Hairless, Su (H) y sus co-represores (Gro y dCtBP).
- Descubrimiento de interacciones con otras proteínas.
- Identificación de proteínas homólogas a Hairless en metazoarios.

10. REFERENCIAS

1. Artavanis-Tsakonas, S., Matsuno, K. y Fortini, M. E. 1995. Notch signaling. *Science* 268: 225-232.
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. Ausubel. F. M., Brent R., Kingston R.E., Moore D.D., Seidman J.G., Smith J.A. y Struhl K. 1999. Short protocols in molecular biology. 4ª edición. John Wiley and Sons Inc.
4. Bang, A. G., Bailey, A. M. y Posakony, J. W. 1995. Hairless promotes stable commitment to the sensory organ precursor cell fate by negatively regulating the activity of the Notch signaling pathway. *Dev. Biol.* 172: 479–494.
5. Bang, A. G. y Posakony, J. W. 1992. The *Drosophila* gene *Hairless* encodes a novel basic protein that controls alternative cell fates in adult sensory organ development. *Genes Dev.* 6: 1752–1769.
6. Barolo, S., Walker, R. G., Polyakov, A. D., 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.
7. 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 Dev.* 16:1964–1976.
8. 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.
9. Baron, M. 2003. An overview of the Notch signalling pathway. *Sem. Cell & Dev. Biol.* 14: 113–119.
10. Bolívar Zapata, F. G. 2004. Fundamentos y casos exitosos de la biotecnología moderna. 1ª edición. Colegio Nacional. México, D.F.
11. Bonner, M. R. y Ballard, L. W. 1999. Considerations in adding mutation detection services to a sequencing core facility. *J. Biomol. Tech.* 10: 177–186.
12. Bravo-Patiño, A. y Baizabal-Aguirre, V.M. 2005. La vía de señalización Notch y el desarrollo embrionario animal. REB (en prensa).
13. Bray, S. y Furriols, M. 2001. Notch pathway: Making sense of Suppressor of Hairless. *Curr. Biol.* 11: R217–R221.
14. Bridges C. B. y Morgan, T. H. 1923. The third-chromosome group of mutant characters of *Drosophila melanogaster*. *Publ. Carnegie Instn.* 327: 1-251.
15. Brou, C., Logeat, F., Lecurtois, M., Vandekerckhove, J., Kourilasky, P., Schweisguth, F. e Israël, A. 1994. Inhibition of the DNA-binding activity of *Drosophila* Suppressor of Hairless

- and its human homolog, KBF2/RBP-J κ , by direct protein-protein interaction with *Drosophila* Hairless. *Genes Dev.* 8: 2491-2503.
16. Brou, C., Logeat, F., Gupta, N., Bessia, C., LeBail, O., Doedens, J.R., Cumano, A., Roux, P., Black, R.A. e Israel, A. 2000. A novel proteolytic cleavage involved in Notch signaling: the role of the disintegrin- metalloprotease TACE. *Mol. Cell* 5: 207-216.
 17. Brown, T. A. 2002. *Genomes*. 2a ed. BIOS Scientific Publishers Ltd, Oxford, UK <http://www.bios.co.uk/book.asp?isbn=1859960294> (en línea) 3 de septiembre 2005.
 18. Bulman, M. P., Kusumi, K., Frayling, T. M., McKeown, C., Garrett, C., Lander, E. S., Krumlauf, R., Hattersley, A. T., Ellard, S. y Turnpenny, P. D. 2000. Mutations in the human delta homologue, DLL3, cause axial skeletal defects in spondylocostal dysostosis. *Nat. Genet.* 24: 438-441.
 19. Campese, A. F., Bellavia, D., Gulino, A. y Screpanti, I. 2003. Notch signalling at the crossroads of T cell development and leukemogenesis. *Sem. Cell Dev. Bio.* 14: 151-157.
 20. Chou, P. Y. y Fasman, G. D. 1974. Prediction of protein conformation. *Biochemistry* 13: 222-245.
 21. Chou, P. Y. y G. D. Fasman. 1978. Empirical predictions of protein structure. *Annu. Rev. Biochem.* 47: 251-256.
 22. Courey, A. J. y Jia, S. 2001. Transcriptional repression: the long and the short of it. *Genes Dev.* 15: 2786-2796.
 23. Deleage, G. y Roux, B. 1987. An algorithm for protein secondary structure prediction based on class prediction. *Protein Eng.* 1: 289-94.
 24. De Strooper, B. 2003. Aph-1, Pen-2, and Nicastrin with Presenilin generate an active gamma-Secretase complex. *Neuron* 38: 9-12.
 25. Ellisen, L. W., Bird, J., West, D. C., Soreng, A. L., Reynolds, T. C., Smith, S. D. y Sklar, J. 1991. TAN-1, the human homolog of the *Drosophila Notch* gene, is broken by chromosomal translocations in T lymphoblastic neoplasms. *Cell* 66: 649-661.
 26. Fleming, R.J. 1998. Structural conservation of Notch receptors and ligands. *Semin. Cell Dev. Biol.* 9: 599-607.
 27. Fortini, M. E. 2001. Notch and presenilin: a proteolytic mechanism emerges. *Curr. Opin. Cell Biol.* 13: 627-634.
 28. Gerhart, J. 1999. Signaling Pathways in Development. *Teratology* 60: 226-239.
 29. Greenwald, I. 1998. LIN-12/Notch signaling: lessons from worms and flies. *Genes Dev* 12: 1751-1762.
 30. Griffiths, A. J. F., Miller, J. H., Suzuki, D. T., Lewontin, R. C. y Gelbart, W. M. 1999. *Introduction to Genetic Analysis*. 7a edición. W. H. Freeman & Co. New York.
 31. Haines, N. e Irvine, K. D. 2003. Glycosylation Regulates Notch Signaling. *Mol. Cell. Biol.* 4: 786-797.

32. Haltiwanger, R. S. 2002. Regulation of signal transduction pathways in development by glycosylation. *Curr. Opin. in Structural Biology*. 12: 593–598.
33. Haltiwanger, R. S. y Stanley, P. 2002. Modulation of receptor signaling by glycosylation: fringe is an O-fucose- β 1,3-N-acetylglucosaminyltransferase. *Biochem. Biophys. Acta* 1573: 328-335.
34. Hasson, P., Muller, B., Basler, K. y Paroush, Z. 2001 Brinker requires two corepressors for maximal and versatile repression in Dpp signaling. *EMBO J*. 20: 5725–5736.
35. Hayashi, K. y Yandell, D. W. 1993 How sensitive is PCR-SSCP?. *Hum Mut* 2: 338-346.
36. Highsmith W. E. Jr, Nataraj A. J., Jin Q., O'Connor J. M., El-Naby S. H., Kusakawa N. y Garner M. M. 1999. Use of DNA toolbox for the characterization of mutation scanning methods. II: Evaluation of single-strand conformation polymorphism analysis. *Electrophoresis* 20: 1195-1203.
37. Humphries, S. E., Gudnason, V., Whittall, R. e Ian N.M. 1997. Single-strand conformation polymorphism analysis with high throughput modifications, and its use in mutation detection in familial hypercholesterolemia. *Clinical Chemistry* 43: 427–435.
38. Jarriault, S., Brou, C., Logeat, F., Schroeter, E.H., Kopan, R. e Israel, A. 1995. Signalling downstream of activated mammalian Notch. *Nature* 377: 355-358.
39. Johannes, B. y Preiss, A. 2002. Wing vein formation in *Drosophila melanogaster*: Hairless is involved in the cross-talk between Notch and EGF signaling pathways. *Mech. Dev.* 115: 3-14.
40. Joutel, A., Corpechot, C., Ducros, A., Vahedi, K., Chabriat, H., Mouton, P., Alamowitch, S., Domenga, V., Cecillion, M. y Marechal, E. 1996. Notch3 mutations in CADASIL, a hereditary adult-onset condition causing stroke and dementia. *Nature* 383: 707-710.
41. Kidd, S., y Lieber, T. 2002. Furin cleavage is not a requirement for *Drosophila* Notch function. *Mech. Dev.* 115: 41-51.
42. Klein, T., Seugnet, L., Haenlin, M. y Martinez Arias, A. 2000. Two different activities of Suppressor of Hairless during wing development in *Drosophila*. *Development* 127: 3553–3566.
43. Kopan, R. y Turner, D. L. 1996. The Notch pathway: democracy and aristocracy in the selection of cell fate. *Curr. Opin. Neurobiol.* 6: 594-601.
44. Kovar, H., Jug, G., Auer, H., Skern, T. y Blaas, D. 1991. Two dimensional single-strand conformation polymorphism analysis: a useful tool for the detection of mutations in long DNA fragments. *Nucleic Acids Research* 19: 3507-3510.
45. Laguna, J. y Piña-Garza, E. 1994. *Bioquímica*. 4ª edición, Editorial Salvat, México, D.F. pp 19-30.
46. Lai, E. C. 2002. Keeping a good pathway down: transcriptional repression of Notch pathway target genes by CSL proteins. *EMBO Reports* 9: 840-845.

47. Lai, E. C. 2004. Notch signaling: control of cell communication and cell fate. *Development* 131: 965-973.
48. 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 Biol* 3(4): e96.
49. Le Borgne, R. y Schweisguth, F. 2003. Notch signaling: endocytosis makes Delta signal better. *Curr. Biol.* 13: R273–R275.
50. Le Gall, M. y Giniger, E. 2004. Identification of Two Binding Regions for the Suppressor of Hairless Protein within the Intracellular Domain of *Drosophila* Notch. *Jour. Bioch. Chem.* 279: 29418–29426.
51. Lee, S. S., Ha J. K. y Cheng K. 2000. Relative contributions of bacteria protozoa, and fungi to *in vitro* degradation of orchard grass cell walls and their interactions. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 3807-13.
52. Li, L., Krantz, I. D., Deng, Y., Genin, A., Banta, A. B., Collins, C. C., Qi, M., Trask, B. J., Kuo, W. L. y Cochran, J. 1997. Alagille syndrome is caused by mutations in human Jagged1, which encodes a ligand for Notch1. *Nat. Genet.* 16: 243-251.
53. Lieber, T., Kidd, S., y Young, M.W. 2002. Kuzbanian-mediated cleavage of *Drosophila* Notch. *Genes Dev.* 16: 209-221.
54. Lodish H, Berk A, Zipursky AL, Matsudaira P, Baltimore D and Darnell J. 2000. *Molecular Cell Biology*. 4a edición. W. H. Freeman, New York. http://www.whfreeman.com/college/book.asp?disc=BIO&id_product=1124001436&@id_course=1058000157&disc_name=Biology (en línea) 3 de sep del 2005.
55. Logeat, F., Bessia, C., Brou, C., LeBail, O., Jarriault, S., Seidah, N.G. e Israel, A. 1998. The Notch1 receptor is cleaved constitutively by a furin-like convertase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 8108-8112.
56. Lyman, D. F. y Yedvobnick, B. 1995. *Drosophila* Notch receptor activity suppresses Hairless function during adult external sensory organ development. *Genetics* 141: 1491–1505.
57. Maier, D., Stumm, G., Kuhn, K. y Preiss, A. 1992 Hairless, a *Drosophila* gene involved in neural development, encodes a novel, serine rich protein. *Mech. Dev.* 67: 97-106.
58. Maier, D., Nagel, A. C. y Preiss, A. 2002. Two isoforms of the Notch antagonist Hairless are produced by differential translation initiation. *PNAS* 99: 15480–15485.
59. Marquart, J., Alexief-Damianof, C., 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.
60. Mathews, C. K., van Holde, K. E. 2001. *Bioquímica*. 2a edición, Ed. McGraw-Hill, España. pp 790-791.

61. Morel, V., Lecourtois, M., Massiani, O., Maier, D., Preiss, A. y Schweisguth, F. 2001. Transcriptional repression by Suppressor of Hairless involves the binding of a Hairless-dCtBP complex in *Drosophila*. *Curr. Biol.* 11: 789–792.
62. Morgan, T. H. 1917. The theory of the gene. *Am. Nat.* 51: 513-544.
63. Mumm, J.S., Schroeter, E.H., Saxena, M.T., Griesemer, A., Tian, X., Pan, D.J., Ray, W.J. y Kopan, R. 2000. A ligand-induced extracellular cleavage regulates gamma-secretase-like proteolytic activation of Notch1. *Mol. Cell* 5: 197-206.
64. 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 combined activity of Groucho and CtBP corepressors. *Mol. Cell. Biol.* 25: 10433-10441.
65. Nakashima, H., Nishikawa, K. y Ooi, T. 1986. The folding type of a protein is relevant to the amino acid composition. *J. Biochem. (Tokyo)*. 99:153-62.
66. Nishikawa, K. 1983. Assessment of secondary-structure prediction of proteins -comparison of computerized Chou-Fasman methods with others. *Biochim. Biophys. Acta* 748: 285-299.
67. Nye, J. S. 1997. Notch signals Kuz it's cleaved. *Curr Biol* 7: R716-R720.
68. Oda, T., Elkahloun, A. G., Pike, B. L., Okajima, K., Krantz, I. D., Genin, A., Piccoli, D. A., Meltzer, P. S., Spinner, N. B. y Collins, F. S. 1997. Mutations in the human Jagged1 gene are responsible for Alagille syndrome. *Nat. Genet.* 16: 235-242.
69. Okochi, M., Steiner, H., Fukumori, A., Tanii, H., Tomita, T., Tanaka, T., Iwatsubo, T., Kudo, T., Takeda, M., y Haass, C. 2002. Presenilins mediate a dual intramembranous gamma-secretase cleavage of Notch-1. *EMBO J.* 21: 5408-5416.
70. Orita, M., Suzuki, Y., Sekiya, T. y Hayashi, K. 1989. Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction. *Genomics* 5: 874-879.
71. Paroush, Z., Finley, R.L. Jr, Kidd, T., Wainwright, S.M., Ingham, P.W., Brent, R. e Ish-Horowicz, D. 1994. Groucho is required for *Drosophila* neurogenesis, segmentation, and sex determination and interacts directly with hairy-related bHLH proteins. *Cell* 79: 805–815.
72. Poortinga, G., Watanabe, M. y Parkhurst, S. 1998 *Drosophila* CtBP: a Hairy-interacting protein required for embryonic segmentation and Hairy-mediated transcriptional repression. *EMBO J.* 17: 2067–2078.
73. Rand, M.D., Grimm, L.M., Artavanis-Tsakonas, S., Patriub, V., Blacklow, S.C., Sklar, J., y Aster, J.C. 2000. Calcium depletion dissociates and activates heterodimeric notch receptors. *Mol. Cell. Biol.* 20: 1825-1835.
74. Sambrook, J. y Russell, D.W. 2001. *Molecular Cloning*. 3a edición. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, N.Y.
75. Schroeter, E.H., Kisslinger, J.A. y Kopan, R. 1998. Notch-1 signalling requires ligand-induced proteolytic release of intracellular domain. *Nature* 393: 382-386.

76. 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.
77. Schweisguth, F. 2004. Regulation of Notch Signaling Activity. Review. *Current Biology* 14: R129–R138.
78. Song, H., Hasson, P., Paroush, Z. y Courey, A. J. 2004. Groucho Oligomerization Is Required for Repression In Vivo. *Mol. Cell Biol.* 24: 4341–4350.
79. Sunnucks, P., Wilson, A. C., Beheregaray, L. B., Zenger, K., French, J. y Taylor, A. C. 2000. SSCP is not so difficult: the application and utility of single-stranded conformation polymorphism in evolutionary biology and molecular ecology. *Molecular Ecology* 9: 1699–1710.
80. Turner, J. y Crossley, M. 2001. The CtBP family: Enigmatic and enzymatic transcriptional co-repressors. *Bioessays* 23: 683–690.

APÉNDICE I. REACTIVOS

Acetato de sodio 2M pH 7.4-7.8

Acetato de sodio	16.407 g
Agua dd	cbp 100 ml

Ajustar pH a 7.4-7.6 con ácido acético y esterilizar

Acetato de sodio 3M pH 5.2

Acetato de sodio	24.61 g
Agua dd	cbp 100 ml

Ajustar pH a 5.2 con ácido acético y esterilizar

Acrilamida/Bisacrilamida (37.5:1) 40%

Acrilamida	38.93g
Bis-acrilamida	1.07g
Agua destilada desionizada	cbp 100ml

Mezclar y almacenar en frasco ámbar

Agar Luria-Bertani con Ampicilina

Triptona	10 g
Cloruro de sodio	10 g
Agar	10 g
Extracto de levadura	5 g
Agua destilada desionizada	cbp 1L

Mezclar, ajustar pH a 7.0 con NaOH 1N y esterilizar. Cuando el medio esté a <42°C adicionar 1 ml de ampicilina (100 mg/ml). Vaciar en cajas Petri.

Ampicilina (100 mg/ml)

Ampicilina	500 mg
Agua dd estéril	cbp 5 ml

Bromuro de etidio (5 mg/ml)

Bromuro de etidio	500 mg
Agua dd estéril	cbp 100 ml

Buffer de carga gel acrilamida

Formamida	9.5 ml
EDTA	400 µl
NaOH	1 µl
Azul de bromofenol	2 mg
Xilencianol	2 mg
Agua dd estéril	cbp 10 ml

Mezclar y almacenar a 4°C

Buffer TAE 50X

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 (1L)

Tris base	108 g
Ácido Bórico	55 g
EDTA 0.5 M pH 8.0	40 ml
Agua destilada desionizada	cbp 1L

Mezclar y esterilizar

Cloruro de sodio 1.2 M

Cloruro de sodio	7.013 g
Agua dd	cbp 100 ml

Mezclar y esterilizar

CTAB (bromuro de hexadeciltrimetilamonio) al 10% (W/V)

CTAB	5 g
Agua dd	cbp 50 ml

Mezclar y esterilizar

EDTA 125 mM pH 8.0

EDTA	45.532 g
Agua dd	cbp 1 L

Ajustar pH a 8.0 con NaOH.

EDTA 0.5 M pH 8.0

EDTA	186.126 g
Agua dd	cbp 1 L

Ajustar pH a 8.0 con NaOH.

Etanol 70%

Etanol absoluto	700 ml
Agua dd	300 ml

Mezclar y almacenar a 4°C

Gel Acrilamida 10%

Acrilamida/Bisacrilamida 40%	10 ml
TBE 10X estéril	4 ml
Glicerol desionizado	2.8 ml
Persulfato de amonio 10% recién preparado	400 µl
TEMED	40 µl
Agua dd estéril	22.8 ml

Vaciar inmediatamente después de agregar el persulfato y el TEMED

Gel de agarosa 1%

TAE 1X filtrado estéril	30 ml
Agarosa	0.3 g
Bromuro de etidio	3 µl

Mezclar la agarosa con el TAE y calentar hasta solubilizarlo, adicionar el bromuro hasta que se atempere un poco la solución y vaciar el gel.

Glicerol desionizado

Glicerol	100 ml
Resina AG® 501-X8 (BioRad)	5 g

Mezclar y agitar constantemente durante 1 h. Filtrar con papel Whatman 3MM.

IPTG 0.1M (isopropil β-D-galactopiranosido)

IPTG	0.024 g
Agua dd estéril	cbp 1 ml

Mezclar y almacenar a 4°C

Lisozima (20mg/ml)

Lisozima	0.2 g
Agua dd estéril	cbp 10 ml

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

Medio Luria-Bertani (LB)

Triptona	10 g
Cloruro de sodio	10 g
Extracto de levadura	5 g
Agua destilada desionizada	cbp 1L

Mezclar, ajustar pH a 7.0 con NaOH 1N y esterilizar

Persulfato de amonio 10%

Persulfato de amonio	100 mg
Agua dd estéril	cbp 1ml

Mezclar y utilizar inmediatamente

Solución de tinción

Nitrato de plata	2 g
Agua dd estéril	cbp 1 L

Mezclar y almacenar en frasco ámbar

Solución fijadora

Etanol absoluto	100 ml
Ácido acético glacial	5 ml
Agua dd estéril	895 ml

Mezclar y almacenar en frasco ámbar

Solución reveladora

NaOH	30 g
Formaldehído	2.5 ml
Agua dd estéril	cbp 1 L

Mezclar y almacenar en frasco ámbar

Solución STET

EDTA 0.5M pH 8.0 estéril	1 ml
Tritón X-100 al 10% estéril	0.5 ml
Tris-HCl 1M pH 8.0 estéril	0.5 ml
Sacarosa	0.08 g
Agua dd estéril	8 ml

Solución TE_{1/10} pH 7.6

Tris-HCl	0.788 g
EDTA	0.1861 g
Agua dd estéril	cbp 500 ml

Ajustar pH a 7.6 con NaOH 0.1N y esterilizar

Solución TFb1

Cloruro de potasio	100mM
Cloruro de manganeso	50mM
Acetato de potasio	30mM
Cloruro de calcio	10mM
Glicerol	15%

Ajustar pH a 5.8 con ácido acético 0.2M y esterilizar por filtración en filtro de 0.22 μ m. Almacenar a 4°C.

Solución TFb2

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

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

Tris-HCl 1M pH 8.0

Tris-HCl	12.11 g
Agua dd	cbp 100 ml

Ajustar pH a 8.0 con ácido clorhídrico concentrado y esterilizar

Tritón X100 10%

Tritón X100	10 ml
Agua dd	cbp 100 ml

Mezclar y esterilizar

X-Gal 20 mg/ml (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido)

X-Gal	200 mg
N,N'-dimetilformamida	cbp 10 ml

Mezclar, cubrir con papel aluminio y almacenar a -20°C protegido de la luz