



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO

PROGRAMA INSTITUCIONAL DE MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

CENTRO MULTIDISCIPLINARIO DE ESTUDIOS EN BIOTECNOLOGÍA

**DISEÑO Y EXPRESIÓN DE UN PÉPTIDO DERIVADO DE LA PROTEÍNA RBP-J_K
DE *Mus musculus* CON ALTA AFINIDAD POR LA PROTEÍNA HAIRLESS DE
Drosophila melanogaster.**

Tesis que presenta

Ingeniero en Biotecnología GERMÁN SAUCEDO CORREA

Para obtener el grado de

MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Opción en

MICROBIOLOGÍA CELULAR Y GENÉTICA MOLECULAR

Asesor

Doctor en Ciencias. ALEJANDRO BRAVO PATIÑO

Morelia, Michoacán, México. Enero 2015

AGRADECIMIENTOS/DEDICATORIA

Índice	c
RESUMEN	i
SUMMARY	ii
1. INTRODUCCIÓN	2
1.1. <i>La comunicación celular y su importancia</i>	2
1.1.2. <i>Vías de traducción de señales, una red de comunicación celular</i>	3
1.2. <i>La vía de señalización Notch</i>	3
1.2.1. <i>Ligandos y receptores de la vía Notch</i>	6
1.2.2. <i>Supresor de Hairless, el Factor Transcripcional de la vía de señalización Notch</i> . 10	
1.2.3. <i>Antagonista por naturaleza, Hairless</i>	14
1.2.4. <i>Proteínas moduladoras de la señalización Notch</i>	15
1.3. <i>Mecanismo de la vía de señalización Notch</i>	21
1.4. <i>Mecanismos de diferenciación de la vía Notch</i>	22
1.4.1. <i>Inhibición lateral</i>	23
1.4.2. <i>Decisión de linaje/división asimétrica</i>	23
1.4.3. <i>Señalización inductiva</i>	23
1.5. <i>Complejos activadores y represores de la vía Notch, un intercambio necesario para la correcta señalización</i>	24
2. JUSTIFICACIÓN	27
3. HIPÓTESIS	29
4. OBJETIVO GENERAL	30
4.1. <i>Objetivos específicos</i>	30
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	34
5.1. Capítulo 1	34
6. DISCUSIÓN GENERAL Y CONCLUSIONES	52
7. Bibliografía	54
8. Apéndice	61
8.1. <i>Preparación de células competentes para choque térmico (cepa Escherichia coli DH5αF'; Cepa E. coli XL1Blue; Escherichia coli TOP10)</i>	61
8.2. <i>Preparación de soluciones</i>	62

Índice de figuras y tablas

Introducción

Figura 1.	<i>Ligandos y Receptores de la VN.....</i>	<i>5</i>
Figura 2.	<i>Ligandos de la VN.....</i>	<i>7</i>
Figura 3.	<i>Esquema de la activación y regulación de la VN.....</i>	<i>9</i>
Figura 4.	<i>Complejos de activación de la VN.....</i>	<i>11</i>
Figura 5.	<i>Complejos transcripcionales de la VN.....</i>	<i>13</i>
Figura 6.	<i>Esquema de Su(H) y sus dominios.....</i>	<i>14</i>
Figura 7.	<i>Sitio de corte entre NICD y NECD.....</i>	<i>17</i>
Tabla 1.	<i>Componentes núcleo de la VN.....</i>	<i>20</i>
Figura 8.	<i>Diagrama de la activación de la VN.....</i>	<i>22</i>
Figura 9.	<i>Representación de los mecanismos de Notch.....</i>	<i>24</i>
Figura 10.	<i>Diagrama de flujo de la estrategia experimental.....</i>	<i>31</i>
Tabla 2.	<i>Características de los oligonucleótidos utilizados.....</i>	<i>32</i>
Figura 10.	<i>Mapa genético del plásmido pFN18K.....</i>	<i>33</i>

Capítulo 1

Figura 1.	<i>Extracción de material genético de <i>Mus musculus</i>.....</i>	<i>43</i>
Figura 2.	<i>PCR para obtener el fragmento CTD de RBP-Jk.....</i>	<i>43</i>
Figura 3.	<i>Digestión del vector con la construcción de fusión Tag-CTD.....</i>	<i>44</i>
Figura 4.	<i>Alineamiento y Traducción de la Secuenciación del péptido Tag-CTD.....</i>	<i>45</i>
Figura 5.	<i>Prueba de expresión del péptido de fusión Tag-CTD.....</i>	<i>46</i>
Figura 6.	<i>Western de la purificación e interacción del péptido de fusión contra extracto proteico de embriones de mosca.....</i>	<i>48</i>

RESUMEN

La vía de señalización Notch (VN) es una de las rutas de comunicación celular que se utiliza principalmente durante el desarrollo embrionario temprano de los individuos, participando en la diferenciación celular y por lo tanto en la organogénesis. La VN, en conjunto con otras vías de transducción de señales, permite las complejas organizaciones espacio-temporales que orquestan y diseñan a los organismos multicelulares. La proteína Hairless (H) es el principal regulador negativo de esta vía y, por lo tanto, funciona como un antagonista de la misma. Si bien ha sido caracterizada en *Drosophila melanogaster* y otros insectos, esta proteína de vital importancia para la vía, no cuenta con un homólogo reportado en mamíferos, solo se sabe que el complejo de proteínas SHARP/MINT/SPEN se une a RBP-J κ /CBF1 para regular de manera negativa la vía de Notch, por lo que se cree que en dicho complejo se encuentre el parálogo de H. Sin embargo, aún no ha habido estudios concluyentes al respecto, ya que dichas proteínas no han sido caracterizadas funcionalmente. Recientemente se demostró que RBP-J κ /CBF1 tiene la capacidad de unir en la región carboxilo terminal, a la proteína H de *D. melanogaster* para armar un complejo regulador negativo transcripcionalmente funcional en embriones de mosca. Mediante PCR se logró amplificar el fragmento CTD de RBP-J κ de *Mus musculus*, se clonó y se produjo la expresión del péptido para diseñar una trampa para capturar una proteína, con una función semejante a la de Hairless, que comparta el sitio de unión al fragmento CTD y funciones similares de regulación negativa en la vía Notch.

Palabras clave: Notch, RBP-J κ , Su(H), Dominio C-Terminal

SUMMARY

The Notch signaling pathway is mainly required during early embryo development in animals. For this reason, it is important in cell differentiation and, as a consequence, in organogenesis. Notch pathway, with the support of another signaling pathways, rules the complex spatial and temporal organization that design and compose the new multicellular organism. Hairless protein has the ability to negatively modulates this transduction signaling pathway. Despite efforts to detect Hairless in higher animals, a homologue protein has no yet been identified. This is essential to understand the regulatory processes during embryo development and other pathological processes in which Notch pathway is involved. RBP-J κ , the homolog of Su(H) in mammals has a binding domain to Hairless, in the carboxyl ending region and form a negative functional transcriptional complex that regulates the Notch Signaling in *Drosophila melanogaster*. Using analysis in silico and molecular biology techniques was a peptide construction was design that function like a bait to catch a protein with a similar function and binding site protein like Hairless.

Key Word: Nocht, RBP-Jk, Su(H), C-Terminal Domain

1. INTRODUCCIÓN

1.1. La comunicación celular y su importancia.

Todos los seres vivos están diseñados para realizar las funciones necesarias que los identifican como tales: nacer, crecer, reproducirse y morir. Estas funciones se vuelven más complejas en organismos pluricelulares, ya que deben ser controladas en cada célula, tejido y órgano. Para llevar a cabo de manera ordenada estas tareas, es necesario contar con un sistema de comunicación eficaz. En este contexto, el proceso de comunicación implica la transmisión de una *señal* que tendrá la finalidad de generar una *respuesta*.

Para que este proceso sea exitoso, deben de existir dos elementos, un elemento *emisor* (el que genera el mensaje) y un elemento *receptor* (el que recibe el mensaje). Este último debe de contar con las habilidades y/o herramientas necesarias para entender o descifrar el mensaje que concluirá en un *resultado*. Esto nos lleva a inferir que todas las funciones celulares son coordinadas mediante un sistema de comunicación, el cual, dependiendo de los estímulos recibidos, hará que la célula reaccione de diversas maneras para dar una respuesta.

Por lo tanto, en un organismo vivo la comunicación celular es un proceso por el cual las células transmiten información a otras células, vecinas o distantes, por medio de mensajeros (p. ej. hormonas), para promover o modificar una respuesta. Estas respuestas pueden ser estimuladoras, inhibitoras o moduladoras, lo cual dependerá del estímulo recibido, de la célula receptora y de su estado fisiológico. En consecuencia, la comunicación celular es un proceso fundamental para la vida, ya que en gran medida es la responsable de la continua respuesta y adaptación tanto al medio externo como al medio interno¹. Es decir, las células tienen que percibir señales de la situación que las rodea para que sus respuestas sean acordes a las circunstancias para asegurar la supervivencia³⁸.

1.1.2. Vías de traducción de señales, una red de comunicación celular.

Las *vías de señalización celular*, o *vías de transducción de señales*, regulan la comunicación, desarrollo y mantenimiento de un organismo multicelular. En estos procesos se ven involucradas una gran variedad de moléculas (en su mayoría proteínas), participando en un intrincado intercambio de información bioquímica finamente controlado y acoplado. Cada una de las moléculas que se ven involucradas en este flujo de información tienen funciones bien definidas. Algunas de ellas actúan como efectoras del mensaje, otras como receptoras y otras más se encargan de interpretar y de dar respuesta a dicho mensaje. Se ha demostrado que las interacciones de las moléculas que participan en el mecanismo de transducción de una señal, formando uno o más complejos denominados transduccisomas³, controlan y coordinan una amplia variedad de procesos moleculares, alterando tanto el metabolismo como la expresión de genes en la célula estimulada, durante la existencia de todo ser vivo².

1.2. La vía de señalización Notch.

En cuanto al desarrollo embrionario se refiere, se conoce que son siete las vías de transducción de señales que, interactuando juntas, regulan la mayoría de los destinos celulares, de acuerdo al contexto y tiempo de desarrollo del organismo⁴: Wntless (Wnt), Factor de Crecimiento Transformante beta (TGF- β), Hedgehog (Hh), Receptor de Tirosina Kinasa (RTK), Receptor Nuclear, Jak/STAT y Notch. Estas vías de transducción regulan un sinnúmero de procesos importantes para la célula y, por tanto, para el organismo.

Dentro de estas vías de comunicación celular, la vía de señalización Notch es la encargada de coordinar y controlar el desarrollo de un organismo pluricelular

después de la fusión de los gametos y de la aparición de las tres capas germinales del embrión. Esta vía, al ser tan importante, se encuentra evolutivamente conservada en los metazoarios^{3,4}. Su activación coordina una amplia variedad de procesos durante el desarrollo temprano y tardío del embrión, promoviendo la proliferación celular, movilidad, especialización celular y apoptosis^{2, 5}. Además, la vía de señalización Notch (VN) participa en el funcionamiento fisiológico adecuado del organismo, desde la etapa de embrión hasta la de adulto^{5, 7}, coordinando el desempeño de las células diferenciadas⁸.

Puesto que la VN se encuentra prácticamente conservada en todos los metazoarios, las proteínas que la constituyen presentan cambios y/o modificaciones muy sutiles en las diferentes especies en que han sido descritas, a excepción de la proteína Hairless (de la cual se tratará más adelante) lo que les permite funcionar de manera interespecífica⁶. Dicho de otra manera, es posible intercambiar genes que codifican para las proteínas que componen esta vía de señalización entre dos especies distintas y se puede lograr que la proteína “extraña” funcione como si fuera la proteína nativa²². Los trabajos realizados por Meier y Kovall (2011)^{6, 40} refuerzan esta relación inter-especie de los factores transcripcionales y sus reguladores, (el dominio intracelular de Notch, y las proteínas Hairless y Supresor de Hairless). Estos trabajos comprobaron el nivel de interacción entre factores transcripcionales de mosca, ratón y gusano, con el regulador negativo Hairless de mosca, demostrando la afinidad que existe entre los dominios de proteínas provenientes de distintas especies de metazoarios y el mecanismo de acción de la VN altamente conservado entre dichas especies^{3, 22}.

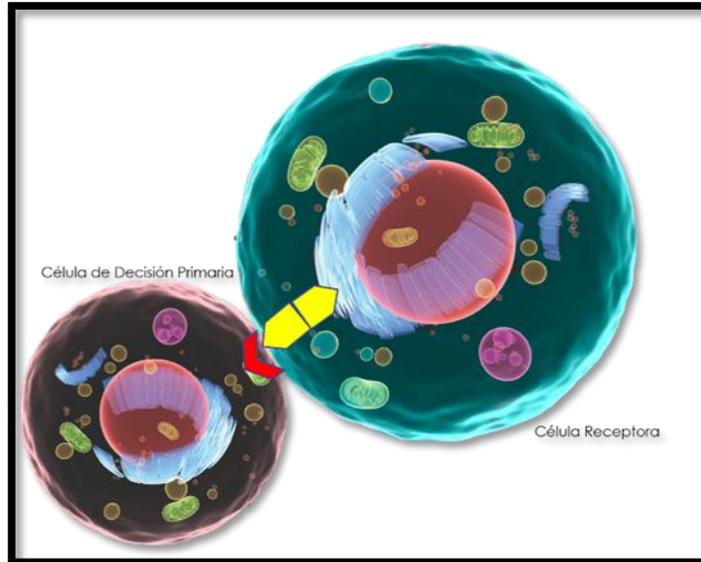


Figura 1. Esquema de la activación de la VN. Se muestra el ligando (rojo) que pertenece a la célula que manda la señal o también conocida como célula de decisión primaria; se muestra el receptor (amarillo) que pertenece a la célula receptora de la señal.

Las proteínas que componen la VN se pueden clasificar en dos grandes grupos. En el primer grupo encontramos las proteínas que transducen la señal y funcionan como ligandos, receptores, represores, co-represores, activadores, co-activadores y factores de la transcripción, y que constituyen el núcleo de la vía¹⁰. En el segundo grupo encontramos las proteínas reguladoras que modulan la respuesta celular e influyen en la duración de la señal recibida, modificando de manera directa a las proteínas integrantes del primer grupo por medio de sus actividades de glucosiltransferasa, proteasa, metaloproteasa y ubiquitina-ligasa y en algunos casos especiales de fosforilación¹¹.

1.2.1. Ligandos y receptores de la vía Notch.

Ligandos: Familia **Delta/Serrate/Lag-2** (DSL). Las proteínas de este grupo se caracterizan por ser proteínas transmembranales de tipo 1 (atraviesa solo una vez la membrana celular)⁸. Su presencia, en el contexto de la VN, define a las células de decisión primaria, ya que son las encargadas de transmitir, mediante su dominio EBD³ (Fig. 2A), el estímulo al receptor de las células efectoras, para iniciar el proceso de especialización celular que conduce a la célula receptora estimulada a un destino celular alternativo al de la célula de decisión primaria³⁰.

Receptores: La Familia LIN-12/Notch, está constituida por una familia de proteínas transmembranales de tipo 1 que presentan un nivel de conservación considerablemente alto, al grado de ser prácticamente idénticos en su dominio intracelular en todas las especies en que han sido descritas. Tienen un peso aproximado promedio de 300 kiloDaltones (kDa) (Fig. 2B), y funcionan como receptores de los ligandos DSL. La región extracelular contiene de 10 a 36 elementos semejantes al factor de crecimiento epidérmico (EGF, por sus siglas en inglés)³, y se sabe que los localizados en posiciones 11 y 12, de las proteínas Notch en *Drosophila* y mamíferos, constituyen el núcleo primario de interacción con el ligando¹². Además, la O-glucosilación de los EGF en posiciones 24, 25 y 26 (Fig. 2B) confiere niveles de regulación adicionales tejido-específicos; es decir, la activación de la vía puede generar señales intracelulares diferentes que determinen el uso preferencial de cualquiera de los mecanismos mediante los cuales se establece la ruta de diferenciación¹³. Los otros elementos repetidos EGF se encargan de modificar la actividad de la proteína Notch, potenciando o inhibiendo la interacción con los ligandos, así como de estabilizar la estructura del receptor. Adyacentes a estos elementos hay un dominio que contiene tres zonas CR (rica en cisteínas) y que se conoce como secuencias repetidas LNG (por estar conservadas en las proteínas **LIN-12**, **Notch** y **GLP-1**), esenciales para la estabilidad y la correcta conformación del dominio extracelular. Entre las secuencias repetidas LNG y el dominio transmembranal, existen dos residuos de cisteína importantes para el ensamble de la forma biológicamente activa de estas proteínas¹⁴.

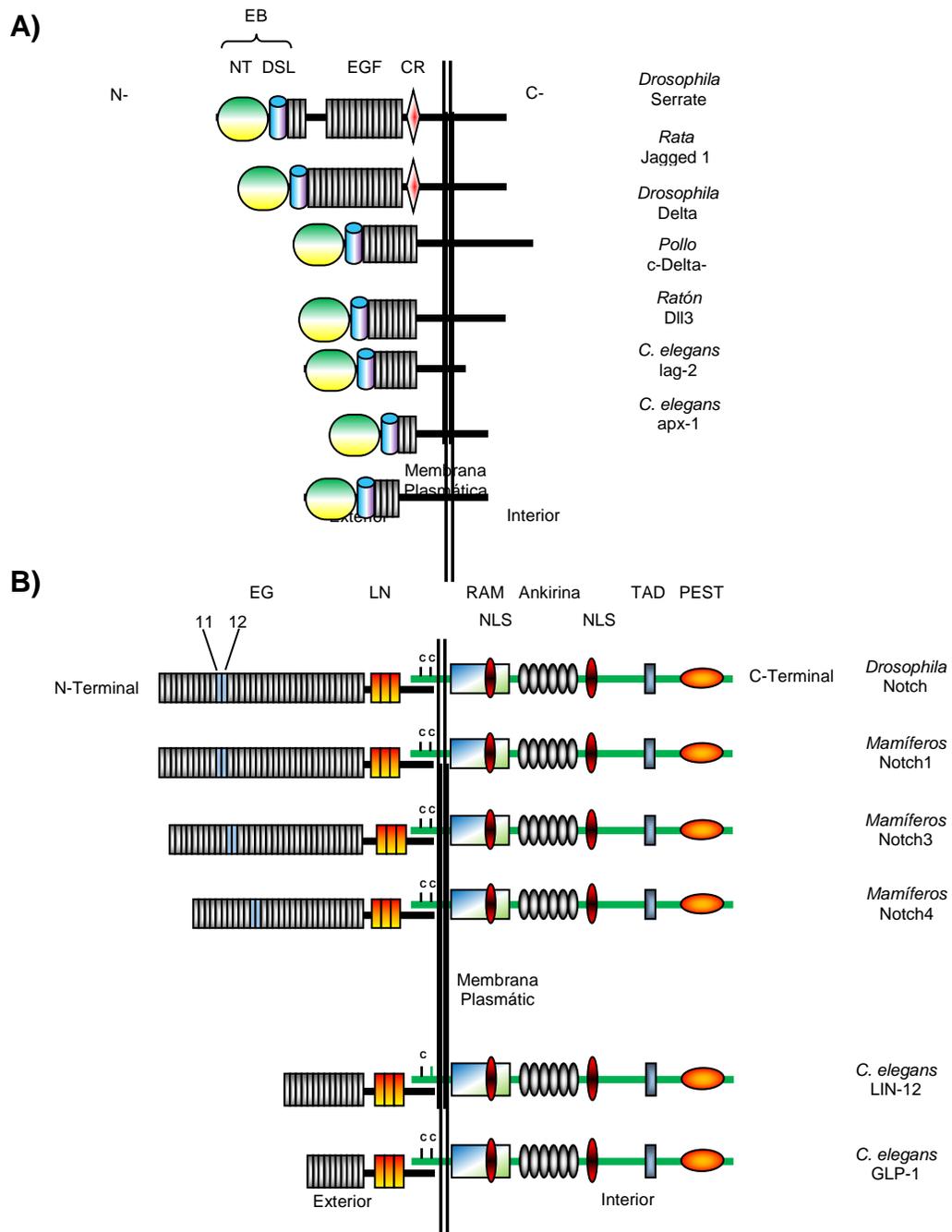


Figura 2. Representación esquemática de los elementos estructurales de la vía Notch. **(A)** Ligandos de la familia Delta-Serrate-Lag-2. **(B)** Receptores de la familia LIN-12/Notch. **EBD**, dominio de enlace a EGF; **NT**, dominio extracelular; **DSL**, dominio modificado común en la familia Delta-Serrate-Lag-2; **EGF**, factor epidérmico de crecimiento; **CR**, región rica en cisteína; **LNG**, zonas CR de los receptores; **C**, residuo de cisteína; **RAM**, región de interacción con factores transcripcionales; **NLS**, señal de localización nuclear; **TAD**, dominio activador de la transcripción; **PEST**, región rica en prolina,

glutamato, serina y treonina. Los EGF en posición 11 y 12 (color blanco) constituyen la región de interacción con los ligandos (Figura modificada de las Refs. 4 y 7).

Como se mencionó anteriormente, el dominio intracelular de todas las proteínas de la familia LIN-12/Notch es evolutivamente conservado (Fig. 2B). Dentro del dominio transmembranal y hacia el N-terminal de un residuo de valina, ocurre el procesamiento proteolítico que permite la liberación de Notch intracelular activo (NIC), el cual posee una región RAM seguida de seis elementos repetidos de ankirina. Estos dos dominios le permiten a NIC interactuar con la familia de proteínas CSL [**C**BF1/**S**upresor de Hairless/**L**ag-1], que funcionan como factores activadores de la transcripción, sirviendo de puente para interactuar con el ADN (Fig. 2B)¹⁵. Además, el dominio RAM y los elementos repetidos de ankirina de NIC regulan la expresión de las proteínas blanco de la vía y que presentan una estructura común de hélice-lazo-hélice (bHLH), las cuales son factores transcripcionales que regulan la expresión de los genes cuyos productos dirigirán a la célula a un destino celular diferente al de la célula que emitió el estímulo. Hacia la región C-terminal se encuentra el dominio activador de la transcripción (TAD, por sus siglas en inglés), cuya función es reclutar acetilasas de histonas para generar una conformación abierta de la cromatina en la doble cadena del ADN. Cerca del dominio TAD se encuentra el dominio PEST, que es esencial para la degradación, previa ubiquitinación, de NIC. Finalmente, existen dos señales de localización nuclear (NLS), una dentro del dominio RAM y la otra entre los elementos repetidos de ankirina y el dominio TAD, que le permiten a NIC entrar al núcleo de la célula³.

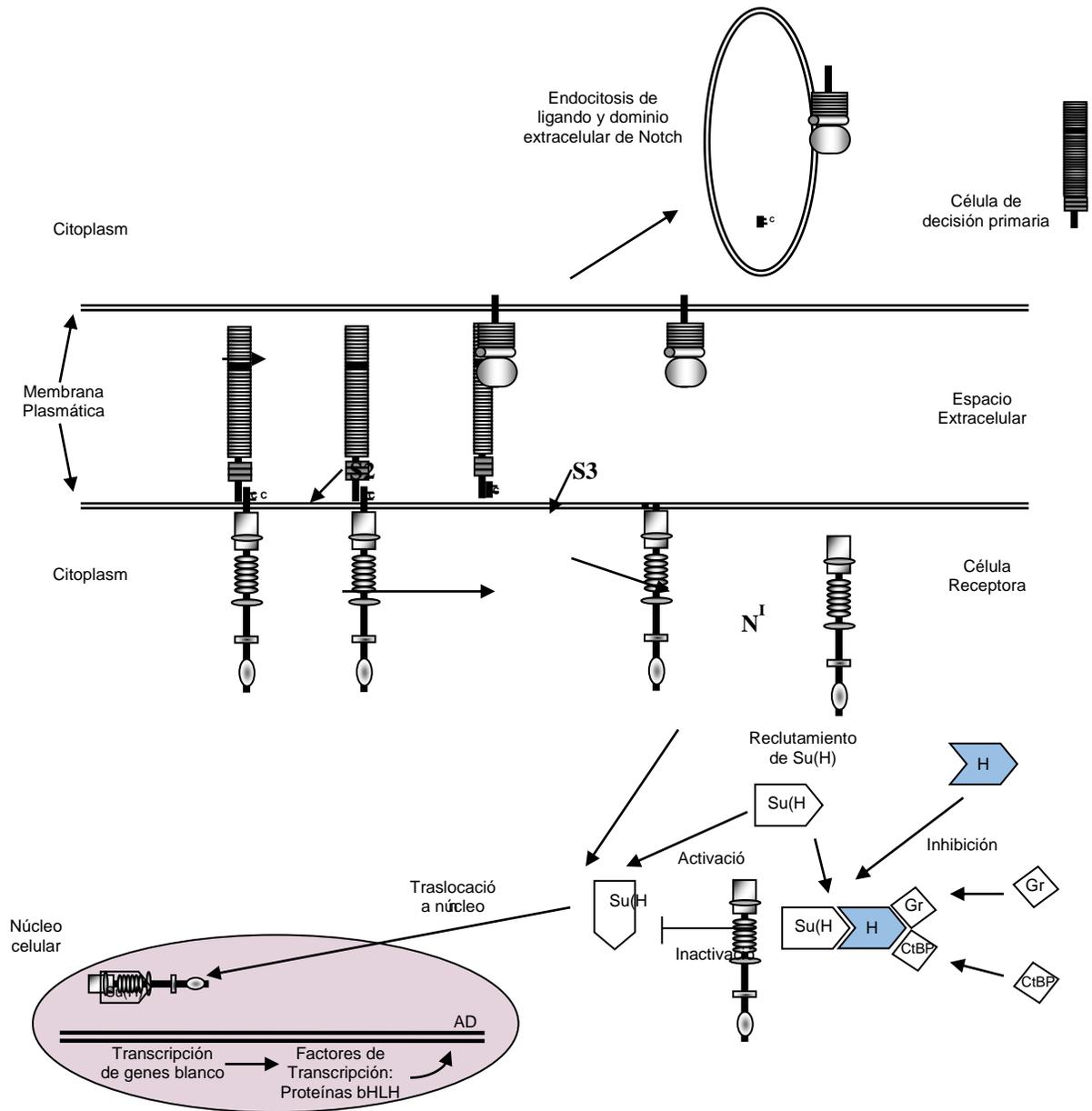


Figura 3. Activación y regulación de la vía Notch. El ligando de la célula de decisión primaria activa a Notch en la célula receptora adyacente lo que induce los cortes secuenciales en S2 y S3 que liberan a NIC. En la célula de decisión primaria se forma una vesícula endocítica que introduce a su interior tanto al ligando como al dominio extracelular de Notch. En la célula receptora NIC forma un complejo con el factor de transcripción Supresor de Hairless [Su(H)], que se transloca al núcleo donde activa la expresión de otros factores transcripcionales (proteínas bHLH). Estos factores inducirán la transcripción de otros genes, cuya función es dirigir a la célula a un destino celular distinto al de la

célula que envió el estímulo. La actividad de Notch se bloquea cuando la proteína antagonista Hairless (H), que recluta a los co-represores Groucho (Gro) y la proteína de enlace a C-terminal (CtBP, por sus siglas en inglés), interactúa con Su(H) impidiendo la formación del complejo NIC-Su(H). Los elementos estructurales están descritos en la Fig. 1. (Figura tomada y modificada de 3).

1.2.2. Supresor de Hairless, el Factor Transcripcional de la vía de señalización Notch.

Un factor transcripcional es una proteína que reconoce secuencias específicas en el ADN y forma complejos proteicos, ya sea de represión o de activación de la transcripción, dependiendo de la configuración y/o combinación de los factores transcripcionales en el promotor. De esta manera, se otorga un nivel más de regulación y coordinación a los diferentes procesos que involucran la vida de una célula. La VN cuenta con un solo factor transcripcional propio de esta vía: Supresor de Hairless [Su(H)]. Este factor transcripcional pertenece a la familia CSL (**CBF1** en mamíferos, **Su(H)** en insectos y **Lag-1** en gusanos), estos factores transcripcionales fueron inicialmente identificados como represores de la vía en vertebrados y como activadores en invertebrados, pero en la actualidad se sabe que puede participar en los dos escenarios, de activación o represión, dependiendo del tipo y contexto celular y de la presencia o ausencia de NIC^{3,4}.

Supresor de Hairless: es el factor transcripcional de la vía Notch en *D. melanogaster* y está involucrado en la regulación tanto positiva como negativa de los genes blanco de la VN. Cuando NIC se une a Su(H) por medio del repetido de Ankirinas, y con la presencia obligatoria de co-activadores como Mastermind, se activan los genes blanco de la VN, los cuales pertenecen al complejo *bHLH*, también conocidos como *Enhancer of split [E(spl)C]*¹⁶. La expresión de las proteínas del complejo E(spl)C en *D. melanogaster* regula de manera diferencial la expresión de otros muchos genes; es decir, el complejo E(spl)C está constituido, a su vez, por factores transcripcionales que favorecen o impiden la transcripción de otros genes. Cuando la proteína H une a Su(H), se produce un efecto contrario al causado por NIC, por lo tanto H actúa como un antagonista de la vía Notch con la ayuda de otros

co-represores (Groucho y CtBP), teniendo como consecuencia que los genes que son regulados positivamente por NIC, H los regula negativamente y viceversa.

Se sabe que las proteínas del complejo E(spl)C se unen a sitios específicos del DNA, los cuales se caracterizan por ser una secuencia palindrómica que consta de 12 pares de bases (pb), 5'-TGC CAC GTG (C/T)(C/T)A-3'¹⁸. Por tanto, cuando las proteínas Hes1 y Hes7, miembros de este complejo, son activadas por la acción de NIC y reconocen a su secuencia consenso, funcionan como reguladores transcripcionales negativos en el desarrollo embrionario¹⁷. Por el contrario, cuando H impide que Hes1 y Hes7 sean expresadas, los genes que tienen que silenciar se siguen expresando. Estos mecanismos regulatorios antagónicos permiten a la VN, durante el desarrollo embrionario temprano, ejecutar y regular los tiempos de expresión en las oleadas de diferenciación¹⁹, por ejemplo, el modelo de diferenciación temprana en el embrión, conocido como reloj de segmentación del mesodermo presomítico (Ver Fig. 4).

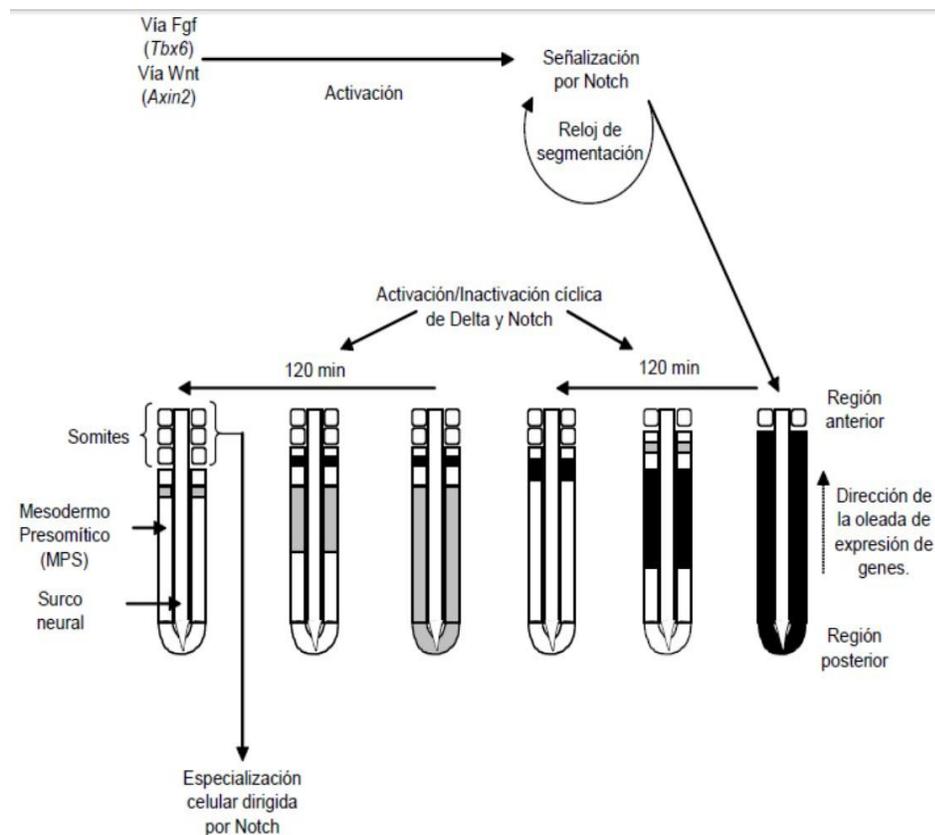


Figura 4. Funcionamiento del reloj de segmentación en el mesodermo presomítico (MPS) del embrión de ratón. La acción combinada de las vías Wnt y Fgt activa la vía Notch, lo cual propicia que en las células receptoras estimuladas se inicie la expresión de factores de transcripción específicos. Estos factores llevarán a las células a un destino celular determinado, por medio de cualquiera de los tres mecanismos por los que funciona la vía. La especialización celular está dirigida por la expresión continua y en oleadas de estos factores de transcripción, lo cual ocurre desde la región posterior del MPS. La señal se debilita conforme alcanza la región anterior del MPS (representado en negro y gris). La expresión cíclica causa la formación de los somites con una periodicidad aproximada de dos horas, (Imagen tomada de 3).

La familia de factores transcripcionales CSL, a la cual pertenece Su(H), está constituida por proteínas altamente conservada en los metazoarios; su similitud a nivel de estructura y de dominios de unión e interacción con otras proteínas de la VN (NIC, H, co-represores o co-activadores), es prácticamente del 80% o más. Estos factores transcripcionales, por hacer contacto directo con el DNA, son clasificados como factores de transcripción del tipo REL (Reticuloendothelosis protein homolog, por sus siglas en inglés), a los que pertenece NF- κ B factor transcripcional importante estructuralmente conservado en la mayoría de las células eucariotas. Estos factores regulan diversas tareas como el crecimiento celular, procesos de inflamación, respuesta inmune, procesos de desarrollo celular y apoptosis. A este tipo de proteínas se les ha relacionado con enfermedades como el cáncer, asma, artritis, enfermedades neurodegenerativas y enfermedades del corazón¹⁹.

Las proteínas CSL contienen tres grande dominios: el dominio N-terminal (NTD, por sus siglas en inglés), el dominio β -plegada (BTD, por sus siglas en inglés) y un dominio C-terminal (CTD, por sus siglas en inglés). Estos dominios aportan la capacidad para que proteínas como NIC o H funcionen como reguladores transcripcionales positivos o negativos, respectivamente²¹. Se sabe que NIC, por medio de los dominios RAM y repetido de Ankirinas, hace contacto directo con los dominios BTD y CTD para, posteriormente, poder interactuar con el dominio NTD. Esta interacción NIC/CSL da lugar a la incorporación de Mastermind (Mam), lo cual permite que se termine de ensamblar el complejo transcripcional activo de regulación positiva de la vía Notch en todos los modelos estudiados, *H. sapiens*, *M. musculus*, *D. melanogaster* y *C. elegans*²², como se puede observar en las figuras 5 y 6.

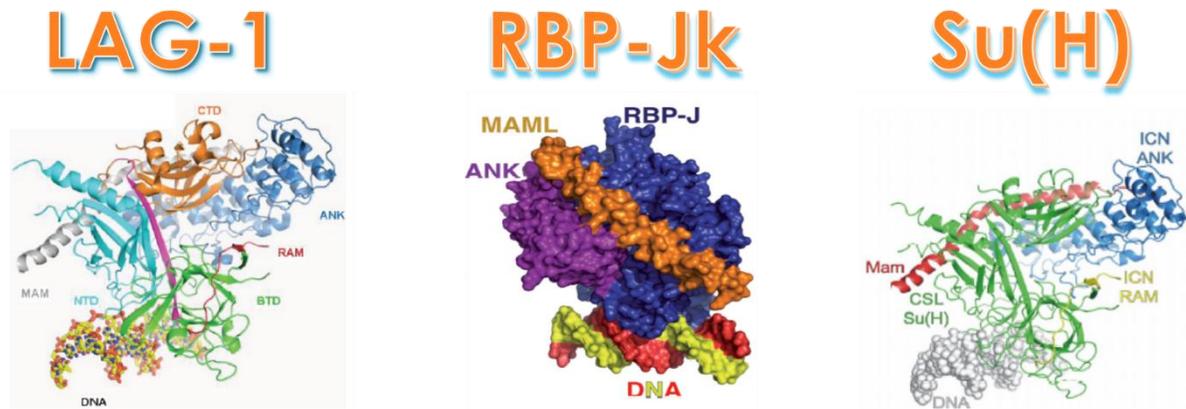
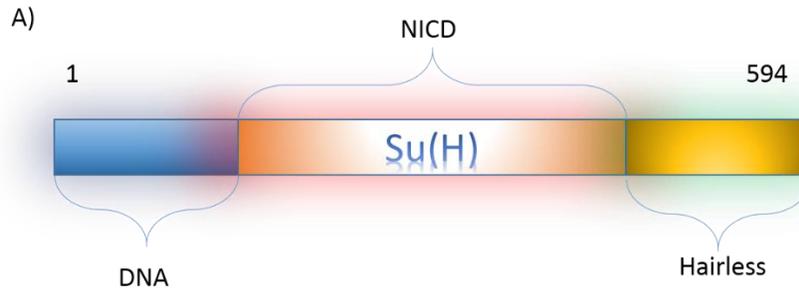


Figura 5. Representación de los complejos de la vía Notch (NICD/CSL/Mam)). Se muestran los diferentes dominios altamente conservados como son BTD, NTD y CTD, con los dominios de NICD (ANK y RAM) que interactúan con el factor transcripcional. Los factores transcripcionales son LAG-1, RBP-J κ y Su(H), que corresponden a las especies de *Caenorhabditis elegans*, *Mus musculus* y *Drosophila melanogaster*, respectivamente. Imágenes tomadas de 40, 13 y 25, respectivamente.



B)

Especie	Secuencia
<i>D. melanogaster</i>	TQ RKR AHGVT WF PEGF R APAAVMS R-RR DPHGQEEM R NLN K QVAMQSQG
<i>L. cuprina</i>	TQ RKR AAGIT WF PEGFRTPTINPQ R-RRR DPTGQEM R NLN K NPSMACMS
<i>A. gambiae</i>	-Q RKR AGIT WF PEGFFTANTNV RRPSRRR PDGQEM R NLN K NPSMVDMM
<i>M. musculus</i>	RKRRR QHGQL WF PEGFKV--SEAS KKKRR EPLGEDSVGL KPLK NASDGA
<i>H. sapiens</i>	RKRR XHGQL WF PEGFKV--SEAS KKKRR EXLGEDSVGL KPLK NASDGA

Figura 6: Esquema de Su(H) y sus dominios de unión a NICD y H. **(A)**; la zona en color azul representa una serie de residuos de Su(H) que se ha demostrado unen al DNA, la zona de color naranja indica el sitio de unión a NICD y la zona en color amarillo al sitio de unión de H (Imagen modificada y tomada de 7). **(B)**; Zonas conservadas del sitio de unión PPD (sitio potencial de fosforilación) de NICD a Su(H), los residuos básicos conservados son mostrados en rojo y remarcado, los residuos resaltados en color morado representan los tres primeros aminoácidos que hacen la primera unión a Su(H), por último se muestra una región separada por 2 o 3 residuos que corresponde a un sitio NLS de color verde y marron (modificada y tomada de 15).

1.2.3. Antagonista por naturaleza, *Hairless*.

Como se mencionó anteriormente, dentro de la VN existe una proteína, llamada *Hairless* (H), cuya actividad antagoniza a la de la proteína Notch²³; y cuya actividad se requiere para la especificación de varios destinos celulares durante el desarrollo embrionario^{24, 25}.

El gen *Hairless* ha sido identificado únicamente en insectos. A diferencia de los demás integrantes de esta vía, *Hairless* está poco conservado entre las especies donde ha sido reportado: comparte un 63% de identidad entre *D. melanogaster* y *D. Hydei*, y un 33% entre drosofilidos y *Anopheles*. La manera tan rápida en que este

gen diverge, ha permitido identificar, a nivel de amino ácidos (aa), pequeñas zonas conservadas y que son importantes en su función. Una de estas regiones se localiza en la zona de interacción con la proteína Su(H). Otra región es el motivo YSIXXLLG (donde X es cualquier aa), que se conserva perfectamente en drososfilidos y *Anopheles*, y que constituye el sitio de unión de la proteína co-represora Groucho (Gro). La región C-terminal de H posee el motivo PLNLSKH, el cual también se encuentra conservado y constituye la región de unión a otro co-represor llamado proteína de unión a C-terminal (CtBP, por sus siglas en inglés)²⁶.

La proteína H de *D. melanogaster* contiene, además, tres dominios ricos en alanina, los cuales ayudan a regular negativamente la transcripción. Sin embargo, estos dominios contienen un menor número de alaninas o están ausentes en H de *D. hydei* y *A. gambiae*, lo que pudiera sugerir que no son esenciales para su función, al menos no en todas las especies²⁶. Además, se han observado dos isoformas de la proteína, H_{p120} y H_{p150}, con una mayor actividad *in vivo* como heterodímeros que en su forma monomérica, lo que implica que ambas formas de H son necesarias para su actividad correcta²⁷.

Es importante mencionar que tanto la regulación positiva como la regulación negativa de la vía Notch está condicionada por el estado espacio-temporal de la célula, donde se deben tomar en cuenta las distintas variaciones que se ven implicadas para que la VN funcione²⁸, tales como: genes que se regularán positiva ó negativamente, controles epigenéticos, nivel y estado de diferenciación, posición y metabolismo de cada célula, dicho de otra manera, el contexto celular en toda la extensión que implica su significado²⁶.

1.2.4. Proteínas moduladoras de la señalización Notch.

Entre las proteínas que juegan un papel importante en la modulación de la transducción por la VN, se encuentran las Glucosil-transferasas, Metaloproteasas, Proteasas y las Ubiquin-ligasas. Estas proteínas, de acuerdo a lo que hasta el momento se conoce, actúan principalmente sobre la familia de receptores LIN-

12/Notch, se sabe también que pueden actuar sobre la familia CSL fosforilando en ciertos y específicos eventos de la diferenciación y ciclo celular²⁹.

1.2.4.1. Glicosil-transferasas

La glicosilación es un proceso modulador de cambios post-traduccionales que sufren ciertas proteínas para llegar a la madurez o para tener un sentido biológico funcional, como es el caso del Receptor Notch³¹. Este proceso de glucosilación de la proteína Notch, donde a ciertos repetidos del dominio conocido como EGF se le adiciona un azúcar (Fucosa) en una serina o treonina, este proceso comienza en el aparato de Golgi hasta llegar a su madurez en el retículo endoplasmico. El dominio EGF de N extracelular es glicosilado en los repetidos 11 y 12, confiriéndole especificidad de unión por la familia de los ligandos de la vía³². Varios de los elementos repetidos de EGF tienen el potencial de ser modificados, por ejemplo los EGF en posiciones 21, 24, 25 y 26 confieren niveles de regulación a nivel de tejido específico, proporcionando una combinación de posibilidades de generar distintas modificaciones en los receptores y por consecuencias por la unión a diferentes ligandos^{33, 34}. Recientemente se ha demostrado que la O-Fucosil-transferasa, responsable de los cambios en N presenta actividad de enzimas chaperonas, por lo que participa en el plegamiento de la forma activa de las proteínas y está implicada en la endocitosis y tráfico de las mismas^{35, 36}.

1.2.4.2. Metaloproteasas/Proteasas

Existe un complejo proteico de la familia de proteínas conocidas como ADAM TACE (por su nombre en inglés, tumor necrosis factor- α -converting enzyme), que se caracteriza por tener actividad de desintegrina y metaloproteinasa. A esta familia pertenecen la proteína Kuzbanian, una Furina y el complejo proteico γ -secretasa que son las encargadas de hacer los cortes proteolíticos sobre el receptor Notch ya sea durante su maduración, o después de su interacción con el ligando para poder cumplir su propósito biológico⁸.

Durante el proceso de maduración del receptor Notch, la Furina hace el primer corte en el dominio HD de la proteína, convirtiéndola en un heterodímero, dividiendo la parte extracelular e intracelular de Notch después de este momento, Notch es transportado a la membrana celular donde queda listo para entrar en contacto con el ligando³⁵. Una vez que ocurre este evento, el segundo corte proteolítico es realizado por Kuzbanian entre el dominio NRR y HD de Notch, produciendo una quelación en el ión calcio formando un heterodímero que divide a NIC de NEC, permitiendo de esta manera que los cortes proteolíticos 3 y 4 sean efectuados por el complejo γ -secretasa en el dominio TMD de Notch, para separar a NIC de NEC³⁷.

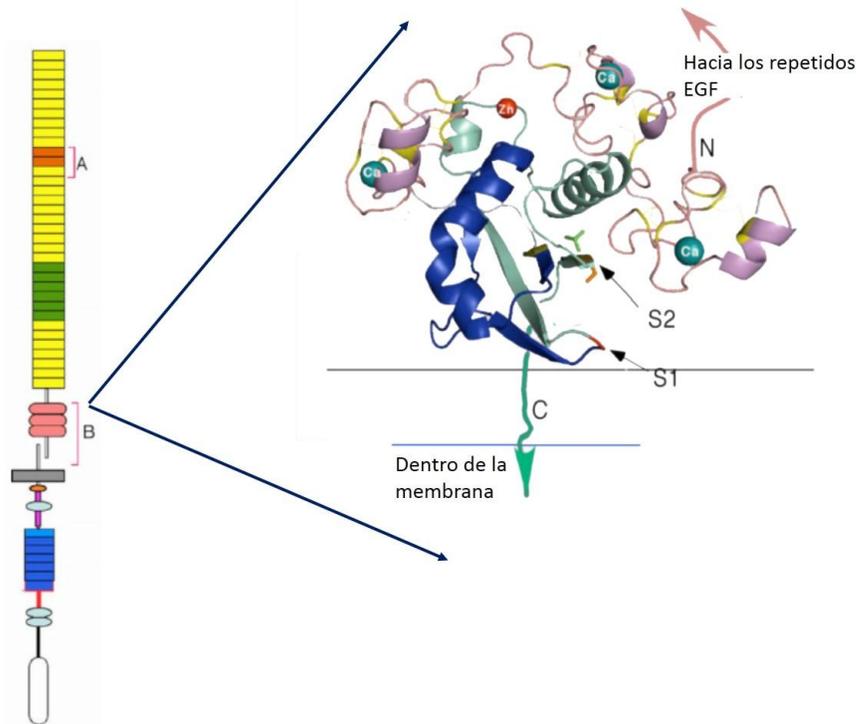


Figura 7. Sitio de corte entre NICD y NECD. Una vez que los cortes S1 y S2 son efectuados, exponen un ion de Ca^{+2} (esferas azules) permitiendo a las metaloproteasas como TACE o el complejo de la γ -secretasa, acceder a esta zona para realizar los cortes S3 y S4 respectivamente. (Imagen tomada y modificada de 7).

Se sabe que cuando ocurre la separación de NEC y NIC, NEC permanece unido al ligando de la célula de decisión primaria y es endocitado por ésta, donde formará parte de otro mecanismo de diferenciación que aún no se conoce del todo. Por su parte, NIC es preparado para ser trasladado al núcleo de la célula que recibió

el estímulo, gracias a sus dominios NLS. Cabe mencionar que los cortes proteolíticos, excepto el efectuado por la Furina, son llevados a cabo a nivel intramembranal³⁸.

1.2.4.3. Ubiquin-ligasas

Las ubiquitin-ligasas son las encargadas de promover la endocitosis y el tráfico de proteínas en la vía de transducción Notch y están involucradas en otros procesos celulares y pueden actuar a diferentes niveles de la VN⁷. A nivel de ligando, Neuralized y Mindbomb (ubiquitin-ligasas tipo E3) son responsables de la correcta activación de la señalización, haciendo marcajes con ubiquitinas en la región C-terminal, se sabe que antes de la degradación de los ligandos, éstos quedan activados en la superficie de la membrana celular o durante el proceso de los cortes proteolíticos, esto dependerá del tejido específico y del estado de diferenciación de la célula⁴⁰. A nivel de Receptores, se sabe que Deltex, Nedd4, Su(Dx)/Itch y Cbl (ubiquin-ligasas tipo E3) actúan directamente sobre Notch, actuando en otra zona que no sea la del C-terminal, llevándolo hacia la degradación o movilización por lisosomas o reciclándolo para su uso en otro estado celular o posición en la membrana. Numb (otra ubiquitin-ligasa tipo E3), actúa en conjunto con NAK (una cinasa)⁴¹, para promover la degradación del receptor Notch en células hijas y durante la división asimétrica que ya no necesitan que expresen la señal de Notch en ese estado celular⁴².

Tabla 1. Componentes núcleo y modificadores de la vía Notch. Se muestra el nombre de la proteína, su función en la vía, y sus homólogos entre *C. elegans*, *M. musculus* y *D. melanogaster* (⁷).

Función Componente	Tipo	<i>Drosophila</i>	<i>C. elegans</i>	Mamíferos
Receptor		Notch	LIN 12	Notch 1-4
Ligandos	DSL/Dos	Delta/Serrato		Dll1, Jagged 1 y 2
	DSL		APX-1, LAG-2, ARG-2, DSL 1-7	Dll3 y 4
	Coligandos DOS		DOS-1 y 3, OSM 7 y 11	DLK1, DLK2/EGFL9
	Fuera de la vía canónica			DNER, MAGP-1 y 2, F3/Contactin1, NB-3/Contactin
Efectores nucleares	CSL DNA-binding transcription factor	Su(H)	LAG-1	RBP-Jk/CBF-1
	Coactivadores	Mastermind	LAG-3	MAML 1-3
	Correpresores	Hairless, SMRT		Mint/Sharp/SPEN, NCoR/SMRT, KyoT2
Receptores de Proteólisis	Furina (Convertasa) sitio 1 de corte	¿?	¿?	PC5/6, Furina
	Metaloproteasa sitio 2 de corte	Kuzbanian Kuzbanian-like, TACE	SUP-17/Kuzbanian, ADM-4 /TACE	ADAM10/Kuzbanian ADAM17/TACE
	γ -Secretasa cortes 3 y 4	Preceñilina, Nicastrin, APH-1, PEN-2	SEL-12, APH-1, APH-2, PEN-2	Presenilina 1 y 2, Nicastrin, APH-1a-c, PEN-2
Modificadores Glicosil-transferasas	O-fucosil transferasa	OFUT-1	OFUT-1	POFUT-1
	O-glucosil transferasa	RUMI		
	β -1,3-GlcNac-transferasa	Fringe		Lunatic, Maniatic y Radical Fringe
Endosomas/Reguladores del Tráfico de Membrana	Ubiquitin-ligasa E3 (Ring Finger) endocitosis por ligando	Mindbomb 1-2 Neuralized		Mindbomb, Skelotrophin, Neuralized 1 y 2
	Ubiquitin-ligasa E3 (Ring Finger) endocitosis por receptor	Deltex		Deltex 1-4
	Ubiquitin-ligasa E3 dominio HECT, endocitosis por receptor	Nedd4, Su(Dx)	WWP-1	Nedd4, Itch/AIP4
	Regulador negativo	Numb		Numb, Numb-like, ACBD3
	Inhibidores de Neuralized	Bearded, Tom, M4		
	Otros modificadores endocíticos	sanpodo		
Degradación de NICD	F-Box Ubiquin ligasa	Archipelago	SEL-10	Fbw-7/ SEL-10
Genes bHLH (vía canónica)		<i>E(spl)</i>	<i>REF-1</i>	<i>HES/ESR/HEY</i>

1.3. Mecanismo de la vía de señalización Notch.

Cuando NIC es liberado de la membrana citoplásmica de la célula que recibió el estímulo, puede seguir dos rutas, una donde será encapsulada por endosomas, y otra donde llega hasta el núcleo gracias a sus dominios NLS⁴⁹. En el primer caso, ocurre cuando la proteína Notch es requerida en otra posición o espacio, los endosomas en este caso sirven como transporte de la membrana celular, o bien porque su función tiene que esperar una fase de diferenciación en la célula, los endosomas funcionan como encapsulamiento de la proteína hasta su utilización⁵⁰. En el segundo caso, cuando NIC llega a núcleo une al factor transcripcional CSL desplazando, si es el caso, a complejos proteicos de regulación negativa, ya que se sabe que posee una mayor afinidad de unión al factor transcripcional que los reguladores negativos⁴⁰. Para ensamblar el complejo transcripcional de regulación positiva, se requiere también de Mam y SKIP, para que sea posible la expresión de los genes blanco de la VN, los genes bHLH. Estos genes codifican para una gran familia de factores transcripcionales que regularán otras vías, procesos celulares y a la propia vía Notch⁵¹ (ver Fig. 8).

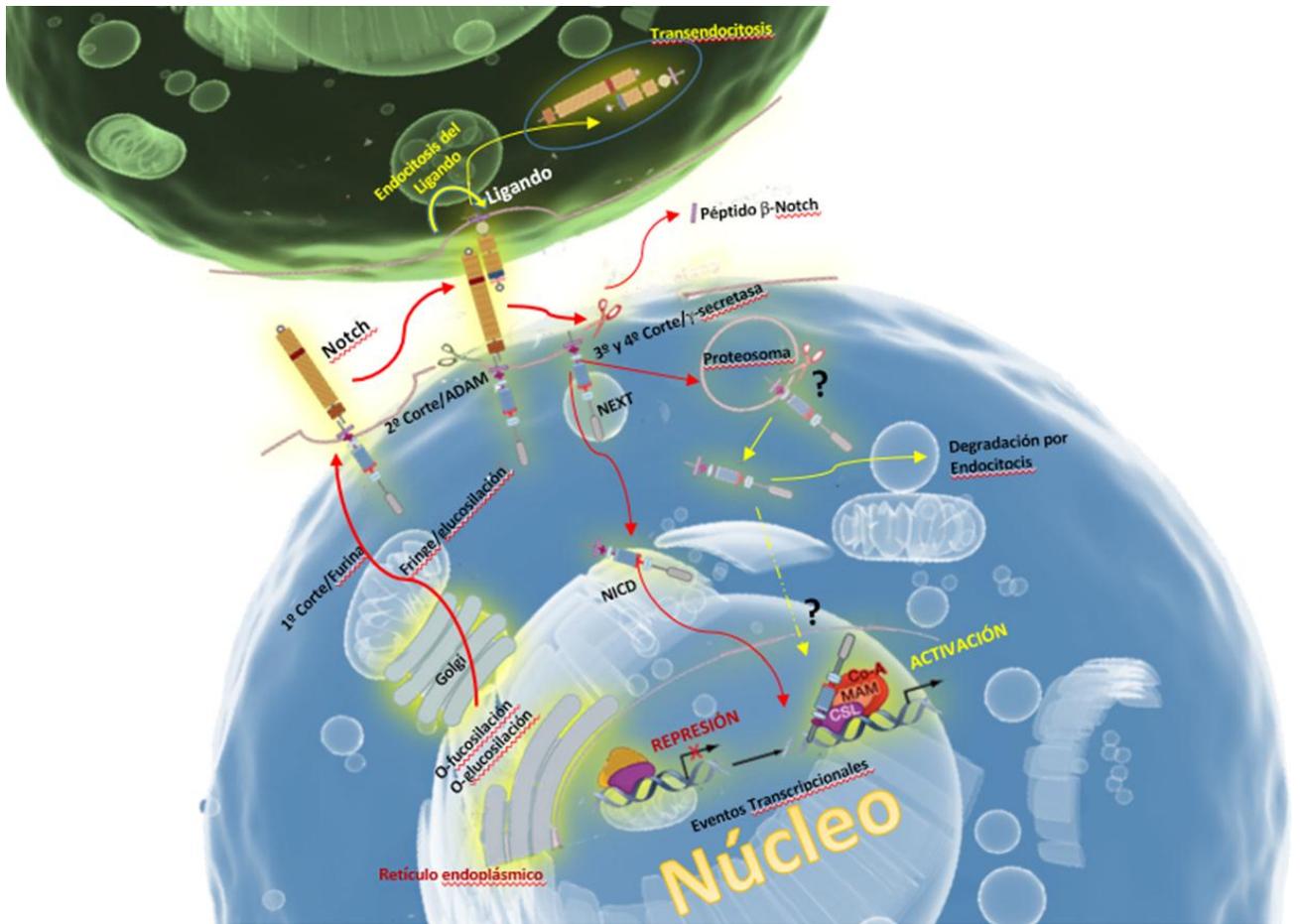


Figura 8. Diagrama donde se ilustran los pasos de activación de la vía de señalización Notch. Imagen tomada y modificada de 7.

1.4. Mecanismos de diferenciación de la vía Notch

Una vez que NIC llega a núcleo de la célula que ha sido estimulada, se induce la expresión de la familia de proteínas bHLH, que a su vez, por ser factores transcripcionales⁵, activan o reprimen la expresión de genes cuya función es dirigir a la célula a una diferenciación distinta a la de la célula de decisión primaria². Cuando H se encuentra presente, recluta a los co-represores Gro y CtBP. El complejo resultante puede atrapar a Su(H), fuera o dentro del núcleo, causando una represión transcripcional de los genes inducidos por NIC. Gracias a estos recambios en la

regulación de la expresión de genes blanco, la VN confiere niveles de diferenciación a cada tipo celular en su propio contexto, llevados a cabo por medio de cualquiera de estos tres mecanismos: inhibición lateral, división asimétrica o decisión de linaje y señalización inductiva³.

1.4.1. Inhibición lateral

La inhibición lateral ocurre cuando en un grupo de células que se encuentran en un estado de desarrollo y especialización semejante, en un contexto espacio-temporal específico⁴, una de ellas se convierte en una célula de decisión primaria y manda una señal para que las células circundantes no tomen su mismo destino celular y tomen otra ruta de diferenciación, un ejemplo de este mecanismo ocurre en la formación de la vena del ala de la mosca⁵² (Fig. 9A).

1.4.2. Decisión de linaje/división asimétrica

Este proceso ocurre cuando durante la división celular una célula hija es inducida a adquirir una especialización diferente de su célula hermana⁴. Esto ocurre porque NIC es biológicamente funcional sólo en una de ellas. En la otra célula, NIC es capturado en vesículas como se muestra en la Fig. 6, impidiendo que llegue al núcleo y se active la transcripción de las proteínas bHLH⁵², lo cual da como resultado un destino celular diferente. Este mecanismo, por ejemplo, es el encargado de la formación de todo el linaje de las células sanguíneas⁵³ (Fig. 9B).

1.4.3. Señalización inductiva

Este tipo de señalización ocurre cuando existen dos poblaciones celulares distintas, y se necesita que entre ellas exista una comunicación indirecta, por lo tanto se genera una tercera población celular que sirve de puente para su correcta

comunicación, un ejemplo de este mecanismo es la diferenciación de tejidos en la ala de la mosca adulta, diferenciando la zona ventral de la dorsoventral⁴ (Fig. 9C).

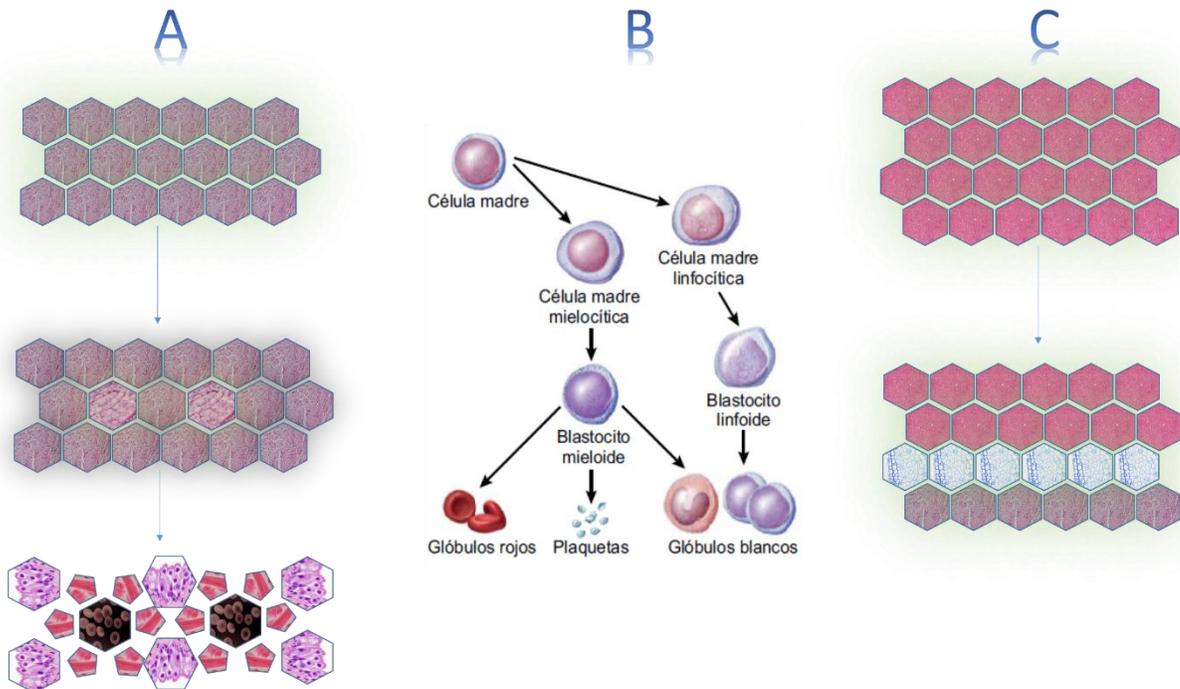


Figura 9. Representación de los mecanismos de señalización de la vía Notch. A: Inhibición lateral, se puede encontrar en tejidos como las venas de las alas de *Drosophila melanogaster*. B: Decisión de linaje o división asimétrica, este tipo de señalización como en la imagen se muestra, es la responsable de la formación de las células sanguíneas. C: Señalización inductiva, de igual manera este tipo de mecanismo se encuentra en el ala madura de la mosca, diferenciando las zonas ventral y dorsal de todas las poblaciones celulares que ahí se encuentre. Imagen tomada y modificada de 2.

1.5. Complejos activadores y represores de la vía Notch, un intercambio necesario para la correcta señalización.

Hasta el momento se sabe que H actúa como un antagonista de la VN a nivel embrionario y solo se ha demostrado su existencia en insectos. A nivel embrionario en mamíferos no se ha encontrado un homólogo, parálogo u ortólogo de esta proteína, pero existen diversos complejos proteínicos que regulan negativamente la VN a nivel tejido específico. La VN tiene gran importancia en el desarrollo

embrionario, con su participación en la formación y sincronización de los somites en el Mesodermo Presomítico, así como en su participación casi exclusiva regulando las oleadas de expresión de genes durante el desarrollo embrionario¹⁷.

Se sabe, gracias a trabajos realizados por Cooke (1995)⁵⁶, que la vía Wnt, promueve la activación de la señalización Notch en el embrión en desarrollo. Los trabajos hechos por Zakany (2001)⁵⁵, demuestran que ocurren interacciones entre las proteínas de la VN que pertenecen a organismos de diferentes especies (pez cebra y mosca, por ejemplo), y los complejos formados son capaces de activar/regular la VN. Esto confirma un gran nivel de conservación de la VN y sus componentes entre varias especies de metazoarios. Así mismo, se conocen mecanismos de control epigenético, como el que ejerce la Histona deacetilasa, que son necesarios para el recambio de cromatina abierta a cerrada, a fin de regular la expresión de genes en los diferentes contextos celulares⁵⁶. También se sabe que existen interacciones con otras Vías de señalización que se ven involucradas en el contexto de la vía Notch como vía Wnt, Hedgehog, Foxc entre otras, otorgando otro nivel de regulación fino y preciso al desarrollo embrionario⁵⁵.

Como se mencionó anteriormente, en animales superiores existen indicios de que más de una proteína se ve involucrada en formar los complejos de represión para los genes regulados por Notch que son específicos en los diferentes tejidos especializados. Recientemente, Kopan y col. (2009)^{5,7} destacan las proteínas SHARP/MINT/SPEN, las cuales forman parte de los complejos de regulación negativa reportados en mamíferos y, por lo tanto, antagonizan la activación de la señalización de Notch-RBP-J κ /CBF1^{7, 51}. Se ha demostrado que RBP-J κ /CBF1 es el homólogo de Su(H) en mamíferos⁵⁷; por tanto, existe la posibilidad que en el complejo SHARP/MINT/SPEN se encuentre el parálogo de H en estas especies. Sin embargo, aún no ha habido estudios concluyentes al respecto, ya que dichas proteínas no han sido caracterizadas funcionalmente⁵⁸.

Recientemente, en el año 2011 Maier y colaboradores, demostraron que Su(H) posee un dominio de unión en la zona C-terminal que es capaz de unir por si solo a Hairless y formar el complejo antagonista de la vía Notch; también y muy

importante, se demostró que la zona CTD (C-terminal Domain, por sus siglas en inglés) de RBP-J κ por si sola une fuertemente a Hairless de *D. melanogaster* y con la misma intensidad que une a NIC por lo tanto el complejo represor de Notch en mosca muestra similitudes comparándolo con el complejo en mamíferos¹⁶. Interesantemente, Hairless une al complejo CSL de mamíferos al ortólogo CBF1/RBP-J κ casi como pasa con Su(H), esto sugiere que la unión de Hairless al sitio CTD está conservada en mamíferos. Esto muestra la posibilidad de identificar un homólogo de H en otros organismos o potencialmente otros co-reguladores transcripcionales que utilicen las uniones de H al sitio CTD, lo cual puede ser indicativo de un modo indefinido de reprimir la señal Notch en mamíferos¹⁷.

2. JUSTIFICACIÓN

Todos los metazoarios, desde insectos hasta el hombre, necesitan de la vía de Notch para poder llevar a cabo con éxito la diferenciación celular durante la embriogénesis. Hairless, el regulador negativo de la VN en *Drosophila*, es una de las pocas proteínas propias de la vía de la que no se ha logrado identificar un homólogo, parálogo u ortólogo en animales superiores, pero es innegable que debe de existir una proteína con funciones similares para que su desarrollo embrionario se lleve a cabo de manera correcta.

Un conocimiento minucioso y funcional de las proteínas que están involucradas en el mecanismo de la VN en metazoarios y conocer más a detalle los dominios de los cuales están compuestas estas proteínas, es indispensable para comprender el conjunto de efectos que desencadena en una célula y, por consiguiente, en un organismo vivo. RBP-J κ es un factor transcripcional que pertenece al grupo de la familia de proteínas CSL, y su importancia se debe a que son los únicos factores transcripcionales de la VN, por lo tanto, el conocimiento generado partir del estudio de los diferentes dominios conservados que poseen y de los cuales están compuestos, aportará nociones que permitirán conocer con un mejor detalle y exactitud sus mecanismo y, puesto que estas proteínas actúan como controladores maestros del destino celular están fuertemente relacionados con los procesos de proliferación, diferenciación y muerte celular.

Como se mencionó anteriormente la proteína H se ha identificado solo en insectos y es la encargada de regular de manera negativa la VN en un estado embrionario temprano, teniendo su mayor efecto en el rejuego de las oleadas de diferenciación de las Somitas, sin embargo, en el caso de los mamíferos o gusanos, no se ha logrado identificar una proteína que cumpla con las mismas funciones que H en un estado embrionario. Es por este motivo que se han hecho estudios

relevantes poniendo a prueba el alto nivel de conservación de todos los compuestos (complejos proteicos y mecanismos) que están involucrados en la actividad de la VN, siendo de especial atención los sitios conservados de ciertos dominios que pueden unir a la proteína H, tal es el caso de los factores transcripcionales y de NICD de ratón y gusano.

Estos dominios interactúan con H de *D. melanogaster*, promoviendo una activación funcional de la VN. Esta interacción de proteínas provenientes de diferentes especies hace suponer que existe cierta proteína con funciones similares a H, que en un momento dado del desarrollo embrionario en animales superiores, pero que aún no se ha podido demostrar a que nivel celular y de diferenciación que es donde actúa. La importancia de conocer los mecanismos por los cuales la VN es regulada de manera negativa son tan relevantes e importantes por el hecho que un funcionamiento sin regulación negativa de la misma, es siempre dirigida a un ciclo celular desordenado que acabará en cáncer. Esto implica que su conocimiento ayudaría a comprender mejor algunos aspectos de la inmunología, la neurobiología y la biología de tumores.

3. HIPÓTESIS

Un péptido híbrido que contiene el fragmento CTD de la proteína RBP-Jκ de *Mus musculus*, tiene la capacidad de interactuar con la proteína Hairless de *Drosophila melanogaster*.

4. OBJETIVO GENERAL

- Diseñar y obtener un péptido derivado de la proteína RBP-Jκ de *Mus musculus* con afinidad por la proteína Hairless de *Drosophila melanogaster*.

4.1. Objetivos específicos

- Generar y expresar una proteína híbrida Tag - dominio CTD de Su(H), e inducir la expresión del péptido híbrido en bacterias transformadas de *E. coli*.
- Generar y expresar una proteína híbrida Tag - dominio CTD de RBP-Jκ, e inducir la expresión del péptido híbrido en bacterias transformadas de *E. coli*.
- Probar la eficiencia de los péptidos híbridos para atrapar a la proteína Hairless de *Drosophila melanogaster*.

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

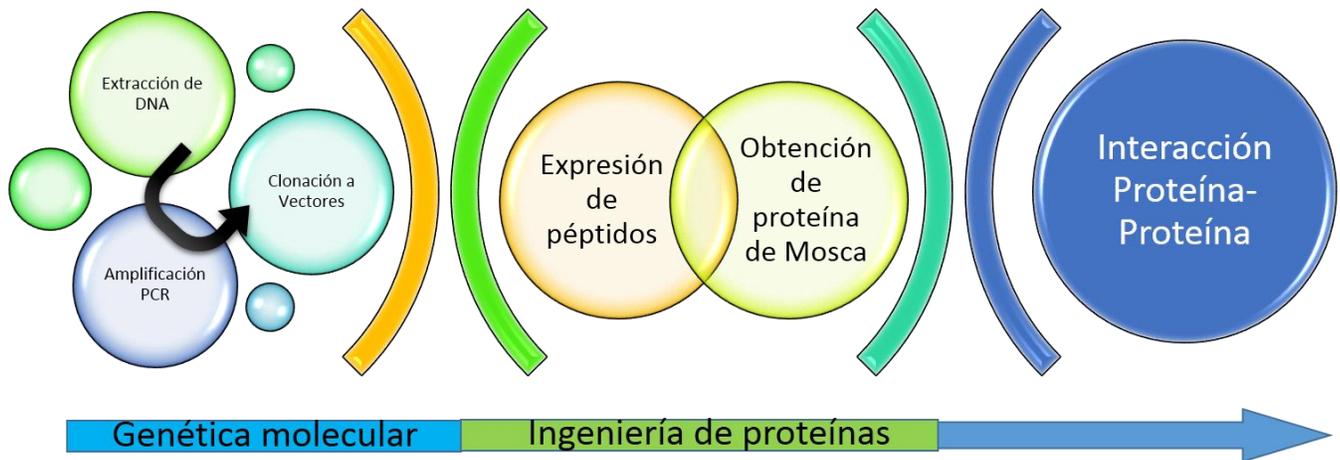


Figura 10. Diagrama de flujo de la estrategia experimental para comprobar la interacción entre el péptido RBP-J κ y la proteína Hairless.

La secuencia de ADN que codifica para el dominio CTD del gen *RBP-J κ* de *Mus musculus* (ratón), se obtuvo por medio de una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a partir de genoma total de ratón obtenido de muestras de médula ósea, cola e hígado. Se diseñaron oligonucleótidos específicos (ver Tabla 2) que permitieron el uso de la familia de vectores Flexi (Promega), usando el producto de la PCR se obtuvo un fragmento de 300 pb que fue clonado en el vector pFN18K (ver Fig. 9), generándose el plásmido pFN-CTDJ κ . Las enzimas de restricción *Sgf* I y *Pme* I fueron empleadas para verificar la presencia del fragmento CTD en el pFN-CTDJ κ . Estas enzimas deben de liberar un fragmento de peso molecular aproximado de 300 pb. Así mismo, se realizó una secuenciación total del fragmento de ADN clonado para comprobar que la secuencia del fragmento CTD del gen de *RBP-J κ* de ratón fuera la correcta.

Tabla 2. Características de cada uno de los oligonuclótidos diseñados para el fragmento CTD de la proteína RBP-Jκ.

Oligo	longitud	Tm	%GC	Delta G
RBPJ-CTD 5'	33 pb	64.2 °C	73	55.7
RBPJ-CTD 3'	38 pb	66.6 °C	47	51.9

El fragmento CTD del gen *RBP-Jκ* fue expresado como un péptido híbrido fusionándolo con el Tag de purificación presente en el vector pFN18K. Para esto, *Escherichia coli* se transformó con el plásmido pFN-CTDJκ (New England Biolabs). Posteriormente, y usando el inductor *Isopropil-b-D-1-tiogalactopiranosido* (IPTG), se indujo la expresión del péptido híbrido Tag-CTD. Una vez comprobada la presencia del péptido híbrido, éste fue purificado usando el kit HaloTag Protein Purification System (siguiendo las instrucciones del fabricante), el cual emplea una resina para secuestrar al Tag-CTD en los extractos proteicos totales de bacteria.

A fin de probar la efectividad de la trampa molecular, fue necesaria la extracción de proteína total de embriones de *Drosophila melanogaster*, empleando el buffer Pierce IP-lysis (ThermoScientific) siguiendo las instrucciones del fabricante, a fin de contar con una cantidad adecuada de la proteína Hairless, la cual debería ser identificada y retenida por el péptido híbrido Tag-CTD.

La interacción proteína-proteína se realizó con los extractos totales de proteína de embriones de mosca purificados contra los extractos totales de proteína de bacteria purificados que contienen la construcción del péptido híbrido Tag-CTD, se siguió el protocolo (proporcionado por el fabricante) de purificación del kit HaloTag Protein Purification System para poner a interactuar los dos extractos proteicos y al final obtener una proteína con afinidad por el péptido híbrido del fragmento CTD de la proteína RBP-Jκ de *Mus musculus*.

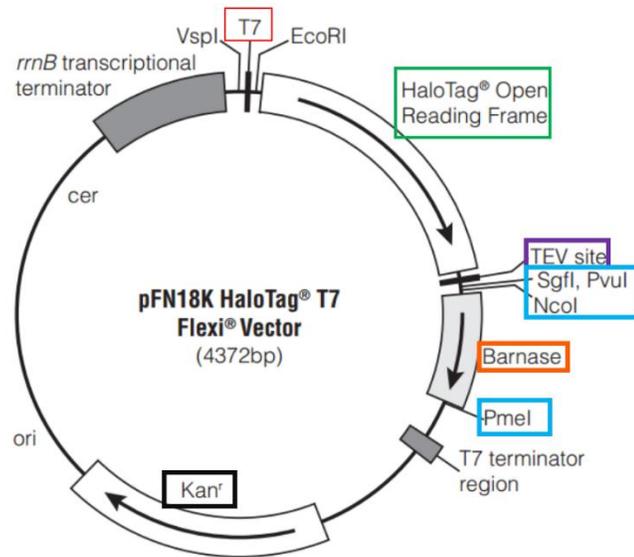


Figura 11. Mapa genético del plásmido pFN18K HaloTag®T7 Flexi®Vector. Se muestran las partes que componen al plasmido usado para crear los péptidos de fusión entre el dominio CTD, de las proteínas Su(H) y RBP-J κ y el Tag de purificación. En el cuadro rojo se observa el sitio del promotor T7, que es el sitio de reconocimiento de la polimerasa, flanqueado por sitios de corte para las enzimas *Vsp* I y otro para *Eco* RI; en el cuadro verde se ilustra el Tag de purificación que consiste en una hidrolasa modificada que contiene en el extremo N-terminal un dominio de Histidinas capaz de unir a una resina; en el cuadro morado se marca el sitio de reconocimiento de corte de la Proteasa TEV seguido por los sitios de corte de las enzimas *Pvu* I, *Nco* I, *Sgf* I y después de la Barnasa (cuadro naranja) que es un gen letal y su función es seleccionar y asegurar la clonación, se encuentra también el sitio de corte de la enzima *Pme* I (cuadro azul claro) y por último tenemos el gen de resistencia a antibiótico (cuadro negro) que en este caso es Kanamicina.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Capítulo 1

DISEÑO Y CONSTRUCCIÓN DE UN PÉPTIDO DERIVADO DE LA PROTEÍNA RBP-J κ DE *Mus musculus* CON AFINIDAD POR LA PROTEÍNA HAIRLESS DE *Drosophila melanogaster*.

Germán Saucedo Correa; Humberto Contreras Cornejo; Alejandro Bravo Patiño.

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

RESUMEN: La vía Notch es una vía de señalización y diferenciación celular conservada en todos los metazoarios. En *Drosophila melanogaster* una de las proteínas clave de esta vía es Supresor de Hairless [Su(H)], que es un factor transcripcional con la capacidad de unirse directamente al ADN. La proteína Hairless (H) de *D. melanogaster* se une a Su(H) para armar un complejo regulador negativo transcripcionalmente activo en embriones de mosca. El homólogo de Su(H) en mamíferos es la proteína RBP-J κ /CBF1; pero hasta el momento no se ha reportado ninguna proteína en mamíferos con actividad similar a H, solo se sabe que el complejo de proteínas SHARP/MINT/SPEN que actúan como reguladores negativos en diferentes niveles de diferenciación y tejido específico de la célula se unen a RBP-J κ /CBF1 para regular de manera negativa a la vía de Notch, por lo que se cree que en dicho complejo se encuentre el parálogo de H. Sin embargo, aún no ha habido estudios concluyentes al respecto, ya que dichas proteínas no han sido caracterizadas funcionalmente. Recientemente se demostró que RBP-J κ /CBF1 tiene la capacidad de unir, en la región carboxilo terminal, a la proteína H de *D. melanogaster* para armar un complejo regulador negativo transcripcionalmente activo en embriones de mosca. Por tanto, es posible que en mamíferos se identifique una proteína equivalente a la proteína H. Empleando el dominio de unión a Hairless de la proteína Su(H) y de su homólogo en mamíferos RBP-J κ como modelo, es posible diseñar y construir una trampa molecular capaz de reconocer a la proteína Hairless y a su posible parálogo en mamíferos.

Palabras clave: Notch, péptidos, Factores transcripcionales, RBP-J κ , Su(H).

Actualmente se sabe que las vías de transducción de señales constituyen una red compleja de comunicación inter e intracelular, la cual se encarga de regular y organizar correctamente las complejas organizaciones y/o funciones espacio-temporales de todas las células que estructuran cualquier ser vivo y es, a su vez, una característica común que comparten los organismos multicelulares complejos¹.

Durante el desarrollo embrionario de cualquier especie es necesario que las vías de transducción trabajen en coordinación perfecta para asegurar tanto la proliferación, como la diferenciación celular². En cuanto a metazoarios, se sabe que durante el desarrollo embrionario temprano y tardío, son siete las vías de transducción que aseguran que el proceso ocurra de manera sincrónica: Wingless (Wnt), Factor de Crecimiento Transformante beta (TGF- β), Hedgehog (Hh), Receptor de Tirosina Kinasa (RTK), Receptor Nuclear, Jak/STAT y Notch (VN)³. Cada una de estas vías de transducción es usada de manera reiterada durante el crecimiento de los organismos de acuerdo al contexto o estadio de desarrollo⁴, pero es la VN quien juega un papel preponderante desde el comienzo de su activación, en la correcta formación del embrión, y hasta el adecuado funcionamiento de las diferentes células especializadas del organismo adulto⁵.

Existen dos vías de transducción de señales, Wnt y FGF, que durante el desarrollo embrionario temprano interactúan de manera sinérgica para regular el comienzo de la actividad de la VN. Una vez que la VN está activa, toma el control del desarrollo de un organismo pluricelular. Esta vía es fundamental para que este proceso se lleve a cabo⁶, por tanto, no es de extrañar que se encuentre evolutivamente conservada en los metazoarios. ⁶.

La VN está compuesta con varias proteínas clasificadas en dos grandes grupos. En el primero encontramos las proteínas que transducen la señal y funcionan como ligandos, receptores, represores, co-represores, activadores, co-activadores y un factor transcripcional único, y que constituyen el núcleo de la vía¹⁰. En el segundo

encontramos las proteínas reguladoras que modulan la respuesta celular e influyen en la duración de la señal recibida, modificando de manera directa a las proteínas integrantes del primer grupo por medio de sus actividades de glucosiltransferasa, proteasa, metaloproteasa y ubiquitina-ligasa y en algunos casos especiales de fosforilación¹¹.

El factor transcripcional único con que cuenta la VN (Supresor de Hairless [Su(H)] en *Drosophila melanogaster* y RBP-Jκ en mamíferos)², juega un papel muy importante en los procesos de regulación de la señal, tanto positiva (donde se ve involucrado el dominio intracelular de Notch [NICD, por sus siglas en inglés])³ como negativamente (donde se ve involucrado Hairless)⁵. Cuando NICD se une a Su(H) por medio del repetido de Ankirinas, y con la forzosa presencia del co-activador Mastermind, los genes blanco activados son los que pertenecen al complejo *bHLH*, también conocidos como *Enhancer of split [E(spl)C]*^{7, 16}. La expresión de las proteínas E(spl)C en *D. melanogaster* regulan la activación de otras proteínas y/o de otras vías de transducción de señales^{9, 10}. Cuando la proteína Hairless (H) une a Su(H), se produce una regulación negativa de los genes del complejo *bHLH*¹¹; por lo tanto, H actúa como un antagonista de la VN^{12,13}, con la ayuda de los co-represores Groucho y la Proteína de unión a C-terminal (CtBP, por sus siglas en inglés)^{14, 15}.

Su(H) pertenece a la familia de factores transcripcionales CSL de la VN, la cual se caracteriza por estar conformada por proteínas altamente conservadas a nivel de estructura y con una alta similitud de dominios de unión e interacción con otras proteínas. De entre dichos dominios destacan principalmente tres: el dominio N-terminal (NTD), el dominio β-plegada (BTD) y el dominio C-terminal (CTD). Estos dominios son muy importantes para que el factor transcripcional tenga la capacidad para interactuar con NICD o H, y pueda estructurar complejos promotores o represores de la transcripción, respectivamente. Se sabe, por ejemplo, que cuando NICD hace contacto directo, por medio de su dominio RAM y el repetido de Ankirinas, con los dominios BTD y CTD del complejo CSL, se promueve la interacción con el dominio NTD de estos últimos, lo cual facilita la unión de Mastermind (Mam), para de esta forma estructurar un complejo transcripcionalmente

activo en todos los modelos estudiados (*H. sapiens*, *M. musculus*, *D. melanogaster* y *C. elegans*)^{21, 22}.

Actualmente se conocen varios complejos represores de la transcripción en los que participa la VN, los cuales varían dependiendo del tejido²³. Sin embargo, se conoce sólo un complejo transcripcional de regulación negativa que funciona en las etapas tempranas del desarrollo embrionario en insectos, donde por su actividad la proteína conocida como H se constituye como un potente antagonista de NICD²⁴, y es indispensable para la especificación de varios destinos celulares²⁵.

El conocimiento detallado de la proteína H en invertebrados es requisito indispensable para lograr identificar los posibles homólogos funcionales en mamíferos donde, a pesar de los esfuerzos realizados, no se ha logrado encontrar ninguna proteína que asemeje la actividad de H durante el desarrollo embrionario⁹. La falta de identificación de una proteína paróloga u ortóloga con funciones semejantes a H en animales superiores, explica por qué sea una proteína ampliamente ignorada en el desarrollo embrionario de los mamíferos¹⁸.

Esta situación resalta la importancia de conocer a detalle el funcionamiento de los complejos transcripcionales de regulación negativa durante la etapa de desarrollo embrionario. Sobre todo si tomamos en cuenta que la VN es altamente conservada en todos los metazoarios, desde insectos hasta el hombre, y que para que dicha vía de transducción de señales funcione correctamente se necesita de la combinación de efectos de las proteínas N y H para llevar a cabo, y con éxito, la diferenciación celular durante la embriogénesis, así como también para asegurar el correcto funcionamiento de células y tejidos en un estado adulto¹⁸. Es por ello que se considera muy importante el identificar una proteína con funciones similares a H en mamíferos, que tenga actividad en un estado embrionario¹⁹.

Es por esto, que en el presente trabajo planteamos diseñar y construir una trampa molecular que tenga la capacidad de reconocer y atrapar a la proteína H de *D. melanogaster*, a partir del fragmento CTD de RBP-Jκ, el factor transcripcional de la VN en mamíferos. Actualmente se sabe, por trabajos realizados por Maier y cols¹⁶ que RBP-Jκ es funcionalmente activo en *D. melanogaster*, donde demostró que es

capaz de estructurar un complejo regulador negativo funcional de la VN durante la embriogénesis. Por lo tanto proponemos que es posible que, usando esta trampa molecular, se pueda atrapar una proteína, a partir de extractos proteicos totales de embriones de mamíferos, que conserve las funciones de la proteína H¹⁷.

Materiales y métodos.

Purificación de DNA. Para la obtención del material genético de *Mus musculus* (ratón), que será usado para obtener el fragmento CTD del gen que codifica para la proteína RBP-Jκ, se usó el QuickGene® DNA tissue Kit S (Fuji film) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Obtención y clonación del fragmento CTD de RBP-Jκ: Se diseñaron dos oligonucleótidos específicos para amplificar el fragmento CTD de RBP-Jκ. El oligonucleótido 5'RBPJCTD (hacia la región 5' del gen), con la secuencia **5'-gAC CgC gAT CgC CgT CCT TgC CCC AgT CAC CCC-3'**; en color azul se muestran 4 bases nitrogenadas adicionadas al azar (como marca el protocolo de PROMEGA), en negrita y cursiva se muestra el sitio de corte por la enzima *Sgf* I. El oligonucleótido 3'RBPJCTD (hacia la región 3' del gen), con la secuencia **5'-gAT ggT TTA AAC_Tgg TgT gTA ggT gAA ggT AAg gCT gg-3'**; en color azul se muestran 3 bases nitrogenadas adicionadas al azar, en rojo se muestra un codón para Valina, en este caso se adiciona un codón de paro para delimitar el final de la transcripción, y el sitio de corte de la enzima *Pme* I (en negritas y cursiva). El fragmento CTD de RBP-Jκ se obtuvo mediante la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) a partir de DNA total de ratón y de una construcción que fue donada por el Dr. Maier (Instituto de Genética de la Universidad de Hohenheim, Stuttgart, Alemania) y agregando a concentración final los siguientes reactivos: 150 ng de ADN genómico ó 10 ng de ADN plásmidico, amortiguador para PCR (Tris-HCl 200 mM, KCl 500 mM) 1X, 2 mM de MgCl₂, 0.2 mM de dNTP's, 0.2 μM de cada oligonucléotido, 1.0 U de *Taq* DNA polimerasa (PROMEGA) y agua destilada desionizada estéril para completar un volumen final de 50 μl. La reacción de PCR fue

llevada a cabo en un termociclador GeneAmp® PCR System 2700 (Applied Biosystems), con las siguientes condiciones en el programa: 1 ciclo a 94°C por 4 min; 40 ciclos a 94°C por 35 seg., 65.5°C por 45 seg y 72°C por 40 seg; un ciclo a 72°C por 7 min y un ciclo sostenido a 4°C. Una vez que se obtuvo la banda esperada de 300 pb, se clonó en el vector pF1A T7 Flexi® (siguiendo las instrucciones del fabricante) empleando el Kit de clonación Flexi® Vector Systems y las enzimas de restricción correspondientes (PROMEGA™, USA). Posteriormente se sub clonó en el plásmido optimizado para la purificación de proteínas de fusión con el sistema HaloTag, en el vector pFN18K, obteniéndose el plásmido pFN-CTDJκ. Todos los productos de PCR y las construcciones obtenidas se secuenciaron para su verificación.

Inducción del péptido: Una vez hecho la comprobación por secuenciación de las construcciones híbridas de los péptidos, se continuó con la expresión de proteínas bajo el sistema que marca el protocolo, empleando el plásmido pFN-CTDJκ. El procedimiento se estandarizó usando como inductor el Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG). Previo a la inducción se preparó un preinóculo de *E.coli* (NEB [MiniF *lacI*^f(Cam^R) / *fhuA2 lacZ::T7 gene1 [lon] ompT gal sulA11 R(mcr-73::miniTn10--Tet^S)2 [dcm] R(zgb-210::Tn10--Tet^S) endA1 Δ(mcrC-mrr)114::IS10]) (transformada con la construcción péptido-Tag, y sin transformar, esta última empleada como control negativo), para posteriormente crecer un cultivo de 20 ml y llevarlo a una densidad óptica de 0.3 a 0.4_{DDO} a una longitud de onda de 600 nm, una vez que el cultivo se encontró en el rango de DDO se adicionó 0.19 μl de IPTG 1M, para que la concentración final fuera de 0.01 mM, estas condiciones son usadas cuando el péptido híbrido resulta ser tóxico para la bacteria. Se dejó inducir por una hora a 37°C y otra hora a 18°C.*

Extracción y Purificación de Proteína Bacteriana: Al término de la inducción, el cultivo bacteriano que ha expresado el péptido fue sometido a centrifugación en una centrifuga de preparación con estas condiciones: 4°C de temperatura, 5,000 g por 10 minutos. Después el sobrenadante se eliminó dejando solo la pastilla bacteriana, se agregó un buffer de extracción B-Pert Lysis Buffer (Thermo Scientific) 4 ml por cada gramo de pastilla bacteriana, junto con una combinación de lisosima y DNAsa en una

relación de 2 μ l por cada ml de Buffer usado, y por último se adiciona inhibidores de proteasa con una concentración final de 2x; se mezcló perfectamente hasta homogeneizar la pastilla. Se dejó reposar a temperatura ambiente por 5 minutos. Después se sometió a centrifugación a 15,000 g por 10 minutos a 4°C y se colocó inmediatamente a -20°C hasta su utilización.

Purificación del péptido: La purificación del péptido se realizó utilizando la resina, HaloTag Protein Purification System (Promega); este protocolo está diseñado para poder ser usado con los vectores de la familia Flexi (Promega). Primeramente se preparó la resina y se activó mediante dos lavados con el Buffer HTPPB (50mM HEPES, pH 7.5, 150mM NaCl), se agregó el extracto purificado de bacterias en la resina y se dejó interactuar por una hora a temperatura ambiente en un agitador oscilatorio del tipo end-over-end. Al cabo de la hora de interacción se somete a centrifugación a 1,000 g por 5 minutos a temperatura ambiente y el sobrenadante es recuperado y nombrado como FT que es un control del proceso, FT es el sobrenadante que no contiene más la construcción híbrida del péptido. La resina con la construcción atrapada en ella fue nuevamente lavada 2 veces con el buffer HTPPB. Se agregó una solución de corte formada de Proteasa TEV (Promega) y de buffer HTPPB y se dejó haciendo digestión por 1 hora a temperatura ambiente, al finalizar la hora se sometió a centrifugación a 3,000 g por 5 minutos a temperatura ambiente y el sobrenadante que contenía al péptido junto con la proteasa se recuperó, a la resina faltante se le adicionó 1 ml de buffer HTPPB y se volvió a centrifugar y tomar el sobrenadante que fue nombrado como E1. La elución 1 (E1) fue puesta en incubación a temperatura ambiente por 20 minutos en un agitador oscilatorio con la resina HisLink (Promega) para quitar los rastros de proteasa y de esta manera dejar solo al péptido en el sobrenadante, finalmente esta elución fue nombrada E2 que contenía el péptido purificado. Se realizaron dos controles durante todo el proceso que fueron nombrados como ST y STEV. El control ST consistió en un extracto total bacteriano más buffer HTPPB y el control STEV consistió en un extracto bacteriano mas solución de corte de la TEV proteasa.

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

Análisis Western: Para la identificación de la sonda en extractos proteicos tanto bacterianos como en la interacción de extracto proteico de mosca contra extracto proteico bacteriano se utilizó el anticuerpo monoclonal anti-HaloTag (Promega). Para la identificación de la proteína Hairless que une a la sonda se utilizó el anticuerpo policlonal anti-Hairless (Santa Cruz). Los extractos fueron tratados para cargarlos en gel de acrilamida para realizar el análisis Western.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

Para obtener el fragmento del gen que codifica para el dominio CTD de la proteína RBP-Jκ, se realizó la extracción de DNA genómico de tejido medular de *Mus musculus* con el kit *Wizard® Genomic DNA Purification Kit* de Promega®, se corrió un gel de Agarosa al 1% para ver la integridad del ADN, las concentraciones finales

de ADN fueron las siguientes: Carril 1: 320 ng/μl, carril 2: 310 ng/μl, carril 3: 200 ng/μl, carril 4: 189 ng/μl, carril 5: 200 ng/μl, carril 6: 450 ng/μl, carril 7: 310 ng/μl, se usó la muestra del carril 6 donde se obtuvo alrededor de los 450 ng/ul de ADN (fig. 1).

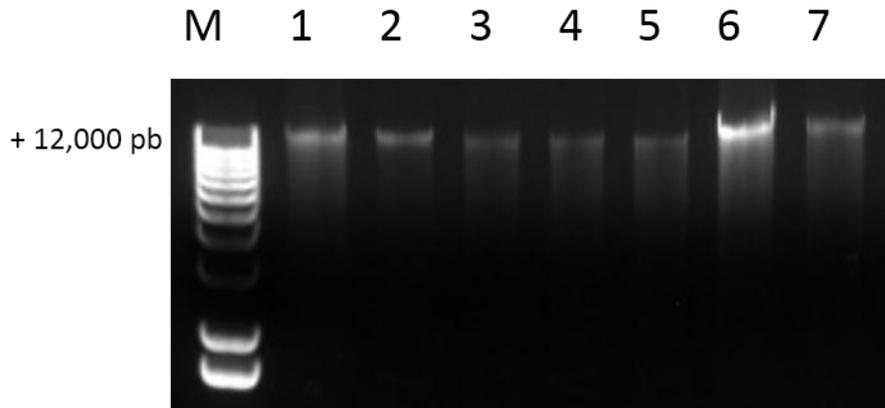


Figura 1. Electroforesis en gel de Agarosa al 1 %. Extracción de material genómico de tejido medular de *Mus musculus*. M, Marcador molecular 1 Kb Plus leader (*Invitrogen*). 1 – 7, diferentes muestras de ADN obtenidas de diferentes porciones de médula de ratón.

El dominio CTD de la proteína RBP-Jκ obtenido por medio de PCR, tuvo el tamaño esperado de 300 pb como puede observarse en la Figura 2²². Para asegurar que era la secuencia deseada, se secuenció el fragmento y al realizar el análisis comparativo con la secuencia del gen de la proteína *RBP-Jκ* (Fig. 4)

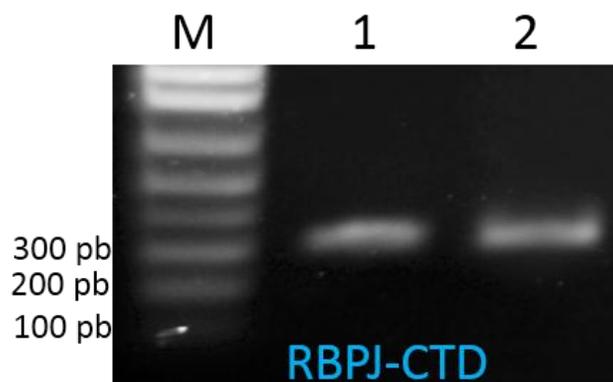
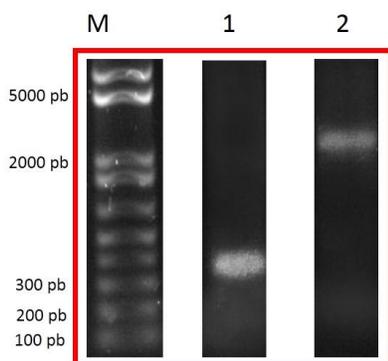


Figura 2. Producto de PCR en gel de agarosa al 1%. M: Marcador 1kb Plus Leader (Invitrogen); 1 – 2: producto de PCR del material genético de tejido de ratón, amplificado con los oligos 5'RBPJCTD y 3'RBPJCTD, esperando una banda a 300 pb, de acuerdo a la secuencia que fue referenciada en la base de datos del NCBI del fragmento CTD de RBP-Jκ de *M. musculus* (www.ncbi.gov).

El producto de PCR obtenido, se clonó en el vector pF1AT7 Flexi® y se subclonó en el vector pFN18K (siguiendo las instrucciones del fabricante) empleando el Kit de clonación Flexi® Vector Systems y las enzimas de restricción correspondientes *Sgf* I, *Pme* I (PROMEGA™, USA), obteniéndose el plásmido pFN-CTDJκ. Para comprobar que la secuencia del fragmento CTD de RBP-Jκ fuera correcta se hicieron las pruebas de restricción utilizando las enzimas *Sgf* I, *Pme* I y *Xmn* I. Usando las dos primeras enzimas de restricción, se esperaba liberar un fragmento de aproximadamente 300 pb, el cual contiene la secuencia del fragmento CTD del gen *RBP-Jκ*, lo cual efectivamente sucedió (ver Fig. 3). El empleo de la enzima de restricción *Xmn* I se usó para verificar que el fragmento efectivamente contenga la secuencia esperada, ya que de ser así hay un sitio interno de corte para esta enzima que junto con el sitio de policlación, debe de liberar un fragmento de aproximadamente 1,200 pb, como efectivamente sucedió y se puede observar en la fig. 3. La secuenciación verificó que el DNA correspondía al fragmento del gen *RBP-Jκ* que es de nuestro interés, y que codifica para el dominio CTD de la proteína RBP-Jκ (ver Fig. 4).

A



B



Figura 3. Producto de la digestión enzimática con *Sgf I*, *Pme I* y *Xmn I* en el plásmido pFN18K con el fragmento CTD de RBP-Jκ. **A)** M: Marcador molecular 1 kb Plus Leader (Invitrogen); 1: liberación del fragmento CTD de RBP-Jκ usando las enzimas *Sgf I* y *Pme I* esperando una banda de 300 pb; 2: liberación de un fragmento por la enzima *Xmn I* que contiene un sitio de corte dentro del fragmento CTD y dentro del mapa del plásmido pFN18K, liberando un fragmento de aproximadamente 1000 pb. **B)** Esquema donde se muestran los sitios de corte dentro del fragmento CTD de RBP-Jκ en el mapa del plásmido pFN18K para las enzimas *Sgf I*, *Pme I* y *Xmn I*.

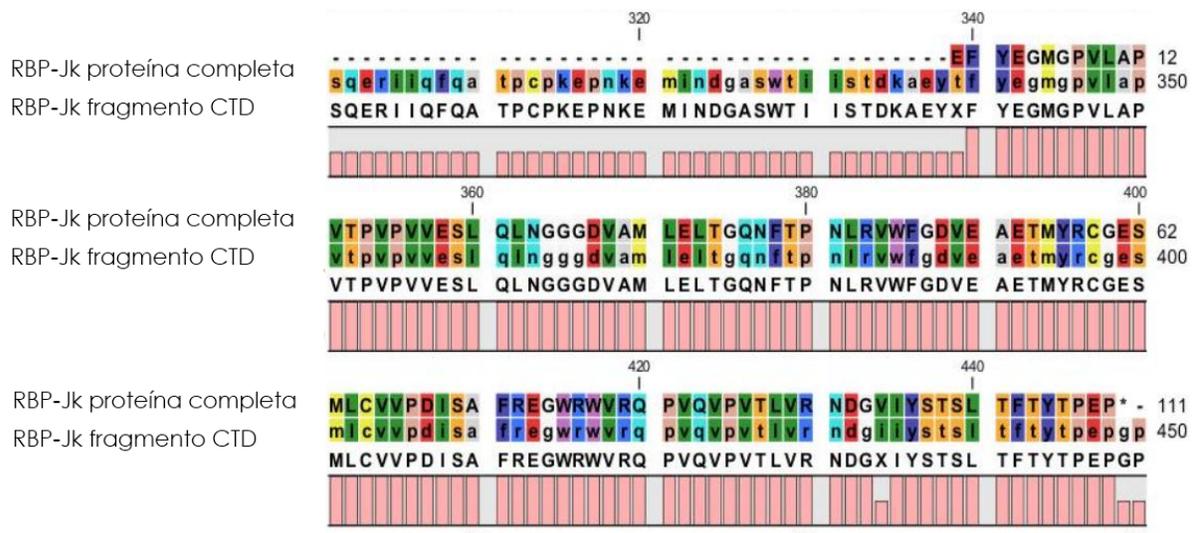


Figura 4. Alineamiento de la secuencia de la proteína completa de RBP-Jκ contra la secuencia del fragmento CTD que se mandó secuenciar. Ambas secuencias fueron traducidas a aminoácidos con el software Workbench versión 6 de CLC.

Ya que las secuenciaciones corroboraron que el dominio CTD de la proteína RBP-Jκ fue clonado, se prosiguió con la expresión del péptido con la ayuda del inductor IPTG. Para esto, fue necesario transformar las bacterias T7 Express I^q Competent *E. coli* (High Efficiency) con el plásmido pFN-CTDJκ, que están optimizadas para la expresión de proteínas de fusión con la ayuda del inductor IPTG. Siguiendo el protocolo para la inducción, se probaron diferentes concentraciones de IPTG (de 0.1 a 0.01 mM), diferentes temperaturas de inducción de 37°C y 18°C y Densidades

ópticas deseadas (de 0.300 a 0.600, a una longitud de onda de 600 nm), hasta estandarizar el protocolo para la inducción.

Se logró establecer las condiciones óptimas para la inducción del péptido del fragmento CTD de RBP-J κ , las cuales fueron las siguientes: una concentración de 0.01 mM de IPTG a una temperatura de 37°C por una hora y a 18°C por otra hora en agitación constante; estas condiciones fueron estandarizadas con la finalidad de poder expresar el péptido del fragmento CTD de RBP-J κ , que es reconocido por la bacteria por contener una similitud dentro de la secuencia, que corresponde a un factor transcripcional perteneciente a la superfamilia IPT de *E. coli* (ver apéndice Figura 1). Una vez logrando expresar el péptido, se realizó el primer ensayo de purificación (HaloTag Proteín Purification/ HaloTag Resin de PROMEGA) y se logró comprobar que la construcción del péptido del fragmento CTD de RBP-J κ con un peso molecular de 11 kDa, está fusionado con el Tag de purificación del plásmido de un peso de 33 kDa, dando como resultado de la unión, un péptido híbrido de aproximadamente 45 kDa (ver Fig. 5).

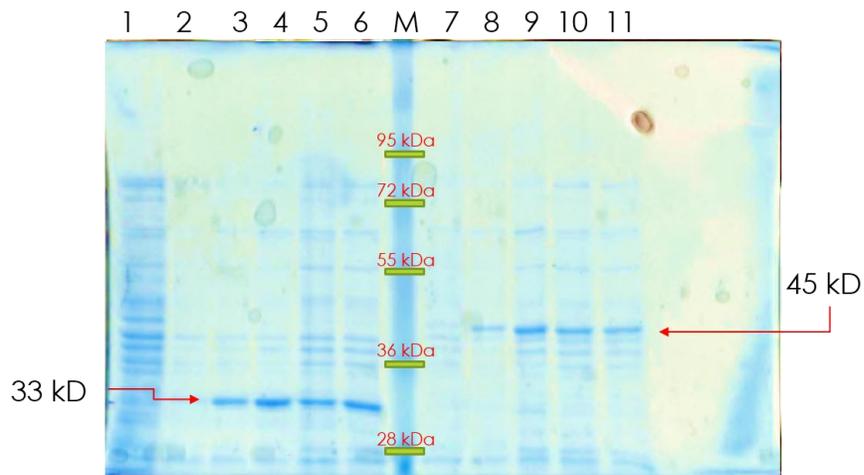


Figura 5. Comprobación de la inducción del péptido de la construcción del fragmento CTD de la proteína RBP-J κ . **1:** Bacterias sin transformar. **2:** Bacterias transformadas sin inductor IPTG. **3 y 4:** Bacterias transformadas con inductor IPTG crecidas a 37°C por dos horas con la construcción del Tag (33 kDa). **5 y 6:** Bacterias transformadas con inductor IPTG crecidas a 37°C por una hora y a 18°C por otra hora con la construcción del Tag. M: Marcador de peso molecular (Plus Prestained Protein

Ladder, FERMENTAS). **7:** Bacterias transformadas sin inductor IPTG con la fusión del Tag y el péptido del fragmento CTD de la proteína RBP-Jκ de 11 kDa. **8:** Bacterias transformadas con inductor IPTG crecidas a 37°C por una hora y a 18°C por otra hora con la fusión del Tag y del péptido. **10 y 11:** Bacterias transformadas con inductor IPTG crecidas a 37°C por dos horas con la fusión del Tag y el péptido.

Se realizó un ensayo de interacción con extracto proteico total de embriones de mosca (*Drosophila melanogaster*) contra extracto proteico de bacterias transformadas con la fusión del Tag y el péptido híbrido del fragmento CTD de la proteína RBP-Jκ, como se mencionó anteriormente, las condiciones de expresión fueron estandarizadas para optimizar la expresión del péptido híbrido que es reconocido como un factor transcripcional propio de la bacteria. Una vez lograda la estandarización del proceso, se obtuvo una cantidad del péptido híbrido sin ser degradado, con la finalidad de poder confrontarlo íntegramente contra los extractos totales de embriones de mosca. Se siguió la metodología según el protocolo del fabricante usando una resina para purificar por el método de inmovilización de ligandos la construcción HaloTag-CTD y la proteína que unió por afinidad al dominio del fragmento CTD de la construcción, que en este caso se diseñó especialmente tomando la secuencia del factor transcripcional de la mosca Su(H) en su homólogo en mamíferos, RBP-Jκ. Con los anticuerpos contra Hairless y HaloTag que se han empleado en las purificaciones y en las interacciones (ver Fig. 6) se ha logrado identificar con la ayuda de proteínas totales de mosca, una proteína con afinidad por el péptido del fragmento CTD de RBP-Jκ que en este caso la utilización del anticuerpo anti-Hairless (SantaCruz) se identificó una isoforma de la proteína Hairless en el carril 1 y 2. En el carril 1 se muestra el producto final del proceso de purificación en donde ha quedado la proteína que unió por afinidad a la sonda diseñada (fragmento Tag-CTD), donde se usó el anticuerpo anti-Hairless, por lo tanto se comprobó que la proteína Hairless ha quedado aislada correctamente, también se puede observar parte de la sonda usada, esto debido a la gran cantidad de sonda usada, en el carril 2 se muestra la sonda y la construcción con una pequeña traza de la proteína Hairless que aún no ha sido aislada por completo, en el carril 1 y 2 se ha

usado el anticuerpo Anti-Hairless (SantaCruz); los carriles de 3 a 6 son explicados con mayor detalle en el pie de página y son controles que describen el proceso de purificación de la sonda y el proceso de asilamiento de la proteína Hairless de acuerdo al protocolo. La cantidad de proteína usada en los extractos totales de mosca fue de un total aproximado de 3 ug de proteína total de embriones de mosca contra 1 ug de proteína total de bacterias *E. coli* NEB, esto por la escasa cantidad de proteína Hairless contenida en los embriones de mosca. Los anticuerpos que se usaron fueron: anti-Hairless (Policlonal de SantaCruz) y anti-HaloTag (Monoclonal de Promega) para realizar el Western final y detectar la señal de Hairless en la purificación de la sonda (ver. Fig. 6).

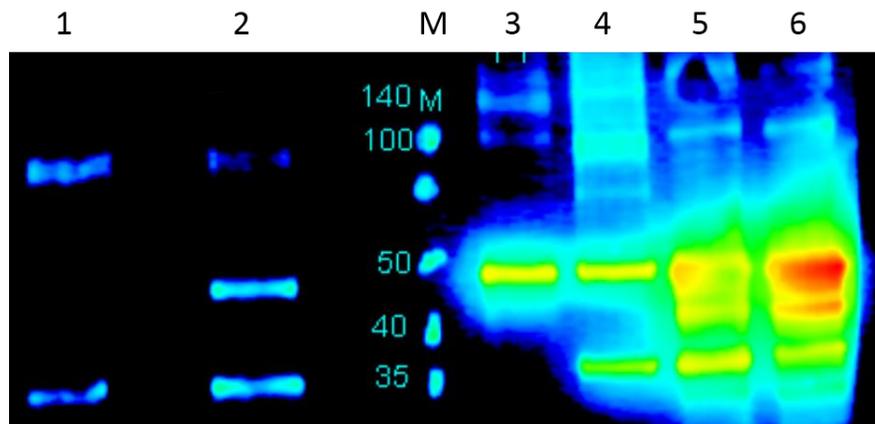


Figura 6. Western del proceso de purificación e interacción de la fusión del Tag y el péptido híbrido del fragmento CTD de la proteína RBP-Jκ usando los anticuerpos específicos anti-Hairless (policlonal) y anti-HaloTag (monoclonal). **1:** Elución 2, se muestra el proceso final de la purificación dejando solamente la proteína Hairless con un peso aproximado de 110 kDa, que tuvo afinidad por la construcción Tag-CTD. **2:** Elución 1, se muestra el proceso de purificación antes de retirar la construcción de la fusión Tag-CTD observándose una ligera presencia de la proteína Hairless y residuos de la construcción Tag-CTD con un peso molecular de 45 kDa y una banda a 35 kDa que indica que ha quedado solo el Tag sin la fusión del fragmento CTD. **M:** Marcador de peso molecular en kDa. **3:** FT, sobrenadante del primer control del protocolo. **4:** Resina, muestra tomada del residuo final de la resina usada en el proceso de purificación. **5 y 6:** Controles STEV y ST respectivamente.

CONCLUSIONES

En el presente trabajo demostramos que fue posible la construcción de un péptido híbrido derivado de un fragmento del dominio CTD de la proteína RBP-Jκ de *Mus musculus* fusionado a un Tag de purificación con la capacidad de unir por afinidad a la proteína Hariless de *Drosophila melanogaster*, enfrentando los extractos proteicos totales de embriones de mosca contra el extracto proteico total bacteriano. Corroboramos también que el péptido híbrido resulta interferir con el crecimiento en el momento de expresarse en el sistema bacteriano descubriendo que el fragmento del dominio CTD de la proteína RBP-Jκ comparte una secuencia de 11 aminoácidos idénticos a un factor transcripcional de la bacteria.

AGRADECIMIENTOS

A CONACYT por la beca otorgada a G. Saucedo-Correa, al Dr. D. Maier por su colaboración al aportar construcciones necesarias para la elaboración del proyecto así como sus instrucciones en algunos protocolos, a los asesores que formaron parte del comité de evaluación, al Dr. Marco Cajero Juárez y al Dr. Homero Reyes de la Cruz.

Bibliografía

- 1.- Bosch P, Blanch MS, Ferrero S, Díaz H, Piccatto F, Bosh RA. **Desarrollo de Embriones Caprinos *In Vitro*: Efecto del Co-Cultivo con Células Epiteliales de Oviducto**. Rev Cient (Maracaibo). 2006. 16(3): 273-281.
- 2.- Bravo, P. A. Baizabal. A. V. M. **La vía de señalización Notch y el desarrollo embrionario animal**. 2005. REB 24(3,4):87-96.
- 3.- Artavanis-Tsakonas S, Rand MD, Lake RJ. *Notch Signaling: Cell Fate Control and Signal Integration*. Development Science 1999. 284:770-776.

- 4.- Gerhart J. **Signaling pathways in development**. Teratology 1999. 60:226-239.
- 5.- Mumm JS, Kopan R. **Notch signaling: from the outside**. Dev Biol 2000. 228:151-165.
6. - Dieter Meier et. al. 2008. **The tiny Hairless protein from Apis melifera: a potent antagonist of Notch signaling in Drosophila melanogaster**. 8:175 doi:10.1186/1471-2148-8-175.
- 7.- Furriols, M., Bray, S. (2000). **Dissecting the mechanisms of Suppressor of Hairless function**. Dev. Biol. 227(2): 520--532. (Export to RIS).
- 8.- Paz-Gómez, D. Baizabal-Aguirre, V. M. Valdez-Alarcón, J. J. Cajero-Juárez, M. Nagel, A. C. Preiss, A. Maier, D. Bravo-Patiño, A. Structural analysis of point mutations in the *Hairless* gen and their association with the ativity of the Hairless protein. 2008. Int. Jour. Biol. Macromolecules. 43:426-432.
- 9.- Barolo S, Stone T, Bang AG, Posakony JW. Default repression and Notch signaling Hairless acts as an adaptor to recruit the corepressors Groucho and dCtBP to Supsressor of Hairless. Genes Develop 2002. 16:1964-1976.
- 10.- Marquart J, Alexief-Damianof C, Preiss A, Maier D. Rapid divergence in the course of Drosophila evolution reveals structural important domains of the Notch antagonist Hairless. Dev Genes Evol 1999. 209:155-164.
- 11.- Brody T. 2002. The Interactive Fly. Hairless. Available from: <http://www.sdbonline.org/fly/hjmuller/hairles1.htm>. Accesed Nov. 10, 2007.
- 12.- Baron M. An overview of the Notch signaling pathway. Sem Cell Devel Biol. 2003. 14:113-119.
- 13.- Schweisguth F. Regulation of Notch signaling Activity. Current Biology 2004. 14;R129–R138.
- 14.- Nagel AC, Krejci A, Tenin G, Bravo-Patiño A, Bray S, Maier D, Preiss A. Hairless-Mediated repression of Notch target genes requires the combined activity of Groucho and CtBP corepressors. Molec and Cell Biol 2005. 25(23):10433-10441.
- 15.- Bray S. J. Notch signalling: a simple pathway becomes complex. Nature 2006. 7:678-689.
- 16.- Maier D, Anja CN, Preiss A. Two isoforms of the Notch antagonist Hairless produced by differential translation initiation. Proc Natl Acad Sci. 2002. 24:15480-15485.
- 17.- Maier D, Stumm G, Kuhn K, Preiss A. Hairless, a Drosophila gene involved in neural development, encodes a novel, serine rich protein. Mech Develop. 1992. 38:143-156.
18. – Dou, S. Zeng, X., Cortes P., Erdjument-Bromage, H., Tempst. P., Honjo, T. y Vales L. D. 1994. **The Recombination Signal Sequence-Binding Protein RBP-2N Functions as a Transcripcional RepressorN**. . Mol. Cell. Biol. 14, 3310-3319.
19. – Brennan, K. y Gardner, P. 2002. **Notching up another pathway**. Bioessays. 24(5):405-410.

20. – Waltzer, L., Bourillot, P. Y., Sergeant, A. y Manet, E. 1995. **RBP-Jk repression activity is mediated by a co-repressor and antagonized by the Epstein-Barr virus transcription factor EBNA2.** Nucleic Acids Res. 23,4939-4945.
21. - Kelly J. Collins,¹ Zhenyu Yuan,¹ and Rhett A. Kovall. 2014. **Structure and Function of the CSL-Kyo12 Corepressor Complex: A Negative Regulator of Notch Signaling.** Cell, ¹Department of Molecular Genetics, Biochemistry and Microbiology, University of Cincinnati, Cincinnati, OH 45267.22.
- Maier D. et. al. 2011. **Structural and functional analysis of the repressor complex in the Notch signaling pathway of Drosophila melanogaster.** Universität Hohenheim, Institut für Genetik (240), 70593 Stuttgart Germany.
23. - Contreras-Cornejo, H., Baizabal-Aguirre, V., Bravo-Patiño, A. 2010. **Obtención de péptidos para la producción de un anticuerpo policlonal contra el dominio de unión a Supresor de Hairless de la proteína Hairless de Drosophila melanogaster.** Ciencia Nicolaita. Número especial:10-14.
24. - Maier D, Anja CN, Preiss A. **Two isoforms of the Notch antagonist Hairless produced by differential translation initiation.** Proc Natl Acad Sci. 2002. 24:15480-15485.
25. - Maier, D.; et al. 1992. **Hairless, a Drosophila gene involved in neural development, encodes a novel, serine rich protein.** Mech. Develop. 38:143-156.

6. DISCUSIÓN GENERAL Y CONCLUSIONES

El perfeccionamiento del conocimiento que involucra a las vías de transducción de señales es de gran interés para el ser humano, ya que un entendimiento minucioso puede impactar a los campos de la investigación como de la medicina, tecnología y el desarrollo celular. Además, ayudará a comprender como funciona el engranaje de estos procesos tan sutilmente exactos y perfectos, lo que nos permitirá conocer más a fondo sobre ciertos mecanismos de la biología del desarrollo, inmunología, neurobiología y muy importante la biología del cáncer, entre otras muchas áreas de interés que involucren a las vías de transducción de señales.

El desarrollo de los metazoarios depende de la actividad reiterada de la vía de transducción de Notch, de tal manera que la célula sea capaz de responder adecuadamente a la variedad de señales, amplificando y adquiriendo la actividad genética y molecular que determina su destino. La capacidad que tiene esta vía de influir sobre un número importante de aspectos específicos del desarrollo, predice que la manipulación adecuada de los elementos que la componen resultaría en aplicaciones médicas, por medio de terapias celulares y/o génicas. Con la modulación de la vía Notch en puntos específicos, empleando modelos tanto *in vitro*, originando líneas celulares específicas, como *in vivo*, produciendo animales “knock out”, se lograría una mejor comprensión de los aspectos moleculares de la biología del desarrollo y de ciertas enfermedades ³. Para lograr estos objetivos en los diferentes campos de investigación, es esencial comenzar por el discernimiento de los componentes que hacen funcionar el mecanismo desde sus orígenes, por ejemplo, el estudio de los engranajes moleculares que componen a las proteínas principales de la VN, sus dominios conservados.

Los resultados obtenidos con la expresión de los péptidos fueron comparados con los anteriormente mostrados por Maier²² y Kovall²¹, respecto con la inducción del péptido del fragmento de Su(H), al parecer resulta presentar un mayor índice de dificultad de expresión en las bacterias. Dada la alta conservación de los componentes de la vía Notch, a nivel estructural y funcional se ha demostrado que

pueden interactuar componentes de diferentes organismos metazoarios y crear una señalización funcional en sistemas *in-vitro*, como lo demuestran los trabajos realizados por Maier en el año 2011 y con los resultados obtenidos en este trabajo donde se ha usado un fragmento híbrido del factor transcripcional de la VN de ratón, RBP-Jκ, para atrapar a la proteína Hairless por afinidad de dominios, como se ha dicho anteriormente la proteína H es exclusiva de insectos, es por este motivo que aún existen incógnitas en los sistemas del mecanismo de cómo actúa la VN en los mamíferos, ya que no se ha logrado encontrar a nivel embrionario una proteína reguladora negativamente, esto por el hecho de ser un sistema molecular tan preciso como lo es una vía de señalización en organismos complejos.

Considerando los resultados obtenidos de un BLAST del fragmento CTD de RBP-Jκ con un genoma de *E. coli* en el genbank se comprobó que comparten a nivel de aminoácidos un 55% de similitud y un 33% de identidad. Para asegurar la expresión de las bacterias transformadas con esta construcción fue necesaria la reducción del metabolismo bacteriano para asegurar la integridad de la construcción y obtener cantidades que nos permitirán realizar interacciones con los extractos proteicos de embriones de mosca. La estrategia planteada y realizada en este trabajo de tesis demostró tener una eficiencia en la manipulación de proteínas al momento de confrontarlas y/o interactuar convirtiendo esta estrategia experimental en una alternativa de bajo costo y tiempo, así como la nobleza en la manipulación de las proteínas.

El desarrollo de este trabajo otorgará una alternativa para identificar homólogos en sistemas con niveles similares de conservación en los dominios involucrados de las proteínas forman parte de su sistema y que tienen la capacidad de interactuar de manera estrecha de modo inter-especie con respecto a las vías de señalización conservadas en diferentes organismos.

7. Bibliografía

- 1.-Adolfo Toledano, María Isabel Álvarez. 2009. **Comunicación Celular, Fundamento para la Vida**. Instituto Cajal, CSIC, Madrid. Museo de Ciencias Naturales, CSIC, Madrid. Autores científico-técnico y académicos.
- 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.- Alejandro Bravo Patiño y Víctor M. Baizabal Aguirre. 2005. **LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN NOTCH Y EL DESARROLLO EMBRIONARIO ANIMAL**. REB 24(3,4): 87-96, 2005.
- 4.- Barolo, S., Walter, R, Polyanosvsky, A., Freschi, G., Keil, T. y Posakony, J. W. 2000. **A Notch-independent activity of Suppressor of Hairless is required for normal mechanoreceptor physiology**. Cell. 103, 957-969.
5. - Gerhart J. 1999. **Signaling pathway in development**. Teratology 60:226-239.
6. - Dieter Meier et. al. 2008. **The tiny Hairless protein from Apis melifera: a potent antagonist of Notch signaling in Drosophila melanogaster**. 8:175 doi:10.1186/1471-2148-8-175.
7. - Kopan, R. & Ilagan, MXG. 2009. **The canonical Notch Signaling Pathway: Unfolding the activation Mechanism**. Cell. 137(2): 216-233.
8. – Baron M. 2003. **An overview of the Notch signaling pathway**. Sem Cell Devel Biol 19:27-38.
9. - Joutel, A., and Tournier-Lasserre, E. (1998). **Notch signaling pathway and human diseases**. Semin. Cell Dev. Biol. 9, 619-625.
10. - Fleming R J (1998) **Structural conservation of Notch receptors and ligands**. Sem Cell Devel Biol 9:599-607.
11. - 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 Devel 16:1964-1976.

12. - Haines N e Irvine K D (2003) **Glycosylation regulates Notch signalling.** Nature Rev Molec Cell Biol 4:786-797.
13. - Nagel, A. C. Krejci, A. Tenin, G. Bravo-Patiño, A. Bray, S. Maier, D. Preiss, A. 2005. **Hairless-Mediated repression of Notch target genes requires the combined activity of Groucho and CtBP corepressors.** Molec. and Cell. Biol. 25(23):10433-10441.
14. - De Celis, J F, Bray S y Garcia Bellido A (1997). **Notch signaling regulates veinlet expression and establishes boundaries between veins and interveins in the Drosophila wing.** Development 124:1919-1928.
15. - 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.** Vol. 279, No. 28, pp. 29418-29426.
16. - Furriols, M., Bray, S. (2000). **Dissecting the mechanisms of Suppressor of Hairless function.** Dev. Biol. 227(2): 520--532. (Export to RIS).
17. – Dou, S. Zeng, X., Cortes P., Erdjument-Bromage, H., Tempst. P., Honjo, T. y Vales L. D. 1994. **The Recombination Signal Sequence-Binding Protein RBP-2N Functions as a Transcriptional RepressorN.** . Mol. Cell. Biol. 14, 3310-3319.
18. – Brennan, K. y Gardner, P. 2002. **Notching up another pathway.** Bioessays. 24(5):405-410.
19. – Waltzer, L., Bourillot, P. Y., Sergeant, A. y Manet, E. 1995. **RBP-Jk repression activity is mediated by a co-repressor and antagonized by the Epstein-Barr virus transcription factor EBNA2.** Nucleic Acids Res. 23,4939-4945.
20. - Morel-V y Schweisguth-F, 1999. **Repression by Suppressor of Hairless and activation by Notch are required for define a single row of single-minded expressing cells in the Drosophila embryo.** GENES AND DEVELOPMENT 14:377-388.
21. - Kelly J. Collins,¹ Zhenyu Yuan,¹ and Rhett A. Kovall. 2014. **Structure and Function of the CSL-Kyo12 Corepressor Complex: A Negative Regulator of**

Notch Signaling. Cell, 1Department of Molecular Genetics, Biochemistry and Microbiology, University of Cincinnati, Cincinnati, OH 45267.

22. - Dieter Meier et. al. 2011. **Structural and functional analysis of the repressor complex in the Notch signaling pathway of Drosophila melanogaster.** Universität Hohenheim, Institut für Genetik (240), 70593 Stuttgart Germany.

23. - Contreras-Cornejo, H., Baizabal-Aguirre, V., Bravo-Patiño, A. 2010. **Obtención de péptidos para la producción de un anticuerpo policlonal contra el dominio de unión a Supresor de Hairless de la proteína Hairless de Drosophila melanogaster.** Ciencia Nicolaita. Número especial:10-14.

24. - Maier D, Anja CN, Preiss A. **Two isoforms of the Notch antagonist Hairless produced by differential translation initiation.** Proc Natl Acad Sci. 2002. 24:15480-15485.

25. - Maier, D.; et al. 1992. **Hairless, a Drosophila gene involved in neural development, encodes a novel, serine rich protein.** Mech. Develop. 38:143-156.

26. - Nagel, A. C. Krejci, A. Tenin, G. Bravo-Patiño, A. Bray, S. Maier, D. Preiss, A. 2005. **Hairless-Mediated repression of Notch target genes requires the combined activity of Groucho and CtBP corepressors.** Molec. and Cell. Biol. 25(23):10433-10441.

27. - Santos L; León-Galván M.F; Marino-Marmolejo. 2006. **Vía de señalización Notch y nuevas estrategias para el tratamiento de cáncer.** Salud Publica Mex. 48:155-165.

28. – Marquart, J., Alexief-Damianof, D., Preiss, A. y Maier, D. 1999. **Rapid divergence in the course of Drosophila evolution reveals structural important domains of the Notch antagonist Hairless.** Dev. Genes.Evol. 209:155-164.

29. - Schweisguth François. 2004. **Regulation of Notch Signaling Activity.** Current Biology, Vol. 14, R129–R138.

30. - Sarah J Bray, Shuji Takada, Emma Harrison, Shing-Chuan Shen and Anne C Ferguson-Smith. 2008. **The atypical mammalian ligand Delta-like homologue 1 (Dlk1) can regulate Notch signalling in Drosophila.** BMC Developmental Biology 2008, 8:11.
31. – Haltiwanger, R. S. 2002. **Regulation of signal transduction pathway in development by glycosylation.** Curr. Opin. in Structural Biology. 12:593-598.
32. – Haltiwanger R. S. y Stanly, P. 2002. **Modulation of receptor signaling by glycosylation: fringe is an O-fucose-b1, 3N-acetylglucosaminyl-transferase.** Biochem. Biophys. Acta 1573:328.335.
33. - Haines, N., Irvine, K. D. 2003. **Glycosylation regulates Notch signaling.** Nature Rev Molec Cell Biol 4:786.797.
34. – Shi, S. y Stanly, P. 2003. **Protein O-fucosyltransferase 1 is a essential component of Notch signaling pathways.** Proc. Natl Acad. Sci. USA 100:5234-5239.
35. – Schweistguth, F. 2004. **Regulation of Notch signaling activity.** Current Biology. 14:R129-R138.
36. – Okajima, T., Reddy B. V. V. G., Matsuda, T., Irvine, K. D. 2008. **Contributions of chaperone and glycosyltransferase activities of O-fucosyltransferase 1 to Notch signaling.** BMC Biology 6:1.
37. – Munro, S. y Freeman, M. 2000. **The Notch signaling regulator Fringe acts in the Golgi apparatus and requires the glycosyltransferase signature motif DxD.** Curr. Biol. 10:813-820.
38. – Gazave, E., Lapébie, P., Richards, G. S., Brunet, F., Ereskovsky, A. V., Degnan, B. M., Borchiellini, C., Vervoot, M y Renard, E. 2009. **Origin and evolution of the Notch signaling pathway: an overview from eukaryotic genomes.** BMC Evolutionary Biology 2009, 9:249.

39. – Baron, M., Aslam, H., Flaszka, 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.
40. - Kovall, R.A. 2008. **More complicated than it looks: assembly of Notch pathway transcription complexes.** *Oncogene* 27, 5099–5109.
41. - Le Borgne, R. 2006. **Regulation of Notch signalling by endocytosis and endosomal sorting.** *Curr. Opin. Cell Biol.* 18, 213–222.
42. - Range, R.C., Glenn, T.D., Miranda, E., and McClay, D.R. (2008). **LvNumb works synergistically with Notch signaling to specify non-skeletal mesoderm cells in the sea urchin embryo.** *Development* 135, 2445–2454.
43. - Gordon, W.R., Arnett, K.L., and Blacklow, S.C. (2008a). **The molecular logic of Notch signaling—a structural and biochemical perspective.** *J. Cell Sci.* 121, 3109–3119.
44. - Gordon, W.R., Vardar-Ulu, D., Histen, G., Sanchez-Irizarry, C., Aster, J.C., and Blacklow, S.C. (2007). **Structural basis for autoinhibition of Notch.** *Nat. Struct. Mol. Biol.* 14, 295–300.
45. - Raya, A., Kawakami, Y., Rodriguez-Esteban, C., Ibanes, M., Rasskin-Gutman, D., Rodriguez-Leon, J., Buscher, D., Feijo, J.A., and Izpisua Belmonte, J.C. (2004). **Notch activity acts as a sensor for extracellular calcium during vertebrate left-right determination.** *Nature* 427, 121–128.
46. - Deuss, M., Reiss, K., and Hartmann, D. (2008). **Part-time alpha-secretases: the functional biology of ADAM 9, 10 and 17.** *Curr. Alzheimer Res.* 5, 187–201.
47. - Brou, C., Logeat, F., Gupta, N., Bessia, C., LeBail, O., Doedens, J.R., Cumano, A., Roux, P., Black, R.A., and Israel, A. (2000). **A novel proteolytic cleavage involved in Notch signaling: the role of the disintegrin-metalloprotease TACE.** *Mol. Cell* 5, 207–216.
47. - Selkoe, D.J., and Wolfe, M.S. (2007). **Presenilin: running with scissors in the membrane.** *Cell* 131, 215–221.

48. - Okochi, M., Steiner, H., Fukumori, A., Tanii, H., Tomita, T., Tanaka, T., Iwatsubo, T., Kudo, T., Takeda, M., and Haass, C. (2002). **Presenilins mediate a dual intramembranous {gamma}-secretase cleavage of Notch-1**. EMBO J. 21, 5408–5416.
49. - Osenkowski, P., Ye, W., Wang, R., Wolfe, M.S., and Selkoe, D.J. (2008). **Direct and potent regulation of gamma-secretase by its lipid microenvironment**. J. Biol. Chem. 283, 22529–22540.
50. - Kanwar, R., and Fortini, M.E. (2008). **The big brain aquaporin is required for endosome maturation and notch receptor trafficking**. Cell 133, 852–863.
51. - Schroeter, E.H., Kisslinger, J.A., and Kopan, R. (1998). **Notch-1 signalling requires ligand-induced proteolytic release of intracellular domain**. Nature 393, 382–386.
52. – T. Borggrefe., F. Oswald. 2009. **The Notch signaling pathway: Transcriptional regulation at Notch target genes**. Cellular and Molecular Immunology. Life Sci. 66 (2009) 1631 – 1646.
53. - Kuang, B., Wu, S.C., Shin, Y., Luo, L. and Kolodziej, P. (2000) **split ends encodes large nuclear proteins that regulate neuronal cell fate and axon extension in the Drosophila embryo**. Development 127, 1517–1529.
54. – Oates A. C., Ho R. K. 2002. **Hairy/E(spl)-related (Her) genes are central components of the segmentation oscillator and display redundancy with the Delta/Notch signaling pathway in the formation of anterior segmental boundaries in the zebrafish**. PMID: 12050140.
55. - Zakany, J., Kmita, M., Alarcon, P., de la Pompa, J.-L., Duboule, D., 2001. **Localized and transient transcription of Hox genes suggests a link between patterning and the segmentation clock**. Cell 106, 207– 217.
56. - Masahiro Yamaguchi, Noriko Tonou-Fujimori, Atsuko Komori, Ryu Maeda, Yasuhiro Nojima, Haichang Li, Hitoshi Okamoto and Ichiro Masai (2005). **Histone**

deacetylase 1 regulates retinal neurogenesis in zebrafish by suppressing Wnt and Notch signaling pathways. Development 132, 3027-3043.

57. – Zanotti S., Canalis E., 2010. **Notch and the skeleton.** Mol Cell Biol. 30(4):886-96.

58. - Contreras-Cornejo, H., Baizabal-Aguirre, V., Bravo-Patiño, A. 2010. **Obtención de péptidos para la producción de un anticuerpo policlonal contra el dominio de unión a Supresor de Hairless de la proteína Hairless de Drosophila melanogaster.** Ciencia Nicolaita. Número especial:10-14.

8. Apéndice

8.1. Preparación de células competentes para choque térmico (cepa *Escherichia coli* DH5 α F'; Cepa *E. coli* XL1Blue; *Escherichia coli* TOP10)

Plaquear en Agar la cepa a propagar e incubar toda la noche a 37°C. Al día siguiente preparar un pre-inóculo de la cepa en 3 ml de medio LB e incubar toda la noche a 37°C con agitación constante (250 rpm). El día siguiente, vaciar el pre-inóculo a un matraz de 2 Lt con 500 ml de medio LB e incubar a 37°C con agitación constante (250 rpm) durante una hora y media. Tomar una muestra del medio de cultivo y medir a una DO₅₅₀. Registrar los datos. Detener el crecimiento incubando en hielo al momento que la lectura alcance un valor aproximado de 0.5 (0.35 a 0.45). Incubar en hielo 5 min. Distribuir el cultivo en dos botellas para centrífuga de 250 ml de capacidad estériles, y centrifugar a 4,600 rpm durante 10 min a 4°C. Retirar sobrenadante. Resuspender cada pastilla en 15 ml de TFb1 (Acetato de potasio 30 mM; Cloruro de potasio 100 mM; Cloruro de calcio 10 mM, Cloruro de manganeso 50 mM; glicerol 15%, esterilizado por filtración) frío y dejar reposar 20 min en hielo. Transferir a tubos para centrífuga estériles de 50 ml de capacidad y centrifugar a 11,600 rpm durante 10 min a 4°C. Retirar sobrenadante. Resuspender cada pastilla en 2 ml de TFb2 (MOPS 75 mM; Cloruro de potasio 10 mM; Cloruro de calcio 100 mM; glicerol 15%, esterilizado por filtración) frío e incubar 15 min en hielo. Alicuotar en tubos Eppendorf de 1.5 ml estériles, 100 μ l de la suspensión bacteriana, congelar en Nitrógeno líquido y almacenar a -80° C. Probar eficiencia de las bacterias preparadas.

8.2. Preparación de soluciones.

Acrilamida/Bisacrilamida 40%

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

Agar Luria-Bertani

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

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

Ampicilina (100 mg/ml)

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

Bromuro de Etidio (5 mg/ml)

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

Buffer TAE 50X

Compuesto	Catidad
Tris base	242 g
Ácido acético glacial	57.1 ml
EDTA 0.5M pH 8.0	100 ml

Agua dd Cbp 1 L

Mezclar y esterilizar

Buffer TBE 10X

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

Mezclar y esterilizar

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

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

EDTA 0.5 M pH 8.0

Compuesto	Cantidad
EDTA	186.126 g
Agua dde	cbp 1 L

Etanol al 70%

Compuesto	Cantidad
Etanol absoluto	700 ml
Agua dd	300 ml

Gel de agarosa 1%

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

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

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

Lisozima (20 mg/ml)

Compuesto	Catidad
Lisozima	0.2 g
Agua dde	cbp 10 ml

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

Medio Luria-Bertani (LB)

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

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

Persulfato de aminio 10%

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

STET

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

Solución TFb1

Compuesto	Concentración
Cloruro de potasio	100 mM

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

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

Solución TFb2

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

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

Tris-HCL 1 M pH 8.0

Compuesto	Cantidad
Tris base	12.114 g
Agua dd	cbp 100 ml

Ajustar pH a 8.0 con ácido clorhídrico concentrado y esterilizar

Tritón x100 al 10%

Compuesto	Cantidad
Tritón X100	10 ml
Agua dd	cbp 100 ml

Mezclar y esterilizar