



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

**CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE LA PROTEÍNA NAC-2 EN
LA REGULACIÓN NEGATIVA DE LA EXPRESIÓN DE GENES
MEDIADOS POR LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN NOTCH**

Tesis que presenta:
IBT. ULISES MACIEL PONCE

Para obtener el grado de:
MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Opción en:
MICROBIOLOGÍA CELULAR Y GENÉTICA MOLECULAR

Asesor:
DR. ALEJANDRO BRAVO PATIÑO

Co-asesor:
DR. JUAN JOSÉ VALDEZ ALARCÓN

Morelia, Michoacán, México. Mayo de 2019



El presente trabajo se realizó en el Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, bajo la dirección del Dr. Alejandro Bravo Patiño. En la realización de este proyecto se contó con financiamiento y beca (CVU 821691) del CONACYT y de la Coordinación de la Investigación Científica de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

ÍNDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
1. INTRODUCCIÓN	3
2. MARCO TEÓRICO	4
2.1. <i>La vía de señalización Notch</i>	4
2.2. <i>Ligandos y receptores de la vía de señalización Notch</i>	5
2.3. <i>Activación de la vía de señalización Notch</i>	8
2.4. <i>Represión de los genes de la vía de señalización Notch</i>	9
2.5. <i>Relación estructural entre los co-represores BEND6 e Insensitive</i>	12
2.6. <i>NAC-2: Identificación y caracterización</i>	14
3. ANTECEDENTES	18
4. JUSTIFICACIÓN	19
5. HIPÓTESIS.....	20
6. OBJETIVOS	20
6.1. <i>Objetivo general</i>	20
6.2. <i>Objetivos específicos</i>	20
7. METODOLOGÍA	21
7.1. <i>Ingeniería genética de vectores</i>	21
7.2. <i>Transfección celular</i>	30
8. RESULTADOS	35
8.1. <i>Análisis de los vectores pGL4xCSL, pHT-NACC-2 y pHT</i>	35
8.2. <i>Estandarización de 4xCSL-Luc</i>	40
8.3. <i>Efecto del polipéptido RegNeg-AID sobre 4xCSL-Luc</i>	42
8.4. <i>Efecto de NAC-2 sobre 4xCSL-Luc</i>	43
9. DISCUSIÓN	46
9.1. <i>El vector pGL4xCSL es sensible a la vía de señalización Notch</i>	46
9.2. <i>NAC-2 aumenta y disminuye la actividad de la enzima luciferasa</i>	47

10. CONCLUSIÓN	50
11. PERSPECTIVAS	51
12. BIBLIOGRAFÍA	52

ABREVIACIONES

μg: Microgramo

μl: Microlitro

ADAM: Una desintegrina y una metaloproteasa

ADNc: ADN complementario

BEN: BANP/E5R/NAC-1

BEND6: Proteína 6 con dominio BEN

bHLH: Hélice-lazo-hélice básico

BTB/POZ: Bric-à-brac Tramtrack Broad/virus POx y dedos de Zinc

BTD: Dominio β-trefoil

CBF-1: Factor 1 de unión a promotor C

Cbp: Cuanto baste para

CC: Hélice superenrollada

CHO-K1: Variante K1 de línea celular de ovario de hámster chino

CIR: Co-represor que interacciona con CBF-1

CMV: Citomegalovirus

CoR: Co-represor

CR: Región rica en cisteína

CSL: Familia de factores transcripcionales CBF-1/RBP-Jκ/Su(H)/Lag-1

CtBP: Proteína de unión a C-terminal

CTD: Dominio C-Terminal

DH: Dominio de heterodimerización

DSL: Delta/Serrate/Lag.2

EBD: Dominio de unión a los repetidos EGF de los receptores Notch

EGF: Factor de crecimiento epidérmico

EST: Error estándar

Fig.: Figura

Gráf.: Gráfica

H: Proteína Hairless

HDAC: Histonas deacetilasas

HES: Genes *Hairy* y *Enhancer of Split*

Insv: Proteína Insensitive

KDa: kilodaltones

Lag-1: Proteína asociada a LIN-12 y GLP-1

LB: Luria Bertani

MCF-7: Línea celular de cáncer de mama

MCS: Sitio múltiple de clonación

MDM2: Proteína 2 doble minuto de murino

NAC-1: Proteína 1 asociada al Núcleo Accumbens

NAC-2: Proteína 2 asociada al Núcleo Accumbens

NCoR: Co-represor de receptor nuclear

Ng: Nanogramo

NICD: Dominio intracelular del receptor Notch

NT: Dominio extracelular

NuRD: Deacetilasa y remodelador del nucleosoma

P. ej: Por ejemplo

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

PEST: Polipéptido rico en residuos de prolina (P), ácido glutámico (E), serina (S), y treonina (T)

PSN: Promotor Sensible a la actividad de la vía de señalización Notch

RAM: Molécula asociada a RBP-J κ

RBB: Proteína represora con dominio BEN y BTB/POZ

RBP-J κ : Proteína de unión a la señal de recombinación kappa

RITA: Proteína que interactúa con RBP-J κ y asociada a tubulina

RPM: Revoluciones por minuto

RSV: Virus del sarcoma de Rous

S1, S2 y S3: Sitios de escisión de los receptores Notch

SAP30: Polipéptido asociado a Sin3 de 30 kilodaltones

SHARP: Proteína represora asociada a SMRT y HDAC

Sin3: Proteína hélice anfipática apareada

SMRT: Mediador de silenciamiento del ácido retinoico y del receptor de hormona tiroidea

SOP: Precursora de órganos sensoriales

Su(H): Supresor de Hairless

TM: Dominio transmembranal

U: Unidad, cantidad de enzima para digerir un μg de ADN en una hora

VSN: Vía de señalización Notch

RESUMEN

La vía de señalización Notch (VSN) es un mecanismo de comunicación celular altamente conservado en casi todos los animales, y su desregulación está involucrada con diversas enfermedades como el cáncer. Varias proteínas responsables de la regulación negativa de los genes blanco de la VSN, han sido reportadas, y todas estas proteínas co-represoras interaccionan con el factor transcripcional de unión a ADN, CSL, para eventualmente, reprimir la transcripción de estos genes. Recientemente, en nuestro laboratorio se identificó a la proteína represora transcripcional NAC-2, como una proteína probablemente involucrada en la regulación de la VSN en mamíferos. Por lo anterior, decidimos investigar la posible participación de NAC-2, en la regulación de los genes blanco de la VSN. Empleando un vector que contiene un gen reportero de la enzima luciferasa sensible a la actividad de la VSN, debido a que tiene algunos elementos regulatorios consenso de unión a CSL, evaluamos el efecto de NAC-2 sobre la actividad de la enzima luciferasa, por transfección de las células MCF-7. Los datos obtenidos demostraron que NAC-2 disminuyó en un 50% la actividad de la luciferasa, lo cual sugiere que NAC-2 funciona como un inhibidor de la expresión de los genes blanco de la VSN. Es probable que esta actividad inhibidora de NAC-2 requiera de la interacción con el factor transcripcional CSL.

PALABRAS CLAVES: vía de señalización, Notch, NAC-2, vector reportero, regulación negativa.

ABSTRACT

The Notch signaling pathway (NSP) is a highly conserved cell communication mechanism in most animals and its deregulation is involved with several diseases such as cancer. Several proteins responsible for the negative regulation of the NSP target genes have been reported and all these co-repressor proteins interact with the DNA-binding transcription factor CSL to, potentially, repress the transcription of these genes. Recently, in our laboratory, the transcriptional repressor protein NAC-2 was identified as a protein possibly involved in the regulation of NSP in mammals. Therefore, we decided to investigate the possible participation of NAC-2 in the regulation of the NSP target genes. Using a vector that contains a reporter gene of the luciferase enzyme sensitive to the activity of the NSP, that contains has some consensus regulatory elements of binding to CSL, we evaluate the effect of NAC-2 on the activity of the luciferase enzyme, by transfection of MCF-7 cells. The data obtained showed that NAC-2 decreased the activity of luciferase by 50%, which suggests that NAC-2 functions as an inhibitor of the expression of the target genes of the NSP. It is likely that this NAC-2 inhibitory activity requires the interaction with the transcriptional factor CSL.

1. INTRODUCCIÓN

Una gran variedad de enfermedades que incluyen diversos tipos de cáncer, como la leucemia linfoblástica aguda de células T (T-LLA), han sido relacionadas con la desregulación de la VSN. En mamíferos, varias proteínas responsables de la regulación negativa de los genes blanco de la VSN, han sido reportadas. Esto hace más complicado el tratamiento de enfermedades relacionadas con la activación constitutiva de la VSN. Por esta razón, es importante identificar los mecanismos represores empleados para antagonizar la expresión de los genes blanco de la VSN, así como la identificación de las proteínas involucradas en estos procesos de represión, a fin de sentar las bases para diseñar nuevas estrategias terapéuticas para el tratamiento de estas enfermedades. Recientemente, en nuestro laboratorio se identificó a la proteína represora NAC-2, como una proteína posiblemente involucrada en la regulación de la VSN en mamíferos. Por lo anterior, nos planteamos el objetivo de diseñar un vector reportero que contenga el gen de la enzima luciferasa, sensible a la actividad de la VSN, para posteriormente investigar si NAC-2 está involucrada en la regulación de los genes blanco de la VSN, lo cual hasta ahora, no ha sido reportado por ningún grupo de investigación.

2. MARCO TEÓRICO

2.1. La vía de señalización Notch

A más de cien años después de su descubrimiento, ahora sabemos que el gen *Notch* codifica para un receptor que permite la comunicación entre células vecinas. El receptor Notch reside en la membrana plasmática para interactuar con ligandos Notch, producidos por otras células. Cuando esta interacción ocurre, se genera una señal que causa cambios en la expresión de genes de la célula receptora. Juntos, los receptores Notch, los ligandos Notch y otros componentes relacionados forman la vía de señalización Notch (VSN), la cual mantiene una comunicación cruzada con otras vías, para coordinar el desarrollo animal [Artavanis-Tsakonas *et al.*, 1999; Perrimon *et al.*, 2012; Egan *et al.*, 1998; Bray, 1998].

La VSN es única entre las principales vías de señalización del desarrollo, porque los ligandos Notch no se secretan en el espacio extracelular, sino que están anclados a la membrana de la célula que los produjo. En consecuencia, solo las células que entran en contacto físico directo pueden acercar el ligando y el receptor lo suficiente como para unirse y transmitir un señal Notch [Lewis, 1998; Blacklow, 2017; Kopan, 2002; Ilagan and Kopan, 2007].

La VSN es un mecanismo de comunicación célula-célula, altamente conservado dentro de un grupo de organismos que abarca prácticamente a todo el reino animal (metazoarios) [Bray, 2006]. Este mecanismo es utilizado para modular una gran variedad de procesos que involucran el mantenimiento no diferenciado de células madre, especificación del destino celular, diferenciación, proliferación y apoptosis. Por lo tanto, esta vía es importante para el desarrollo y la vida adulta de un organismo [Artavanis-Tsakonas *et al.*, 1999; Ilagan and Kopan, 2007; Bray, 2016].

2.2. Ligandos y receptores de la vía de señalización Notch

Los ligandos Notch, los receptores Notch, los co-activadores, los co-represores y los factores transcripcionales, son el esqueleto de la VSN. Los ligandos Notch son una familia de proteínas transmembranales, de las cuales hay cinco en mamíferos, Jagged1, Jagged2, Delta1, Delta3 y Delta4 (Fig. 1). Cada ligando posee un motivo N-terminal, denominado DSL (por las proteínas Delta/Serrate/Lag-2), el cual es requerido para su interacción con los repetidos del factor de crecimiento epidérmico (EGF) de los receptores Notch. El dominio DSL es seguido por repetidos EGF, los cuales varían en número entre los diferentes ligandos. Estas proteínas son producidas por las células encargadas de dar el estímulo (células de señalización), para la activación de la VSN en las células receptoras, las cuales responden siguiendo un destino celular alternativo al de la célula que emitió la señal [Nam *et al.*, 2002; Bravo and Baizabal, 2005; Contreras-Cornejo *et al.*, 2016; Fortini, 2009; Gordon *et al.*, 2008].

Los receptores Notch (Notch1-4 en mamíferos) (Fig. 2) son también una familia de proteínas transmembranales, los cuales son sintetizados como proteínas precursoras. Un proceso de activación proteolítica de tres pasos es empleado para que las proteínas precursoras adquieran sus formas activas [Bravo and Baizabal, 2005; Egan *et al.*, 1998; Andersson *et al.*, 2011]. La primera escisión ocurre en la cara trans del aparato de Golgi, por una convertasa semejante a la furina, que actúa sobre el sitio de escisión S1 (Fig. 3), esta escisión convierte a la proteína precursora en un heterodímero, cuyos dominios están vinculados no covalentemente [Mumm and Kopan, 2000; Bravo and Baizabal, 2005; Borggreffe and Oswald, 2009].

Además de funcionar como receptores de los ligandos Notch, también funcionan como factores transcripcionales anclados a la membrana plasmática. Estas proteínas pueden dividirse en dos regiones, la región extracelular y la intracelular, las que a su vez se subdividen en estructuras más pequeñas. La región extracelular contiene de 29 a 36 elementos repetidos EGF. La región intracelular, también conocida como dominio intracelular de Notch (NICD), está evolutivamente conservada. Esta región contiene el dominio RAM (molécula asociada a RBP-J κ), mediante el cual, NICD interacciona con los factores transcripcionales de unión a ADN de la familia CSL [CBF-1/RBP-J κ en mamíferos, Su(H) en *Drosophila melanogaster* y Lag-1 en *Caenorhabditis elegans*], seguido por seis elementos repetidos de anquirina y un dominio PEST [polipéptido rico en residuos de prolina (P), ácido glutámico (E), serina (S), y treonina (T)], el cual regula la vida media del receptor [Bravo and Baizabal, 2005; Bray, 2006; Wang *et al.*, 2015; Fortini, 2009; Egan *et al.*, 1998; Andersson *et al.*, 2011].

Otras proteínas modulan la actividad de los ligandos y receptores, por medio de la actividad de las enzimas glucosiltransferasas, proteasas, metaloproteasas y ubiquitina ligasas, para cambiar la respuesta celular, intensidad y duración de la señal [Bray, 2006; Bravo and Baizabal, 2005; Greenwald, 1998; Fortini, 2009; Becker and Lowe, 2003; Jafar-Nejad *et al.*, 2010; Schwanbeck *et al.*, 2011; Miyoshi *et al.*, 2008].

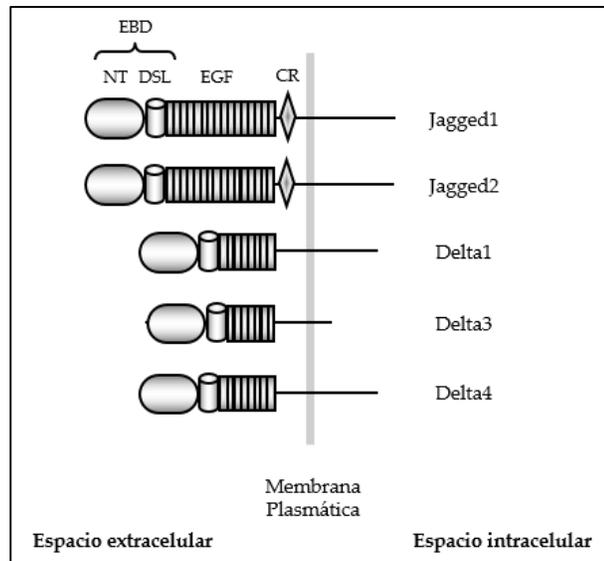


Figura 1. Organización de los dominios de los ligandos Notch en mamíferos. Los ligandos Notch contienen el dominio de unión a los repetidos EGF de los receptores Notch (EBD), el cual se conforma del dominio extracelular (NT) y del dominio DSL, seguido de estos dominios se encuentran los repetidos EGF, los cuales varían en número entre los diferentes ligandos Notch. Algunos ligandos poseen una región rica en cisteína (CR) [Modificada de Bravo and Baizabal, 2005].

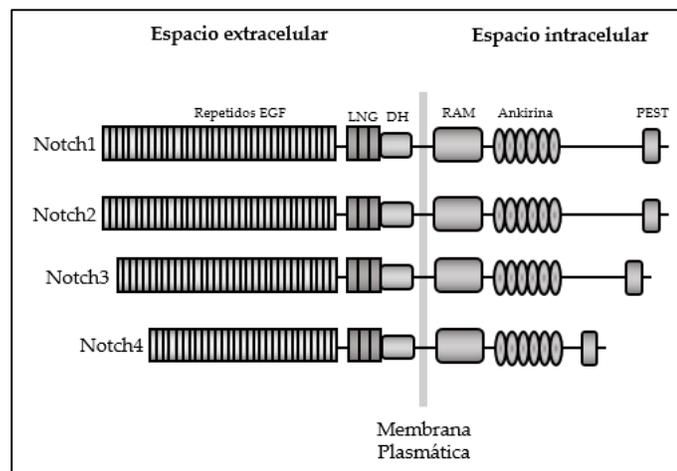


Figura 2. Organización de los dominios de los receptores Notch en mamíferos. Los receptores Notch contienen de 29 a 36 repetidos EGF, estos repetidos son seguidos por tres repetidos LNG (por las proteínas LIN-12/Notch/GLP-1), después se encuentra el dominio de heterodimerización (DH). El región intracelular contiene el dominio RAM, dos señales de localización nuclear, seis repetidos anquirina y una secuencia PEST [Modificada de Bravo and Baizabal, 2005].

2.3. Activación de la vía de señalización Notch

La activación de la VSN en mamíferos, comienza cuando el receptor Notch1-4, presente en una célula receptora, interacciona con un ligando Notch (p. ej., Jagged1), presente en una célula de señalización. La unión del ligando promueve dos eventos secuenciales de escisión proteolítica sobre el receptor Notch1-4. La primera escisión (sobre el sitio S2) (Fig. 3) es catalizada por las metaloproteasas de la familia ADAM (una desintegrina y una metaloproteasa), mientras que la segunda escisión (sobre el sitio S3) (Fig. 3) es mediada por el complejo de enzimas γ -secretasa, las cuales liberarán a NICD1-4. Este último es translocado al núcleo, donde en cooperación con el factor transcripcional CSL y el co-activador común a Mastermind (MAML), formarán un complejo co-activador ternario constituido por CSL, NICD1-4 y MAML. Este complejo ternario se ubica sobre un elemento regulatorio consenso (5'-CGTGGGAA-3'), presente en los promotores de los genes blanco de la VSN, tales como la familia *HES1-7* (por los genes *Hairy* y *Enhancer of Split*), cuyos productos, factores transcripcionales tipo hélice-lazo-hélice básico (bHLH), dirigirán a la célula a un destino celular alternativo al de la célula que inició la señal (Fig. 4). El complejo CSL/NICD1-4/MAML se encuentra conservado en todos los organismos donde la VSN ha sido descrita [Bray, 2006; Bravo and Baizabal, 2005; Contreras-Cornejo *et al.*, 2016; Kadesch, 2000; Nam *et al.*, 2002; Bray, 2016; Fortini and Bilder, 2009].

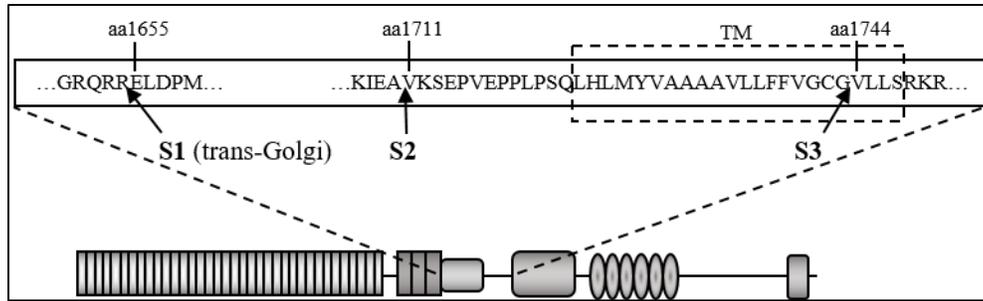


Figura 3. Procesamiento de activación proteolítica del receptor Notch1. El rectángulo con línea continua muestra la secuencia de aminoácidos de la región donde ocurre el proceso proteolítico del receptor Notch1. Se señalan con flechas los tres sitios de corte, S1, S2 y S3. El rectángulo con línea discontinua indica la zona transmembranal (TM) de la proteína. El corte en el sitio S1 ocurre en la cara trans del aparato de Golgi, para generar la forma heterodimérica de la proteína. Los cortes en S2 y S3 se producen de manera secuencial cuando un ligando interactúa con el receptor Notch [Modificada de Bravo and Baizabal, 2005]

2.4. Represión de los genes de la vía de señalización Notch

En ausencia de activación de la VSN, el factor transcripcional CSL, en contraste a la activación de la VSN, actúa como un represor transcripcional, reclutando complejos co-represores sobre los mismos elementos regulatorios consenso (5'-CGTGGGAA-3') (Fig. 4) [Barolo *et al.*, 2002]. A diferencia del complejo co-activador CSL/NICD1-4/MAML, varias proteínas co-represoras que interactúan con CSL, han sido identificadas, estableciendo diferentes estrategias de represión, que incluyen diferentes complejos co-represores de los genes de la VSN. Sin embargo, ningún estudio ha revelado algún requisito conservado entre estos co-represores para interactuar con CSL. Los co-represores requieren de enzimas remodeladoras de la cromatina, como las histonas deacetilasas (HDAC), Sin3 (proteína hélice anfipática apareada), NCoR (co-represor de receptor nuclear), SAP30 [polipéptido asociado a Sin3 de 30 kilodaltones (kDa)] y miembros del complejo NuRD (deacetilasa y remodelador del nucleosoma) [Dai *et al.*, 2013; Contreras-Cornejo *et al.*, 2016; Maier, 2006; Yuan *et al.*, 2016; Barolo *et al.*, 2002].

Los co-represores en mamíferos, incluyen p. ej., a la proteína represora asociada a SMRT; Mediador de silenciamiento del ácido retinoico y del receptor de hormona tiroidea y HDAC (SHARP), KyoT2, CIR (Co-represor que interacciona con CBF-1), RITA (Proteína que interactúa con RBP-J κ y asociada a tubulina) y BEND6 (proteína 6 con dominio BEN), los cuales se unen primeramente al dominio β -trefoil (BTD) de CSL, probablemente compitiendo con NICD. En *Drosophila melanogaster*, p. ej., la proteína Hairless (H) es el mayor antagonista de la VSN, la cual se une al dominio C-terminal (CTD) de Su(H). Además, H requiere de las proteínas co-represoras Groucho y la proteína de unión a C-terminal (CtBP), para eventualmente silenciar los genes blanco de la VSN en este organismo. Sin embargo, ningún ortólogo de H ha sido identificado en mamífero hasta ahora [Contreras-Cornejo *et al.*, 2016; Maier, 2006; Borggreffe and Oswald, 2009; Zehender *et al.*, 2017].

En mamíferos, los mecanismos de represión empleados para silenciar los genes blanco de la VSN, son muy variados a diferencia de los mecanismos empleados en *Drosophila melanogaster*. Aunque las proteínas y los mecanismos moleculares de activación de los genes blanco de la VSN están conservados en los metazoarios. Por el contrario, las proteínas y los mecanismos moleculares de represión de los genes blanco de la VSN, no lo están, a pesar del alto grado de conservación entre las proteínas de la familia CSL [Contreras-Cornejo *et al.*, 2016; Borggreffe and Oswald, 2009; Oswald *et al.*, 2002; Zehender *et al.*, 2017; Yuan *et al.*, 2019; Dai *et al.*, 2013]. Quizá, una excepción podrían ser las proteínas co-represoras Insensitive (Insv) y BEND6, de las cuales se conoce su organización estructural de dominios, lo que ha llevado a considerarlas como homólogas funcionales [Dai *et al.*, 2013; Duan *et al.*, 2011; Reeves and Posakony, 2005].

Los detalles moleculares de cómo las proteínas co-represoras median la represión de los genes blanco de la VSN, aún no están bien definidos, ni tampoco qué grupo de genes de la VSN, son reprimidos por cada una de estas proteínas co-represoras o si existe redundancia entre las proteínas co-represoras; no se sabe cuáles son todos los componentes de los complejos de represión formados por estas proteínas y si existen otras proteínas aún no identificadas, que físicamente interaccionan con CSL para antagonizar los genes de la VSN. No hay duda de se necesitan más estudios para responder todas estas y más preguntas relacionadas con la represión de los genes blanco de la VSN.

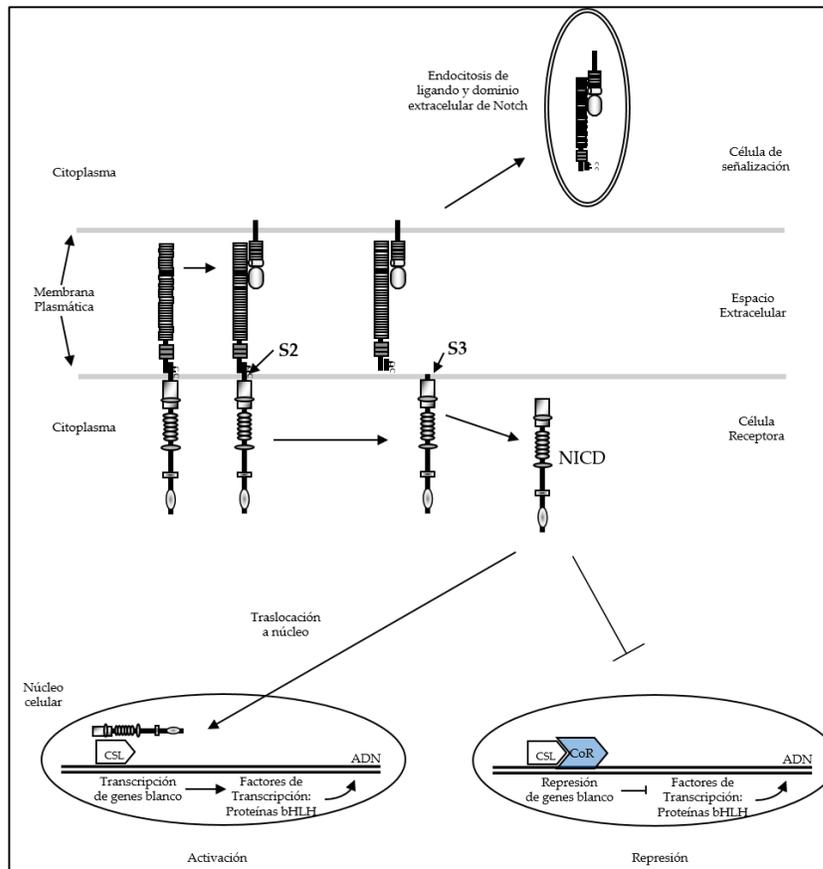


Figura 4. Activación y regulación de la vía de señalización Notch. El ligando Notch de la célula de señalización activa al receptor Notch en la célula receptora adyacente lo que induce los cortes secuenciales en los sitios S2 y S3 que liberan a NICD. En la célula de señalización se forma una

vesícula endocítica que introduce a su interior tanto al ligando como al dominio extracelular de Notch. En la célula receptora NICD se transloca al núcleo donde forma un complejo con el factor transcripcional CSL y MAML, para activar la expresión de otros factores transcripcionales (proteínas bHLH). Estos factores afectarán la transcripción de otros genes, cuya función es dirigir a la célula a un destino celular distinto al de la célula que inició el estímulo. En ausencia de activación de la VSN, CSL forma complejos con proteínas co-represoras (CoR), para eventualmente antagonizar la expresión de los genes blanco de la VSN [Modificada de Bravo and Baizabal, 2005].

2.5. Relación estructural entre los co-represores BEND6 e Insensitive

Los datos experimentales de Dai y colaboradores (2013), indican que BEND6 es un homólogo funcional de *Insv*, a pesar de que comparten una identidad a nivel de secuencia de aminoácidos (aa) del 34%. Además, ambas proteínas poseen hacia su N-terminal una estructura de hélice superenrollada (CC) y hacia su C-terminal un dominio BEN (por las proteínas **B**ANP, **E**5R y **N**AC-1) (Fig. 5), y en este último dominio la identidad es del 33% entre estas proteínas. Por otro lado, ambas proteínas están involucradas en el desarrollo neural de los organismos donde están presentes [Contreras-Cornejo *et al.*, 2016; Dai *et al.*, 2013; Duan *et al.*, 2011].

Particularmente, BEND6 es una proteína nuclear, cuya expresión está limitada al desarrollo neural en mamíferos. Se une directamente a CBF-1/RBP-Jκ, oponiéndose a la activación transcripcional inducida por Notch, para inhibir la auto-renovación mantenida por Notch en células madre neuronales, promoviendo la neurogénesis. Por otro lado, BEND6 es capaz de rescatar el fenotipo causado en moscas heterocigotas para el gen *Hairless* - / +, debido a la interacción interespecífica entre BEND6 y Su(H) [Duan *et al.*, 2011; Dai *et al.*, 2013].

La proteína *Insv* fue identificada por su alta expresión en células precursoras de órganos sensoriales (SOP), donde puede actuar como represora uniéndose a una secuencia palindrómica (5'-CCAATTGG-3'), y/o co-represora transcripcional,

interaccionando con CSL, para mediar la represión transcripcional de los genes blanco de la VSN, y otros genes involucrados en el desarrollo neural en *Drosophila melanogaster* [Contreras-Cornejo *et al.*, 2016; Dai *et al.*, 2013; Duan *et al.*, 2011].

En ensayos de “pull-down”, Dai y colaboradores (2013) usaron construcciones que codifican para una región que abarca el dominio BEN de las proteínas BEND6 e Insv (de mamíferos y moscas, respectivamente), y a través de las cuales, capturaron a CBF-1/RBP-Jκ y Su(H) (de mamíferos y moscas, respectivamente). Con las mismas construcciones, estos investigadores, capturaron a Su(H) y CBF-1/RBP-Jκ. Es decir, demostraron que hay una interacción interespecie, a pesar de la baja identidad que existe entre los dominios BEN de estas proteínas. Es probable que estos dominios han conservado residuos de aminoácidos específicos necesarios para interactuar con CSL, y probablemente también las proteínas de la familia CSL, los han conservado, aunque no está definido qué dominios de CSL son necesarios para estas interacciones. Estos resultados permiten especular que el dominio BEN podría estar involucrado en la interacción entre el factor transcripcional CSL y las proteínas BEND6 e Insv [Dai *et al.*, 2013; Abhiman *et al.*, 2008].

A la fecha, se han caracterizado una gran variedad de proteínas que contienen uno o más dominios BEN. BEND6 e Insv, son las únicas proteínas con dominio BEN, que están involucradas en la regulación de los genes blanco de la VSN, a pesar del gran número de proteínas que contienen este dominio [Abhiman *et al.*, 2008]. NAC-2 es una de estas proteínas que contienen un dominio BEN, además de un dominio BTB/POZ (por las proteínas de complejo **B**ric-à-brac **T**ramtrack **B**road/virus **PO**x y dedos de **Z**inc), hacia su C-terminal y N-terminal, respectivamente [Xuan *et al.*, 2013]. Esta proteína está involucrada con la estabilidad de la proteína p53, sin embargo, no ha sido relacionada con la VSN.

Contreras-Cornejo y Bravo-Patiño (manuscrito en preparación) en un intento por encontrar una proteína homóloga de H en mamíferos, mediante un ensayo de “pull-down”, utilizando el dominio CTD de Su(H) (el dominio al cual se une la proteína H), se capturó a NAC-2, a partir de un extracto de proteína total, derivado de medula ósea de bovino. A pesar de que NAC-2 no es homóloga de H, estos datos indican que posiblemente existen más proteínas co-represoras con dominio BEN que interaccionan con CSL, como H lo hace, para antagonizar los genes blanco de la VSN.

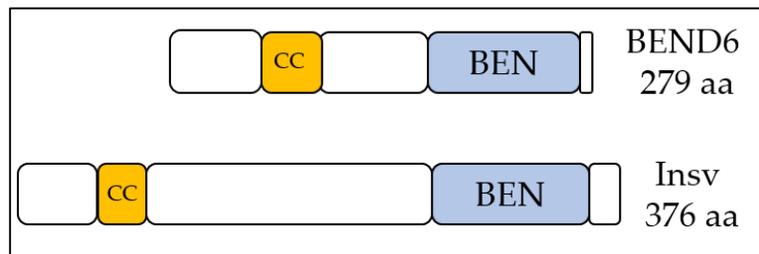


Figura 5. Conservación estructural entre las proteínas BEND6 e Insv. A pesar de la baja identidad general a nivel de secuencia de aa, ambas proteínas poseen un dominio BEN hacia su región C-terminal y hacia su N-terminal poseen una estructura CC.

2.6. NAC-2: Identificación y caracterización

Xuan y colaboradores (2013) en un esfuerzo por identificar nuevos factores epigenéticos que están potencialmente involucrados en la regulación genética, clonaron un gen de una biblioteca de ADN complementario (ADNc) mamario. Los análisis bioinformáticos mostraron que la proteína correspondiente contiene un dominio BTB/POZ y un dominio BEN, por lo que la llamaron proteína **R**epresora transcripcional con dominio **B**TB/POZ y domini**B**EN (RBB) (Fig. 6), actualmente conocida como NAC-2, codificada por el gen *NACC-2* [Xuan *et al.*, 2013]. Por su similitud estructural, NAC-2 debe su nombre a la proteína NAC-1, la cual está

presente en altos niveles en el Núcleo ACcumbens (grupo de neuronas del encéfalo) de ratas que recibieron tratamiento con cocaína [Cha *et al.*, 1997], y más tarde involucrada en la proliferación de células cancerígenas, migración y recurrencia tumoral. No se sabe si NAC-1 y NAC-2 están relacionadas en función. Sin embargo, ambas parecen tener funciones opuestas, puesto que NAC-1 está relacionada con la oncogénesis y NAC-2 está relacionada con la estabilización del supresor tumoral p53 [Zhang *et al.*, 2017; Zhang *et al.*, 2012; Yap and Shih, 2012].

Los estudios experimentales de Xuan y colaboradores (2013) han demostrado que NAC-2 está relacionada indirectamente con la estabilidad de la proteína p53, a través de la inhibición de la expresión de la proteína MDM2 (proteína 2 doble minuto de murino), una ubiquitina ligasa tipo E3 que media la ubiquitinación de p53 para su degradación a través del proteasoma, lo que conduce a la estabilización de p53. NAC-2 se homodimeriza a través de su dominio BTB/POZ para unirse mediante su dominio BEN a una secuencia específica (5'-TGTCTGTACCTAC-3') en el promotor interno del gen de la proteína MDM2. Además, al reclutar a HDAC2, así como a otros miembros del complejo NuRD, reprime la transcripción del gen de la proteína MDM2 [Xuan *et al.*, 2013].

El dominio BEN es un módulo de hélices alfa, que ha sido encontrado en diversas proteínas como BANP/SMAR1, NAC-1, la isoforma C de mod(mdg4) de *Drosophila melanogaster*, la proteína virosomal del chordopoxvirus E5R y varias proteínas de polidnavirus. Los análisis sugieren que este dominio puede mediar interacciones proteína-proteína y proteína-ADN, durante la organización de la cromatina y la transcripción. Estos análisis también sugieren una asociación íntima funcional entre los dominios BEN y los dominios BTB/POZ [Xuan *et al.*, 2013; Abhiman *et al.*, 2008; Sathyan *et al.*, 2011; Aoki *et al.*, 2012].

El dominio BTB/POZ es un motivo de interacción proteína-proteína evolutivamente conservado que ha sido identificado en más de 200 proteínas en organismos que van desde levaduras hasta humanos. Las proteínas que contienen dominios BTB/POZ, muestran una variedad de funciones y participan en muchos procesos celulares críticos tales como apoptosis, desarrollo, diferenciación y oncogénesis [Xuan *et al.*, 2013; Kreusch *et al.*, 1998; Li *et al.*, 1997].

Otras proteínas con dominio BEN, han sido identificadas en *Drosophila melanogaster*, como p. ej., las proteínas ELBA1-3 (Proteína de actividad límite temprana). Sin embargo, solo Insv funciona en la regulación de los genes blanco de la VSN, en este organismo. En mamíferos existe una familia de proteínas con dominio BEN, no obstante, al igual que Insv, BEND6 es la única proteína implicada en la regulación de los genes blanco de la VSN en estos organismos [Dai *et al.*, 2013; Duan *et al.*, 2011; Abhiman *et al.*, 2008].

En un alineamiento de las proteínas ELBA1-3 e Insv, con secuencias de proteínas de humano con dominio BEN, se demostró que Insv está más cercanamente relacionada a NAC-2 y BEND6, en comparación con las proteínas ELBA1-3 [Aoki *et al.*, 2012]. Aunque estos análisis no demuestran que NAC-2 está involucrada en la regulación la VSN, refuerzan la posibilidad de una función de NAC-2 en la regulación de los genes blanco de la VSN.

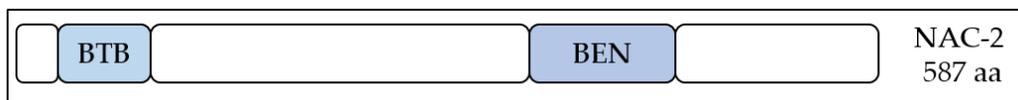


Figura 6. Representación estructural de la proteína NAC-2. De la misma forma a todas las proteínas con dominio BEN, el dominio BEN de la proteína NAC-2 está orientado hacia su región C-terminal, esta proteína también posee un dominio BTB/POZ hacia su N-terminal.

Como ya se mencionó, BEND6 e Insv, interaccionan con el factor transcripcional CSL para antagonizar los genes blanco de la VSN. Los análisis de alineamiento de secuencias determinaron una relación más cercana entre las proteínas BEND6, Insv y NAC-2, en comparación con otras proteínas de dominio BEN, quizá, porque NAC-2 conserva residuos de aminoácidos necesarios para interaccionar con la familia de factores transcripcionales CSL. En este sentido, es válido plantear las siguientes preguntas, ¿NAC-2 está involucrada en la VSN, mediante su interacción con CSL, para regular negativamente la expresión de genes blanco de la VSN?, Si la respuesta es afirmativa entonces, ¿es el dominio BEN el responsable de dicha interacción?

3. ANTECEDENTES

Recientemente, Contreras-Cornejo y Bravo-Patiño, capturaron a partir de un extracto de proteína total de médula ósea de bovino, una proteína no relacionada con la VSN, conocida como NAC-2. Para esto se desarrolló un ensayo de “*pull-down*”, utilizando el dominio CTD de Su(H) como sonda. En el mismo trabajo de Contreras-Cornejo y Bravo-Patiño, en colaboración con el Dr. Dieter Maier del Instituto de Genética de la Universidad de Hohenheim, en Stuttgart, Alemania, utilizando ensayos doble híbrido de levadura, demostraron la interacción entre NAC-2 y Su(H). También fueron empleadas construcciones de eliminación para definir los dominios de Su(H) que interactúan con NAC-2. Los datos indicaron que los dominios BTD y CTD de Su(H) son necesarios y suficientes para interactuar con NAC-2 (Fig. 7) (manuscrito en preparación).

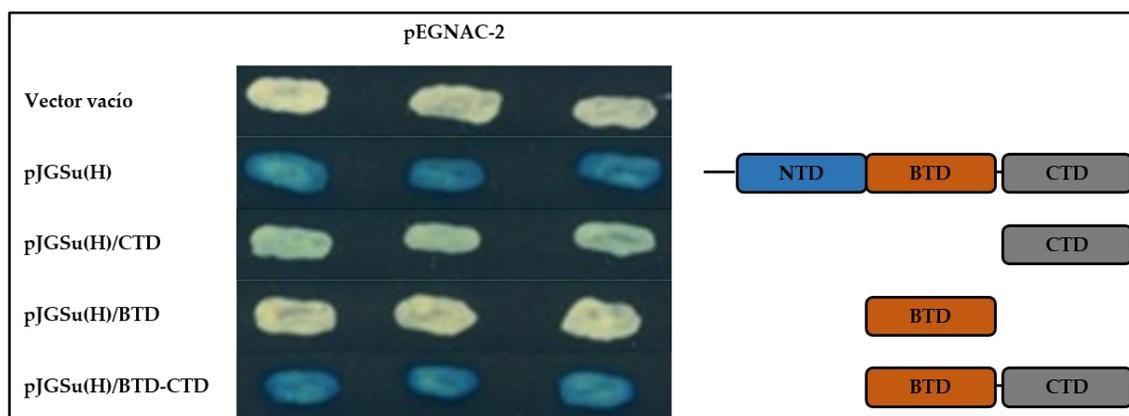


Figura 7. Ensayo doble híbrido de levadura. Este experimento demuestra la interacción entre NAC-2 y Su(H). Un conjunto de construcciones de eliminación fueron evaluadas para definir los dominios de Su(H) que interactúan con NAC-2. “Vector vacío” se refiere a la ausencia total de Su(H).

4. JUSTIFICACIÓN

La VSN es un mecanismo que coordina una gran variedad de procesos que involucran el mantenimiento no diferenciado de células madre, la especificación del destino celular, diferenciación, proliferación y apoptosis, en organismos que van desde un erizo de mar hasta los humanos. La desregulación de esta vía de señalización está relacionada con varias enfermedades como el cáncer [Santos *et al.*, 2006; Radtke and Raj, 2003; Artavanis-Tsakonas, 1997].

Los mecanismos de activación de los genes blanco de la VSN, comprenden un conjunto reducido de proteínas altamente conservadas en todos los organismos donde esta vía de señalización ha sido reportada. En contraste, los mecanismos de represión incluyen varias proteínas co-represoras no conservadas entre organismos invertebrados y vertebrados [Contreras-Cornejo *et al.*, 2016; Borggreffe and Oswald, 2009]. Por lo tanto, es importante estudiar el funcionamiento y los componentes de los mecanismos de represión de los genes blanco de la VSN, a fin de sentar las bases para encontrar y/o diseñar nuevos blancos terapéuticos en enfermedades relacionadas con la activación constitutiva de la VSN.

5. HIPÓTESIS

La proteína NAC-2 regula negativamente la expresión de genes mediados por la vía de señalización Notch.

6. OBJETIVOS

6.1. Objetivo general

Caracterizar la actividad inhibitoria de la proteína NAC-2 en la expresión de los genes mediados por la vía de señalización Notch.

6.2. Objetivos específicos

Diseñar un vector reportero, sensible a la actividad de la vía de señalización Notch.

Evaluar el efecto de la proteína NAC-2 en la expresión de un gen reportero, sensible a la actividad de la vía de señalización Notch.

7. METODOLOGÍA

La metodología empleada para evaluar si existe una función de NAC-2 en la regulación de los genes blanco de la VSN, implicó el diseño de tres construcciones genéticas. Un vector que contiene un gen reportero de la enzima luciferasa, bajo el control de un Promotor Sensible a la actividad de la VSN (PSN), denominado pGL4xCSL; un vector de expresión en células de mamífero, que contiene el gen de la proteína NAC-2, fusionada a la secuencia de la proteína etiqueta HaloTag®, bajo el control del promotor/enhancer del citomegalovirus (CMV), denominado pHT-NACC-2; y por último, un vector control que contiene únicamente la secuencia que codifica para la proteína HaloTag®, bajo el control del promotor/enhancer del CMV, denominado pHT. Estas construcciones fueron co-transfectadas transitoriamente en diferentes relaciones molares, en la línea celular de cáncer mama MCF-7. Posteriormente, se midió la actividad de emisión de luz de la enzima luciferasa, que indirectamente indica el nivel de expresión del gen reportero de la enzima luciferasa, codificada por el vector pGL4xCSL, en otras palabras, mostrando el efecto de NAC-2, sobre la expresión del gen de la enzima luciferasa, que está bajo el control del PSN.

7.1. Ingeniería genética de vectores

El vector reportero pGL4xCSL (Fig. 8) se construyó a partir del vector reportero comercial pGL4.18[*luc2P*/Neo] (Fig. 9), al cual se le incorporó el PSN, el cual, contiene cuatro elementos regulatorios consenso de reconocimiento de alta afinidad del factor transcripcional CSL, en tándem [4x(5'-CGTGGGAA-3')], y una caja TATA del virus del sarcoma de Rous (RSV), dicho promotor fue extraído a través de restricción enzimática (como es descrito en la tabla 1), con las enzimas *Sma*I

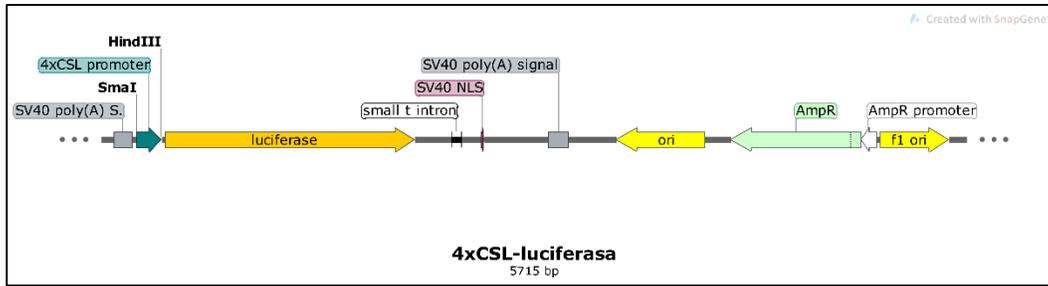


Figura 10. Mapa lineal del vector 4xCSL-luciferasa. Este vector de expresión en células de mamífero, codifica para la enzima luciferasa, bajo el control del PSN. Además, este vector contiene un marcador de selección para la resistencia a la ampicilina.

Digestión del 4xCSL-luciferasa	
Componentes	Volumen
Buffer CutSmart® (10X)	2.00 µl
Vector 4xCSL-luciferasa (100 ng)	5.00 µl
Enzima <i>Sma</i> I (20 U/ µl)	1.00 µl
Enzima <i>Hind</i> III-HF (20 U/ µl)	1.00 µl
H ₂ O cbp 20 µl	11.00 µl

Tabla 1. Reacción de restricción del vector reportero 4xCSL-luciferasa. Este vector fue digerido con las enzimas de restricción *Sma*I y *Hind*III-HF. La reacción se incubó a temperatura ambiente durante 90 minutos para la enzima *Sma*I y otros 90 minutos a 37°C para la enzima *Hind*III-HF. Las enzimas fueron inactivadas a 80°C durante 20 minutos. Posteriormente, se llevó a cabo una electroforesis en gel de agarosa al 1%, teñido con bromuro de etidio (BrEt) para visualizar la digestión en un fotodocumentador.

Ligación del PRN en el pGL4.18[luc2P/Neo]	
Componentes	Volumen
Buffer T4® (10X)	2.00 µl
Vector pGL4.18[luc2P/Neo] (50 ng)	5.00 µl
Inserto PSN (50 ng)	0.50 µl
Enzima ligasa T4 (20 U/ µl)	1.00 µl
H ₂ O cbp 20 µl	11.50 µl

Tabla 2. Reacción de ligación de ADN. El PSN se ligó en el vector pGL4.18[luc2P/Neo], previamente digerido con las enzimas *EcoRV* y *HindIII*-HF. La ligación se llevó a cabo en una relación inserto:vector 3:1, e incubada a temperatura ambiente durante dos horas. Posteriormente, se inactivó la reacción a 65°C por 10 minutos.

El vector pHT-NACC-2 (Fig. 11) permite la expresión de NAC-2 en células de mamífero, y se construyó a partir del vector comercial pFN21K HaloTag® CMV Flexi® (Fig. 12). Para la amplificación del gen *NACC-2*, a través de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), a partir del vector pUC57-NACC-2 (como es descrito en la tabla 3), se diseñaron 2 oligonucleótidos: FNACC-2 (forward, 5'-TC TCG CGA TCG CCT CGC AGA TGC TGC ACA TCG AGA TCC CCA-3'), que inserta en el extremo 5' del gen de NAC-2, el sitio para la enzima de restricción *AsiSI* (subrayado) y cuatro bases aleatorias para el anclaje de la enzima de restricción (en cursivas), y RNACC-2 (reverse, 5'-A CAG TCT AGA CTA CAA GGG CCC CGC GTA CGG GCC TTC-3'), que inserta en el extremo 3' del gen de NAC-2, el sitio de restricción para la enzima de restricción *XbaI* (subrayado) y cuatro bases aleatorias para el anclaje de la enzima de restricción (en cursivas). Posteriormente, el producto de PCR y el vector aceptor pFN21K HaloTag® CMV Flexi®, fueron digeridos con las enzimas de restricción *AsiSI* y *XbaI* y sometidos a una reacción de ligación (como es descrito en la tabla 4), que mantiene en fase los genes de las proteínas HaloTag® y NAC-2. La región que codifica para la proteína HaloTag-NAC-2, fue secuenciada.

Los resultados de la secuenciación fueron analizados en el software CLC Main Workbench 7.9.1. HaloTag® es un péptido derivado de una enzima bacteriana (haloalcano deshalogenasa) de 33 kDa, inactiva catalíticamente, que permite la identificación de la proteína de interés fusionada a HaloTag® por western blot y la ubicación de la proteína de interés dentro de la célula mediante el uso de anticuerpos anti-HaloTag®, así como la purificación por la unión no catalítica con el sustrato en columnas de afinidad. La fusión de estas proteínas ocurre en la región C-terminal de HaloTag® y en la región N-terminal de NAC-2 [Los *et al.*, 2008].

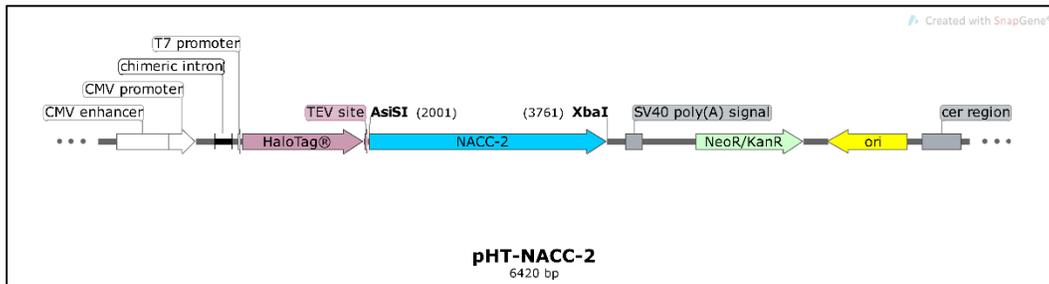


Figura 11. Mapa lineal del vector pHT-NACC-2. Este vector codifica para las proteínas de fusión HaloTag-NAC-2, y proporciona una expresión constitutiva en células de mamífero utilizando el promotor/enhancer del CMV. Las proteínas HaloTag® y NAC-2 están vinculadas a través de un sitio de reconocimiento para la proteasa TEV.

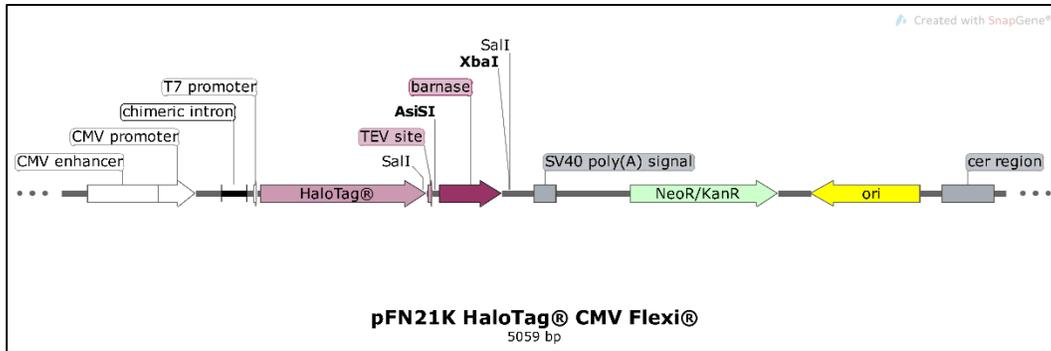


Figura 12. Mapa lineal del vector pFN21K HaloTag® CMV Flexi®. Este vector está diseñado para unir la proteína HaloTag® al N-terminal de la proteína de interés y proporcionar una expresión constitutiva en células de mamífero utilizando el promotor/enhancer del CMV. Además, este vector contiene un gen letal *barnasa*, el cual es útil como selección positiva del inserto.

PCR del gen NACC-2	
Componentes	Volumen
Buffer GoTaq (5X)	10.00 µl
MgCl ₂ (25 mM)	8.00 µl
dNTP's (10 mM c/u)	1.00 µl
Primer FNACC-2 (12.5 µM)	1.00 µl
Primer RNACC-2 (12.5 µM)	1.00 µl
GoTaq (5 U/ µl)	0.25 µl
Vector pUC57-NACC-2 (10 ng/ µl)	2.00 µl
H ₂ O cbp 50 µl	26.75 µl

Tabla 3. Reacción de PCR para la amplificación del gen de NACC-2. La reacción se llevó a cabo en un termociclador GeneAmp® PCR System 2700 (Applied Biosystems), aplicando el siguiente programa: 1 ciclo a 95°C por 2 minutos, 30 ciclos a 95°C por 45 segundos, 67°C por 45 segundos y 72°C por 2 minutos; 1 ciclo a 72°C por 5 minutos y 1 ciclo sostenido a 4°C. Posteriormente, se llevó a cabo una electroforesis en gel de agarosa al 1%, teñido con BrEt para visualizar la amplificación en un fotodocumentador.

Ligación de NACC-2 en el pFN21K HaloTag® CMV Flexi®	
Componentes	Volumen
Buffer T4® (10X)	2.00 µl
Vector pFN21K HaloTag® CMV Flexi® (50 ng)	5.00 µl
Producto de PCR NACC-2 (50 ng)	0.50 µl
Enzima ligasa T4 (20 U/ µl)	1.00 µl
H ₂ O cbp 20 µl	11.50 µl

Tabla 4. Reacción de ligación de ADN. El producto de la reacción de PCR (*NACC-2*), se ligó en el vector pFN21K HaloTag® CMV Flexi®, previamente digeridos con las enzimas *AsiSI* y *XbaI*. La ligación se llevó a cabo en una relación inserto:vector 3:1, e incubada a temperatura ambiente durante dos horas. Posteriormente, se inactivó la enzima ligasa a 65°C por 10 minutos.

Por último, la construcción control pHT (Fig. 13) resultó de la eliminación en una reacción de restricción (como es descrito en la tabla 5), de un fragmento que abarca el gen *barnasa* (un gen letal para la selección positiva del inserto), con la enzima de restricción *SallI*-HF, del vector comercial pFN21K HaloTag® CMV Flexi® (ya descrito, figura 12), posteriormente, se recircularizó en una reacción de ligación (como es descrito en la tabla 6). Esta construcción codifica únicamente para la proteína HaloTag®, y es utilizada como vector control, con el fin de descartar falsos positivos, derivados de un efecto de HaloTag®, sobre la actividad de la enzima luciferasa, codificada por el vector pGL4xCSL, y no de NAC-2.

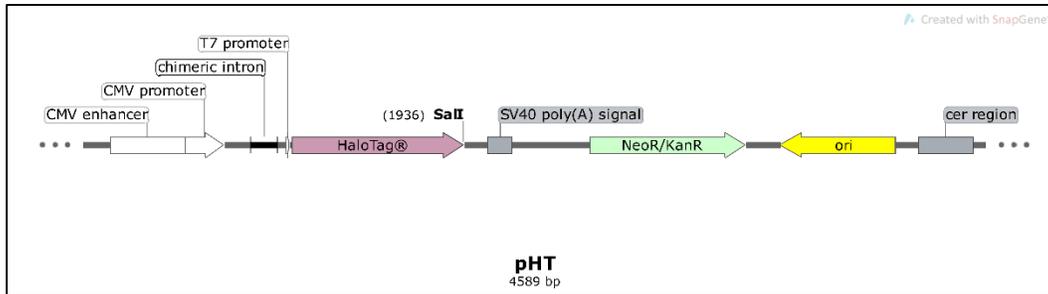


Figura 13. Mapa lineal del vector pHT. Este vector codifica para la proteína etiqueta HaloTag®, y proporciona una expresión constitutiva en células de mamífero utilizando el promotor/enhancer del CMV.

Digestión del pFN21K HaloTag® CMV Flexi®	
Componentes	Volumen
Buffer CutSmart® (10X)	2.00 µl
Vector pFN21K HaloTag® CMV Flexi® (100 ng)	2.00 µl
Enzima <i>SalI</i> -HF (20 U/ µl)	1.00 µl
H ₂ O cbp 20 µl	15.00 µl

Tabla 5. Reacción de restricción del vector pFN21K HaloTag® CMV Flexi®. Este vector fue digerido con la enzima de restricción *SalI*-HF. La reacción se incubó a 37° durante dos horas. La enzima se inactivó a 65°C durante 20 minutos. Posteriormente, se llevó a cabo una electroforesis en gel de agarosa al 1%, teñido con BrEt para visualizar la digestión en un fotodocumentador.

Ligación del pFN21K HaloTag® CMV Flexi®	
Componentes	Volumen
Buffer T4® (10X)	2.00 µl
Vector digerido pFN21K HaloTag® CMV Flexi® (10 ng)	5.00 µl
Enzima ligasa T4 (20 U/ µl)	1.00 µl
H ₂ O cbp 20 µl	12.00 µl

Tabla 6. Reacción de ligación para la recircularización del vector pFN21K HaloTag® CMV Flexi®. Previamente, el vector fue digerido con la enzima *SalI*-HF. La ligación se llevó a temperatura ambiente durante dos horas. Posteriormente, se inactivó la enzima a 65°C por 10 minutos.

Las reacciones de ligación de todas las construcciones fueron transformadas por choque térmico en células competentes XL1-Blue (como es descrito en la tabla 7), posteriormente cultivadas en placas de medio agar Luria Bertani (LB) con el antibiótico correspondiente según la construcción. Las colonias bacterianas resultantes, fueron aisladas y crecidas en medio LB líquido para purificar plásmido, como descrito en el protocolo Wizard®Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega) y analizarlo por restricción enzimática. Estos pasos fueron repetidamente realizados hasta obtener resultados positivos para cada una de las construcciones. Posteriormente, se diseñaron 6 oligonucleótidos para secuenciar el gen de NAC-2, de la construcción pHT-NACC-2. Las otras dos construcciones (pGL4xCSL y pHT), solo fueron analizadas por restricción enzimática, debido a que para su construcción no fue necesario amplificar por PCR, alguna secuencia, por el contrario, se realizaron mediante reacciones de sub-clonación y de restricción enzimática, respectivamente.

Transformación de células competentes	
Componentes	Volumen
Células competentes XL1-Blue	50.00 µl
Reacción de ligación	10.00 µl
Medio Luria Bertani (LB)	1000.00 µl

Tabla 7. Transformación por choque térmico de células competentes. Se mezcló 10.00 µl de ligación con 50.00 µl de células competentes XL1-Blue y se incubó en hielo por 15 minutos, posteriormente se dio un choque térmico a 42°C durante 45 segundos y se incubó en hielo 3 minutos, se añadió un ml de medio LB y se incubó a 37°C durante una hora en agitación a 250 revoluciones por minuto (RPM). Finalmente se cultivó con perlas de vidrio de 100-250 µl en medio agar LB con el antibiótico correspondiente.

7.2. Transfección celular

La línea celular MCF-7 expresa una forma constitutivamente activa del receptor Notch1, por otra parte, el factor transcripcional CSL y el co-activador MAML son proteínas constitutivas. Por lo tanto, esta línea celular es un modelo adecuado para los ensayos de transfección porque posee los elementos necesarios que conforman los complejos co-activadores (CSL/NICD1-4/MAML) *in vivo* [Radtke and Raj, 2003; Rizzo *et al.*, 2013; Leong, 2005; Stylianou *et al.*, 2006]. En un ensayo de transfección con la construcción pGL4xCSL, la cual posee los elementos de reconocimiento de CSL, se debería activar la transcripción del gen reportero de la luciferasa, y como consecuencia se detectaría su actividad.

Todos los ensayos de transfección realizados en este estudio fueron transitorios y se llevaron a cabo siguiendo el protocolo del reactivo de transfección Xfect™ (Clontech). Posteriormente, se midió la actividad de la luciferasa siguiendo el protocolo del Dual-Luciferase® Reporter Assay System (Promega), en el equipo Thermo Scientific™ Varioskan™ LUX. Adicionalmente, en las transfecciones se incluyó el vector reportero luciferasa control pGL4.75, como descrito en el Dual-Luciferase® Reporter Assay System (Promega). La actividad de las enzimas luciferasas codificadas por los vectores pGL4xCSL (de *Photinus pyralis*) y pGL4.75 (de *Renilla reniformis*), responden a diferentes sustratos, por lo que es posible medirlas secuencialmente a partir de una sola muestra. Así, la actividad del vector reportero experimental (pGL4xCSL) es normalizada a la actividad del vector reportero control (pGL4.75), para minimizar la variabilidad experimental causada por las diferencias de viabilidad celular o eficiencia de transfección.

Para la estandarización de la actividad de emisión de luz de la enzima luciferasa, se realizaron transfecciones con diferentes cantidades del vector

pGL4xCSL, en la línea celular MCF-7 (como es descrito en la tabla 8), y las lecturas de la actividad de la enzima luciferasa fueron medidas a las 24 horas.

Transfección de MCF-7 con pGL4xCSL						
Componentes	1	2	3	4	5	6
Vector reportero pGL4xCSL (μg)	1.50	2.00	2.50	3.00	3.50	4.50
Número de células MCF-7 ($\times 1000$)	300	300	300	300	300	300

Tabla 8. Estandarización de la actividad de la enzima luciferasa. Previo a la transfección, se sembraron 300,000 células MCF-7. Posteriormente, se transfectó según el protocolo del Xfect™ (Clontech). 24 horas más tarde se midió la actividad de la enzima luciferasa, según el protocolo del Dual-Luciferase® Reporter Assay System (Promega), en el equipo Thermo Scientific™ Varioskan™ LUX.

Como ya se mencionó, el gen de la enzima luciferasa, del vector pGL4xCSL, está bajo el control del PSN. Por lo tanto, se incluyeron ensayos de transfección (como es descrito en la tabla 9) en los que se co-transfectó en diferentes relaciones molares a los vectores pGL4xCSL y a un vector que codifica para una región que corresponde al dominio de la proteína H, a través del cual se une a Su(H), denominado pRegNeg-AID [**p** (de plásmido) **Regulación Negativa-AID** (ayuda en inglés), patente en proceso]. La actividad de la enzima luciferasa se midió a las 24 y 48 horas.

Transfección control con el pRegNeg-AID				
Componentes	1		2	
Vector reportero pGL4xCSL (µg)	2.50	2.50	2.50	2.50
Vector reportero control pGL4.75 (µg)	0.02	0.02	0.02	0.02
pRegNeg-AID (µg)	-	2.30	-	6.90
Vector relleno pBlueScript (µg)	2.30	-	6.90	-
ADN total (µg)	4.82	4.82	9.42	9.42
Relación molar pGL4xCSL:pHT-DS	1:1		1:3	

Tabla 9. Condiciones de co-transfección del vector pRegNeg-AID y el vector pGL4xCSL. Todas las condiciones (1 y 2), consideran un control donde no se transfecta el vector pRegNeg-AID [(-) columna izquierda], por el contrario, en la columna derecha, si se transfecta el vector pRegNeg-AID, La relación molar es de 1:1 y 1:3 pGL4xCSL:pRegNeg-AID, en las condiciones 1 y 2, respectivamente. Las diferencias en cantidad de plásmido a transfectar, son compensadas con el vector de relleno pBlueScript. 24 horas previas a la transfección, se sembraron 450,000 células MCF-7. Posteriormente, se transfectó según el protocolo del Xfect™ (Clontech). 24 y 48 horas más tarde se midió la actividad de la enzima luciferasa, según el protocolo del Dual-Luciferase® Reporter Assay System (Promega).

Una vez que se determinó la funcionalidad del vector pGL4xCSL, también fue importante evaluar la expresión de las proteínas HaloTag-NAC-2 y HaloTag®, derivadas de las construcciones pHT-NACC-2 y pHT, respectivamente. Para este propósito, se transfectaron células CHO-K1 con los vectores pHT-NACC-2 y pHT, 48 horas postransfección, se obtuvo proteína total, para la identificación de las proteínas HaloTag-NAC-2 y HaloTag®, a través de un ensayo de western blot, usando anticuerpos monoclonales anti-HaloTag®.

Una vez establecidos los controles necesarios, como lo fueron la estandarización de la actividad de la enzima luciferasa y el control positivo que involucra al vector pRegNeg-AID, se realizaron ensayos de co-transfección con los vectores pGL4xCSL y pHT-NACC-2, en diferentes relaciones molares,

adicionalmente. Las mediciones de la actividad de las enzimas luciferasas fueron tomadas a las 24 y 48 horas (como es descrito en la tabla 10 y 11, respectivamente).

Transfección con el pHT-NACC-2, 24 horas						
Componentes	1		2		3	
Vector reportero pGL4xCSL (µg)	2.50	2.50	2.50	2.50	2.50	2.50
Vector reportero control pGL4.75 (µg)	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02
pHT-NACC-2 (µg)	-	2.70	-	4.10	-	5.50
Vector relleno pBlueScript (µg)	2.70	-	4.10	-	5.50	-
ADN total (µg)	5.22	5.22	6.62	6.62	8.02	8.02
Relación molar pGL4xCSL: pHT-NACC-2	1:1		1:1.5		1:2	

Tabla 10. Condiciones de co-transfección del vector pHT-NACC-2 y el vector pGL4xCSL. Todas las condiciones (1, 2 y 3), consideran un control donde no se transfecta el vector pHT-NACC-2 [(-) columna izquierda], por el contrario, en la columna derecha, si se transfecta el vector pHT-NACC-2, La relación molar es de 1:1, 1:1.5 y 1:2 pGL4xCSL:pHT-NACC-2, en las condiciones 1, 2 y 3, respectivamente. Las diferencias en cantidad de plásmido a trasfectar, son compensadas con el vector de relleno pBlueScript. Un día previo a la transfección, se sembraron 450,000 células MCF-7. Posteriormente, se transfectó según el protocolo del Xfect™, de clontech. 24 horas más tarde se midió la actividad de la enzima luciferasa, según el protocolo del Dual-Luciferase® Reporter Assay System (Promega).

Transfección con el pHT-NACC-2, 48 horas						
Componentes	1		2		3	
Vector reportero pGL4xCSL (µg)	2.50	2.50	2.50	2.50	2.50	2.50
Vector reportero control pGL4.75 (µg)	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02
pHT-NACC-2 (µg)	-	2.70	-	5.50	-	8.20
Vector relleno pBlueScript (µg)	2.70	-	5.50	-	8.20	-
ADN total (µg)	5.22	5.22	8.02	8.02	10.72	10.72
Relación molar pGL4xCSL: pHT-NACC-2	1:1		1:2		1:3	

Tabla 11. Condiciones de co-transfección del vector pHT-NACC-2 y el vector pGL4xCSL. Todas las condiciones (1, 2 y 3), consideran un control donde no se transfecta el vector pHT-NACC-2 [(-) columna izquierda], por el contrario, en la columna derecha, si se transfecta el vector pHT-NACC-2, La relación molar es de 1:1, 1:1.5 y 1:2 pGL4xCSL:pHT-NACC-2, en las condiciones 1, 2 y 3, respectivamente. Las diferencias en cantidad de plásmido a trasfectar, son compensadas con el vector de relleno pBlueScript. Un día previo a la transfección, se sembraron 450,000 células MCF-7. Posteriormente, se transfectó según el protocolo del Xfect™ (Clontech). 48 horas más tarde se midió la actividad de la enzima luciferasa, según el protocolo del Dual-Luciferase® Reporter Assay System (Promega).

8. RESULTADOS

8.1. Análisis de los vectores *pGL4xCSL*, *pHT-NACC-2* y *pHT*

Todas las construcciones fueron analizadas por restricción enzimática. Para el análisis del vector reportero *pGL4xCSL*, se utilizaron las enzimas de restricción *XhoI*, *HindIII* y *EcoRI* (Fig. 14), por lo siguiente: el PSN derivado del vector *4xCSL*-luciferasa, se extrajo con las enzimas *SmaI* y *HindIII*, de corte romo y cohesivo, respectivamente. Posteriormente, para sub-clonar el PSN en el vector *pGL4.18[luc2P/Neo]*, hubo que digerir este vector con una enzima de corte romo y cohesivo, para lo cual usamos las enzimas *EcoRV* y *HindIII*, respectivamente. Entendiendo que los sitios de corte para las enzimas *SmaI* y *EcoRV*, de corte romo, se perderían al momento de la sub-clonación, y en su lugar, para el análisis de restricción se utilizó la enzima *XhoI*. Además, un sitio para la enzima *EcoRI*, adicional al que ya tenía el vector *pGL4.18[luc2P/Neo]*, se incorporó con la sub-clonación del PSN. Las reacciones de digestión se sometieron a una electroforesis en gel de agarosa al 1%, teñido con BrEt para visualizar la digestión en un fotodocumentador. El patrón de bandas confirmó la identidad de la construcción *pGL4xCSL*.

La razón de extraer el PSN de un vector reportero e incorporarlo a otro vector reportero, radica en lo siguiente: el esqueleto sobre el cual está diseñado el vector *4xCSL*-luciferasa, corresponde al vector reportero *pGL2*-básico, y la principal diferencia entre este vector reportero y el vector *pGL4.18[luc2P/Neo]*, es que éste último vector está diseñado para reducir el riesgo de expresión anómala e incrementar la confiabilidad de la expresión del gen reportero. Este diseño incluye: un número muy reducido de sitios de unión consenso de factores de transcripción; un rediseño de la región de clonación múltiple; la eliminación del origen de

replicación f1; supresión de una secuencia intrónica; y una reducción en el número de módulos de promotores (los módulos de promotores son elementos reguladores compuestos que constan de al menos dos sitios de unión de factores de transcripción separados por un espaciador. Los módulos promotores pueden tener funciones sinérgicas o antagónicas). Esto se traduce en un incremento de la confiabilidad de la expresión del gen reportero, además contiene una secuencia hPEST, la cual está fusionada al gen de la enzima luciferasa. Esta secuencia aumenta la tasa de degradación, ofreciendo valores de actividad más precisos. Todo esto en comparación con vectores reporteros anteriores al pGL4.18[*luc2P*/Neo], como p. ej., los vectores pGL2 y pGL3 [Dougherty and Sanders, 2005].

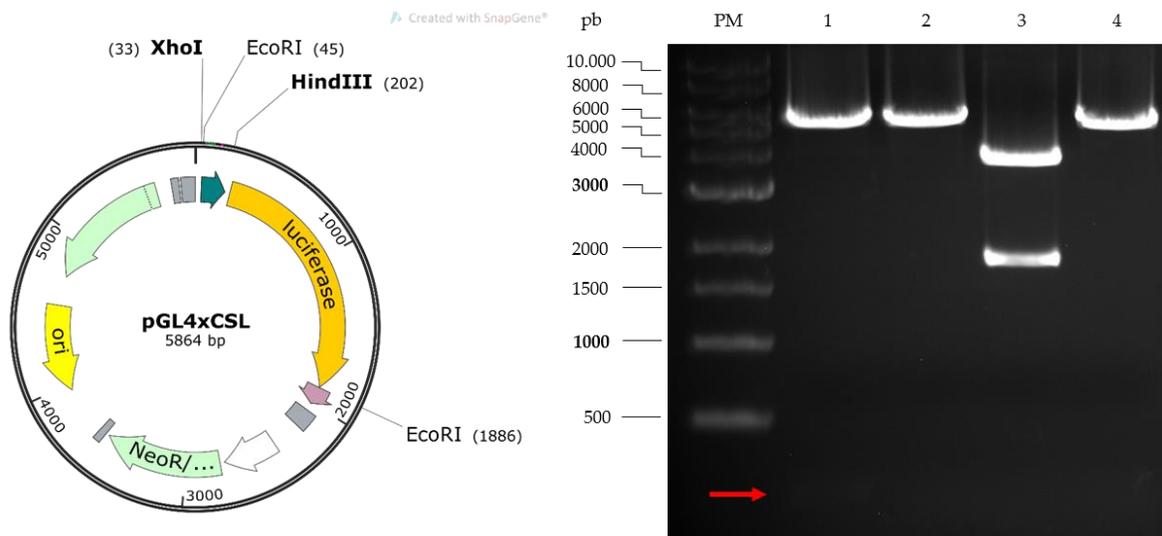


Figura 14. Análisis de restricción de la construcción pGL4xCSL. Carril PM, marcador de peso molecular GeneCraft® 1 kb DNA Ladder; carril 1, dos bandas de 5695 y 169 pares de bases (pb) (flecha roja), corresponden al plásmido pG4xCSL, digerido con las enzimas *XhoI* y *HindIII*; carril 2, dos bandas de 5695 y 32 pb, corresponden al vector pGL4.18[*luc2P*/Neo], sin clonar, digerido con las mismas enzimas; carril 3, dos bandas de 4023 y 1841 pb, corresponden al plásmido pGL4xCSL, digerido con la enzima *EcoRI*; carril 4, una banda de 5727 pb, corresponde al pGL4.18[*luc2P*/Neo], sin clonar, digerido con las mismas enzimas.

En el análisis por restricción enzimática del vector pHT-NAC-2, se utilizaron las enzimas *AsiSI*, *XbaI* y *NcoI* (Fig. 15), por lo siguiente: el gen de NAC-2, amplificado por PCR, se clonó en el vector pFN21K HaloTag® CMV Flexi®, a través de los sitios para las enzimas *AsiSI* y *XbaI*. Por otro lado, el gen de NAC-2 posee dos sitios de restricción para la enzima *NcoI*, los cuales se adicionan a los otros dos que posee el vector pFN21K HaloTag® CMV Flexi®. Las reacciones de digestión se sometieron a una electroforesis en gel de agarosa al 1%, teñido con BrEt para visualizar la digestión en un fotodocumentador. El patrón de bandas confirmó la identidad de la construcción pHT-NACC-2. Por otro lado, este vector fue secuenciado por la empresa Macrogen y los resultados de la secuenciación fueron analizados en el software Main Workbench 7.9.1, confirmando la integridad de la secuencia que codifica para la proteína HaloTag-NAC-2 (Fig. 16).

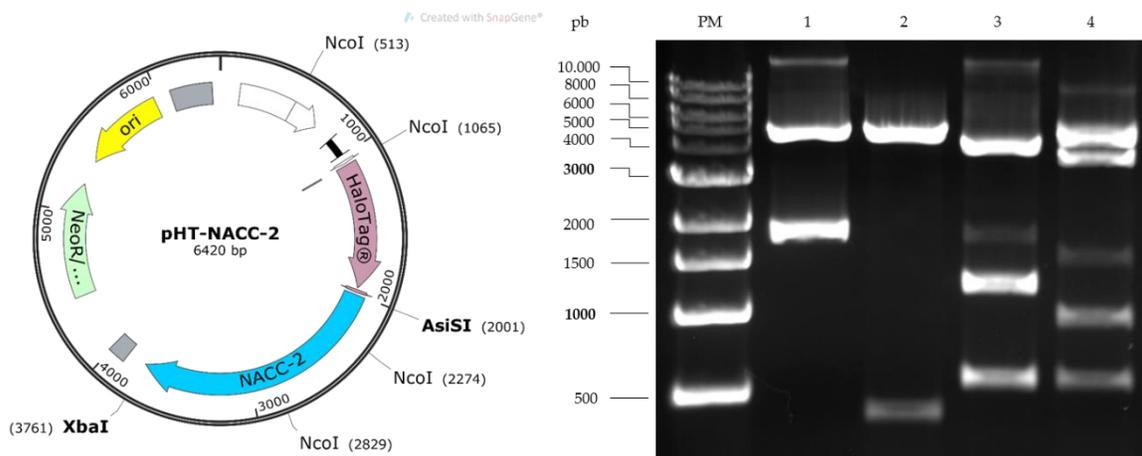


Figura 15. Análisis de restricción de la construcción pHT-NACC-2. Carril PM, marcador de peso molecular 1 kb DNA Ladder (NEB); carril 1, dos bandas de 4660 y 1760 pares de bases (pb), corresponden al plásmido pHT-NACC-2, digerido con las enzimas *AsiSI* y *XbaI*; carril 2, dos bandas de 4660 y 399 pb, corresponden al vector pFN21K HaloTag® CMV Flexi®, sin clonar, digerido con las mismas enzimas; carril 3, cuatro bandas de 4104, 1209, 555 y 552 pb, corresponden al plásmido pHT-NACC2, digerido con la enzima *NcoI*; carril 4, tres bandas de 3568, 939 y 552 pb, corresponde al vector pFN21K HaloTag® CMV Flexi®, sin clonar, digerido con las mismas enzimas.

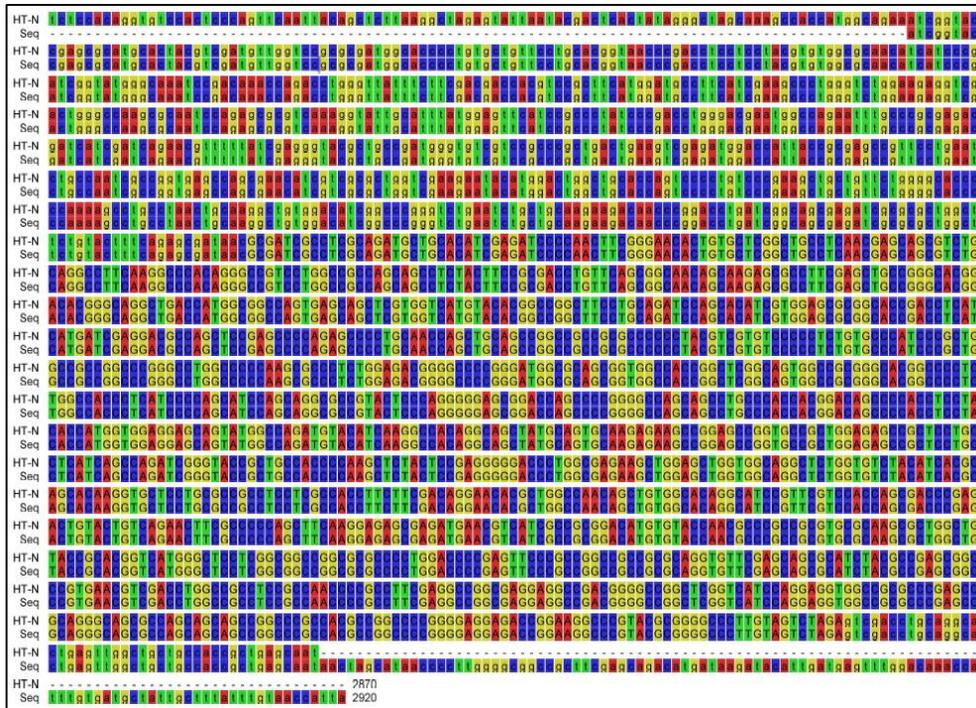


Figura 16. Análisis de alineamiento en el software CLC Main Workbench 7.9.1. La secuencia del vector pHT-NACC-2 (HT-N), fue alineada con los resultados de la región secuenciada (Seq) del mismo vector. Determinando la integridad de la secuencia que codifica para la proteína HaloTag-NAC-2.

La construcción control pHT fue analizada por restricción enzimática, con las enzimas *Sall*, *StuI* y *NcoI* (Fig. 17), por lo siguiente: esta construcción se obtuvo mediante la eliminación del gen de la barnasa, con la enzima de restricción *Sall*, y posteriormente se recircularizó, por lo que un sitio para esta enzima debería permanecer. Por otro lado, el gen de HaloTag®, posee un sitio para la enzima *StuI*, además, es único en todo el vector. Sin embargo, en la reacción no se aprecia una buena digestión debido a que el sitio de restricción para esta enzima es parte de un sitio de metilación en procariontes, lo cual bloquea la digestión por parte de la enzima *StuI*. En el caso del análisis con la enzima *NcoI*, un sitio de restricción para esta enzima de los tres que contiene el vector, se pierde cuando se elimina el gen de la barnasa, por lo que en el análisis se deberían observar dos bandas. Las reacciones

de digestión se sometieron a una electroforesis en gel de agarosa al 1%, teñido con BrEt para visualizar la digestión en un fotodocumentador. El patrón de bandas confirmó la identidad de la construcción pHT.

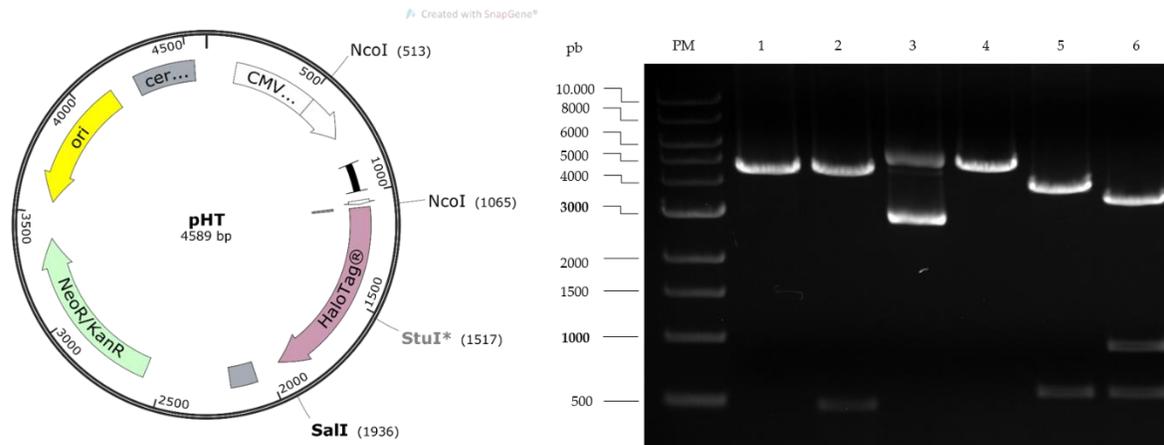


Figura 17. Análisis de restricción de la construcción pHT. Carril PM, marcador de peso molecular 1 kb DNA Ladder | NEB; carril 1, una banda de 4589 pares de bases (pb), corresponden al plásmido pHT, digerido con la enzima *SalI*; carril 2, dos bandas de 4589 y 470 pb, corresponden al vector pFN21K HaloTag® CMV Flexi®, sin clonar, digerido con la misma enzima; carril 3, una banda de 4589 pb, corresponde al plásmido pHT; digerido con la enzima de restricción *StuI*; carril 4, una banda de 5059 pb, corresponde al vector pFN21K HaloTag® CMV Flexi®, sin clonar, digerido con la misma enzima; carril 5, dos bandas de 4037 y 552 pb, corresponden al plásmido pHT, digerido con la enzima *NcoI*; carril 6, tres bandas de 3568, 939 y 552 pb, corresponden al vector pFN21K HaloTag® CMV Flexi®, sin clonar, digerido con la misma enzima.

Células CHO-K1 fueron transfectadas con las construcciones pHT-NACC-2 y pHT, para evaluar la expresión de las proteínas HaloTag-NAC-2 y HaloTag®. 48 horas postransfección se obtuvo la proteína total de células transfectadas. Las proteínas se separaron por electroforesis en gel desnaturizante SDS-poliacrilamida al 10%; las proteínas separadas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa y se procedió a detectar las proteínas HaloTag-NAC-2 y HaloTag® por ensayo tipo western blot, con anticuerpos monoclonales anti-HaloTag®. Los resultados

mostraron que las proteínas HaloTag-NAC-2 y HaloTag® se expresaron puesto que se detectaron dos bandas de aproximadamente 33 y 108 kDa, cuyos pesos corresponden a las proteínas HaloTag® y HaloTag-NAC-2, respectivamente (Fig. 18). Estos resultados nos permiten concluir que las construcciones pHT-NACC-2 y pHT funcionan.

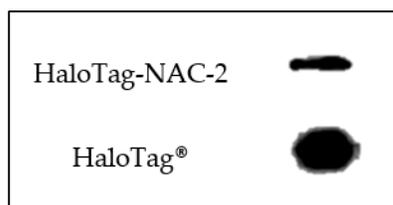
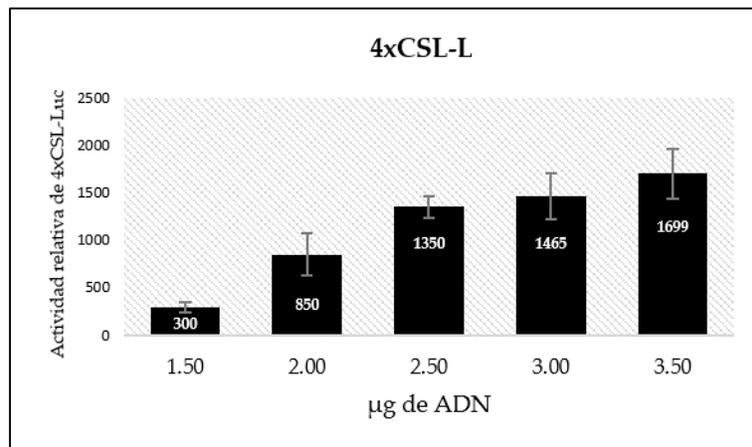


Figura 18. Western blot de las proteínas HaloTag-NAC-2 y HaloTag®. Células CHO-K1 fueron transfectadas con los vectores pHT-NACC-2 y pHT, 48 horas postransfección se obtuvo proteína total. Las proteínas se separaron por electroforesis en gel desnaturalizante SDS-poliacrilamida al 10%; las proteínas separadas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa y se procedió a detectar las proteínas HaloTag-NAC-2 y HaloTag® con anticuerpos monoclonales anti-HaloTag®.

8.2. Estandarización de 4xCSL-Luc

Los resultados de la estandarización de la actividad de la enzima luciferasa, mostraron que los valores de actividad más estables se observaron en las transfecciones de las células MCF-7 con 2.5 µg del vector pGL4xCSL. En las transfecciones con menor y mayor cantidad del vector, no hubo diferencias significativas con respecto a las transfecciones con 2.5 µg del vector (Gráf. 1). Estos experimentos nos permitieron determinar una cantidad del vector pGL4xCSL adecuada para los ensayos de transfección posteriores, donde se evaluó el efecto del polipéptido RegNeg-AID y de la proteína HaloTag-NAC-2, sobre la actividad de la enzima luciferasa codificada por el vector pGL4xCSL. Como ya se mencionó, el

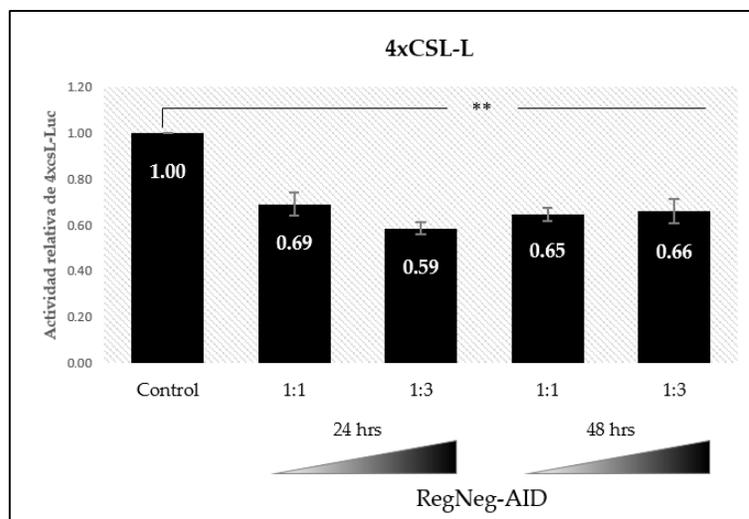
protocolo del Dual-Luciferase® Reporter Assay System (Promega) implica el uso de dos vectores reporteros para los ensayos de co-transfección: un vector reportero experimental (pGL4xCSL) y un vector reportero control (pGL4.75). Estos vectores son combinados en una relación 75:1 (vector reportero experimental:vector reportero control). De modo que a 2.5 µg del vector pGL4xCSL le corresponden ~0.024 µg del vector reportero control pGL4.75. Por otra parte, a cantidades menores a 2.5 µg del vector pGL4xCSL implicarían cantidades muy pequeñas del vector pGL4.75, y a cantidades mayores a 2.5 µg del vector pGL4xCSL implicarían cantidades mayores a 0.024 µg del vector pGL4.75, y en consecuencia, las lecturas de actividad de las enzimas luciferasas, podrían resultar en datos no confiables.



Gráfica 1. Estandarización de la actividad de la enzima luciferasa. Células MCF-7 fueron transfectadas con 1.5, 2, 2.5, 3 y 3.5 µg de plásmido pGL4xCSL. 24 horas más tarde, la actividad de la luciferasa fue medida. Cada barra representa el ± EST de la media para experimentos triplicados.

8.3. Efecto del polipéptido RegNeg-AID sobre 4xCSL-Luc

El vector reportero pGL4xCSL fue diseñado para controlar la transcripción del gen reportero de la enzima luciferasa con el PSN. Por lo tanto, fue necesario incluir un control positivo que involucrara una proteína co-represora, como p. ej., la proteína H, para comprobar la funcionalidad de este vector. En este sentido, una proteína co-represora de la VSN, debería reprimir la expresión del gen reportero de la enzima luciferasa, codificada por el vector pGL4xCSL, y en consecuencia su actividad. Para este propósito, se transfectaron células MCF-7 con el vector pRegNeg-AID, causando una disminución de la actividad de la enzima luciferasa hasta en un 41% ($p \leq 0.01$) (Gráf. 2). La relación molar de los vectores de transfección pGL4xCSL y pRegNeg-AID, fue de 1:1 y 1:3, respectivamente. La actividad de la luciferasa se midió a las 24 y 48 horas después de la transfección. Sin embargo, es interesante observar que no hubo diferencias significativas entre las lecturas de actividad de la enzima luciferasa tomadas a las 24 y 48 horas después de la transfección. Así mismo, la disminución de la actividad de la enzima luciferasa no fue tan drástica, a pesar de que H es el mayor antagonista de la VSN en *Drosophila melanogaster*. Posiblemente porque el polipéptido codificado por el vector pRegNeg-AID, carece de los dominios de unión a los co-represores Groucho y CtBP. No obstante, estos resultados nos permiten decir que el vector pGL4xCSL es sensible a la actividad de la VSN.

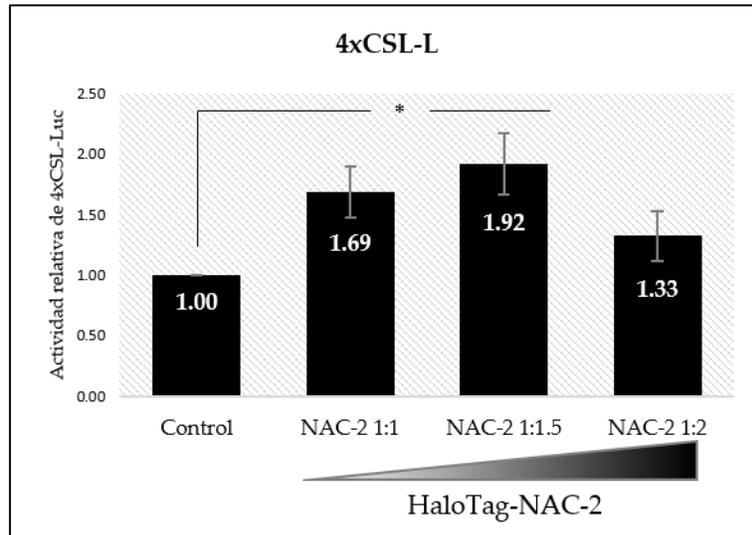


Gráfica 2. El vector pRegNeg-AID disminuye la actividad de la enzima luciferasa. Células MCF-7 fueron transfectadas en una relación molar 1:1 y 1:3, respecto a los vectores pGL4xCSL y pRegNeg-AID. 24 y 48 horas más tarde, la actividad de la enzima luciferasa fue medida. La actividad relativa de la enzima luciferasa se calculó como la actividad de la enzima luciferasa de pGL4xCSL, dividida entre la actividad de la enzima luciferasa de pGL4.75. Cada barra representa el \pm EST de la media para experimentos triplicados. Los valores de P fueron determinados por la prueba t de Student (** $p \leq 0.01$ vs control. $n=3$).

8.4. Efecto de NAC-2 sobre 4xCSL-Luc

El efecto de NAC-2 sobre la actividad de la enzima luciferasa, se midió a las 24 y 48 horas postransfección. A las 24 horas se observó que NAC-2 aumentó la actividad de la enzima luciferasa hasta en un 92% ($p \leq 0.05$) (Gráf. 3). Las células MCF-7 se transfectaron con los vectores pGL4xCSL y pHT-NACC-2 a una relación molar de 1:1, 1:1.5 y 1:2. El mayor incremento correspondió a la relación molar de 1:1.5, algo no esperado dadas las características represoras de la proteína NAC-2. Estos resultados mostraron un aumento en la actividad de la enzima luciferasa en todas las relaciones molares de transfección. No obstante, a la relación molar 1:2, la actividad de la enzima luciferasa disminuyó con respecto a la relación molar 1:1.5. Posiblemente porque los niveles de la proteína NAC-2 a la relación molar 1:1.5,

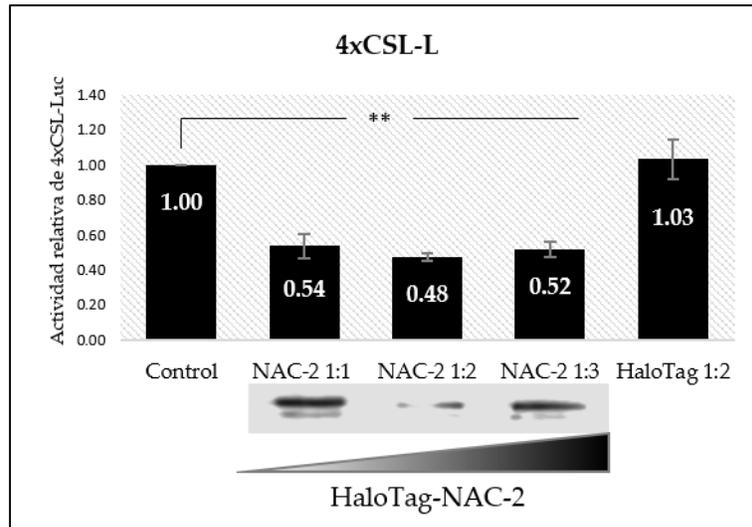
superaban los niveles a los cuales NAC-2 funciona como un co-activador transcripcional.



Gráfica 3. NAC-2 aumenta la actividad de la enzima luciferasa a las 24 horas. Células MCF-7 fueron transfectedas en una relación molar 1:1, 1:1.5 y 1:2, respecto a los vectores pGL4xCSL y pHT-NACC-2. 24 horas más tarde, la actividad de la luciferasa fue medida. La actividad relativa de la enzima luciferasa se calculó como la actividad de la enzima luciferasa de pGL4xCSL, dividida entre la actividad de la enzima luciferasa de pGL4.75. Cada barra representa el \pm EST de la media para experimentos triplicados. Los valores de P fueron determinados por la prueba t de Student ($*p \leq 0.05$ vs control. $n=3$).

A las 48 horas postransfección, se observó que NAC-2 tuvo un efecto inhibitorio sobre la actividad de la enzima luciferasa (Gráf. 4), opuesto a lo observado en las lecturas tomadas a las 24 postransfección. En la misma relación de transfección 1:1, NAC-2 disminuyó la actividad de la luciferasa en un 46%, un 52% en la relación 1:2 y 48% en la relación molar 1:3 ($p \leq 0.01$). La proteína HaloTag-NAC-2 se detectó por western blot, usando anticuerpos anti-HaloTag®. El control HaloTag®, no generó ningún efecto sobre la actividad de la enzima luciferasa (Gráf. 4). Estos resultados nos permiten decir que NAC-2 funciona como un inhibidor dependiente

de la concentración, puesto que a periodos más largos de transfección NAC-2 causó una inhibición de la actividad de la enzima luciferasa.



Gráfica 4. NAC-2 disminuye la actividad de la enzima luciferasa a las 48 horas. Células MCF-7 fueron transfectadas en una relación molar 1:1, 1:2 y 1:3, respecto a los vectores pGL4xCSL y pHT-NACC-2. 48 horas más tarde, la actividad de la luciferasa fue medida. La actividad relativa de la enzima luciferasa se calculó como la actividad de la enzima luciferasa de pGL4xCSL, dividida entre la actividad de la enzima luciferasa de pGL4.75. Cada barra representa el \pm EST de la media para experimentos triplicados. Los valores de P fueron determinados por la prueba t de Student (** $p \leq 0.01$ vs control. $n=3$).

9. DISCUSIÓN

9.1. El vector *pGL4xCSL* es sensible a la vía de señalización Notch

El empleo de un gen reportero de la enzima luciferasa, bajo el control de un promotor que contiene elementos regulatorios del factor transcripcional CSL, es un método efectivo y ampliamente utilizado para la identificación de nuevas proteínas involucradas en la regulación transcripcional de la VSN [Saxena *et al.*, 2001; Dai *et al.*, 2013; Nagel *et al.*, 2005; Hsieh *et al.*, 1999; Coumailleau and Schweisguth, 2014; Duan *et al.*, 2011; Taniguchi *et al.*, 2015; Oswald *et al.*, 2002; Kuroda *et al.*, 2003; Oswald *et al.*, 2005; Vanderwielen *et al.*, 2011; Yuan *et al.*, 2019].

La proteína H es el mayor antagonista de la VSN en *Drosophila melanogaster*, puesto que es el co-represor que se une a CSL con mayor afinidad [Yuan *et al.*, 2016]. Por esta razón, el vector reportero luciferasa *pGL4xCSL*, empleado en este estudio, fue sometido al efecto del vector *pRegNeg-AID*, el cual codifica para una polipéptido derivado de la proteína H, a través del cual se une al factor transcripcional CSL, denominado *RegNeg-AID*. Los resultados demuestran que el vector *pRegNeg-AID*, fue capaz de disminuir la actividad de la enzima luciferasa a las 24 y 48 horas postransfección. Sin embargo, no hubo un cambio significativo en los efectos vistos entre estos dos tiempos. Se sabe que las proteínas H y Notch, se mantienen en una relación 1:1, *in vivo*. Cualquier proteína que supere esta relación predominará su función represora o activadora, respectivamente, en una forma dependiente de la concentración [Praxenthaler *et al.*, 2017; Nagel *et al.*, 2005]. En otras palabras, es probable que la concentración del polipéptido *RegNeg-AID*, en la relación de transfección 1:1, fue suficiente para superar en concentración a los receptores Notch, inhibir la transcripción de la enzima luciferasa, y en consecuencia su actividad. Sin embargo, no fue posible detectar el polipéptido *RegNeg-AID* en los

ensayos de western blot, para respaldar esta especulación. Sin embargo, la literatura en parte la respalda. Es importante mencionar, que el polipéptido RegNeg-AID, no contiene los dominios de unión para los co-represores Groucho y CtBP, los cuales son requeridos por H para llevar a cabo su función represora completa [Nagel *et al.*, 2005], y quizá, aunque la proteína H de tamaño completo, hubiera sido empleada en estos ensayos, no hubiéramos visto una completa inhibición de la actividad de la enzima luciferasa, debido a que H no se encuentra en sistema cognado, porque es una proteína de insectos, ya que solo se ha identificado en estos organismos, hasta ahora [Zehender *et al.*, 2017]. Por otro lado, estos resultados mostraron que el vector pGL4xCSL cumplía con la función para la cual fue diseñado, de responder a la actividad de la VSN.

9.2. NAC-2 aumenta y disminuye la actividad de la enzima luciferasa

Nuestros resultados muestran que NAC-2 causó un aumento del 69, 92 y 33% en la actividad de la enzima luciferasa, medida a las 24 horas postransfección, en las condiciones donde la relación molar de los vectores pGL4xCSL y pHT-NACC-2, fue de 1:1, 1:1.5 y 1:2, respectivamente. En contraste, cuando la actividad de la luciferasa fue medida a las 48 horas postransfección, NAC-2 causó una disminución del 46, 52 y 48%, en las condiciones donde la relación molar de los vectores pGL4xCSL y pHT-NACC-2, fue de 1:1, 1:2 y 1:3. Con base en estos resultados, podemos especular que NAC-2 está involucrada en la regulación de los genes blanco de la VSN, tanto positiva como negativamente. Además, esta posible funcionalidad dual, parece ser dependiente de la concentración, Cuando se midió la actividad de la enzima luciferasa en la relación molar 1:1, a las 24 y 48 horas, se observaron efectos opuestos. A las 24 horas hubo un aumento del 69% y, en contraste, a las 48 horas

hubo una disminución del 46% en la actividad de la enzima luciferasa. Generalmente, en ensayos de transfección transitorios, la proteína codificada por un vector de expresión, alcanza su mayor expresión a las 48 horas. Si este es el caso para el vector pHT-NACC-2, entonces, los niveles de la proteína HaloTag-NAC-2, a las 24 horas, son menores que a las 48 horas, y en este sentido, los niveles de proteína a las 24 horas fueron suficientes para aumentar la actividad de la enzima luciferasa, y por el contrario, los niveles a las 48 horas, fueron suficientes para disminuir la actividad de la enzima luciferasa. Algo similar se observa en las mediciones de actividad de la enzima luciferasa, en las condiciones donde la relación molar de los vectores pGL4xCSL y pHT-NACC-2, fue de 1:2, es decir, el doble de la relación 1:1, respecto al vector pHT-NACC-2. A las 24 horas hubo aumento del 33%, y a las 48 horas hubo una disminución del 52%, en la actividad de la luciferasa.

Es importante observar, que el aumento en la actividad de la enzima luciferasa a las 24 horas, con respecto al control, en la relación de transfección 1:2, fue una disminución, con respecto a las relaciones de transfección 1:1 y 1:1.5 (Gráf. 3 y 4). Posiblemente, los niveles de la proteína HaloTag-NAC-2, a las 24 horas, están por encima de los niveles a los cuales NAC-2, tiene su mayor efecto como un activador transcripcional, y por lo tanto la actividad de la enzima luciferasa disminuye con respecto a las relaciones molares de transfección 1:1 y 1:1,5. Es decir, la activación transcripcional medida por NAC-2, está por debajo de la relación 1:2.

A pesar de que en la relación de transfección 1:3, con respecto a los vectores pGL4xCSL y pHT-NACC-2, la actividad de la enzima luciferasa solo se midió a las 48 horas (a las cuales, la actividad disminuyó en un 48%), era de esperar, según lo discutido hasta el momento, que la actividad de la enzima luciferasa a las 24 horas, disminuyera aún más, con respecto a la relación molar 1:2. Estos resultados, nos

permiten especular que NAC-2 funciona dependiente de la concentración. Sin embargo, solo fue posible detectar a la proteína HaloTag-NAC-2 en los ensayos a las 48 horas, y las bandas observadas no corresponden a los efectos observados, no obstante, solo se realizó un ensayo de western blot. Habrá que determinar en estudios posteriores la concentración a la cual NAC-2 funciona de la manera observada en este estudio.

En la literatura existen reportes de proteínas que pueden regular tanto positiva como negativamente la expresión de genes, tal es el caso de la proteína Krüppel, involucrada en la segmentación durante el desarrollo de *Drosophila melanogaster*. Esta proteína activa la expresión de genes a bajas concentraciones y a concentraciones más altas se homodimeriza y reprime la transcripción uniéndose al mismo elemento regulatorio en el ADN, en ambos casos [Sauer and Jäckle, 1993].

NAC-2 fue caracterizada originalmente como una proteína represora transcripcional, que se une al ADN en forma de homodímero. NAC-2 usa su dominio BTB/POZ para homodimerizarse y unirse al ADN con su dominio BEN [Xuan *et al.*, 2013]. Quizá, NAC-2 funcione de una manera parecida a como lo hace Krüppel, a ciertas concentraciones activa la transcripción y a concentraciones más altas se homodimeriza e inhibe la transcripción. Sin embargo, hacen falta más estudios, en los cuales se consideren las concentraciones a las cuales NAC-2 funciona de esta manera. A pesar de que se demostró que NAC-2 puede unirse a CSL a través de su dominio BEN, como lo hacen las proteínas BEND6 e Insv, habrá que determinar si NAC-2 realmente se une a CSL, para llevar a cabo esta función dual o si requiere de otras proteínas, incluso si lo hace uniéndose al ADN, debido a que se sabe que los dominios BEN, también pueden mediar interacciones proteína-ADN, de este modo, Insv se une a una secuencia palindrómica en el ADN para funcionar como un represor, sin embargo, no sobre los genes blanco de la VSN.

10. CONCLUSIÓN

En el presente estudio, observamos que la proteína NAC-2 aumentó y disminuyó la actividad de la enzima luciferasa en sistemas de expresión *in vitro*, lo que indirectamente sugiere, que aumentó y disminuyó la actividad transcripcional del gen reportero de la enzima luciferasa, el cual está bajo el control de un promotor que contiene elementos regulatorios consenso de unión a CSL. Por lo anterior, podemos concluir que NAC-2, está implicada en la regulación de los genes blanco de la VSN, tanto positiva como negativamente, posiblemente dependiente de la concentración y quizá, a través de la unión a CSL.

11. PERSPECTIVAS

En este estudio, demostramos que NAC-2 está involucrada en la regulación de los genes blanco de la VSN, sin embargo, nuestros resultados no definen con precisión el mecanismo de acción de NAC-2. Por lo anterior, es necesario abordar adecuadamente, futuros experimentos que nos permitan determinar la concentración a la cual NAC-2 funciona como un activador y como un represor de los genes blanco de la VSN. Así mismo, habrá que diseñar construcciones de eliminación para determinar que dominios de NAC-2 están involucrados con su función y si realmente se une al factor transcripcional CSL. También será importante elucidar que genes de todo el espectro de los genes blanco de la VSN, son blanco de NAC-2. Si NAC-2 requiere de otras proteínas co-represoras para funcionar adecuadamente, así como definir en qué contextos celulares funciona. Es claro mucho trabajo experimental es necesario para resolver estas interrogantes.

12. BIBLIOGRAFÍA

- Abhiman, Saraswathi, *et al.* 2008. "BEN: A Novel Domain in Chromatin Factors and DNA Viral Proteins." *Bioinformatics*, **vol. 24**, **no. 4**, **pp. 458–61**, doi:10.1093/bioinformatics/btn007.
- Andersson, E. R., *et al.* 2011. "Notch Signaling: Simplicity in Design, Versatility in Function." *Development*, **vol. 138**, **no. 17**, **pp. 3593–612**, doi:10.1242/dev.063610.
- Aoki, Tsutomu, *et al.* 2012. "Elba, a Novel Developmentally Regulated Chromatin Boundary Factor Is a Hetero-Tripartite DNA Binding Complex." *ELife*, **vol. 1**, **pp. 1–24**, doi:10.7554/elife.00171.
- Artavanis-Tsakonas, Spyros. 1997. "Alagille Syndrome—a Notch up for the Notch Receptor." *Nature Genetics*, **vol. 15**, **pp. 57–61**, doi:10.1038/ng0797-270.
- Artavanis-Tsakonas, Spyros, *et al.* 1999. "Notch Signaling: Cell Fate Control and Signal Integration in Development." *Science*, **vol. 284**, **no. 5415**, **pp. 770–76**, doi:10.1126/science.284.5415.770.
- Barolo, Scott, *et al.* 2002. "Default Repression and Notch Signaling: Hairless Acts as an Adaptor to Recruit the Corepressors Groucho and DCtBP to Suppressor of Hairless." *Genes and Development*, **vol. 16**, **no. 15**, **pp. 1964–76**, doi:10.1101/gad.987402.
- Becker, Daniel J., and John B. Lowe. 2003. "Fucose: Biosynthesis and Biological Function in Mammals." *Glycobiology*, **vol. 13**, **no. 7**, **pp. 41R–53R**, doi:10.1093/glycob/cwg054.
- Blacklow, Stephen C. 2017. "Signal Transduction: Notch Catches a Jagged Edge." *Nature Chemical Biology*, **vol. 13**, **no. 6**, Nature Publishing Group, **pp. 570–71**, doi:10.1038/nchembio.2379.
- Borggreffe, T., and F. Oswald. 2009. "The Notch Signaling Pathway: Transcriptional Regulation at Notch Target Genes." *Cellular and Molecular Life Sciences*, **vol. 66**, **no. 10**, **pp. 1631–46**, doi:10.1007/s00018-009-8668-7.
- Bravo, Alejandro, and Víctor M. Baizabal. 2005. "La Vía de Señalización Notch y El Desarrollo Embrionario Animal." *REB*, **vol. 24**, **no. 3,4**, **pp. 87–96**.
- Bray, Sarah. 2006. "Notch Signalling: A Simple Pathway Becomes Complex." *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, **vol. 7**, **no. 9**, **pp. 678–89**, doi:10.1038/nrm2009.
- Bray, Sarah J. 2016. "Notch Signalling in Context." *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, **vol. 17**, **no. 11**, Nature Publishing Group, **pp. 722–35**, doi:10.1038/nrm.2016.94.
- Bray, Sarah. 1998. "Notch Signalling in Drosophila: Three Ways to Use a Pathway." *Seminars in Cell and Developmental Biology*, **vol. 9**, **no. 6**, **pp. 591–97**, doi:10.1006/scdb.1998.0262.
- Cha, Xian-Yuan, *et al.* 1997. "NAC-1, a Rat Brain MRNA, Is Increased in the Nucleus

- Accumbens Three Weeks after Chronic Cocaine Self-Administration." *The Journal of Neuroscience*, **vol. 17**, **no. 18**, pp. 6864–6871, doi:10.1523/jneurosci.17-18-06864.1997.
- Contreras-Cornejo, Humberto, *et al.* 2016. "The CSL Proteins, Versatile Transcription Factors and Context Dependent Corepressors of the Notch Signaling Pathway." *Cell Division*, **vol. 11**, **no. 1**, BioMed Central, **p. 12**, doi:10.1186/s13008-016-0025-2.
- Coumailleau, Franck, and François Schweisguth. 2014. "Insensible Is a Novel Nuclear Inhibitor of Notch Activity in Drosophila." *PLoS ONE*, **vol. 9**, **no. 6**, pp. 1–10, doi:10.1371/journal.pone.0098213.
- Dai, Q., *et al.* 2013. "BEND6 Is a Nuclear Antagonist of Notch Signaling during Self-Renewal of Neural Stem Cells." *Development*, **vol. 140**, **no. 9**, pp. 1892–902, doi:10.1242/dev.087502.
- Dougherty, Dawne C., and Michel M. Sanders. 2005. "Comparison of the Responsiveness of the PGL3 and PGL4 Luciferase Reporter Vectors to Steroid Hormones." *BioTechniques*, **vol. 39**, **no. 2**, pp. 203–07, doi:10.2144/05392ST02.
- Duan, Hong, *et al.* 2011. "Insensitive Is a Corepressor for Suppressor of Hairless and Regulates Notch Signalling during Neural Development." *EMBO Journal*, **vol. 30**, **no. 15**, pp. 3120–33, doi:10.1038/emboj.2011.218.
- Egan, S. E., *et al.* 1998. "Notch Receptors, Partners and Regulators: From Conserved Domains to Powerful Functions." *Current Topics in Microbiology and Immunology*, **vol. 228**, pp. 273–324, doi:10.1007/978-3-642-80481-6_11.
- Fortini, Mark E. 2009. "Notch Signaling: The Core Pathway and Its Posttranslational Regulation." *Developmental Cell*, **vol. 16**, **no. 5**, Elsevier Inc., pp. 633–47, doi:10.1016/j.devcel.2009.03.010.
- Fortini, Mark E., and David Bilder. 2009. "Endocytic Regulation of Notch Signaling." *Current Opinion in Genetics and Development*, **vol. 19**, **no. 4**, pp. 323–28, doi:10.1016/j.gde.2009.04.005.
- Gordon, W. R., *et al.* 2008. "The Molecular Logic of Notch Signaling - a Structural and Biochemical Perspective." *Journal of Cell Science*, **vol. 121**, **no. 19**, pp. 3109–19, doi:10.1242/jcs.035683.
- Greenwald, Iva. 1998. "LIN-12/Notch Signaling: Lessons from Worms and Flies." *Genes and Development*, **vol. 12**, **no. 12**, pp. 1751–62, doi:10.1101/gad.12.12.1751.
- Hsieh, J. J., *et al.* 1999. "CIR, a Corepressor Linking the DNA Binding Factor CBF1 to the Histone Deacetylase Complex." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **vol. 96**, **no. 1**, pp. 23–28, doi:10.1073/pnas.96.1.23.
- Ilagan, Ma. Xenia G., and Raphael Kopan. 2007. "SnapShot: Notch Signaling Pathway." *Cell*, **vol. 128**, **no. 6**, pp. 1246.e1-1246.e2, doi:10.1016/j.cell.2007.03.011.

- Jafar-Nejad, Hamed, *et al.* 2010. "Role of Glycans and Glycosyltransferases in the Regulation of Notch Signaling." *Glycobiology*, **vol. 20**, **no. 8**, **pp. 931–49**, doi:10.1093/glycob/cwq053.
- Kadesch, Tom. 2000. "Notch Signaling: A Dance of Proteins Changing Partners." *Experimental Cell Research*, **vol. 260**, **no. 1**, **pp. 1–8**, doi:10.1006/excr.2000.4921.
- Kopan, Raphael. 2002. "Notch: A Membrane-Bound Transcription Factor." *Journal of Cell Science*, **vol. 115**, **no. 6**, **pp. 1095–97**.
- Kreusch, Andreas, *et al.* 1998. "The Shaker Potassium Channel." *Nature*, **vol. 392**, **no. 6679**, **pp. 945–48**, doi:10.1038/31978.
- Kuroda, Kazuki, *et al.* 2003. "Regulation of Marginal Zone B Cell Development by MINT, a Suppressor of Notch/RBP-J Signaling Pathway." *Immunity*, **vol. 18**, **no. 2**, **pp. 301–12**, doi:10.1016/S1074-7613(03)00029-3.
- Leong, K. G. 2005. "Recent Insights into the Role of Notch Signaling in Tumorigenesis." *Blood*, **vol. 107**, **no. 6**, **pp. 2223–33**, doi:10.1182/blood-2005-08-3329.
- Lewis, Julian. 1998. "Notch Signalling and the Control of Cell Fate Choices in Vertebrates." *Seminars in Cell and Developmental Biology*, **vol. 9**, **no. 6**, **pp. 583–89**, doi:10.1006/scdb.1998.0266.
- Li, Xinmin, *et al.* 1997. "Overexpression, Purification, Characterization, and Crystallization of the BTB/POZ Domain from the PLZF Oncoprotein." *Journal of Biological Chemistry*, **vol. 272**, **no. 43**, **pp. 27324–29**.
- Los, Georgyi V, *et al.* 2008. "HaloTag: A Novel Protein Labeling Technology for Cell Imaging and Protein Analysis." *ACS Chemical Biology*, **vol. 3**, **no. 6**, **pp. 373–82**.
- Maier, Dieter. 2006. "Hairless: The Ignored Antagonist of the Notch Signalling Pathway." *Hereditas*, **vol. 143**, **no. 2006**, **pp. 212–21**, doi:10.1111/j.2007.0018-0661.01971.x.
- Miyoshi, Eiji, *et al.* 2008. "Biological Function of Fucosylation in Cancer Biology." *Journal of Biochemistry*, **vol. 143**, **no. 6**, **pp. 725–29**, doi:10.1093/jb/mvn011.
- Mumm, Jeffrey S., and Raphael Kopan. 2000. "Notch Signaling: From the Outside In." *Developmental Biology*, **vol. 228**, **no. 2**, **pp. 151–65**, doi:10.1006/dbio.2000.9960.
- Nagel, A. C., *et al.* 2005. "Hairless-Mediated Repression of Notch Target Genes Requires the Combined Activity of Groucho and CtBP Corepressors." *Molecular and Cellular Biology*, **vol. 25**, **no. 23**, **pp. 10433–41**, doi:10.1128/mcb.25.23.10433-10441.2005.
- Nam, Yunsun, *et al.* 2002. "Notch Signaling as a Therapeutic Target." *Current Opinion in Chemical Biology*, **vol. 6**, **no. 4**, **pp. 501–09**, doi:10.1016/S1367-5931(02)00346-0.
- Oswald, Franz, *et al.* 2005. "RBP-J / SHARP Recruits CtIP / CtBP Corepressors To Silence Notch Target Genes." *Molecular and Cellular Biology*, **vol. 25**, **no. 23**, **pp. 10379–90**, doi:10.1128/MCB.25.23.10379.

- Oswald, Franz, *et al.* 2002. "SHARP Is a Novel Component of the Notch/RBP-Jkappa Signalling Pathway." *The EMBO Journal*, **vol. 21**, **no. 20**, pp. 5417–26, doi:10.1093/emboj/cdf549.
- Perrimon, Norbert, *et al.* 2012. "Signaling Mechanisms Controlling Cell Fate and Embryonic Patterning." *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, **vol. 4**, **no. 8**, p. a005975, doi:10.1101/cshperspect.a005975.
- Praxenthaler, Heiko, *et al.* 2017. "Hairless-Binding Deficient Suppressor of Hairless Alleles Reveal Su(H) Protein Levels Are Dependent on Complex Formation with Hairless." *PLoS Genetics*, **vol. 13**, **no. 5**, pp. 1–23, doi:10.1371/journal.pgen.1006774.
- Radtke, Freddy, and Kenneth Raj. 2003. "The Role of Notch in Tumorigenesis: Oncogene or Tumour Suppressor." *Nature Reviews Cancer*, **vol. 3**, **no. 10**, pp. 756–67, doi:10.1038/nrc1186.
- Reeves, Nick, and James W. Posakony. 2005. "Genetic Programs Activated by Proneural Proteins in the Developing Drosophila PNS." *Developmental Cell*, **vol. 8**, **no. 3**, pp. 413–25, doi:10.1016/j.devcel.2005.01.020.
- Rizzo, Paola, *et al.* 2013. "Cross-Talk between Notch and the Estrogen Receptor in Breast Cancer Suggests Novel Therapeutic Approaches." *Cancer Research*, **vol. 68**, **no. 13**, pp. 5226–35, doi:10.1038/ki.2012.40.Activation.
- Santos, Leticia, *et al.* 2006. "Vía de Señalización Notch y Nuevas Estrategias Para El Tratamiento de Cáncer." *Salud Publica de Mexico*, **vol. 48**, **no. 2**, pp. 155–65.
- Sathyan, K. M., *et al.* 2011. "A BEN-Domain-Containing Protein Associates with Heterochromatin and Represses Transcription." *Journal of Cell Science*, **vol. 124**, **no. 18**, pp. 3149–63, doi:10.1242/jcs.086603.
- Sauer, Frank, and Herbert Jäckle. 1993. "Dimerization and the Control of Transcription by Krüppel." *Nature*, **vol. 364**, **no. 6436**, pp. 454–57, doi:10.1038/364454a0.
- Saxena, Meera T., *et al.* 2001. "Murine Notch Homologs (N1-4) Undergo Presenilin-Dependent Proteolysis." *Journal of Biological Chemistry*, **vol. 276**, **no. 43**, pp. 40268–73, doi:10.1074/jbc.M107234200.
- Schwanbeck, Ralf, *et al.* 2011. "The Notch Signaling Pathway: Molecular Basis of Cell Context Dependency." *European Journal of Cell Biology*, **vol. 90**, **no. 6–7**, pp. 572–81, doi:10.1016/j.ejcb.2010.10.004.
- Stylianou, Spyros, *et al.* 2006. "Aberrant Activation of Notch Signaling in Human Breast Cancer." *Cancer Research*, **vol. 66**, **no. 3**, pp. 1517–25, doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-3054.
- Taniguchi, Yoshihito, *et al.* 2015. "LIM Protein KyoT2 Negatively Regulates Transcription by Association with the RBP-J DNA-Binding Protein." *Molecular and Cellular Biology*, **vol. 18**, **no. 1**, pp. 644–54, doi:10.1128/mcb.18.1.644.
- Vanderwielen, Bradley D., *et al.* 2011. "Transcriptional Repression in the Notch

- Pathway: Thermodynamic Characterization of CSL-MINT (Msx2-Interacting Nuclear Target Protein) Complexes." *Journal of Biological Chemistry*, **vol. 286**, **no. 17**, pp. 14892–902, doi:10.1074/jbc.M110.181156.
- Wang, Kai, *et al.* 2015. "PEST Domain Mutations in Notch Receptors Comprise an Oncogenic Driver Segment in Triple-Negative Breast Cancer Sensitive to a γ -Secretase Inhibitor." *Clinical Cancer Research*, **vol. 21**, **no. 6**, pp. 1487–96, doi:10.1158/1078-0432.CCR-14-1348.
- Xuan, C., *et al.* 2013. "RBB, a Novel Transcription Repressor, Represses the Transcription of HDM2 Oncogene." *Oncogene*, **vol. 32**, **no. 32**, pp. 3711–21, doi:10.1038/onc.2012.386.
- Yap, KL, and IM Shih. 2012. "NACC1 (Nucleus Accumbens Associated 1, BEN and BTB (POZ) Domain Containing)." *Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology*, **vol. 16**, **no. 10**, pp. 723–26, doi:10.4267/2042/48148.
- Yuan, Zhenyu, *et al.* 2019. "Structural and Functional Studies of the RBPJ-SHARP Complex Reveal a Conserved Corepressor Binding Site." *Cell Reports*, **vol. 26**, **no. 4**, ElsevierCompany., pp. 845–854.e6, doi:10.1016/j.celrep.2018.12.097.
- Yuan, Zhenyu, *et al.* 2016. "Structure and Function of the Su(H)-Hairless Repressor Complex, the Major Antagonist of Notch Signaling in *Drosophila Melanogaster*." *PLoS Biology*, **vol. 14**, **no. 7**, pp. 1–26, doi:10.1371/journal.pbio.1002509.
- Zehender, Ariella, *et al.* 2017. "Conservation of the Notch Antagonist Hairless in Arthropods: Functional Analysis of the Crustacean *Daphnia Pulex* Hairless Gene." *Development Genes and Evolution*, **vol. 227**, **no. 5**, Development Genes and Evolution, pp. 339–53, doi:10.1007/s00427-017-0593-4.
- Zhang, Yi, *et al.* 2012. "Dysfunction of Nucleus Accumbens-1 Activates Cellular Senescence and Inhibits Tumor Cell Proliferation and Oncogenesis." *Cancer Research*, **vol. 72**, **no. 16**, pp. 4262–75, doi:10.1158/0008-5472.CAN-12-0139.
- Zhang, Y., *et al.* 2017. "Nucleus Accumbens-Associated Protein-1 Promotes Glycolysis and Survival of Hypoxic Tumor Cells via the HDAC4-HIF-1 α Axis." *Oncogene*, **vol. 36**, **no. 29**, pp. 4171–81, doi:10.1038/onc.2017.51.