



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas**

Modulación de la vía de señalización Notch en la carcinogénesis  
cervical

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
Maestro en Ciencias

PRESENTA:  
MARÍA ALICIA ELENAÉ VÁZQUEZ ULLOA

TUTOR PRINCIPAL  
MARCELA LIZANO SOBERÓN  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR Y ENTIDAD O INSTITUCIÓN DE  
ADSCRIPCIÓN

ADRIANA CONTRERAS PAREDES  
INSTITUTO NACIONAL DE CANCEROLOGÍA  
ALEJANDRO MANUEL GARCÍA CARRANCA  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

MÉXICO, D. F.

Enero, 2013

Of. No. PMDCB/562/2012

**BIÓL. MARÍA ALICIA ELENAÉ VÁZQUEZ ULLOA**  
Alumno (a) de la Maestría en Ciencias Bioquímicas  
**P r e s e n t e**

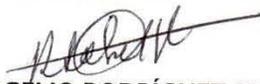
Los miembros del Subcomité Académico, en reunión ordinaria del día 18 de Junio del presente año, conocieron su solicitud de ASIGNACIÓN de JURADO DE EXAMEN para optar por el grado de MAESTRA EN CIENCIAS (BIOQUIMICA), con la tesis titulada “**Modulación de la vía de señalización Notch en la carcinogénesis cervical**”, dirigida por la Dra. Marcela Lizano Soberón.

De su análisis se acordó ratificar al jurado asignado:

|            |                                    |
|------------|------------------------------------|
| PRESIDENTE | Dr. Marco Antonio Cerbón Cervantes |
| VOCAL      | Dra. Elizabeth Langley McCarron    |
| VOCAL      | Dr. Vicente Madrid Marina          |
| VOCAL      | Dr. Mauricio Salcedo Vargas        |
| SECRETARIO | Dra. Leticia Rocha Zavaleta        |

Sin otro particular por el momento, aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

**Atentamente**  
“**POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU**”  
Cd. Universitaria, D.F., a 19 de Junio de 2012.  
**EL COORDINADOR DE ENTIDAD**

  
**DR. ROGELIO RODRÍGUEZ SOTRES**

C.c.p. Archivo

RRS:lgg



mdcbq@posgrado.unam.mx

## **AGRADECIMIENTOS**

- Al posgrado en Ciencias Bioquímicas UNAM por todo su apoyo durante mi formación académica**
- Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada durante el desarrollo de este trabajo**
- A la Dra. Marcela Lizano por sus enseñanzas y apoyo. Por tener una palabra de aliento en momentos difíciles, muchas gracias.**
- A la Dra. Adriana Contreras por todas las enseñanzas tanto profesionales como personales. Gracias por fomentar mi desarrollo y sobre todo por forjarme con rectitud y alegría.**
- Al Dr. Alejandro García Carranca por sus consejos y aportaciones durante el desarrollo de este trabajo.**
- A los Dres. Leticia Rocha, Elizabeth Langley, Mauricio Salcedo, Vicente Madrid y Marco Antonio Cerbón por sus valiosos comentarios y aportaciones.**

**La elaboración de este trabajo fue financiado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología  
(CONACYT CB-2010-01) proyecto 151493.**

**Esta tesis fue realizada en el Instituto Nacional de Cancerología**

*A mi mama por darme la vida  
A la vida por darme una segunda oportunidad  
Y a la oportunidad de haberte encontrado Luis Zapata*

*Gracias*

## DEDICATORIAS

- **A Dios y a la vida por darme una segunda oportunidad para estar y ser feliz, permitiéndome llegar a este momento de satisfacción personal.**
- **A mi mapa por acompañarme a lo largo de este camino lleno de obstáculos que has ido superando conmigo. Gracias por enseñarme que la vida no es justa pero aun así esta padre vivirla. Mi trabajo entero te lo debo y te lo dedico.**
- **Mi amigo, mi confidente, mi novio, mi prometido, mi esposo: gracias Zapata por enseñarme a ser paciente y a tener fe. Por estar a mi lado con una sonrisa sin importar lo feo del panorama. Gracias por entender y apoyar lo que hago. TA**
- **LKY gracias por estar cuando tanto lo he necesitado, por enseñarme que la distancia también nos une. Te quiero!**
- **Nina eres el complemento ideal de esta familia maravillosa que tengo. Gracias por estar aquí.**
- **A ese amiguito inseparable que me ha enseñado a respetar aun mas a la vida y ahora también a su compañera por mostrarme que siempre se puede hacer algo por ayudar: Darwin y Curie.**
- **Al resto de mi familia: tíos y primos en especial a Liz porque me hizo recobrar la confianza en la familia y Álvaro por los buenos momentos vividos.**
  - **Gilda gracias por enseñarme a levantar y a no llorar.**
  - **Dora gracias por las risas y los llantos. Por ser mi Dra\_**
- **Yadira mi compañera de viaje y de fiestas, gracias por ponerle alegría a mis días.**
- **A mis amigos que en la distancia se que por ahí andan: Carlos, Sofia, araña de arañas (Marina), Rose, Daniel.**
- **Al Dr. Avilés muchas gracias por su opinión tanto profesional como personal y por su apoyo en momentos difíciles.**
- **A los médicos, enfermeras y sobre todo a los pacientes del INCAN porque su lucha también es mi lucha.**

## ÍNDICE

|  |           |
|--|-----------|
| <b>INTRODUCCION</b>  |           |
| <b>1. EL CANCER CERVICO UTERINO</b>  | <b>8</b>  |
| <b>1.1. GENOMA VIRAL</b>   | <b>8</b>  |
| <b>2. ONCOPROTEINA E6 Y SUS BLANCOS CELULARES</b>  | <b>9</b>  |
| <b>2.1. PROTEINA SUPRESORA DE TUMOR hDIg</b>   | <b>10</b> |
| <b>2.2. hDIg EN LA CARCINOGENESIS CERVICAL</b>   | <b>11</b> |
| <b>3. UNIONES NO CANONICAS DE LOS DOMINIOS PDZ</b>                                       | <b>11</b> |
| <b>3.1. NUMB:PROTEINA CON DOMINIO PTB</b>  | <b>13</b> |
| <b>3.2. NUMB: REGULADOR NEGATIVO DE LA VIA DE SEÑALIZACION NOTCH</b>                     | <b>14</b> |
| <b>3.3. NUMB EN LA CARCINOGENESIS CERVICAL</b>   | <b>15</b> |
| <b>4. VIA DE SEÑALIZACION NOTCH</b>  | <b>15</b> |
| <b>5. JUSTIFICACION</b>  | <b>18</b> |
| <b>6. HIPOTESIS</b>  | <b>18</b> |
| <b>7. OBJETIVO GENERAL</b>   | <b>19</b> |
| <b>8. OBJETIVOS PARTICULARES</b>   | <b>19</b> |
| <b>9. METODOLOGIA</b>  |           |
| <b>9.1 CULTIVO CELULAR</b>   | <b>19</b> |
| <b>9.2 EXTRACCION DE ARN Y ENSAYO DE EXPRESION RT-PCR</b>                                | <b>19</b> |
| <b>9.3 WESTERN BLOT Y EXTRACCION DE PROTEINAS</b>  | <b>20</b> |
| <b>9.4 ANALISIS DENSITOMETRICO</b>   | <b>21</b> |
| <b>9.5 CO-INMUNOPRECIPITACION</b>  | <b>21</b> |
| <b>9.6 INMUNOCITOQUIMICA</b>   | <b>22</b> |
| <b>10. RESULTADOS</b>  |           |
| <b>10.1 EXPRESIÓN Y LOCALIZACION DE LA PROTEÍNA hDIg EN LAS LÍNEAS CELULARES DE CaCU</b> | <b>23</b> |
| <b>10.2 EXPRESIÓN Y LOCALIZACIÓN DE LA PROTEÍNA NUMB EN LAS LÍNEAS CELULARES DE CaCU</b> | <b>25</b> |
| <b>10.3 UNION DE LAS PROTEINAS hDIg-NUMB EN LINEAS DE CaCU</b>                           | <b>26</b> |
| <b>10.4 EXPRESION Y LOCALIZACION DE NOTCH-1 Y NICD EN CELULAS DE CaCU</b>                | <b>27</b> |
| <b>11. DISCUSION</b>   | <b>29</b> |
| <b>12. CONCLUSIONES</b>  | <b>35</b> |
| <b>13. ANEXO</b>   | <b>36</b> |
| <b>15. BIBLIOGRAFIA</b>  | <b>37</b> |

## **INTRODUCCION**

### **1. EL CANCER CERVICO UTERINO**

El cáncer cérvico uterino (CaCU) representa un gran reto para los servicios de salud a nivel mundial. En el año 2008 se registraron 529,800 nuevos casos con una tasa de mortalidad del 52%; este cáncer es más frecuente en los países en vías de desarrollo, en donde son diagnosticados más del 85% de los casos. [1]. En México, el CaCU es la segunda neoplasia más común entre las mujeres, con una incidencia anual en el 2010 de 10186 nuevos casos [2].

La infección persistente por Virus del Papiloma Humano (VPH) es el factor etiológico principal en el desarrollo de CaCU [3]. Existen más de 100 tipos de VPH divididos en dos grupos: 1) VPHs de bajo riesgo los cuales no pueden causar CaCU pero pueden causar verrugas genitales; los tipos 6 y 11 son los responsables de aproximadamente el 90% de las verrugas genitales. 2) VPHs de alto riesgo (VPH-AR) los cuales pueden generar anomalías celulares que resulten en CaCU [4]. Entre los VPH-AR, los virus tipo 16 y 18 son los más comunes entre las mujeres que padecen este cáncer (50.5% y 13.1% respectivamente) [1].

#### **1.1 GENOMA VIRAL**

Los virus del papiloma son pequeños virus de ADN de doble cadena, sin envoltura, cuyo genoma está constituido por aproximadamente 7200-8000 pb y se divide en tres regiones: la región de expresión temprana E (Early), la cual codifica para las proteínas virales (E1, E2, E4, E5, E6 y E7), necesarias para la replicación viral y la regulación de la transcripción, así como la transformación e inmortalización celular; una región de expresión tardía L (Late), que codifica para proteínas estructurales (L1 y L2) y una región reguladora conocida como región larga de control o LCR (Long Control Region), que contiene la secuencia de ADN que controla la replicación y la expresión del genoma viral [5]. El mecanismo de acción de los VPH-AR en el desarrollo de la neoplasia cervical, se explica principalmente por la acción de sus oncoproteínas virales E6 y E7. La expresión continua de estos genes es requisito indispensable para mantener el fenotipo maligno de las células del cérvix [6].

En el CaCU las proteínas pRB y p53, están inhabilitadas por la acción de las oncoproteínas E6 y E7. E6 forma un complejo con la proteína p53 e induce su degradación por la vía de la ubiquitina [7]; E7 interactúa con el gen del retinoblastoma (pRB) favoreciendo su degradación a través del proteasoma [8]. Ambos eventos previenen el arresto del ciclo celular en la fase G1 y/o la apoptosis en respuesta a un daño al ADN celular, lo cual contribuye a la transformación celular. Sin embargo, se ha determinado que la inactivación de p53 y pRb, no son suficientes para inducir una transformación celular total [9]. Otro factor importante que participa en la tumorigénesis cervical es la interacción entre la oncoproteína E6 y las proteínas poseedoras de dominios PDZ [10].

## **2. ONCOPROTEÍNA E6 Y SUS BLANCOS CELULARES**

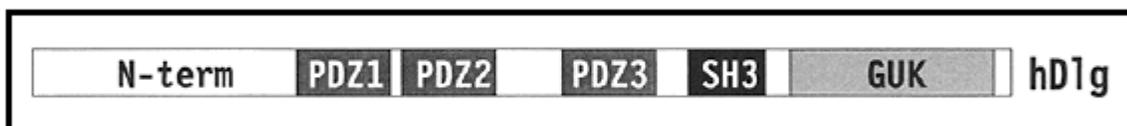
La proteína E6 está formada por aproximadamente 150 aminoácidos y contiene dos motivos de dedos de zinc. Esta oncoproteína tiene la capacidad de unirse a un sinfín de blancos celulares lo que le permite bloquear la apoptosis, regular la transcripción viral, abatir la diferenciación celular y las interacciones célula-célula e incrementar la inestabilidad cromosómica [11].

A la fecha se han caracterizado diversas proteínas PDZ blanco de la proteína E6 de los VPH-AR, entre las que se encuentran MAGI-1, MAGI-2, MUPP1, PATJ, y hDlg [12]. E6, a través de su extremo C-terminal, es capaz de unirse a alguno de los dominios PDZ presentes en estas proteínas y mediar su degradación vía el proteosoma 26s [13]. Sin embargo, los diferentes VPH-AR difieren en su capacidad para degradar a estas proteínas: el VPH tipo 18 se une de manera más eficiente a las proteínas PDZ en comparación al VPH tipo 16, esto debido a un simple cambio de aminoácido [14].

Son varios los virus que interactúan con proteínas con dominios PDZ, entre estos no solo figuran virus oncogénicos, sino también virus como el de la influenza, dengue, rabia, entre otros. Por lo que se ha visto que la disrupción de las proteínas PDZ es un mecanismo ampliamente utilizado por los virus para favorecer su replicación, diseminación, transmisión y carcinogénesis [15,16].

## 2.1 PROTEINA SUPRESORA DE TUMOR hDlg

La proteína hDlg fue la primera proteína PDZ descrita como blanco de E6 [15]. hDlg es la proteína supresora de tumor homóloga del disco largo de *Drosophila* o también conocida como SAP97 (Synapse Associated Protein) [17]; es miembro de la familia MAGUK (*Membrane Associated Guanylate Kinases homologues*). Las proteínas comprendidas en esta familia se localizan en las regiones de unión célula – célula (uniones estrechas o *tight junctions*) en donde se comportan como proteínas de andamiaje celular formando complejos moleculares a través de sus dominios de unión entre proteínas [18]. hDlg está formada por 3 dominios PDZ en su extremo amino-terminal, un motivo SH3 central en su extremo carboxilo-terminal y un dominio GUK (homóloga de guanilato-cinasa) (Fig. 1)[19].



**Figura 1. Organización de la proteína hDlg.** La proteína hDlg está conformada por un extremo N – terminal, tres dominios PDZ de unión entre proteínas; un dominio homólogo a Src3 (SH3) y un dominio GUK al cual no se le conoce función enzimática. **Modificado de Lue 1996 [19].**

Se conocen diversos productos de procesamiento alternativo para esta proteína: en el extremo N-terminal se encuentra la región de procesamiento I1A e I1B; entre el dominio SH3 y el dominio GUK se encuentran las regiones de inserción desde I2-I5 [20]. Existen pocos estudios acerca de la función de las isoformas de hDlg, pero se sabe que I2 se localiza en el núcleo en donde se cree podría tener funciones en la señalización; mientras que la isoforma I3 se encuentra en las membranas de los queratinocitos manteniendo la arquitectura celular [21].

hDlg se encuentra implicada en el crecimiento, adhesión y polaridad celular, tanto en tejido embrionario como adulto [22]. Al ser una proteína de andamiaje, se encuentra relacionada con la transducción de señales, la división asimétrica, proliferación, diferenciación y migración celular [23, 24]. Entre los complejos formados por hDlg destacan el integrado por hDlg-APC (Adenomatous Polyposi Coli) el cual bloquea el ciclo celular [25], la unión con E-caderina a través de la cual regula la adhesión y la interacción con la proteína 4.1 con lo que forma parte de la dinámica del citoesqueleto [20].

### **2.1.2. hDlg EN LA CARCINOGENESIS CERVICAL**

E6 se une a través de su extremo C-terminal, al PDZ 2 de hDlg [26]; esta unión dirige la degradación proteosómica de hDlg, aunque a la fecha no se conoce la ligasa de ubiquitina responsable [27]. Ahora bien, algunos estudios demuestran que la degradación de hDlg depende de su estado de fosforilación, ya que E6 induce la degradación preferencialmente a las formas hiperfosforiladas de la proteína [28,29].

Existen varios trabajos acerca del papel de hDlg en la carcinogénesis cervical, todos ellos con resultados similares: en el 2002, Watson et al. [30] mostró mediante un estudio inmunohistoquímico la acumulación citoplásmica de hDlg en lesiones de alto grado de cérvix; Lin et al. en 2004 [31] menciona que los cambios en la expresión de hDlg no están relacionados al tipo de VPH presente en la lesión. También en el 2004 Cavatorta et al. [32] propone a hDlg como un marcador tardío en la carcinogénesis cervical, en un estudio posterior se concluye que la deslocalización de hDlg en CaCU repercute en la localización de la fosfatasa PTEN debido a que la unión entre estas dos proteínas se ve afectada por la relocalización citoplásmica de hDlg[33].

De igual forma, ha sido evaluada la expresión de hDlg en líneas derivadas de CaCU, con lo que se ha visto que las líneas positivas a VPH, HeLa y CaSki muestran expresión tanto del transcrito como de la proteína, mientras que la línea C33, negativa a VPH, muestra bajos niveles del transcrito y la proteína. En principio, las células no sincronizadas muestran expresión similar de hDlg independientemente de la presencia de VPH, lo que sugiere que la degradación de hDlg por VPH se lleva a cabo en un momento preciso del ciclo celular [22].

### **3. UNIONES NO CANÓNICAS DE LOS DOMINIOS PDZ.**

Los repetidos PDZ son dominios de aproximadamente 90 aminoácidos que deben su nombre a las primeras tres proteínas en donde fueron descritos (PSD-95,Dlg y ZO) [34]; son también conocidos como regiones homólogas del disco largo (DHRs en inglés) o repetidos GLGF debido los cuatro residuos bien conservados en el dominio [35].

Estudios recientes clasifican a los repetidos PDZ en tres grupos según la secuencia que reconocen:

1. Dominios clase 1. Reconocen el motivo S/T-X- $\Phi$ .
2. Dominios clase 2. Reconocen el motivo  $\Phi$ -X- $\Phi$ .

### 3. Dominios clase 3. Reconocen el motivo D/E-X-Φ.

Estos dominios encontrados en el extremo C-terminal, son llamados dominios de unión a PDZ (PBD por sus siglas en inglés) en donde Φ representa un residuo hidrofóbico y X cualquier aminoácido [15,36].

Trabajos recientes muestran que los dominios PDZ pueden unirse a secuencias diferentes a las PDMs. En particular se tratarán los ejemplos conocidos de la unión entre dominios PDZ y los dominios PTB (Phosphotyrosine Binding Domains). El dominio de unión a fosfotirosinas, también llamado dominio de interacción a fosfotirosinas o simplemente PTB, es un módulo de interacción proteína-proteína de aproximadamente 100-170 aminoácidos [37]. A la fecha se reconocen alrededor de 60 proteínas humanas que codifican dominios PTB [38]. Inicialmente estos dominios fueron identificados como alternativos al dominio SH2 el cual también reconoce tirosinas fosforiladas [39]. La diferencia entre los dominios SH2 y PTB radica en el contexto de reconocimiento: el primero determina su especificidad por residuos presentes en el extremo C-terminal, mientras que el segundo reconoce residuos en el extremo N-terminal posterior a la tirosina fosforilada [40].

Los dominios PTB se unen preferentemente al motivo NPXpY acompañado de aminoácidos hidrofóbicos en el extremo N-terminal [39]. Según su estructura, estos dominios han sido clasificados en tres familias [41]:

1. Tipo sustrato del receptor 1 de insulina (IRS-1)/Dok.
2. Tipo Shc.
3. Tipo Dab.

Sin embargo, los dominios PTB son capaces de unirse a secuencias NPXY no fosforiladas e inclusive a motivos diferentes a NPXY [37]. Los miembros de las familias Shc e IRS-1/Dok se unen con mayor afinidad a residuos fosforilados. Por otro lado, los miembros de la familia Dab reconocen preferencialmente motivos no fosforilados. A esta última familia pertenece la proteína NUMB de la cual se hablará más adelante [41].

La habilidad que presentan las proteínas con dominios PTB de unirse tanto a péptidos fosforilados y no fosforilados, involucra a estas proteínas en una diversidad de funciones celulares [40].

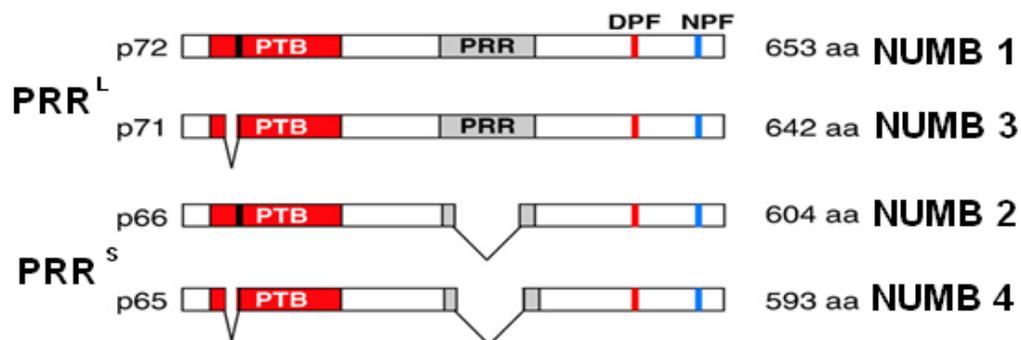
Participan en los procesos de desarrollo neuronal, inmunidad, homeostasis y crecimiento, por lo que sus mutaciones también se ven reflejadas en patologías como accidentes cerebrovasculares, hipercolesterolemia, enfermedad coronaria, Alzheimer, diabetes y cáncer renal [38].

A la fecha se conocen dos ejemplos de uniones PDZ-PTB: 1) La ligasa de ubiquitina LNX, cuya estructura cuenta con cuatro dominios PDZ, se une a partir del PDZ1 al dominio PTB de la proteína de destino celular NUMB [42]. 2) La proteína supresora de tumor Scribble cuenta también con cuatro dominios PDZ, el último de los cuales es capaz de unirse al dominio PTB presente en la proteína adaptadora NOS1AP [43]. Aunque no se conocen más ejemplos, es posible que este tipo de interacciones sean más comunes de lo que se piensa.

### 3.1 NUMB: PROTEINA CON DOMINIO PTB

La proteína NUMB es un ejemplo de proteína PTB que no requiere tirosinas fosforiladas para su unión [41]. La proteína NUMB fue la primera molécula descrita como determinante del destino celular al ser segregada asimétricamente durante la división celular. Originalmente identificada en *Drosophila*, trabajos posteriores han demostrado su importancia en mamíferos [44].

La palabra NUMB significa adormecimiento [45], y su nombre se debe al hecho que la pérdida de su función, en *Drosophila*, provoca una dramática pérdida de las neuronas sensoriales, con lo que las moscas se ven “adormecidas” [46]. Si bien en *Drosophila* no hay procesamiento alternativo de NUMB, el genoma de los mamíferos codifica para cuatro isoformas de la proteína NUMB, que van de los 65-72KDa (Fig.2) [47].



**Figura 2. Proteínas NUMB de mamíferos.** La proteína NUMB está conformada por un dominio PTB terminal, un sitio rico en prolinas (PRR) y dos regiones homologas al dominio Eps15 (DPF y NPF). Modificado de Gulino 2010 [47].

El procesamiento alternativo afecta tanto al dominio PTB como PRR. Una inserción de 48 aminoácidos en la región PRR genera a las proteínas NUMB1 (p72) y NUMB3 (p71) ambas llamadas NUMB-PRR<sub>L</sub> (large); las isoformas NUMB3 (p66) y NUMB4 (p65) no cuentan con esta inserción, estas dos últimas son las isoformas NUMB-PRR<sub>S</sub> (short). Una inserción de 11 aminoácidos en la región PTB también se identifica en dos de las isoformas [47]. Sin embargo en el 2010, Karaczyn et al. [48] demostró la existencia de dos productos de procesamiento adicionales (NUMB5 y NUMB6) los cuales no cuentan con la región PRR; estas formas son transitorias y raras en tejido normal pero abundantes en células transformadas y cancerosas.

Ahora bien, las funciones de NUMB son tan diversas como el número de isoformas. Existe una diferencia fundamental entre las formas PRR<sup>L</sup> y PRR<sup>S</sup>, al menos en el linaje neuronal, las proteínas PRR<sup>S</sup> se relacionan con la diferenciación, mientras tanto, las moléculas PRR<sup>L</sup> se relacionan con la proliferación de células, esto lógicamente ligado a procesos de señalizaciones diferentes [49]. La localización de estas formas de la proteína NUMB también varía, ya que las formas con el PTB largo se sitúan en la membrana celular, mientras que las formas cortas se encuentran en el citoplasma, lo que habla también de la diferencia en sus funciones [50].

La estructura modular de NUMB la convierte en una proteína adaptadora la cual interactúa con diversas moléculas. Por ejemplo, su dominio PTB le permite unirse a ligasas de ubiquitina con lo que participa en la degradación proteolítica, endocitosis, adhesión celular, migración, renovación de células madre y como ya se había mencionado anteriormente, en la división asimétrica y destino celular; además forma parte de vías de señalización como la de p53, Hedgehog y Notch [46,47]. Esta última vía es de particular interés para el presente trabajo por lo se dedicara un apartado especial a ella.

### **3.2 NUMB: REGULADOR NEGATIVO DE LA VIA DE SEÑALIZACION NOTCH**

NUMB fue originalmente identificada como modulador negativo de la vía de señalización Notch en *Drosophila* [47]. En la mosca, durante el desarrollo del sistema nervioso periférico, NUMB se localiza asimétricamente en las células a dividirse, con lo que, posterior a la citocinesis se segrega de manera diferencial entre las células resultando a su vez en cambios en la expresión de Notch: las células carentes de NUMB expresarán Notch y viceversa [51].

En mamíferos, la historia es similar: NUMB antagoniza la vía de señalización Notch, aunque los mecanismos no son del todo claros (Fig. 3) [52]. NUMB, a través de su dominio PTB, co-localiza a diversas proteínas encargadas de modular a Notch [53]. Por ejemplo, NUMB es capaz de unirse a la ligasa de ubiquitina Itch, lo que provoca la ubiquitinización de Notch. Ahora bien, la sobreexpresión de NUMB promueve la degradación de NICD, que es la forma activa del receptor que ya no se encuentra unida a la membrana [46]. Además es importante señalar que se ha demostrado la unión directa entre NUMB y NICD, la cual es dependiente del dominio PTB [52]. Finalmente NUMB también participa en la endocitosis del receptor Notch, con lo que regula los niveles superficiales en membrana, y por ende, la disponibilidad de este para ser activado por alguno de sus ligandos [54].

### **3.3 NUMB EN LA CARCINOGENESIS CERVICAL**

Desde su descubrimiento en *Drosophila*, NUMB ha sido definida como proteína supresora de tumor [48]. En el cáncer de mama se ha visto que la regulación negativa de Notch a partir de NUMB, se ve perdida en alrededor del 50% de los carcinomas mamarios debido a la intensa degradación de NUMB en esta neoplasia [55]. Por otro lado, NUMB favorece la expresión de p53 al impedir su degradación mediada por Mdm2 (NUMB se une a Mdm2 a través de la misma región de unión a p53), por lo que la perdida de la expresión de NUMB en el cáncer de mama, se inactiva la vía de p53 [55, 56]. Además, las neoplasias donde se bloquea la vía Notch, responden mejor a tratamiento siempre y cuando NUMB esté presente [53,55].

En el caso del desarrollo de CaCU, la proteína NUMB ha sido pobremente estudiada, el único trabajo publicado al respecto es de Chen en el 2009 [57] donde se demuestra que las isoformas NUMB-PRR<sub>L</sub> son las de mayor expresión génica en los carcinomas epidermoides.

## **4. VÍA DE SEÑALIZACION NOTCH.**

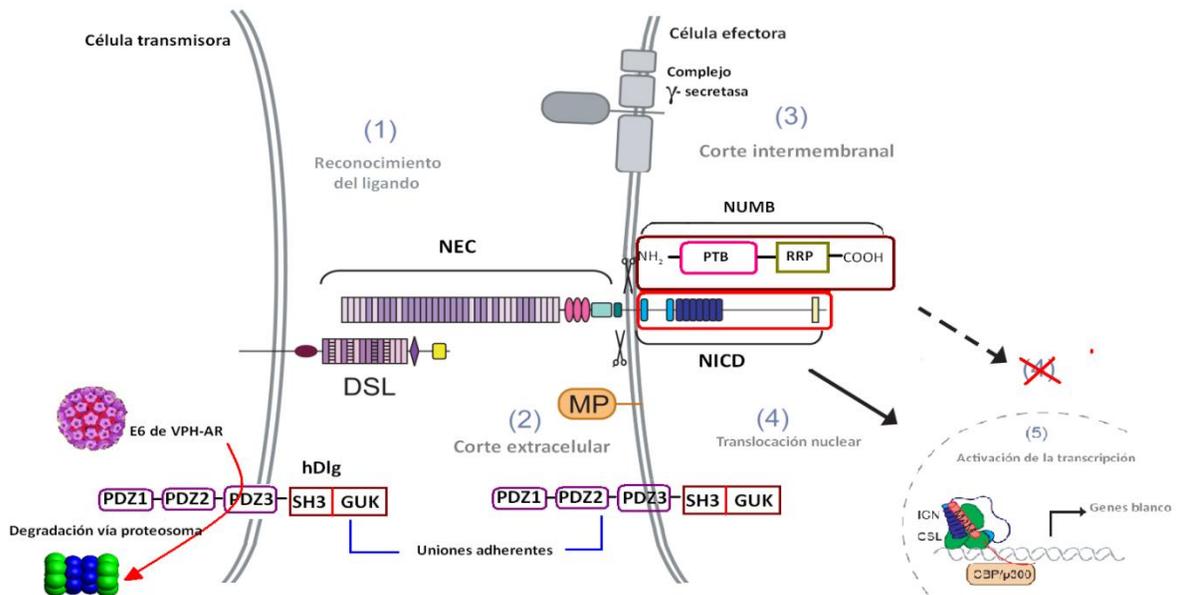
La vía de señalización Notch es una importante forma de comunicación intercelular, que controla diversos procesos biológicos dependiendo del contexto celular y estadio del desarrollo. Posiblemente las funciones más caracterizadas de Notch son la inhibición lateral, proceso central en la determinación del destino celular [58,59] y la división asimétrica de las células, mediante la cual resulta una progenie diferente con solo una división celular [60]. Esta vía también se encuentra relacionada con la diferenciación de queratinocitos al inducir la expresión de

marcadores tempranos de diferenciación y al regular la expresión de p21 [61, 62]. Controla la diferenciación y número de células madre [63]. Las alteraciones en esta vía se presentan en diversas enfermedades humanas como el síndrome de Alagille, el síndrome de CADASIL, distosis espondilocostal [58] y en enfermedades degenerativas como Alzheimer [64] y cáncer. En esta última se ha visto puede comportarse tanto como oncogén o como supresor tumoral [65].

Los receptores Notch son proteínas transmembranales del tipo I, en mamíferos se codifican 4 receptores (Notch 1-4) de aproximadamente de 300 KDa cada uno [66]. El producto de estos genes es modificado post-transcripcionalmente en el aparato de Golgi produciendo una proteína con 3 dominios: el intracelular (IC, regula la actividad del receptor), el transmembranal (TM, le permite anclarse a la membrana) y el extracelular (EC, contiene entre 29-36 repetidos tipo factor de crecimiento epidermal EGF los cuales regulan la unión a los ligando) [67].

A la fecha, en mamíferos se han caracterizado 5 ligandos denominados DSL (por los ligandos Delta y Serrate en *Drosophila* y LAG-2 de *Caenorhabditis elegans*) [68]. Los ligandos DSL canónicos son proteínas de superficie celular que, al igual que Notch, tienen múltiples repeticiones en tándem de EGF necesarios para su unión al receptor. Basado en la homología estructural con Delta y Serrate de *Drosophila*, los ligandos en mamíferos son designados como “Delta-like” (Dll1, Dll3 y Dll4) o “Serrate-like” conocidos como Jagged1 y Jagged2 [69].

La unión del ligando al receptor Notch, activa dos complejos enzimáticos: la metaloproteasa ADAM/TACE y el denominado complejo  $\gamma$ -secretasa. El primero, realiza un corte a nivel del dominio EC y el segundo libera el fragmento intracelular, el cual se transloca al núcleo e interactúa, como un co-activador, con las proteínas de la familia CLS (CBF-1/ Lag-1/Suppressor of Hairless), que regulan la transcripción de genes como los de la familia HES (*Hairy and Enhancer of Split*), y HRT/HERP/Hey (familia “*basic helix-loop-helix-Orange*”), IL-4, p21 y ciclina D1 (Fig. 3) [70].



**Figura 3. Vía canónica de Notch y regulación negativa por la proteína NUMB.** La vía de señalización Notch se desencadena tras la unión del ligando (DSL) al receptor (Notch 1-4) (1), esto activa dos complejos enzimáticos (2 y 3) que liberan el fragmento intracelular del receptor (NICD: Notch Intracellular domain) (4), el cual se transloca al núcleo y regula la transcripción de diversos genes (5). El NICD es regulado negativamente por la proteína NUMB. La proteína de uniones celulares, hDlg, es blanco de la oncoproteína E6 de los VPH-AR. **Modificado de Gordon 2008 [70].**

Con respecto al papel de Notch en el desarrollo del cáncer en los últimos años, se ha identificado la sobreexpresión de componentes de esta vía en una gran variedad de carcinomas humanos, incluyendo leucemias [60], neuroblastomas [71], cáncer de mama [72], carcinomas renales [73] y cáncer pulmonar [74], entre otros. En el desarrollo del CaCU, los resultados son controversiales, ya que algunos trabajos concluyen que esta vía se comporta como oncogén, mientras que otros le atribuyen un papel de supresor. En el cuadro 1 se muestran algunos de los trabajos al respecto.

**Cuadro 1. Notch en la carcinogénesis cervical**

| NOTCH COMO SUPRESOR DE TUMOR   | Autor [referencia] |
|--|--------------------|
| La disminución en la actividad de la vía Notch-1 en líneas derivadas de CaCU, es necesaria para la expresión sostenida de E6/E7 y para las etapas finales de la transformación maligna.                      | Talora 2002 [75]   |
| En células positivas a VPH, la activación de Notch-1 reprime la expresión de E6/E7, debido a la modulación de (AP)-1, con lo que se restituyen los niveles de p53 y se bloquea la hiperfosforilación de pRb. | Talora 2005 [76]   |
| La sobreexpresión de NICD 1 induce arresto en el ciclo celular. Reduce la transcripción del VPH al suprimir a proteínas activadoras como (AP)-1.   | Wang 2007 [77]     |

|   |                     |
|---|---------------------|
| La expresión de Notch1 se reduce en las neoplasias escamosas, en comparación con las células basales normales. La reducción de Notch1 evita la diferenciación terminal y por lo tanto permite la formación de epitelios inmaduros.                  | Sakamoto 2012 [78]  |
| <b>NOTCH COMO ONCOGÉN</b>   |                     |
| Tanto los tumores escamosos como los adenocarcinomas presentan una intensa expresión inmunohistoquímica   | Zagouras 1995 [79]  |
| NICD1 sinergiza con los oncogenes virales para la transformación e inmortalización, además de generar resistencia a la anoikis.   | Rangarajan 2001[80] |
| Niveles moderados de Notch-1, exhiben propiedades oncogénicas que transforman células primarias que contienen las proteínas E6 y E7 de VPH 16. Además niveles de NICD son detectados en líneas derivadas de CaCU (C33, S12, W12, SiHa, HeLa, C4-1). | Lathion 2003 [81]   |
| NICD 1 induce la proliferación a través de la ciclina D1 y genera resistencia a la apoptosis.   | Nair 2003 [82]      |

## 5. JUSTIFICACIÓN

Debido a las controversias que existen acerca del papel de la vía de señalización Notch en el desarrollo de CaCU, resulta importante entender más a fondo la regulación de esta vía. La proteína NUMB se muestra como clave en el entendimiento de la cascada Notch, su capacidad de unirse a diversos blancos celulares la sitúan en el centro de la modulación. Evidencias sugieren la posible unión de NUMB con blancos anteriormente no descritos como lo es la proteína supresora hDIg. Dicha unión podría ser clave en la regulación de la vía Notch durante la carcinogénesis cervical.

## 6. HIPÓTESIS

La vía de señalización Notch-1 está regulada por la proteína hDIg a través de su unión con la proteína NUMB en el cáncer cervical.

## **7. OBJETIVO GENERAL**

Determinar la participación de hDlg en la regulación de la vía de señalización Notch-1, en líneas derivadas de CaCU.

## **8. OBJETIVOS PARTICULARES**

- Evaluar la expresión génica de Notch-1 en las líneas derivadas de CaCU y en las líneas Hek293.
- Determinar los niveles de las proteínas Notch-1 (total y activa), hDlg y NUMB en líneas celulares derivadas de CaCU y en HEK-293.
- Evaluar la expresión de NICD, hDlg y NUMB en las líneas celulares anteriores mediante inmunocitoquímica
- Establecer la posible unión entre las proteínas hDlg y NUMB en las líneas celulares.

## **9. METODOLOGÍA**

### **9.1 CULTIVO CELULAR**

En este trabajo se emplearon las líneas celulares: HEK 293T/17 (queratinocitos fetales de riñón); HeLa y C-4 1 (adenocarcinoma y carcinoma de cérvix, positivas para VPH-18 respectivamente), CaSki (carcinoma de cérvix positiva para VPH-16) y C33 (línea celular de CaCU sin VPH). Estas líneas celulares se crecieron en medio de cultivo (DMEM GIBCO), suplementado con 8% de Suero Bovino Fetal (SBF, GIBCO). Se mantuvieron en una atmósfera húmeda al 5% de CO<sub>2</sub> y a una temperatura de 37°C.

### **9.2 EXTRACCIÓN DE ARN Y ENSAYO DE EXPRESIÓN RT-PCR**

Con el fin de conocer la expresión del gen Notch-1 en las líneas utilizadas, se realizaron ensayos de RT-PCR (Reverse Transcription Polimerase Chain Reaction), en donde una hebra de ARN es transcrita de manera reversa en ADN complementario (cADN). Para esto, se extrajo el ARN total de cada línea celular utilizando el kit RNeasy Mini Kit (Qiagen) el cual permite la purificación a partir de micro columnas de sílice. Las muestras de ARN se trataron con DNAsa (20U/μl) (DNA-free Ambion) para eliminar una posible contaminación ADN celular. La concentración de ARN se determinó mediante espectrofotometría. La calidad del ARN se verificó por electroforesis en geles de agarosa con tinción de bromuro de etidio.

Se utilizaron 2µg de ARN total para llevar a cabo la reacción de RT-PCR mediante el GeneAmp RNA PCR Kit (Applied Biosystems) el cual incluye la transcriptasa reversa MuLv. El cADN resultante se amplificó mediante ensayos de PCR con el uso de la ADN polimerasa AmpliTaq Gold (Applied Biosystems) con oligonucleótidos específicos, la secuencia de estos se muestra en el cuadro 2 [83]. Se empleó la expresión de β-actina como control.

**Cuadro 2. Oligonucleótidos específicos para Notch-1**

|                                    |                                    |
|------------------------------------|------------------------------------|
| <b>Oligonucleótido sentido</b>     | <b>5'- CAACATCCAGGACAACATGG-3'</b> |
| <b>Oligonucleótido antisentido</b> | <b>3'- TTGTTAGCCCCGTTCTTCAG-5'</b> |

### **9.3 WESTERN BLOT Y EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS**

Para evaluar la expresión de las proteínas Notch-1 (receptor y NICD), hDlg y NUMB se realizaron ensayos de Western Blot con anticuerpos específicos para cada una de estas proteínas. Para ello, las células fueron crecidas en cajas de 75cm<sup>2</sup>, hasta alcanzar una confluencia aproximada del 90%. Posteriormente, las células fueron lavadas con PBS (ver anexo) y despegada la monocapa con 3ml de Tripsina (0.05% Tripsina-EDTA, Gibco).

La obtención de las proteínas totales se realizó con 100µl de solución RIPA (ver anexo) con 10% de inhibidores de proteasas (Protease inhibitor Cocktail, SIGMA) (ver anexo), los lisados celulares se pasaron 10 veces por jeringa de insulina y se incubaron por 30 minutos en hielo. Posteriormente, las muestras se centrifugaron a 10,000xg, durante 10 min. a 4°C. El sobrenadante fue recuperado y almacenado a -20°C hasta ser utilizados.

La cuantificación de proteínas se realizó por el método de ácido Bicinconínico (Bicinchonilic Acid solution/ Copper(II) sulfate solution, Sigma-Aldrich), en el cual la unión entre Cu<sup>2+</sup> y los grupos NH presentes en las proteínas resulta en una coloración púrpura que correlaciona con la concentración de proteínas presentes en la muestra [81]. La absorbancia se midió en un espectrofotómetro con un filtro de 560nm.

Las proteínas se separaron en geles de acrilamida-SDS a una concentración del 10%, y se electrotransferieron (60 min. a 200 mA) a membranas de nylon-nitrocelulosa (Hybond-C Amersham, LIFE Science). La eficiencia de la transferencia se comprobó por la tinción del gel con una mezcla de

azul de Coomassie R-250 (ver anexo). Posteriormente se bloquearon los sitios no específicos de la membrana con 10% de leche. Las membranas fueron incubadas con los anticuerpos primarios específicos para cada proteína durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente, se realizaron 3 lavados de 15 minutos con TBS-Tween (ver anexo). Los anticuerpos secundarios se incubaron por 1 hora a temperatura ambiente y se lavaron de la misma manera que los primarios. Los anticuerpos y las concentraciones empleadas de cada uno de ellos, se muestran en la cuadro 3.

**Cuadro 3. Concentración de anticuerpos utilizada para la técnica de Western Blot**

| Anticuerpo y marca  | Concentración | Secundario | Concentración |
|---|---------------|------------|---------------|
| Anti-Notch1, Notch Intracellular Domain (NICD) (Millipore). | 2: 1000       | Conejo     | 1:10,000      |
| Anti-Numb (pan-isoform) (200µg) Antibody (Upstate).         | 1:1000        | Conejo     | 1:10,000      |
| SAP 97 (2D11) (200 µg/ml) (Santa Cruz Biotechnologies).     | 10:1000       | Ratón      | 2:1000        |

Para la detección del complejo antígeno-anticuerpo, se empleó una reacción de quimioluminiscencia (Amersham, LIFE Science). Dicho sistema emplea luminol, compuesto que se oxida en presencia del anticuerpo secundario, que esta conjugado con peroxidasa. La presencia del peróxido de hidrógeno genera la emisión de luz. La membrana previamente incubada con el anticuerpo secundario, se incubó por 1 min con luminol y la emisión de luz se detectó, exponiendo la membrana a placas de rayos X (Hyper film ECL, Amersham, LIFE Science). Los experimentos se realizaron por triplicado y los controles negativos correspondieron a las células libre de VPH.

#### **9.4 ANALISIS DENSITOMETRICO**

Para conocer la expresión de las isoformas de la proteína NUMB se realizó el análisis semicuantitativo de la densidad óptica de las bandas obtenidas por Western Blot. Se utilizó el programa Scion Image 4.0.

#### **9.5 CO-INMUNOPRECIPITACIÓN**

Para determinar si las proteínas hDlg y NUMB se unen, se realizó un ensayo de co-inmunoprecipitación el cual consiste en concentrar la proteína de interés y precipitarla con ayuda de proteína G, la cual está unida a perlas de sefarosa y un anticuerpo específico, que

posteriormente se separan del lisado total mediante centrifugación, las moléculas que interaccionan con la proteína separada se identifican posteriormente por inmuno-blot [84].

200 µl de proteína G-agarosa (0.5ml de agarosa en 2ml de PBS) (Santa Cruz Biotechnology) fueron lavadas con RIPA con inhibidores. Las perlas se incubaron a 4°C durante toda la noche con 20 µl de anticuerpo primario (200 µl con panNUMB y 200 µl con SAP97). Al siguiente día el complejo perlas-anticuerpo se lavó similar al paso anterior; a 40 µl de este complejo se agregaron 200µg de lisado celular y se dejó incubar toda la noche a 4°C. Finalmente el complejo se lavó dos veces con RIPA, se centrifugó a 12,000 rpm y se resuspendió en 50 µl de buffer de carga (Laemmli Sample Buffer, Bio-Rad), se hirvió por 10 min. y se tomaron 10 µl del sobrenadante para ser sometidos a ensayos de western blot.

Para la evaluación de la expresión del receptor Notch-1, el lisado celular se inmunoconcentro con 200 µl de proteína G-agarosa (0.5ml de agarosa en 2ml de PBS) (Santa Cruz Biotechnology) y fueron lavadas con RIPA con inhibidores. Las perlas se incubaron a 4°C durante toda la noche con 20 µl de anticuerpo primario (NICD). Al día siguiente el complejo perlas-anticuerpo se lavó y centrifugo a 12 000 rpm; se resuspendio en 50 µl de buffer de carga (Laemmli Sample Buffer, Bio-Rad), se hirvió por 10 min. y se tomaron 10 µl del sobrenadante para ser sometidos a ensayos de western blot.

## **9.6 INMUNOCITOQUÍMICA**

La inmunocitoquímica es una técnica de tinción específica basada en el uso de anticuerpos específicos, que se emplea para visualizar *in situ* la expresión de alguna proteína. En este caso se empleó esta técnica para determinar la localización de las proteínas Notch, hDlg y NUMB.

Las diferentes líneas celulares se sembraron en laminillas cargadas, se fijaron con formol al 10% en PBS, se re-hidrataron colocándolas en diferentes concentraciones de alcohol (96%, 80%, 70%) y agua. La recuperación de antígenos se realizó en buffer de citrato de sodio 1M (pH=6) en una vaporera de uso doméstico. Posteriormente, se colocaron en buffer de citratos a 4°C. Tras la recuperación se hizo un lavado en PBS y se bloqueó la peroxidasa endógena con el peróxido de hidrógeno contenido en el kit DakoCytomation EnVision+® System-HRP (DAB). Tras el lavado con PBS se incubaron los diferentes anticuerpos primarios, a la concentración que se muestra en la cuadro 4.

#### **Cuadro 4. Concentración de anticuerpos utilizada para la técnica de inmunocitoquímica**

| Anticuerpo y marca   | Concentración |
|--|---------------|
| Anti-Notch1, Notch Intracellular Domain (NICD) (Millipore) | 2:1000        |
| Anti-Numb (pan-isoform) Antibody (Upstate)                 | 4:1000        |
| SAP 97 (2D11) (Santa Cruz Biotechnologies)                 | 5:1000        |

El tiempo de incubación fue durante una noche a 4° C, pasado este tiempo se realizó un lavado para agregar el polímero marcado también incluido en el kit, este se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente.

Al momento del revelado se realizó la mezcla del buffer substrato y la diaminobencidina (DAB) a razón de dos mililitros de buffer por una gota de DAB también incluidos en el kit, fue filtrada y aplicada a la muestra mientras se observaba al microscopio óptico la reacción para evitar sobre exposición. Las muestras se lavaron nuevamente en PBS.

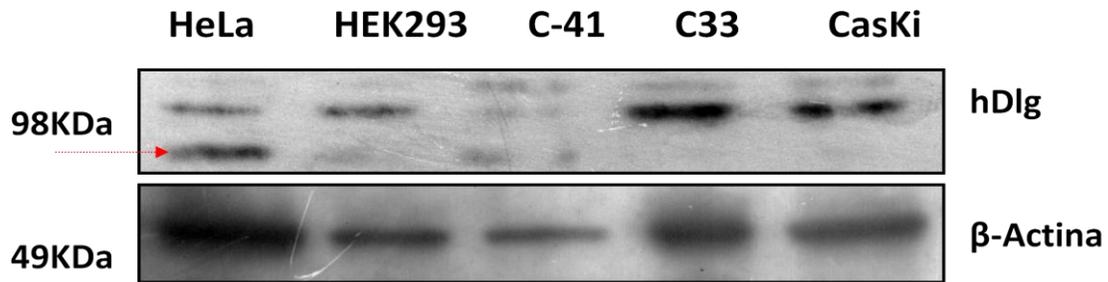
Las laminillas se contrastaron con hematoxilina de Harris (Merck, Alemania) se lavaron en agua corriente y deshidrataron en alcohol 70%, 80% ,96% y xilol. Fueron montadas con medio rápido Entellan® (Merck, Alemania) y fueron evaluadas por el Departamento de Patología del Instituto Nacional de Cancerología.

## **10 RESULTADOS**

### **10.1 EXPRESIÓN Y LOCALIZACIÓN DE LA PROTEÍNA hDIg EN LAS LÍNEAS CELULARES**

#### **DE CaCU**

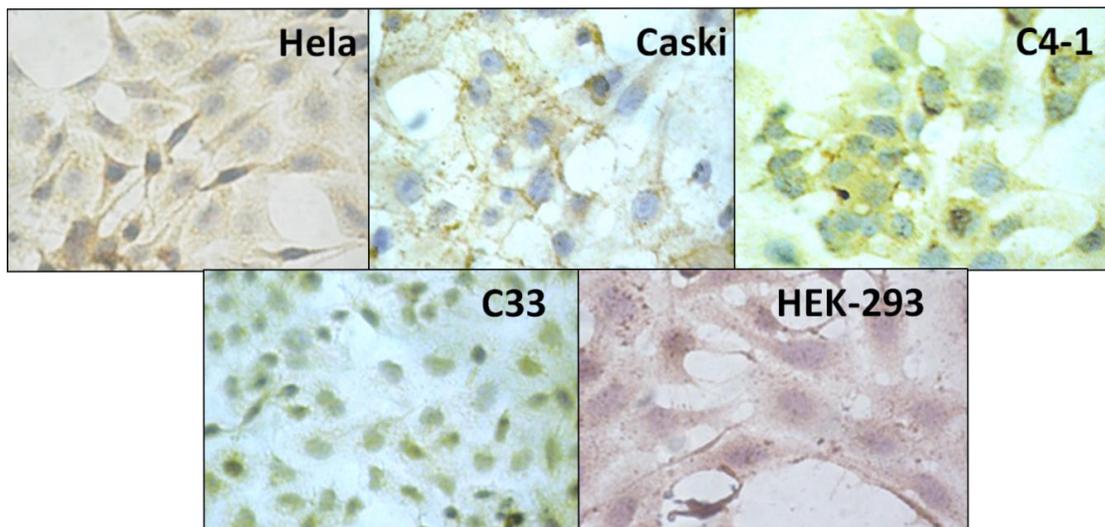
La capacidad oncogénica de los VPH reside en sus proteínas E6 y E7; en particular E6 degrada a diversos blancos celulares entre los que destaca la proteína supresora de tumor hDIg. En el presente trabajo se evaluó la expresión de hDIg en líneas celulares positivas (HeLa, CaSki C-41) y negativas (C33 y HEK293) a secuencias de VPH. Nuestro interés fue determinar la existencia de una asociación entre la expresión de esta proteína con la actividad de la vía de señalización Notch-1. En la figura 4 se muestra la expresión de hDIg en las líneas derivadas de CaCU así como HEK293.



**Figura 4. Niveles de Expresión de la proteína hDlg en líneas derivada de CaCU y HEK293.** La proteína hDlg tiene un peso de 97kDa el cual se identifica con la flecha roja.

Al evaluar la expresión de la proteína hDlg, fue evidente la presencia de más de una banda correspondiente al peso molecular esperado de hDlg (97kDa). Como se observa en la figura 4, HeLa, HEK293 y C4-1 expresan la proteína sin modificaciones postranscripcionales (97kDa, flecha roja) encontrándose niveles más elevados de esta proteína en la línea HeLa. Por otro lado, las líneas celulares C33 y CaSki no expresan a la proteína de 97KDA pero muestran otras bandas de mayor peso molecular que posiblemente son formas fosforiladas de la proteína. Este patrón fue similar en las tres repeticiones que se llevaron a cabo para este ensayo.

La proteína hDlg se puede encontrar en diversas localizaciones subcelulares, lo que correlaciona con sus diferentes actividades. Para conocer la localización de la proteína hDlg en las líneas celulares estudiadas, se llevó a cabo el ensayo de inmunocitoquímica



**Figura 5. Localización de la proteína hDlg en líneas de CaCU y HEK293.**

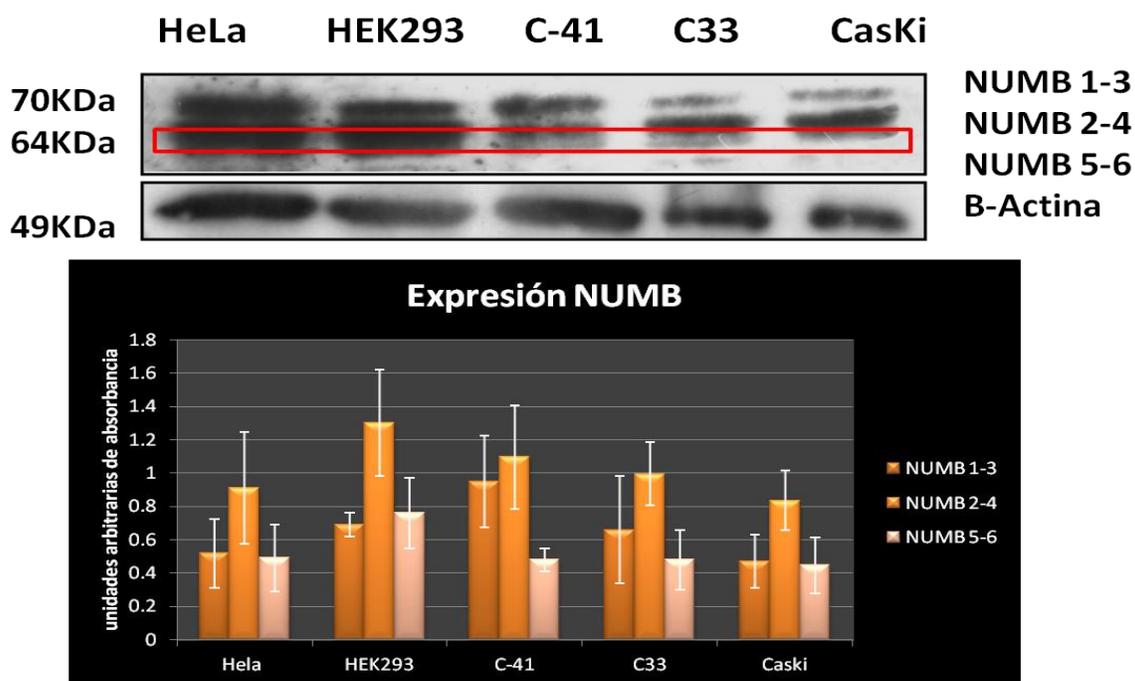
Como se muestra en la figura 5 todas las líneas celulares presentaron inmunorreacción para hDlg. Sin embargo de todos los casos, solo la línea negativa a VPH C33, expresó la proteína en el núcleo.

Además, todas fueron positivas a la expresión de hDlg en el citoplasma y en algunos casos en la membrana, como es el caso de la línea celular CaSki que presentó una expresión evidentemente membranal. La línea que presentó la reacción de mayor intensidad fue C4-1 tanto en el citoplasma como en membrana.

## 10.2 EXPRESIÓN Y LOCALIZACIÓN DE LA PROTEÍNA NUMB EN LAS LÍNEAS CELULARES

### DE CaCU

La proteína NUMB es un importante regulador de la vía Notch, ésta posee en su estructura un dominio de unión proteína-proteína del tipo PTB. Se ha demostrado que estos dominios pueden unirse a los dominios PDZ como los presentes en hDlg, por ello el objetivo principal del presente trabajo fue relacionar la expresión de hDlg con la vía de señalización Notch a través de su posible unión con NUMB, para lo cual se realizaron ensayos de Western Blot que permitieron evaluar los niveles de expresión de NUMB los cuales no habían sido anteriormente evaluados en líneas derivadas de CaCU. Los resultados se muestran en la figura 6.

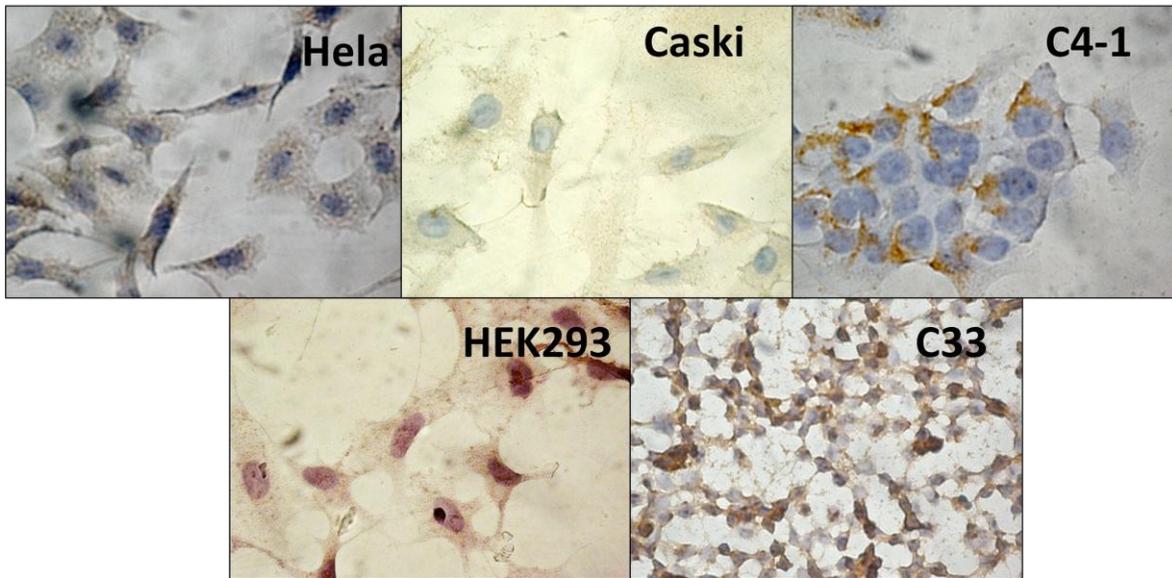


**Figura 6. Niveles de expresión de la proteína NUMB en líneas de CaCU y HEK293.** La proteína NUMB expresa 6 productos de procesamiento alternativo agrupados en tres bandas: NUMB 1-3, NUMB 2-4 y NUMB 5-6. Se resaltan con el recuadro rojo las isofomas 5-6.

Como se muestra en la figura 6, todas las líneas celulares expresaron las tres bandas correspondientes a las 6 isoformas reportadas para la proteína NUMB. En general las células HeLa y CaSki expresan menores niveles de todas las isoformas de esta proteína. En todas las

líneas celulares las isoformas que más se expresan son la 2-4 (Figura 6). Finalmente la línea HEK293 es la que expresa mayores niveles de las isoformas 5-6.

Para determinar si la localización de la proteína NUMB correlaciona con la localización de hDIg, se llevó a cabo la técnica de inmunocitoquímica en las líneas celulares de CaCU y HEK293. Los resultados se muestran en la figura 7.

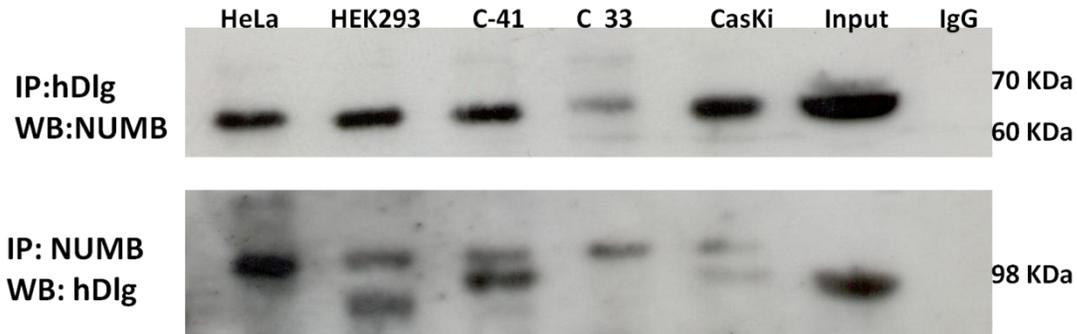


**Figura 7. Localización de la proteína NUMB en líneas de CaCU y HEK293.**

Solo la línea celular negativa a VPH HEK293, expresó a la proteína NUMB en el núcleo. Entre las líneas derivadas de CaCU, las líneas C4-1 y C33 mostraron la mayor expresión, con una localización citoplásmica. Las células HeLa mostraron una expresión citoplásmica homogénea.

### **10.3 UNION DE LAS PROTEINAS hDIg-NUMB EN LINEAS DE CaCU**

Los dominios PDZ suelen unirse con secuencias en el C-terminal de las proteínas con las que interactúan, sin embargo, ya se han demostrado interacciones con dominios diferentes a los PBDs. En el presente trabajo se muestra la interacción entre hDIg y NUMB, posiblemente una interacción entre uno de los dominios PDZ de hDIg y el dominio PTB de NUMB. En la figura 8 se muestra el inmuno-blot correspondiente.



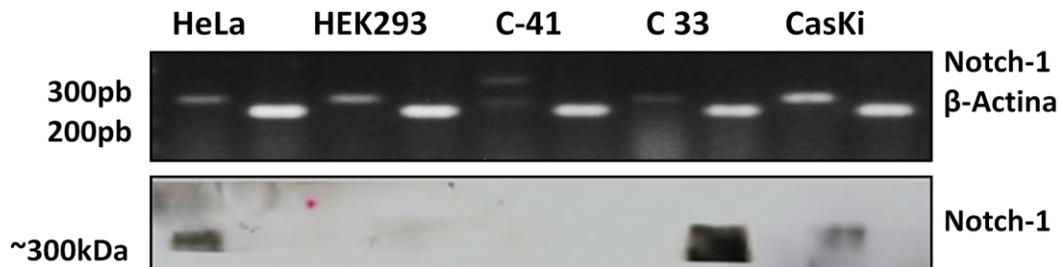
**Figura 8. Inmunoprecipitación hDlg y NUMB.** Se muestra el inmuno blot correspondiente a la interacción entre las proteínas hDlg y NUMB.

En la parte superior de la figura 8, se muestra la inmunoconcentración de la proteína hDlg a la cual se le probó la interacción con la proteína NUMB. En todas las células analizadas se observa que existe una interacción entre éstas dos proteínas. Sin embargo, aparentemente, esta interacción solo ocurre con las isoformas 2-4.

De manera inversa, al inmunoconcentrar a la proteína NUMB, las diferentes bandas observadas pudieran corresponder a interacciones con las diferentes formas fosforiladas de hDlg.

#### **10.4 EXPRESION Y LOCALIZACION DE NOTCH-1 Y NICD EN CELULAS DE CaCU**

La vía de señalización Notch-1 interviene de forma importante en la comunicación entre las células. Ésta es regulada negativamente por la proteína NUMB. En este trabajo se demostró la unión de la proteína hDlg y NUMB, por lo tanto resultó importante evaluar la expresión tanto génica como protéica, de Notch-1. En la figura 9 se muestra la expresión del transcrito Notch-1 en las líneas celulares HeLa, HEK 293, C4-1, C33 y CaSki obtenida mediante RT-PCR. En la parte inferior de la figura se muestra la expresión (protéica) del receptor Notch-1.

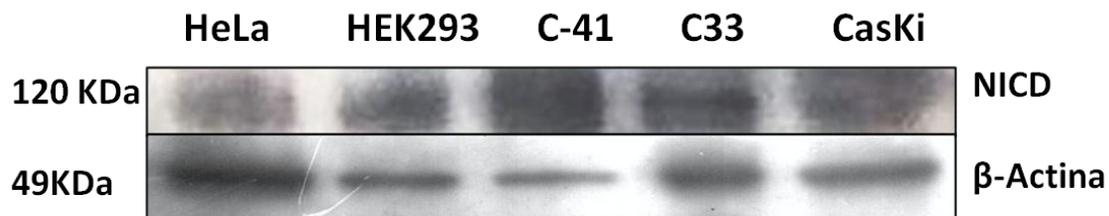


**Figura 9. Expresión génica y proteica Notch-1.**

Las cinco líneas expresaron este transcrito aunque fue la línea CaSki la de mayor expresión, seguida de la línea HEK293 (Figura 9 parte superior). Con la finalidad de facilitar la detección del

receptor completo, la proteína se concentró mediante inmunoprecipitación, en la parte inferior de la figura 9 se muestra el inmuno-blot correspondiente a la precipitación del receptor Notch-1. La línea C33 (negativa a VPH) tuvo mayor expresión mientras que las líneas celulares HEK293 y C4-1 no expresaron el receptor completo.

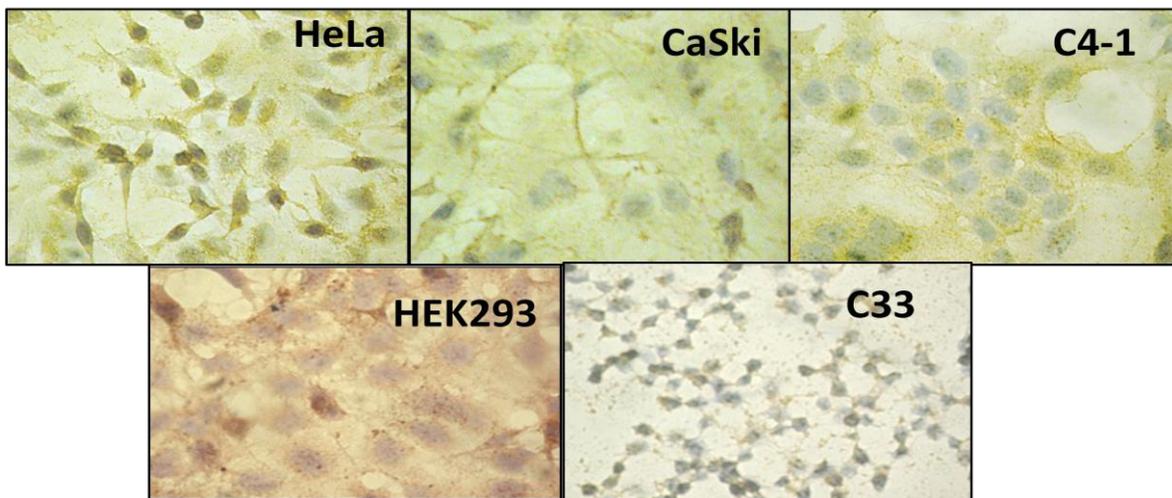
El receptor Notch-1 tiene un peso aproximado de 300 KDa, tras su activación es procesado por las enzimas ADAM-TACE10 y el complejo  $\gamma$ -secretasa con lo que se libera la porción intracelular de alrededor de 120kDa [67]; en la figura 10 se muestra la expresión de NICD.



**Figura 10. Niveles de expresión de NICD.** La porción intracelular del receptor Notch, tiene un peso aproximado de 120 kDa.

A diferencia de lo sucedido con el receptor completo, las cinco líneas celulares mostraron la expresión de la parte activa. La que tuvo mayores niveles de expresión fue la línea C41, seguida de C33 y CaSki. Mientras que la línea HeLa presentó los niveles más bajos.

Tras la activación del receptor, NICD se transloca al núcleo en donde activa la transcripción, por lo que fue importante conocer en donde se encontraba la proteína. En la figura 11 se muestran los resultados de la inmunocitoquímica.



**Figura 11. Localización de la proteína NICD en líneas de CaCU y HEK293.**

Las células HeLa fueron las que presentaron la mayor expresión nuclear de NICD. Las líneas negativas a VPH HEK293 y C33 también mostraron a la proteína en el núcleo, pero en menor número de células e intensidad. Las células CaSki y C4-1 expresaron a la proteína en el citoplasma.

## **11. DISCUSIÓN**

La infección persistente por VPH-AR es el principal agente etiológico para el desarrollo de CaCu [3]. La proteína E6 de estos virus es capaz de unirse a un sinnúmero de blancos celulares regulando su expresión [7]. En particular, E6 marca a la proteína hDlg para su degradación proteosómica [10]. hDlg posee tres dominios PDZ, los cuales funcionan como secuencias de unión entre proteínas y median la degradación de hDlg inducida por E6 de los VPH-AR [14]. Por otro lado, aunque la infección persistente con los VPHs de alto riesgo, ha sido claramente establecida como el principal agente causal en el desarrollo de cáncer cervical, no es suficiente, ya que muy pocas de las mujeres con infección con VPHs de alto riesgo progresan a cáncer [86]. Debido a esto, actualmente se han propuesto otros factores que podrían participar en la tumorigénesis cervical. Entre estos se encuentran, la amplificación de algunos genes como: c-myc [87], PIK3CA [88], erbB [89] y c-IAP1 [90], la disminución en la expresión de la proteína supresora de tumor PTEN [91] y una desregulación de la vía de señalización de Notch [67]. La implicación de esta cascada de señalización en el desarrollo del CaCu, así como su relación con las oncoproteínas E6 y E7 es controversial, por lo que el objetivo del presente trabajo fue determinar la posible participación de la proteína hDlg en la regulación de la vía de Notch. En el presente trabajo, se evaluó la expresión y localización de las proteínas hDlg, NUMB y Notch-1, en las líneas celulares HeLa, C4-1, CasKi, C33 y HEK 293. También se evaluó la posible unión de las proteínas hDlg y NUMB, así como la repercusión de dicha unión en la expresión de Notch-1.

Se encontró que independiente a la presencia de VPH, las líneas células aquí empleadas, mostraron expresión de hDlg y en la mayoría de los casos, con una localización citoplásmica. Con respecto a la proteína NUMB, se encontraron altos niveles de expresión de esta proteína en todas las líneas celulares. La unión hDlg y NUMB se demostró en todas las líneas celulares independientemente de la presencia de VPH-AR. Se analizó la expresión de Notch-1 para evaluar una posible modulación de la vía por esta unión. El transcrito Notch-1 se expresó poco en las líneas C4-1 y C33, sin embargo la proteína no fue encontrada en las líneas HEK293 y C4-1. Paradójicamente, el producto de la activación catalítica (NICD) se expresó en altos niveles en

todas las líneas. Este es el primer trabajo que evalúa la expresión de NUMB en líneas derivadas de cáncer; dado que en todas las líneas se expresa el producto de activación catalítica de Notch-1 (NICD), además de que todas presentan altos niveles de NUMB, sugerimos que la proteína NUMB no modula de manera negativa a la vía de señalización Notch-1 en el contexto de VPH.

La proteína hDlg ha sido ampliamente estudiada en el contexto de la infección por VPH [11-18]. En estos estudios se ha determinado que E6 de los VPH-AR es capaz de unirse a través de su extremo C-terminal al dominio PDZ-2 de hDlg con lo que la proteína es ubiquitinada y degradada [26]. Se ha reportado que el VPH-18 se une a hDlg de forma más eficiente que el VPH-16 [14]. Con lo anterior se esperaría que en células derivadas de CaCU, positivas a VPH; la expresión de hDlg se viera drásticamente disminuida. Sin embargo, todas las líneas celulares utilizadas en este trabajo, independientemente de la presencia de VPH, expresaron la proteína.

Se ha reportado previamente que la proteína hDlg presenta hiperfosforilaciones [28, 29,85]; esto concuerda con el patrón de bandeo que detectamos en este trabajo, donde específicamente el ensayo de Western Blot mostró dos bandas adicionales a la esperada de 97KDa para la proteína hDlg. Las bandas que se observaron por arriba de este peso pueden representar fosforilaciones de la proteína. El producto de 97KDa solamente fue observado en las células HeLa, HEK293 y C-41, donde la línea HeLa (VPH-18) fue la que presentó los mayores niveles. En contraste, todas las líneas expresaron a las posibles formas fosforiladas. En general, al comparar entre las células con y sin VPH no existió una diferencia significativa en la expresión de hDlg, que se pudiera atribuir al papel de E6 en la degradación de esta proteína. Lo anterior se podría explicar por: 1) localización sub-celular de la proteína, 2) fosforilaciones en posiciones específicas, 3) a la fase del ciclo celular en que se encontraban los cultivos.

Como se muestra en la figura 5, solo la línea celular C33 (negativa a VPH) presentó la proteína en el núcleo. Esto es importante, ya que algunos trabajos muestran que la fracción nuclear de la proteína hDlg es la más susceptible a degradación por E6 de VPH-AR [29]. Las tres líneas positivas a VPH (HeLa, CasKi y C4-1) no expresaron la proteína en el núcleo, por el contrario la expresión fue predominantemente citoplásmica y membranal en algunos casos. Trabajos como el de Banks *et al* [10] muestra que la localización de hDlg es dependiente de la confluencia celular, a mayor confluencia la proteína se localiza preferentemente en membrana. Además, la degradación de hDlg es dependiente de la capacidad de la célula para formar uniones: en células aisladas hDlg se

degrada eficientemente, mientras que en células unidas la proteína se estabiliza. En el caso de los cultivos que se emplearon en el presente trabajo, las células siempre llegaron a una confluencia mínima del 80%, por lo que se esperaría que en todos los casos se presentaran células con tinción membranal, sin embargo esto ocurrió únicamente con las células CaSki.

Por otro lado, hDlg puede ser fosforilada por diversas cinasas como ERK5 [1], CDK1 y CDK2 [2], p38γ [3], JNK [28] entre otras. Son estas modificaciones postranscripcionales las que modulan tanto la localización como la estabilidad de la proteína. Por ejemplo, cuando hDlg es hiperfosforilada, se acumula en las uniones celulares y en este sitio también muy susceptible a degradación por E6 de VPH-18; las fosforilaciones en los primeros 185 aminoácidos son las que median esta susceptibilidad [28]. Con respecto a la localización de hDlg solo la línea positiva a VPH-16 (CaSki) mostro una tinción membranal debido a la poca afinidad de este tipo viral para degradar a las formas membranales de hDlg.

Además de las modificaciones postranscripcionales de hDlg, se ha demostrado que las fosforilaciones en E6 son importantes. La proteína cinasa A (PKA) es capaz de fosforilar el PBD del extremo C-terminal de E6 por lo que está ya no puede unirse a hDlg y marcarla para su degradación [92]. Por lo tanto es posible que los niveles de hDlg encontrados en este trabajo sean un reflejo de las fosforilaciones de E6.

El papel de hDlg en el control del ciclo celular ha sido ampliamente caracterizado, en primer lugar por su asociación con APC [25]. En 2009 Narayan *et al.* [2] mostraron que hDlg presenta diferentes localizaciones a lo largo del ciclo: se encuentra en las uniones celulares durante G1, se acumula en citoplasma durante la fase de síntesis, y se localiza en el uso mitótico en fase M. Dado que la fosforilación afecta la localización es difícil poder determinar una única localización de la proteína por inmunocitoquímica o una sola banda por western blot; si las células no se encuentran sincronizadas previamente. Los resultados aquí mostrados no fueron realizados con células sincronizadas, por este motivo es posible que cambios en la expresión de las formas fosforiladas y no fosforiladas de hDlg pudieran haber sido enmascaradas.

La proteína NUMB fue originalmente descrita en *Drosophila*, pero a diferencia de invertebrados, en mamíferos el gen *NUMB* tiene procesamiento alternativo, lo que produce cuatro isoformas (NUMB 1-4) [47]. Sin embargo el trabajo de Karaczyn *et al* del 2010 [48] reporta dos productos de procesamiento alternativo adicionales. Estas isoformas (NUMB 5-6) carecen de la región rica en

prolinas (PRR), se expresan abundantemente en células transformadas y cancerosas; y se comportan menos antagónicas a la vía Notch-1 en comparación a las isoformas 1-4. Análisis *in silico* predicen expresión del ARNm de NUMB tanto en el útero como en CaCU [93], sin embargo los niveles de esta proteína no se habían evaluado.

Encontramos que las líneas derivadas de CaCU HeLa, C4-1, CaSki y C33 expresan las seis isoformas reportadas para la proteína; con mayor abundancia las isoformas 2-4. Este resultado contrasta con el trabajo de Chen et al. [57], el cual muestra que en casos de CaCU, las isoformas 1-3 son las de mayor expresión génica. Estas isoformas (1-3) son las que se encuentran implicadas en proliferación, a diferencia de las 2-4 las cuales se relacionan con diferenciación [49]. Cabe señalar, que el trabajo anteriormente citado fue realizado en tejidos embebidos en parafina, por lo que los resultados podrían ser poco comparables con los obtenidos por nosotros *in vitro*. Por otro lado, la proteína NUMB también se ha implicado en la formación de uniones celulares [46], por lo que podría estar regulada por confluencia, como en el caso de hDlg.

Con respecto a las isoformas 5-6, la línea control HEK293 mostro mayor expresión de estas isoformas en comparación a las líneas derivadas de CaCU, además esta fue la única línea que presentó una expresión nuclear de NUMB. La función de NUMB 5-6 está relacionada con la migración celular [48], entre las líneas derivadas de CaCU, la expresión de las isoformas 5-6 se dio en niveles similares, por lo que pareciera que la expresión en células transformadas esta de alguna manera limitada.

La localización de NUMB fue citoplásmica en todas las líneas derivadas de CaCU independientemente de las isoformas que expresaran. El trabajo de Dho *et al* en 1999 [50], muestra que las proteínas NUMB con PTB largo (isoformas 1 y 2) se asocian a membrana, mientras que las isoformas 3 y 4 (PTB corto) se localizan en el citoplasma. Como ya se discutió anteriormente, en nuestras líneas de CaCU se expresaron todas las isoformas, por lo que el hecho de que no hayamos encontrado a la proteína en la membrana podría indicar que las formas de NUMB con PTB largo forman algún complejo con otras proteínas que dificulta su observación. Cabe señalar, que son las isoformas de membrana (1-2), las que se han reportado se unen a través de su dominio PTB a NICD y de esta manera previenen su traslocación a núcleo. Sin embargo en nuestro estudio se encontró una elevada expresión de NUMB aunque los niveles de NICD fueron altos.

Los resultados de la expresión de NUMB que se muestran en este trabajo, revelan que el comportamiento de esta proteína es muy diferente a lo observado en otras neoplasias. Por ejemplo, en cáncer de mama se ha visto que esta proteína se pierde en alrededor del 50% de los tumores, debido a la ligasa de ubiquitina LNX [55]. Por otro lado, en las líneas celulares MCF-7 y MDA-MB-231 se presenta un aumento en la actividad de la vía Notch-1 atribuible a la pérdida de NUMB [53]. Además NUMB repercute directamente en la estabilidad de p53 [94] lo que coloca a esta proteína como un importante regulador de la carcinogénesis. A la fecha, existen pocos estudios del papel de NUMB en la carcinogénesis cervical, pero con los resultados mostrados en este trabajo es posible que los altos niveles de NUMB se pudieran explicar por bajos niveles de su regulador negativo LNX.

Trabajos recientes muestran que los dominios PDZ pueden unirse a dominios PTB [42-43]. En este trabajo se demostró la unión entre NUMB-hDlg, lo que podría representar es un nuevo ejemplo de este tipo de interacciones (Figura 8). Es difícil predecir entre cual de los dominios PDZ de hDlg se esté llevando a cabo la interacción, pues a cada uno se le conocen diferentes proteínas de unión. Por ejemplo PDZ 2 es aquel en el que se une APC y también E6 de VPH-AR [25,15] por lo que inclusive esta unión hDlg-NUMB, de darse a través de PDZ2, podría ser una explicación adicional a las anteriormente mencionadas al porque hDlg no se ve claramente disminuida en las líneas de CaCU. Lo que queda claro es que las fosforilaciones de hDlg juegan un papel importante en esta interacción, pues en el inmuno blot de hDlg se presentan formas fosforiladas que si interactúan con NUMB. A su vez, es necesario determinar con exactitud entre que isoformas de NUMB se está dando la interacción, pues al existir variaciones en la secuencia del dominio PTB, sería lógico que no todas las isoformas interactúen con hDlg; sin embargo, al comparar las bandas presentes en el inmuno blot de NUMB tras la concentración de la proteína hDlg se descarta la unión con las isoformas 1-3 y 5-6. Es importante señalar, que en *Drosophila* ya se había sugerido esta interacción ya que las proteínas co-localizan durante la división celular [95], pero es este trabajo el primero que comprueba esta unión.

Debido al papel de NUMB como antagonista de la vía de señalización Notch [47-55], y ya que esta vía se muestra controversial en la carcinogénesis cervical, fue importante conocer si la unión entre hDlg-NUMB repercutía en la expresión de Notch-1 en las líneas derivadas de CaCU. En primer lugar, se evaluó la expresión del transcrito Notch-1. Se vio que todas las líneas presentan el

transcrito, pero al evaluar la expresión del receptor completo ésta no correspondió: las líneas HEK293 y C4-1 no expresaron la proteína; y la línea C33 la cual expresó el menor nivel de transcrito fue en la que se presentó una mayor concentración de Notch-1. Debido a que con los anticuerpos utilizados no fue posible detectar a la proteína Notch-1, decidimos llevar a cabo la técnica de inmunoprecipitación con el fin de concentrar a la proteína. Ahora las diferencias encontradas entre la expresión del transcrito y la proteína pueden deberse a la estabilidad misma del receptor, ya que, se ha demostrado que la activación del receptor es dependiente de ubiquitinación que permite la endocitosis para llevarse a cabo el corte por el complejo  $\gamma$ -secretasa [58]. Por lo anterior, posiblemente las líneas HEK293 y C4-1, que sabemos expresaron el transcrito Notch-1 pero no el receptor completo, ya habían endocitado al receptor en el momento de la detección, aunque esta internalización del receptor no apunta necesariamente a su activación, pues la endocitosis del receptor está mediando también la concentración de Notch-1 en la superficie celular, con lo que también se ha visto que los niveles de NICD no necesariamente correlacionan con los de Notch-1 [58]. Tal como lo que observamos en este trabajo, en la figura 10, en donde todas las líneas expresan a NICD, aunque es C4-1 la de mayor expresión y fue una de las dos líneas negativas a Notch-1.

Ahora bien, el hecho de detectar NICD, no necesariamente implica de que la vía este activa, pues NICD pudiera expresarse pero no ser traslocado al núcleo en donde debería ejercer su función [68], fue por eso que evaluamos la expresión, *in situ* de NICD, en las líneas celulares positivas y negativas a VPH. Se mostró que las líneas HeLa, HEK 293 y C33 presentaron a la proteína en el núcleo, por lo que se piensa que en estas células la vía se encuentra activa. Es claro, que para poder demostrar este punto, será necesario llevar a cabo experimentos de actividad transcripcional mediante el uso de un gen reportero. También es un hecho de que aunque la proteína no se encuentre en el núcleo no quiere decir que no será posteriormente traslocada, pues dicho movimiento es dependiente de otras proteínas que regulan de manera positiva a NICD como lo es la proteína Deltex [58] que se encarga de traslocar a núcleo a NICD.

Son muchos los elementos implicados en la vía de señalización Notch-1, nuestro estudio aporta información a esta vía a través del conocimiento de los niveles de expresión de NUMB en líneas derivadas de CaCU y su interacción con hDlg.

## **12. CONCLUSIONES**

- La proteína hDlg se expresa en las líneas de CaCU a pesar de la presencia de VPH. Además la proteína muestra diferentes patrones de fosforilación.
- En este trabajo se mostró que en las líneas derivadas de CaCU (HeLa, C4-1, C33 y Caski) la proteína NUMB se expresa en altos niveles.
- Las líneas HeLa, HEK293, C4-1, C33 y CaSki expresan las isoformas 5-6 de la proteína NUMB.
- En este trabajo se mostró la interacción entre las proteínas hDlg y NUMB en líneas derivadas de CaCU y HEK293.
- La presencia de VPH en líneas celulares de cérvix no modifica la unión hDlg-NUMB.
- Las líneas celulares HeLa, HEK293, C4-1, C33 y CaSki expresan el transcrito Notch-1, pero en las líneas HEK293 y C4-1 no fue posible detectar al receptor.
- La expresión de NICD se observó en todas las líneas celulares.

### **13. ANEXO**

#### PBS (Phosphate *Buffer* Saline)

- NaCl 8 g/L
- KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.2 g/L
- KCl 2 g/L

Ajustar a pH 7.4

#### RIPA -PBS

- NP40 100µl
- Deoxicolato de Sodio 50mg
- SDS 100µl (stock 10%)

Aforar a 10 ml con PBS 1x

Agregar 10% de inhibidores de proteasas

#### TBS 10X 1L

- NaCl 87.6g
- Tris (pH=7.5) 60.37
- Tween-20 100µl

#### Buffer de citratos 1M

- NaH<sub>2</sub>(C<sub>3</sub>H<sub>5</sub>O (COO)<sub>3</sub> 29.4g

#### Inhibidor de proteasas (SIGMA)

- AEBSF.....23 mM
- Aprotinina.....2 mM
- Bestatina.....130 µM
- EDTA..... 100mM
- E-64.....0.3 mM
- Pepstatina A.....0.3 mM

#### Azul de Coomassie

- 0.1% metanol
- 50% ácido acético

## BIBLIOGRAFIA

1. Cervical Cancer Incidence and Mortality Worldwide in 2008 Summary. <http://globocan.iarc.fr/factsheets/cancers/cervix.asp>.
2. México Human Papillomavirus and Related Cancers, Fact Sheet 2010. [http://apps.who.int/hpvcentre/statistics/dynamic/ico/country\\_pdf/MEX\\_FS.pdf?CFID=5041572&CFTOKEN=76127434](http://apps.who.int/hpvcentre/statistics/dynamic/ico/country_pdf/MEX_FS.pdf?CFID=5041572&CFTOKEN=76127434)
3. <http://es.thehpvtest.com/about-hpv/high-and-low-risk-hpv-types/>
4. Zur Hausen H. Human papillomaviruses and their possible role in squamous cell carcinomas. *Curr Top Microbiol Immunol.* 1977; 78:1-30.
5. Prendiville W, Davies P. The Human Papillomavirus. In: Prendiville W, Davis P, Eds. The Health Professionals HPV Handbook: Human papillomavirus and cervical cancer. Oxford: Taylor and Francis, 2004b:11-26.
6. McMurray HR, Nguyen D, Westbrook TF, McAnce DJ. Biology of human papillomaviruses. *Int J Exp Pathol.* 2001; 82:15-33.
7. Tungteakkun SS, Durkensen-Hughes. Cellular binding partners of the human papillomavirus E6 protein. *Arch Virol.* 2008; 153: 397-408.
8. Longworth M, Laimins L. Pathogenesis of Human Papillomaviruses in Differentiating Epithelia. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2004; 68(2):362-371.
9. Yugawa T, Kiyono T. Molecular mechanisms of cervical carcinogenesis by high-risk human papillomaviruses: novel functions of E6 and E7 oncoprotein. *Rev. Med. Virol.* 2009; 19: 97–113.
10. Massimi P, Gammoh N, Thomas M, Banks L. HPV E6 specifically targets different cellular pools of its PDZ domain-containing tumour suppressor substrates for proteasome-mediated degradation. *Oncogene.* 2004; 23, 8033–8039.
11. Lizano M, Carrillo A, Contreras A. Infección por virus del Papiloma Humano: epidemiología, historia Natural y carcinogénesis. *Cancerología.* 2009; 4:205-216.
12. Tungteakkun S, Hughes D. Cellular binding partners of the human papillomavirus E6 protein. *Arch Virol.* 2008; 153: 397-408.
13. Sterlinko H, Banks L. Degradation of hDIg and MAGIs by human papillomavirus E6 is E6-AP-independent. *J Gen Virol.* 2004; 85: 2815–2819.

14. Thomas M, Glaunsinger B, Pim D, Javier R, Banks L. HPV E6 and MAGUK protein interactions: determination of the molecular basis for specific protein recognition and degradation. *Oncogene*. 2001; 20(39): 5431-5439.
15. Javier R, Rice A. Emerging Theme: Cellular PDZ Proteins as Common Targets of Pathogenic Viruses. *J. Virol*. 2011; 85(22):11544-11556.
16. Watson R, Thomas M, Banks L, Roberts S. Activity of the human papillomavirus E6 PDZ-binding motif correlates with an enhanced morphological transformation of immortalized human keratinocytes. *J Cell Sig*. 2003; 15 (116):4925-34.
17. <http://en.wikipedia.org/wiki/DLG1>
18. Thomas M, Glaunsinger B, Pim D, Javier R, Banks L. HPV E6 and MAGUK protein interactions: determination of the molecular basis for specific protein recognition and degradation. *Oncogene*. 2001; 20(39): 5431–5439.
19. Lue R, Brandin E, Chan E, Branton D. Two Independent Domains of hDlg Are Sufficient for Subcellular Targeting: The PDZ 1,2 Conformational Unit and an Alternatively Spliced Domain. *J Cell Biol*. 1996; 135(4):1125-1137.
20. McLaughlin M, Hale R, Ellston R, Gaudet S, Lue R, Viel A. The Distribution and Function of Alternatively spliced Insertions on hDlg. *J Biol Chem*. 2002; 277(8):6406-6412.
21. Roberts S, Calautti E, Vanderweil S, Nguyen O, Foley A, Baden H, Viel A. Changes in localization of human discs large (hDlg) during keratinocyte differentiation is associated with expression of alternatively spliced hDlg variants. *Exp Cell Res*. 2007; 313:2521-2530.
22. Mantovani F, Massimi P, Banks L. Proteasome-mediated regulation of the hDlg tumour suppressor protein. *J Cell Sci*. 2001; 114:4285-4292.
23. Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology. Disponible en <http://atlasgeneticsoncology.org/Genes/DLG1/D40333ch3q29.html>
24. Unno K, Hanada T, Chishiti A. Functional involvement of human discs large tumor suppressor in cytokinesis. *Exp Cell Res*. 2008. 15; 314(17): 3118–3129.
25. Ishidate T, Matsumine A, Toyoshima K, Akiyama T. The APC-hDLG complex negatively regulates cell cycle progression from the G0/G1 to S phase. *Oncogene*. 2000; 19(3):365-372.
26. Kiyono T, Hiraiwa A, Fujita M, Hayashi Y, Akiyama T, Ishibashi M. Binding of high-risk human papillomavirus E6 oncoproteins to the human homologue of the Drosophila discs large tumor suppressor protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997; 94(21):11612-11616.

27. Sterlinko H, Banks L. Degradation of hDlg and MAGIs by human papillomavirus E6 is E6-AP independent. *J Gen Virol.* 2004; 85:2815–2819.
28. Massimi P, Narayan N, Cuenda A, Banks L. Phosphorylation of the discs large tumour suppressor protein controls its membrane localisation and enhances its susceptibility to HPV E6-induced degradation. *Oncogene.* 2006; 25: 4276-4285.
29. Narayan N, Subbaiah V, Banks L. The high-risk HPV E6 oncoprotein preferentially targets phosphorylated nuclear forms of hDlg. *Virology.* 2009; 387(1):1-4.
30. Watson R, Rollason T, Reynolds G, Murray P, Banks L, Roberts S.. Changes in expression of the human homologue of the *Drosophila* discs large tumour suppressor protein in high-grade premalignant cervical neoplasias. *Carcinogenesis.* 2002; 23(11):1791-1796.
31. Lin H, Steller M, Aish L, Hanada T, Chishti A. Differential expression of human Dlg in cervical intraepithelial neoplasias. *Gynecol Oncol.* 2004; 93(2):422-428.
32. Cavatorta A, fumero G, Chouhy D, Aguirre R, Nocito A, Giri A. Differential expression of the human homologue of *drosophila* discs large oncosuppressor in histologic samples from human papillomavirus-associated lesions as a marker for progression to malignancy. *Int. J. Cancer.* 2004; 111:373–380.
33. Vazquez E, Lizano M, Alfaro E, Contreras A. Abnormal distribution of hDlg and PTEN in premalignant lesions and cervical cancer. *Gynecol Oncol.* 2011; 122(3):663-668.
34. Morais CJ, Petosa C, Sutcliffe MJ, Raza S, Byron O, Poy F, Marfatia SM, Chishti AH, Liddington RC. Crystal structure of a PDZ domain. *Nature.* 1996; 382: 649-652.
35. Jelén F, Oleksy A, Smietan K, Otlewski J. . PDZ domains-common player in the cell signaling. *Acta Biochim Pol.* 2003; 50(4):985-1017.
36. Lee H, Zheng J. PDZ domains and their binding partners: structure, specificity, and modification. *Cell Commun Signal.* 2010; 8:1-8.
37. Yan K, Kuti M, Zhou M. PTB or not PTB ^ that is the question. *FEBS Lett.* 2002; 513: 67-70.
38. Uhlik M, Temple B, Bencharit S, Kimple A, Siderovski D, Johnson G. Structural and evolutionary division of phosphotyrosine binding (PTB) domains. *J Mol Biol.* 2005;345(1):1-20.
39. O'Bryan J. The PTB domain: a modular domain with multiple functions. *Curr Opin Drug Discov Devel.* 1999; 2(5):505-18.

40. Margolis B, Borgs J, Straight S, Meyer D.. The function of PTB domain proteins. *Kidney Int.* 1999; 56:1230-1237.
41. Smith M, Hardy W, Murphy J, Jones N, Pawson T. Screening for PTB Domain Binding Partners and Ligand Specificity Using Proteome-Derived NPXY Peptide Arrays. *Mol Cell Biol.* 2006; 26(22): 8461–8474.
42. Nie J, Li S, McGlade J. A Novel PTB-PDZ Domain Interaction Mediates Isoform-specific Ubiquitylation of Mammalian Numb. *J Biol Chem.* 2004; 279(20): 20807–20815.
43. Richier L, Williton K, Clattenburg L, Colwill K, O’Brian M, Tsang C, Kolar A, Zinck N, Metalnikov P, Trimble W, Kruger S, Pawson T, Fawcett J. NOS1AP Associates with Scribble and Regulates Dendritic Spine Development. *J Neurosci.* 2010; 30(13):4796-805.
44. Yan B. NUMB—from flies to humans. *Brian Dev.* 2010; 32(4):293-8
45. <http://translate.google.es/#en|es|numb>
46. Pece S, Confalonieri S, R Romano P, Di Fiore P. NUMB-ing down cancer by more than just a NOTCH. *Biochim Biophys Acta.* 2011; 1815:26–43.
47. Gulino A, Di Marcotullio L, Screpanti I. The multiple functions of Numb. *Expl Cell Res.* 2010; 316(6):900-906.
48. Karaczyn A, Bani-Yaghoub M, Tremblay R, Kubu C, Cowling R, Adams T, Prudovsky I, Spicer D, Friesel R, Vary C, Verdi J. Two novel human NUMB isoforms provide a potential link between development and cancer. *Neural Dev.* 2010; 5(31).
49. Verdi J, Bashirullah A, Goldhawk D, kubu C, Jamali M, Meakin S, Lipshitz H. Distinct human NUMB isoforms regulate differentiation vs proliferation in the neuronal lineage. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999; 96(18):10472-6.
50. Dho S, French M, Woods S, McGlade C. Characterization of four mammalian numb protein isoforms. Identification of cytoplasmic and membrane-associated variants of the phosphotyrosine binding domain. *J Biol Chem.* 1999; 274: 33097-33104.
51. Jafar-Nejad H, Norgan K, Bellen H. Numb: “Adapting” Notch for Endocytosis. *Dev Cell.* 2002; 3(2): 155-156.
52. McGill M, McGades J. Mammalian Numb Proteins Promote Notch1 Receptor Ubiquitination and Degradation of the Notch1 Intracellular Domain. *J Biol Chem.* 2003; 278(26): 23196-23203.
53. Ostrakhovitch E. Interplay between Numb and Notch in epithelial cancers: Role for dual oxidase maturation factor. *Eur J Cancer.* 2009; 45(12):2071-6.
54. Martin N. 2010. Papel de la proteína adaptadora Numb en la modulación de la señalización por TCR. Tesis. Universidad de Granada.

55. Pece S, Serresi M, Santolini E, Capra M, Hulleman E, Galimberti V, Zurrída S, Maisonneuve P, Viale G, Di Fiore P. Loss of negative regulation by Numb over Notch is relevant to human breast carcinogenesis. *J Cell Biol.* 2004; 167(2):215-221.
56. Juven-Gershon T, Shifman O, Unger T, Elkeles A, Haupt Y, Oren M. The Mdm2 Oncoprotein Interacts with the Cell Fate Regulator Numb. *Mol. Cell. Biol.* 1998; 18(7):3974-3982.
57. Chen H, Chen X, Ye F, Lu W, Xie X. Symmetric Division and Expression of Its Regulatory Gene Numb in Human Cervical Squamous Carcinoma Cells. *Pathobiology.* 2009; 76(3):149-154.
58. Fiuza U, Martínez A. Cell and molecular biology of Notch. *J Endocrinol.* 2007; 194:459–474.
59. Chapman G, Liu L, Sahlgren C, dahlqvist C, Lendhal U. High levels of Notch signaling down-regulate NUMB and NUMBlike. *J Cell Biol.* 2006; 175(4):535-540.
60. Liu J, Sato C, Cerletti M, Wagers A. Notch signaling in the regulation of stem cell self-renewal and differentiation. *Curr Top Dev Biol.* 2010; 92:367-409.
61. Rangarajan A, Talora T, Okuyama R, Nicolas M, Mammucari C, Chambon P, Miele L, Aguet M, Radtke F and Dotto P. Notch signaling is a direct determinant of keratinocyte growth arrest and entry into differentiation. *EMBO J.* 2001; 20:3427-3436.
62. Dotto P. Notch tumor suppressor function. *Oncogene.* 2008; 27(38): 5115–5123.
63. Liu J, Sato C, Cerletti M, Wagers A. Notch signaling in the regulation of stem cell self-renewal and differentiation. *Curr Top Dev Biol.* 2010; 92:367-409.
64. Woo HN, Park JS, Gwon AR, Arumugam TV, Jo DG. Alzheimer's disease and Notch signaling. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009 Dec 25; 390(4):1093-7.
65. Sjölund J, Manetopolus C, Stockhausen M, Axelson H. The Notch pathway in cancer: differentiation gone awry. *European Journal of Cancer.* 2005; 41: 2620–2629.
66. Radtke F, Schweisguth F, Pear W. The Notch Gospel. *EMBO.* 2005.; 6 (12):1120-1125.
67. Santos L, Leon-Galvan M, Marino-Marmolejo N. Vía de señalización Notch y nuevas estrategias para el tratamiento de cáncer. *Salud pública de México.* 2006; 48: 155-165.
68. Kopan & Xenia. The canonical notch signaling pathway: unfolding the activation mechanism. *Cell.* 2009; 137(2): 216-33.
69. Radtke F, Schweisguth F, Pear W. The Notch Gospel. *EMBO.* 2005; 6 (12):1120-1125.

70. Gordon W, Arnett K, Blacklow S. The molecular logic of Notch signaling: a structural and biochemical perspective. *J Cell Sci.* 2008; 121:3109-3119.
71. van Limpt V, Chan A, Caron H, Sluis PV, Boon K, Hermus MC, Versteeg R. SAGE analysis of neuroblastoma reveals a high expression of the human homologue of the Drosophila Delta gene. *Med Pediatr Oncol.* 2000, 35:554-558.
72. Siziopikou K, Jang M-S, Miao H, Miele L. Notch signaling in ductal carcinoma *in situ* of the breast [abstract]. *Proc Am Assoc Cancer Res.* 2002; 43:4.
73. Rae F, Stephenson S, Nicol D, Clements J. Novel association of a diverse range of genes with renal cell carcinoma as identified by differential display. *Int J Cancer.* 2000; 88:726-732.
74. Sriuranpong V, Borges M, Ravi R, Arnold D, Nelkin B, Baylies S, Ball D. Notch signaling induces cell cycle arrest in small cell lung cancer cells. *Cancer Res.* 2001; 61:3200-3205.
75. Talora C, Cialfi C, Segatto O, Monrrone S, Choi J, Frati L, Dotto G, Gulino A, Screpanti I. Constitutively active Notch1 induces growth arrest of HPV-positive cervical cancer cells via separate signaling pathways. *Exp Cell Res.* 2005; 305(2):343-54.
76. Talora C, Sgroi DC, Crum CP, Dotto GP. Specific down-modulation of Notch1 signaling in cervical cancer cells is required for sustained HPV-E6/E7 expression and late steps of malignant transformation. *Genes Dev.* 2002; 16(17):2252-63.
77. Wang, QINY H, B. Chen H, Xin X, Lly J Hany H . Overexpressed active Notch1 induces cell growth arrest of HeLa cervical carcinoma cells. *Int J Gynecol Cancer.* 2007; 17: 1283–1292
78. Sakamoto K, Fujii T, Kawachi H, Miki Y, Omura K, Morita K, Kayamori K, Katsube K, Yamaguchi A. Reduction of NOTCH1 expression pertains to maturation abnormalities of keratinocytes in squamous neoplasms. *Lab Invest.* 2012; 92(5):688-702
79. Zagoura P, Stifani S, Blaumueller C, Carcangius M, Artavanis S. Alterations in Notch signaling in neoplastic lesions of the human cervix. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1995; 92:6414-6418.
80. Rangarajan A, Syal R, Selvarajah S, Chakrabarti O, Sarin A, Krishna S. Activated Notch1 Signaling Cooperates with Papillomavirus Oncogenes in Transformation and Generates Resistance to Apoptosis on Matrix Withdrawal through PKB/Akt. *Virology.* 2001; 286:23-30.
81. Lathion S, Schaper J, Beard P, Raj K. Notch1 Can Contribute to Viral-Induced Transformation of Primary Human Keratinocytes. *Cancer Res December.* 2003; 63: 8687.
82. Nair P, Somasundaram K, Krishna S. Activated Notch1 Inhibits p53-Induced Apoptosis and Sustains Transformation by Human Papillomavirus Type 16 E6 and E7 Oncogenes through a PI3K-PKB/Akt-Dependent Pathway. *J. Virol.* 2003; 77(12): 7106-7112.
83. Mittal S, Subramanyam D, Dey D, Kumar R, Rangarajan A. Cooperation of Notch and Ras/MAPK signaling pathways in human breast carcinogenesis. *Mol Cancer* 2009; 23:8-128.

84. <http://www.unioviado.es/estresoxidativo/protocolos/Inmunoprecipitacion.pdf>
85. Narayan N, Massimi P, Banks L. CDK phosphorylation of the discs large tumor suppressor controls its localization and stability. *J Cell Sci.* 2009; 1(122):65-74.
86. Doeberitz V.. New markers for cervical dysplasia to visualise the genomic chaos created by aberrant oncogenic papillomavirus infections. *Eur J Cancer.* 2002; 38(17):2229-2242.
87. Herrick J, Conti C, Teissier S. Genomic organization of amplified MYC genes suggests distinct mechanisms of amplification in tumorigenesis. *Cancer Res.* 2005; 65: 1174–1179.
88. Bertelsen BI, Steine SJ, Sandvei R, *et al.* Molecular analysis of the PI3K-AKT pathway in uterine cervical neoplasia: frequent PIK3CA amplification and AKT phosphorylation. *Int J Cancer.* 2006; 118:1877-1883.
89. Zhang A, Maner S, Betz R. Genetic alterations in cervical carcinomas: frequent low-level amplifications of oncogenes are associated with human papillomavirus infection. *Int J Cancer.* 2002; 101: 427–433.
90. Imoto I, Tsuda H, Hirasawa A. Expression of cIAP1, a target for 11q22 amplification, correlates with resistance of cervical cancers to radiotherapy. *Cancer Res.* 2002; 62: 4860–48.
91. Cheung TH, Lo KW, Yim SF. Epigenetic and genetic alternation of PTEN in cervical neoplasm. *Gynecol Oncol.* 2004; 93: 621–627.
92. Kühne C, Gardiol D, Guarnaccia C, Amenitsch H, Banks L. Differential regulation of human papillomavirus E6 by protein kinase A: conditional degradation of human discs large protein by oncogenic E6. *Oncogene.* 2000; 19(51):5884-91.
93. Katoh M, Katoh M. NUMB is a break of WNT - Notch signaling cycle. *Int J Mol Med.* 2006; 18: 517-521.
94. Carter S, Vousden K. A Role of NUMB in p53 stabilization. *Genome Biol.* 2008; 2:221.
95. Bellaïche Y, Radovic A, Woods D, Hough C, Parmentier M, O'Kane C, Bryant P, Schweisguth F. The Partner of Inscuteable/Discs-large complex is required to establish planar polarity during asymmetric cell division in *Drosophila*. *Cell.* 2001; 106(3):355-66.