

Instituto de Parasitología y Biomedicina
“Lopez-Neyra”

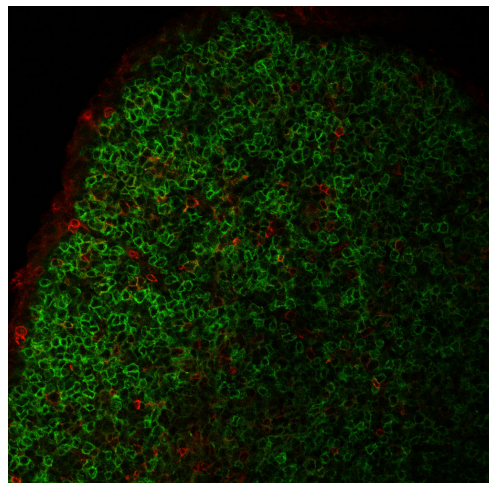


Universidad de Granada



TESIS DOCTORAL

**“PAPEL DE LA PROTEINA ADAPTADORA NUMB EN DIVISION
ASIMETRICA, SEÑALIZACIÓN POR PRE-TCR Y PROLIFERACION
DURANTE EL DESARROLLO DE TIMOCITOS”**



MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Rocío Aguado Álvarez

DIRECTORA

Dra. Matilde Cañelles López

Científica Titular del CSIC

Granada, 2009

Editor: Editorial de la Universidad de Granada
Autor: Rocío Aguado Álvarez
D.L.: GR 2284-2009
ISBN: 978-84-692-3080-0

AUTORIZACION PARA LA PRESENTACION DE LA TESIS

Dra. MATILDE CAÑELLES LOPEZ, Científica Titular del CSIC

CERTIFICA :

que Dña. Rocío Aguado Alvarez, Licenciada en Biología, por la Universidad de Granada, ha realizado bajo su dirección en el Departamento de Biología Celular e Inmunología del Instituto de Parasitología y Biomedicina "Lopez-Neyra" del CSIC, la presente tesis titulada :

"PAPEL DE LA PROTEINA ADAPTADORA NUMB EN DIVISION ASIMETRICA, SEÑALIZACIÓN POR PRE-TCR Y PROLIFERACION DURANTE EL DESARROLLO DE TIMOCITOS"

para la obtención del título de Doctora en Biomedicina.

Y para que conste y surta sus efectos en el expediente correspondiente, expido la presente certificación en Granada, a de de 2009.

DIRECTORA DEL TRABAJO

LA ASPIRANTE

Dra. D^a Matilde Cañelles López

Lda. D^a Rocío Aguado Alvarez

Esta Tesis Doctoral ha sido realizada en el Departamento de Biología Celular e Inmunología del Instituto de Parasitología y Biomedicina "Lopez-Neyra" (CSIC) de Granada y ha podido ser realizada gracias a una beca de Postgrado-I3P del CSIC, cofinanciada por el fondo Social Europeo (2006); un contrato de Formación-I3P del CSIC (2007) y un contrato asociado al proyecto "BFU-2007-67476" del Ministerio de Educación y Ciencia (2008).

Parte de los resultados de esta Tesis han sido descritos y enviados para su publicación en:

Aguado R., Martín-Blanco N., Canelles M. *Numb plays a crucial role during thymocyte development.* 2009.

*"Que nunca te falte un sueño por el que luchar,
un proyecto que realizar, algo que aprender,
un lugar a donde ir y alguien a quien querer"*

A mis padres, José Antonio y M^a Carmen

A mi hermano, Alfonso.

INDICE



INDICE

ABREVIATURAS	1
RESUMEN	3
INTRODUCCIÓN	5
1. Desarrollo, Estructura y Función el Timo	5
2. Desarrollo Temprano de Linfocitos T	7
3. Principales Factores implicados en Desarrollo Temprano de Linfocitos T ...12	
3.1. <i>pre-TCR</i>	12
3.2. <i>Notch</i>	14
3.3. <i>Microambiente</i>	16
4. La Proteína Adaptadora Numb	18
4.1. Estructura	18
4.2. Funciones	22
4.2.1. <i>División Asimétrica</i>	22
4.2.2. <i>Endocitosis</i>	29
4.2.3. <i>Modulación Negativa de Notch</i>	31
4.2.4. <i>Oncosupresión</i>	33
4.3. Numb en el Sistema Inmune	34
JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	35

MATERIALES Y MÉTODOS	36
1. Materiales	36
2. Métodos	43
2.1. <i>Experimentos con ratones</i>	43
2.2. <i>Experimentos con líneas celulares</i>	49
 RESULTADOS	 53
1. Papel de Numb en División Asimétrica : Localización de Numb durante la proliferación de Timocitos Fetales	53
1.1. <i>Numb es segregada asimétricamente durante la proliferación de timocitos</i>	54
1.2. <i>El pre-TCR es segregado de forma simétrica durante la división en timocitos</i>	56
2. Efecto de las Alteraciones de los Niveles Funcionales de Numb sobre el Desarrollo Temprano del Timo :	
2.1. Sobreexpresión de Numb	59
2.1.1. <i>La sobreexpresión de Numb provoca un aumento de la celularidad de las poblaciones celulares del timo</i>	59
2.1.2. <i>La sobreexpresión de Numb provoca alteración en el proceso de división asimétrica</i>	60
2.2. Expresión de un Dominante Negativo de Numb	62
2.2.1. <i>Estructura de Numb dominante negativo</i>	63
2.2.2. <i>La expresión de un dominante negativo de Numb provoca una disminución importante del tamaño del timo</i>	64

2.2.3. R ratones <i>dnNb TG</i> presentan un bloqueo en DN3 así como una menor proliferación en el estadio DN.....	66
2.2.4. El dominante negativo de <i>Numb</i> provoca una alteración de la división asimétrica.....	69
2.2.5. El dominante negativo de <i>Numb</i> inhibe la capacidad de <i>Numb</i> endógena de inhibir la señalización por <i>Notch</i>	73
2.2.6. Los ratones <i>dnNb TG</i> presentan una excesiva señalización por pre-TCR, provocando apoptosis y diferenciación prematura de la subpoblación DN3.....	74
2.2.7. La excesiva señalización por pre-TCR correlaciona con elevados niveles de <i>TCRβ</i>	76
2.2.8. Bloqueo del mecanismo degradativo del pre-TCR en timocitos DN3 de ratones <i>dnNb TG</i>	77
2.2.9. La localización endosomal de <i>c-Cbl</i> está alterada en timocitos DN de ratones <i>dnNb TG</i>	78
3. Efecto de la Expresión de un Dominante Negativo de <i>Numb</i> en una Línea Celular Leucémica : Estudio de su carácter Oncosupresor.....	82
3.1. La expresión de un dominante negativo mediante un plásmido-vector ocasiona un ligero aumento proliferativo en células K562.....	83
3.2. La expresión de un dominante negativo mediante un vector lentiviral provoca un importante aumento proliferativo en células K562.....	85
3.3. El aumento proliferativo va acompañado de aumento en la expresión de <i>Hes-1</i> y <i>Myc</i> a nivel de mRNA.....	88
DISCUSIÓN GENERAL	89
CONCLUSIONES	95
BIBLIOGRAFÍA	96
PUBLICACIONES	104

ABREVIATURAS



APC	Aloficocianina
ARNm	Acido ribonucleico mensajero
BrdU	2 Bromo-2'-deoxyuridina
BSA	Albúmina sérica bovina
cDNA	Acido desoxirribonucleico complementario del ARN mensajero
CLP	Progenitores linfoides comunes
CMV	Citomegalovirus
CFSE	[5(6)]-ester succinimidyl diacetato de carboxyfluoresceína
DNA	Acido desoxirribonucleico
DN	Timocitos dobles negativos
DNNB	Dominante negativo de Numb
DNNB TG	Ratón transgénico que expresan un dominante negativo de Numb
DP	Timocitos dobles positivos
EDTA	Acido etilendiamino tetra-acético
FACS	Citómetro de flujo
FBS	Suero fetal bovino
FITC	Isocianato de fluoresceína
GFP	Proteína verde fluorescente
IC	Dominio intracelular
KNOCKOUT	Carencia inducida de la síntesis de una proteína.
MHC	Complejo mayor de histocompatibilidad
NGS	Suero normal de cabra
NK	Células natural killer

NUMB TG	Ratón que sobreexpresa la isoforma 71 de Numb
pb	Par de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PBS	Tampón salino de fosfatos
PE	Ficoeritrina
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
PRR	Región rica en prolina
PTB	Dominio de unión a fosfotirosina
pTα	Cadena α del pre-TCR
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa retrotranscriptasa
SDS	Sodio dodecil sulfato
SFFV	Spleen focus forming virus
SP	Timocitos simples positivos
TCR	Receptor de la célula T
TCRβ	Cadena β de TCR
WT	Ratón wild-type o salvaje

RESUMEN



La linfopoyesis constituye un proceso complejo mediante el cual se genera un repertorio de células T y B preparado para la defensa del organismo frente a infecciones. En el caso de las células T, la linfopoyesis tiene lugar en el timo, hacia donde los precursores se dirigen, procedentes de la médula ósea, y donde van a recibir una serie de señales que dirigirán la diferenciación de esos precursores hasta linfocitos T funcionales.

Múltiples son los procesos, que incluyen diferentes proteínas y mecanismos de señalización, implicados y necesarios para un correcto desarrollo del sistema linfocítico. Uno de los más importantes a nivel de precursores y desarrollo temprano es el denominado división binaria o asimétrica, proceso por el cual los precursores deben decidir entre auto-renovación (proliferación) o diferenciación, consiguiéndose así un equilibrio que permita, tanto el mantenimiento de un pool de progenitores, como otro de células ya diferenciadas hacia un determinado linaje. Las dos proteínas responsables de este proceso de división asimétrica y por tanto, cruciales en las decisiones de linaje en múltiples sistemas, incluido el sistema inmune, son la proteína Notch y su modulador negativo, la proteína adaptadora Numb.

Numb ha sido definida como el principal determinante intrínseco de la división asimétrica, siendo heredada sólo por una de las dos células hijas. Así, aquella célula que la herede dejará de recibir la señalización por Notch, adquiriendo un compromiso celular distinto al de su célula hermana que no la hereda, la cual sí recibirá la señalización por Notch. Pero ésta no es la única función conocida de Numb, ya que también se sabe que participa en la regulación de la señalización de algunos receptores al funcionar como adaptador en endocitosis dependiente de clatrina.

Así mismo, Numb también parece jugar un papel importante en proliferación oncogénica, ya que su expresión está inhibida en cáncer mamario humano y mutaciones inducidas en ella provocan neuroblastomas en *Drosophila*. Esta función quizás sea consecuencia de su papel como regulador negativo de Notch, una de las proteínas más fuertemente implicada en producción de tumores.

En esta tesis se ha querido analizar por una parte, el papel de Numb en división asimétrica y señalización de receptores durante el desarrollo temprano de timocitos. Para ello, se ha utilizado la alteración de los niveles funcionales de Numb, bien por expresión de un dominante negativo o por sobreexpresión de la proteína completa; y por otra parte, si el inhibir la funcionalidad de Numb en una línea eritroleucémica resulta en un aumento de la proliferación oncogénica.

Así, mostramos por primera vez que la división asimétrica tiene lugar durante el desarrollo normal del timo y como la alteración funcional de Numb, tanto por exceso como por defecto, afecta fuertemente al proceso de división asimétrica y a la producción de timocitos maduros.

Además, hemos comprobado que la inhibición de Numb afecta gravemente la endocitosis del pre-TCR, provocando un exceso de señalización que desencadena una cascada de alteraciones como bloqueo en DN3, diferenciación prematura y alteración de la función de la proteína c-Cbl, encargada de la degradación del pre-TCR.

De manera que estos resultados revelarían dos nuevos aspectos del desarrollo temprano de linfocitos T: Primero, la importancia de unos adecuados niveles endógenos de Numb para una correcta división asimétrica y segundo, un nuevo papel de Numb como adaptador clave en la degradación y endocitosis del pre-TCR por parte de c-Cbl.

Con respecto al papel de Numb en proliferación oncogénica, hemos podido observar cómo la inhibición de Numb desencadena un aumento de señalización por Notch, provocando un incremento proliferativo bastante importante en una línea celular eritroleucémica. Esto apoyaría la recientemente descrita función de Numb como posible proteína supresora de tumores.

INTRODUCCION



1. DESARROLLO, ESTRUCTURA Y FUNCION DEL TIMO

El sistema inmune está formado por un conjunto de mecanismos que protegen al organismo de infecciones por medio de la identificación y eliminación de agentes patógenos. Las células que componen este sistema se originan en dos órganos principales: timo y medula ósea, lugares que albergaran el desarrollo de linfocitos T y B respectivamente.

El timo es un órgano linfoide primario con estructura bilobulada que se localiza justo encima del corazón. Su organogénesis es el resultado de las interacciones mesénquimo-epiteliales entre el mesénquima, derivado de la cresta neural, y el endodermo, derivado de la tercera bolsa faríngea.

Cada lóbulo está rodeado por una cápsula formada por tejido conectivo denso, de origen mesenquimal. Su principal componente estructural es una red de células epiteliales formadoras del estroma. Este tipo celular es altamente heterogéneo, permitiendo la organización del timo en tres zonas únicas: región subcapsular, cortical y medular. Junto a este tipo celular también se localizan células dendríticas, macrófagos y células linfoides (**Figura 1**).

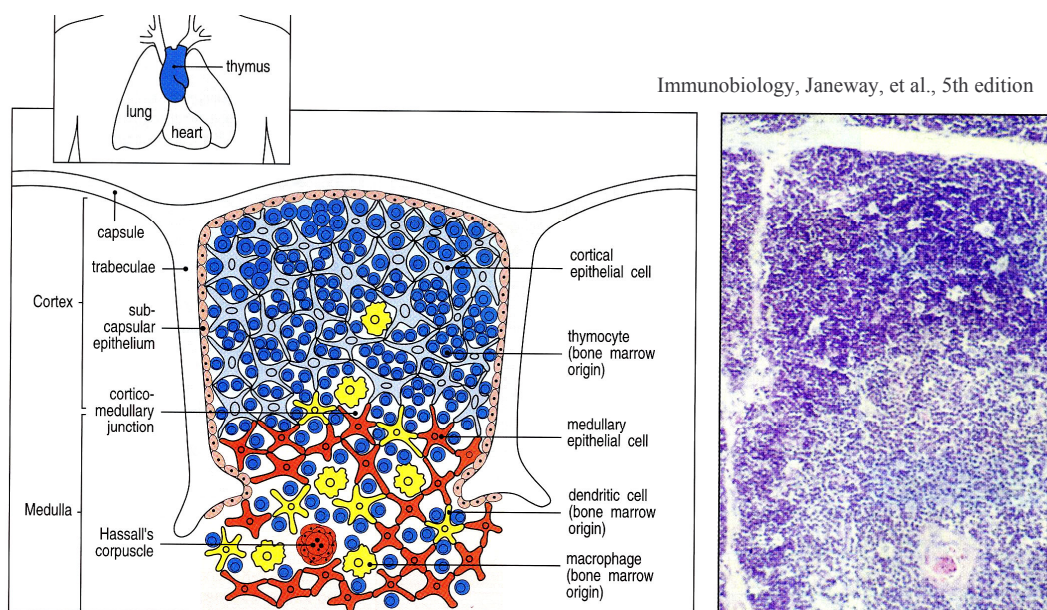


Figura 1. Localización y Estructura del Timo

La función del timo de albergar el desarrollo del linaje T es posible gracias al microambiente tímico y en particular, a la disposición en 3D de su epitelio, lo cual facilita la migración de los timocitos y las interacciones célula-célula al aumentar el área de superficie de contacto [1]. Esto ha sido corroborado por estudios que muestran como la pérdida de esa red tridimensional está directamente relacionada con la involución tímica dependiente de la edad, provocando una alteración en las señales necesarias para la timopoyesis [2, 3].

Por tanto, las células epiteliales tímicas son fundamentales para el desarrollo de los distintos estadios madurativos de las células T. Así, las corticales, poseedoras de una morfología dendrítica que permite un mayor contacto célula-célula, son necesarias en las etapas tempranas de la timopoyesis al favorecer la selección positiva [4] mientras que las medulares son importantes para la selección negativa, al expresar MHC-I y MHC-II [5].

Pero no sólo es necesaria la interacción celular sino también la liberación de moléculas solubles, las quimioquinas, por parte de las células epiteliales. Estas quimioquinas son responsables de dirigir la migración de los timocitos durante su diferenciación.

El timo forma, por tanto, una compleja red estructural y funcional imprescindible para un adecuado proceso de desarrollo y diferenciación del linaje de células T a partir de precursores hematopoyéticos.

El conocimiento cada vez mayor de los factores y moléculas que lo componen han permitido desarrollar, en los últimos años, sistemas *in vitro* capaces de soportar el desarrollo temprano de timocitos. Bien sistemas tridimensionales como cultivos de timo fetal (FTOCs) o sistemas de monocapa de células estromales (OP9DL o TSCs), en cuyo caso se debe inducir la expresión de determinados ligandos debido a la carencia de la necesaria estructura 3D de estos sistemas [3].

2. DESARROLLO TEMPRANO DE LINFOCITOS T

El desarrollo de las células T dentro del timo ocurre en tres fases fundamentales: desarrollo temprano mediado por pre-TCR, selección positiva mediada por TCR y maduración funcional. En estos procesos las células proliferan, se diferencian y son seleccionadas para generar células T inmunocompetentes.

La linfopoyesis intratímica incluye diferentes estadios con diferencias genéticas, fenotípicas y de localización tímica [6-9].

El proceso de diferenciación tímica es similar en el timo embrionario y en el timo postnatal y adulto. La principal diferencia es que los precursores hematopoyéticos en el timo embrionario proceden del hígado fetal mientras que en el timo adulto proceden de la médula ósea.

Durante la embriogénesis del ratón, el primordio tímico se forma entre los días 10 y 11 de edad gestacional (cuarta semana de gestación en humanos), siendo colonizado por las células madre hematopoyéticas aproximadamente en el día 12 (octava semana en humanos). En este estadio, el rudimento tímico carece aún de la corteza y médula características del timo adulto. Sólo está constituido por precursores de las células tímicas epiteliales, las cuales continuaran diferenciándose y desarrollándose hasta generar las diferentes subpoblaciones corticales y medulares, responsables de facilitar el desarrollo completo de los timocitos. Al nacer, los ratones aún no han terminado de formar el timo adulto mientras que en humanos el timo está totalmente formado.

La llegada de los precursores no es continua sino intermitente y en oleadas, ocurriendo tanto durante la embriogénesis como tras el nacimiento. Así, la primera oleada de precursores llega en el ratón sobre el día 12 de vida fetal, comenzando rápidamente el proceso de diferenciación hacia timocitos, mientras que una segunda oleada llega sobre el día 19-20 y permanece sin diferenciarse hasta 6 o 7 días después del nacimiento, reemplazando a la primera generación de timocitos [10].

La linfopoyesis comprende una serie de etapas de diferenciación, pudiéndose distinguir 4 grandes tipos celulares de acuerdo a la expresión de moléculas de superficie (**Figura 2**):

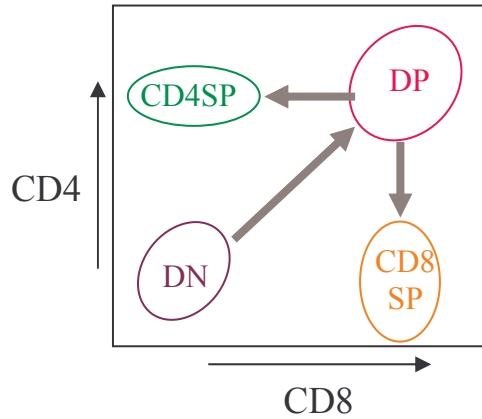


Figura 2. Esquema de análisis por citometría de las poblaciones de timocitos según sus moléculas de expresión.

La población doble negativa (DN) representa en el timo adulto el 3-5% del total de timocitos y es la única población celular presente en el timo fetal hasta el día 14-15 [9, 11]. Carecen de expresión de las moléculas CD4 y CD8 pero sí expresan CD44 y/o CD25, diferenciándose 4 subpoblaciones (**Figura 3**):

a) DN1 (CD25-CD44+) → Son células pluripotenciales con capacidad para generar células T, B, NK y dendríticas pero no mieloides [12]. Se localizan en la zona más interna del cortex tímico.

b) DN2 (CD25+CD44+) → Pierden ligeramente su capacidad de producir células B y NK pero aún son capaces de generar células dendríticas, células T $\gamma\delta$ y células T $\alpha\beta$. Se sitúan en la mitad de la corteza externa y representa la subpoblación de dobles negativas con mayor capacidad de migración.

c) DN3 (CD25+CD44-) → Durante este estadio se activan los genes RAG1 y RAG2, ocurriendo los reordenamientos V-D-J del gen de la cadena β del TCR, cadena que una vez sintetizada aparece en la superficie celular y unida a la cadena invariante $pT\alpha$, formando el pre-TCR. Sólo los timocitos DN3 capaces de señalizar por su pre-TCR pasan a DN4 en un proceso llamado “selección β ”, muriendo por apoptosis los demás. Este proceso implica una serie de eventos claves para el correcto desarrollo de los linfocitos T como son: 1) Compromiso hacia el linaje α/β ; 2) Exclusión alélica del locus TCR β , al inducir fosforilación y por tanto, inactivación de los genes RAG; 3) Diferenciación hacia dobles positivas; 4) Supervivencia; 5) Proliferación, ya que es en este estadio donde se produce una intensiva expansión celular con 6 a 8 ciclos proliferativos, estableciéndose el número adecuado y definitivo de timocitos en el timo. Predominan en la región subcapsular de la corteza.

d) DN4 (CD25-CD44-) → Aquellos que han elegido el linaje $\alpha\beta$ pasan por este estadio, donde pierden la expresión de CD25 y comienzan a regular la expresión de CD4 y CD8, pasando así al siguiente estadio de diferenciación, es decir, hacia dobles positivas (DP). Se localizan en la región subcapsular.

Existe una población de linfocitos CD4-CD8-TCR $\gamma\delta$, que representan 1/3 de la población doble negativa y que se dirige hacia el tejido epitelial.

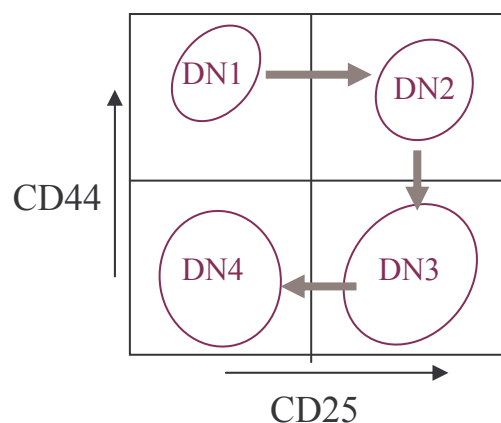


Figura 3. Esquema de análisis por citometría de las subpoblaciones DN

El siguiente estadio de diferenciación lleva a la aparición de las células DP (80-85%). A nivel fetal esta población comienza a aparecer en el día 17 gestacional, llegando a representar el 80% en el día 10 después del nacimiento.

Esta población se caracteriza por expresar en su superficie CD4 y CD8 y por comenzar a generar la cadena α del TCR, de manera que el pre-TCR se sustituye por un TCR maduro. A continuación se da el proceso de selección positiva, es decir, son seleccionados aquellos precursores capaces de interactuar eficientemente con complejos péptido-MHC en las células estromales; y de selección negativa, donde son eliminados los que generan señales demasiado fuertes a través de su TCR. La población resultante migra de nuevo hacia la médula tímica para madurar a simples positivas.

El último estadio de diferenciación es el de simple positivas (10-15%), apareciendo ya tras el nacimiento, y donde hay que distinguir dos poblaciones diferenciadas : $CD4^+ CD8^- SP$, responsables de la defensa frente a infecciones extracelulares y $CD4^- CD8^+ SP$, encargadas de la defensa frente a infecciones intracelulares. La relación CD4:CD8 es aproximadamente de 2:1. Ambas poblaciones migrarán hacia la periferia para llevar a cabo su función.

Por tanto, el mecanismo de diferenciación de timocitos desde un precursor hematopoyético es bastante complejo, sufriendo numerosas etapas y dependiendo de multitud de factores (**Figura 4**). La alteración en cualquiera de ellos va a provocar modificaciones que comprometerán seriamente la funcionalidad de los linfocitos maduros.

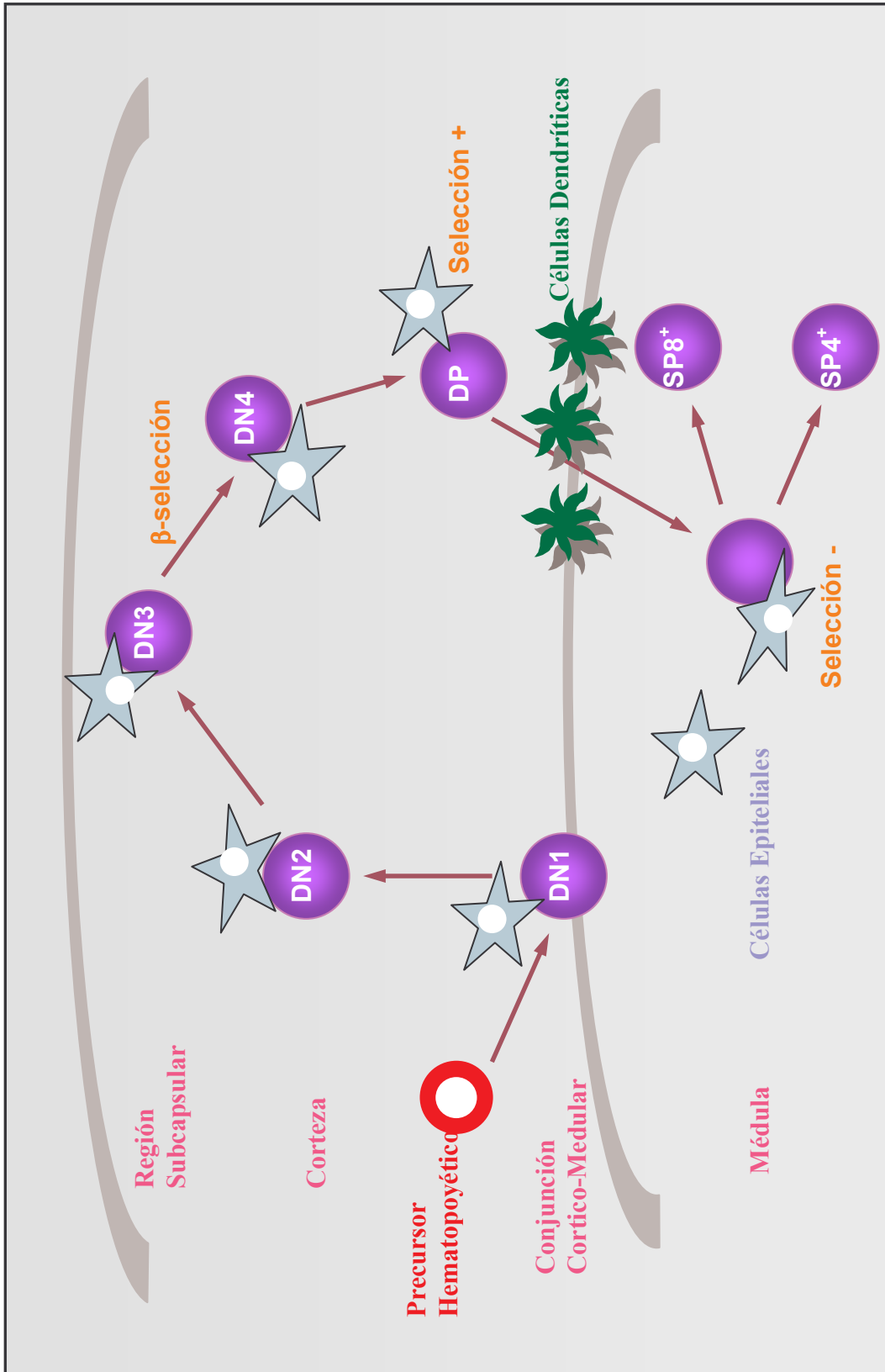


Figura 4. Etapas del desarrollo de los Linfocitos T

3. PRINCIPALES FACTORES IMPLICADOS EN EL DESARROLLO TEMPRANO DE LINFOCITOS T

Múltiples son los procesos implicados en dirigir el desarrollo de los linfocitos pero quizás los más importantes a nivel de dobles negativas sean la señalización por pre-TCR, por una proteína de membrana llamada Notch y por quimioquinas liberadas por el microambiente tímico.

3.1. Pre-TCR

En la diferenciación intratímica, durante la transición desde el estadio DN3 al DN4 tiene lugar un proceso crucial para el desarrollo de linfocitos T conocido como selección β . Para que esta selección tenga lugar la célula DN3 debe expresar en su superficie un complejo denominado pre-TCR.

Este complejo está constituido por una unión covalente entre una cadena TCR β y una cadena invariante pT α , uniéndose ambas de forma no covalente a moléculas CD3 (**Figura 5**). El pre-TCR se localiza en rafts, es decir, en microdominios de membrana enriquecidos con glicoesfingolípidos, colesterol y moléculas de señalización necesarias para el desarrollo de las células T como p56^{lck}, ZAP-70 y LAT. Además, presenta una estabilidad limitada en la membrana como consecuencia de una tasa degradativa constitutiva acelerada [13], localizándose en lisosomas [13] y carece de reciclaje nuevamente a la membrana [14], lo cual lo diferencia del TCR $\alpha\beta$ y TCR $\gamma\delta$. Esto parece ser necesario para la regulación de la duración de su señalización, ya que se ha demostrado que la sobreexpresión de la cadena pT α altera la diferenciación normal [15].

Otra diferencia con respecto al TCR, es su señalización continua e independiente de ligando, de manera que su mera expresión en superficie proporciona el estímulo necesario sin necesidad de interactuar con ninguna molécula. Se cree que es

la cadena pT α la responsable de esta peculiar característica, debido a su capacidad para formar oligómeros, gracias a una serie de residuos de su dominio extracelular. Esta teoría se apoya en investigaciones que muestran cómo alteraciones en esos residuos bloquean la selección β [16]. Además, otras investigaciones han permitido concluir que todas las peculiaridades del pre-TCR, que le diferencian del TCR maduro, son aportadas por la cadena pT α [17, 18].

Antes de la señalización por pre-TCR se producen reordenamientos productivos del gen Tcrb, generando una diversidad de cadenas TCR β que pasaran a expresarse en la superficie de los timocitos DN3 y que junto con la cadena pT α formarán el pre-TCR. Es en ese momento cuando comienza la señalización por este complejo, desencadenando exclusión alélica del gen Tcrb, y proliferación y supervivencia únicamente de aquellas células con complejos pre-TCR funcionales, que continuarán con su diferenciación hacia dobles positivas. Para asegurar un amplio repertorio y evitar la pérdida de clones que pudieran generar cadenas β funcionales, los timocitos DN3 expresan un receptor con alto potencial de oligomerización y con muy baja sensibilidad a señales del ambiente celular que lo rodea.

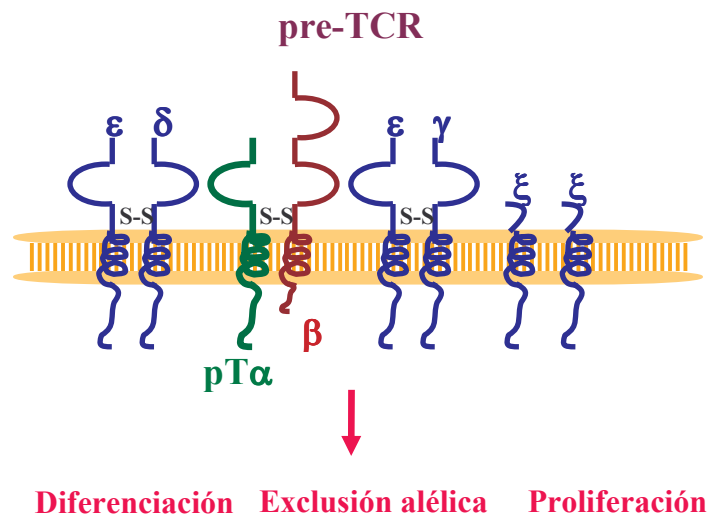


Figura 5. Estructura y Funciones del pre-TCR

La señalización por este complejo representa el primer punto de control durante la diferenciación de los linfocitos T y el único existente en el estadio temprano del desarrollo. Es por esto que debe estar finamente regulado, participando en este proceso tanto la propia cadena $pT\alpha$, la cual promueve la internalización del complejo [14], como una ubiquitin-ligasa llamada c-Cbl que parece ser la responsable de la ubiquitinización del receptor, favoreciendo así su degradación fundamentalmente lisosomal, aunque también la hay proteosomal y por tanto consiguiéndose una atenuación de la señal [13, 19] (**Figura 6**).

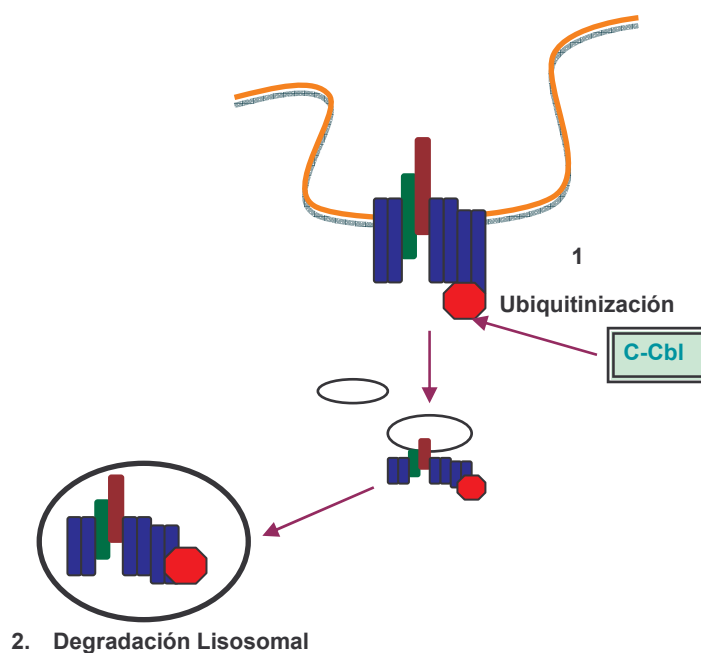


Figura 6. Esquema del mecanismo de degradación del pre-TCR por c-Cbl

3.2. NOTCH

Notch es una proteína transmembrana que participa en decisiones de linaje y diferenciación en varios organismos desde *Drosophila* a humanos; así como en una gran variedad de sistemas, incluyendo el sistema inmune y hematopoyético [20].

Los distintos receptores y ligandos de Notch son expresados en el timo, también en médula ósea y ganglios linfáticos, desde estadios muy tempranos del

desarrollo [21, 22] y según qué tipo de receptor y ligando actúe en cada momento y en cada órgano la diferenciación linfocítica será dirigida en un sentido u otro (**Figura 7**). Así, se sabe que esta proteína participa en la decisión entre diferenciación hacia linfocitos T o linfocitos B [23-25] ; decisión entre linfocitos $T\alpha\beta$ y linfocitos $T\gamma\delta$ [26] ; diferenciación entre CD4 y CD8 [27, 28] y diferenciación entre Th1 y Th2 [29] .

Existe controversia con respecto al papel de Notch en la decisión hacia CD4 o CD8. Así, uno de los estudios revela que la señalización activa de una versión truncada del dominio intracelular de Notch bajo el promotor lck favorece la diferenciación hacia CD8 [27], mientras que otro estudio, que utiliza la expresión retroviral de una versión completa del dominio intracelular de Notch revela que favorece la diferenciación tanto hacia CD4 como hacia CD8 [28]. El por qué de estos resultados tan dispares parece ser debido a las diferencias en las construcciones utilizadas para Notch, así como en los promotores utilizados.

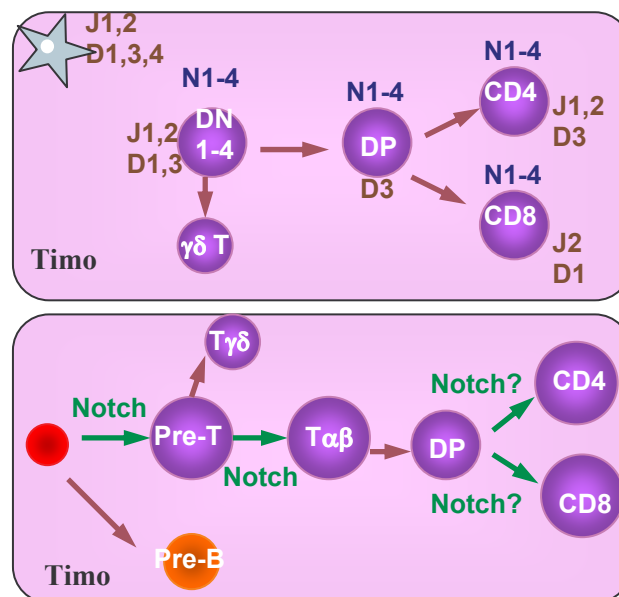


Figura 7. Expresión de receptores (azul) y ligandos (marrón) de Notch (panel superior). Esquema de la señalización por Notch en linfopoyesis (panel inferior)

También varios estudios han puesto de manifiesto la posible participación de

Notch durante la selección β , aunque sigue sin estar claro en qué consiste esa participación. Así, unos estudios parecen indicar que Notch es fundamental en este proceso porque controla la expresión del gen pT α [30, 31] mientras que otros aseguran que ejerce un papel por sí mismo e independiente del pre-TCR [32, 33]. Sea como sea, de lo que no hay duda es de la importancia de estos dos factores durante la diferenciación del estadio doble negativo, ya actúen dependiente o independientemente el uno del otro.

Además, se ha demostrado que más del 50% de las leucemias linfoblásticas agudas de células T se deben a mutaciones que afectan al dominio extracelular de Notch [34], y al menos un 1% de este tipo de leucemias está provocado por una translocación t(7;9), fusionándose el locus que codifica TCR β con una porción del gen Notch, lo cual origina una expresión constitutiva de su dominio intracelular [35].

Todos estos datos demuestran el papel tan importante que la proteína Notch ejerce durante el desarrollo linfoide, ya que de su buen funcionamiento va a depender el desarrollo de un sistema linfocítico adecuadamente funcional. Todavía queda mucho por conocer acerca del mecanismo de esa ruta de señalización y sobre todo qué ligandos y receptores participan en cada decisión, pero lo conocido hasta ahora deja claro que esta proteína es crucial en las decisiones de linaje dentro del sistema inmune.

3.3. MICROAMBIENTE

El término “microambiente tímico” hace referencia al conjunto de células y moléculas que van a interactuar con los timocitos. Así, ese microambiente lo constituye tanto la estructura en 3-D del timo, lo cual favorece el contacto célula-célula, como todas las quimioquinas e inteleuquinas liberadas por las células estromales corticales y medulares.

Las quimioquinas son responsables de regular la localización y movilidad de los timocitos por las diferentes zonas del timo durante su diferenciación [36, 37]. Para su

reconocimiento por parte de los timocitos éstos van expresando diferentes receptores a lo largo de su proceso de diferenciación. Alteraciones en estos receptores provocan bloqueos en el estadio de dobles negativas [38, 39].

Con respecto a las interleuquinas, quizás la mas importante sea la IL-7, ya que es fundamental para la proliferación, diferenciación y supervivencia durante los estadios tempranos del desarrollo de células T [40-42] . En concreto, es clave para la proliferación y diferenciación del estadio DN1, DN2 y DN3, aunque después de la selección β y previo a la selección positiva los timocitos parecen ser insensibles a su señal [43, 44], quizás para garantizar en esos estadios los procesos de muerte de aquellas células que no pasan esos dos puntos de control.

Por tanto queda claro que son varias las proteínas y complejos los mecanismos participantes durante el desarrollo de células T, necesitándose una correcta interrelación entre todos ellos para que pueda tener lugar una adecuada linfopoyesis de células T.

4. LA PROTEINA ADAPTADORA NUMB

4.1. ESTRUCTURA

Numb es una proteína adaptadora de localización intracelular y que ha conservado evolutivamente su homología funcional.

Posee una estructura con múltiples dominios a través de los cuales es capaz de unirse a diferentes proteínas. Así, posee un dominio de unión a fosfotirosina o PTB en su extremo amino-terminal, mientras que en el extremo carboxi-terminal presenta tres regiones ricas en prolina o PRR con motivos altamente conservados como DPF y NPF [45].

Las proteínas que contienen dominios PTB funcionan como adaptadores, organizando los complejos de señalización. En los últimos años han alcanzado una gran notoriedad debido al amplio rango de procesos fisiológicos que regulan, incluyendo desarrollo neuronal, respuesta inmune y crecimiento celular.

Los dominios PTB se unen a péptidos con secuencias NPXY y las proteínas que contienen estos dominios se agruparon en 2 familias, *IRS like PTBs* y *Shc like PTBs*, según sus diferencias estructurales; sin embargo, recientemente ha surgido una nueva clasificación [46], compuesta por 3 familias, atendiendo a la relación estructura/función : *IRS like PTBs*, *Shc like PTBs* y *Dab-2 like PTBs*. Ésta última nueva familia se compone de proteínas pertenecientes a la familia Shc pero que poseen diferencias suficientes, en cuanto a tipo de ligandos a los que se unen así como en la secuencia de unión al ligando, para ser considerada como una nueva familia.

En la siguiente tabla se muestran esas diferencias entre las familias Shc y Dab-2 :

Familia PTB	Dominio PTB	Ligando	Secuencia ligando
<i>Dab-2</i>	mNumb	Péptido sintético	AYIGP p YL
	mNumb	Numb associated kinase (NAK)	GFSNMS F EDFP
	mNumb	Ligand of Numb-protein X	EPGLDNPA Y TSSVE
	mDab-2	LDLR	NINSIFDNPV Y QKTT
	mDab-2	Amyloid precursor protein (APP)	NGYENP T YK
	hARH	LDLR	NINSIFDNPV Y QKTT
<i>Shc</i>	mShc	EGFR	HSTAVGNPE p YLN
	mShc	IL-2R	SCFTNQG p YFF
	mShc	IL-3R	FDENG Pp YLGPPQ
	mShc	Integrin β 4	DLLPNH S p Y VFRV
	mShc	Insulin receptor (IR)	LYASSNPE p YLS

Tabla I. *Ligandos de proteínas PTB*

Como se puede observar en la tabla anterior, Numb pertenece a la familia Dab-2, dentro de la cuál existen varios homólogos con respecto al PTB : Dab-2, ARH y Numblike. Además, si estudiamos el grado de similaridad de sus PTBs con respecto a Numb comprobamos que es bastante alto (**Tabla II**), mientras que con Shc es menor.

	Numblike	Dab-2	ARH	SHC
Numb	68.20	43.96	41.22	25.71

Tabla II. *Porcentaje de similaridad entre PTBs*

También es importante destacar que, mientras todos los ligandos del PTB de Shc contienen una fosfotirosina (pY), el PTB de las proteínas de la familia de Dab-2 sólo son capaces de unir pY en un péptido sintético. Esto nos permite concluir que un dominio negativo consistente en el dominio PTB de Numb podría potencialmente inhibir, además de a Numb, a todas sus proteínas con PTBs altamente homólogas que además se unen a ligandos afines, como Numblike, Dab-2 y ARH, pero no a Shc.

La mayoría de los dominios PTB conocidos han sido encontrados en mamíferos, unos 150. Análisis de las proteínas que los poseen han revelado que carecen de dominios que contengan actividades intrínsecas catalíticas aunque sí poseen dominios de interacción proteína-proteína, de ahí que reciban el nombre de proteínas adaptadoras.

Las funciones celulares llevadas a cabo por este tipo de proteínas varía según la familia. Así, las familias con PTBs del tipo de IRS y Shc participan en rutas de transducción de señal mientras que las pertenecientes a la familia Dab-2, como la proteína Numb, participan en procesos de endocitosis.

Muy poco se conoce acerca de las proteínas que interaccionan con el PTB de Numb (**Figura 8**). Se han identificado varias como NAK [47], actúa regulando a Numb; PON[48], dirige la localización de Numb durante el proceso de división asimétrica; y Notch [49], sobre el que actúa como inhibidor. Además de su capacidad para reconocer motivos NPXY [50], también se ha descrito la propiedad que tiene el PTB de Numb de unirse a moléculas de clatrina, en concreto a secuencias de tipo FXNPXY [51].

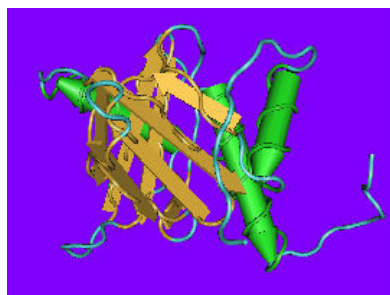


Figura 8. Estructura del dominio PTB de Numb

Con respecto al extremo carboxi-terminal de Numb se distinguen motivos llamados DPF, que le permitirán unirse a la subunidad α -adaptina del complejo endocítico AP2 [52, 53], y motivos NPF, por medio de los cuales se une a dominios EH presentes en Eps15 [54], otra proteína también implicada en procesos de endocitosis. Así mismo se ha descrito su capacidad de unir ubiquitin-ligasas, como Itch, a través de este extremo [49].

Existen cuatro isoformas de Numb resultantes de un diferente procesamiento del ARNm [55]. Son designadas según su peso molecular : p65, p66 p71 y p72 y se diferencian entre sí por la ausencia o presencia de un inserto de 11 aminoácidos dentro del PTB (PTBi) y por la ausencia o presencia de un inserto de 49 aminoácidos dentro de PRR (PRRi) (**Figura 9**).

La presencia de PTBi, presente en las isoformas p66 y p72, confiere la capacidad de unirse a la membrana plasmática, mientras que su ausencia, isoformas p65 y p71, hace que se localicen en el citoplasma o en el núcleo. Sin embargo, se ha comprobado que las que carecen del PTBi también son capaces de unirse a fosfolípidos de membrana, lo cual lleva a suponer la existencia de mecanismos complejos a través de los cuales Numb podría ser retenida en membrana por otras proteínas [55].

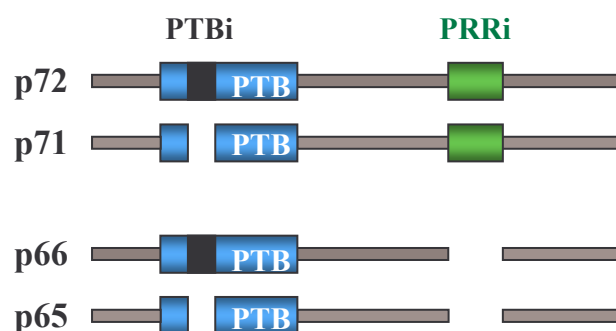


Figura 9. Representación esquemática de las 4 isoformas de Numb

La expresión de las diferentes isoformas de Numb varía de un tejido a otro, siendo las isoformas p71 y 72 las que dominan en tejidos que se encuentran continuamente dividiéndose, como el timo de ratón. En concreto, aquellas que poseen un inserto en la región PRR favorecen la proliferación, p71 y p72 y las que carecen de él, p65 y p66, potencian la diferenciación [56].

4.2. FUNCIONES

Aunque el descubrimiento de la proteína Numb tuvo lugar en 1989, poco es lo conocido hasta ahora sobre las funciones que realiza y mucho menos los mecanismos a través de los cuales las lleva a cabo.

A continuación se describen las funciones que hasta este momento son conocidas sobre esta proteína adaptadora.

4.2.1. DIVISION ASIMETRICA

El proceso de división asimétrica ocurre cuando una célula madre genera dos células hijas que adquirirán diferentes compromisos celulares [57]. Este proceso es, por tanto, crucial para generar diversidad en los organismos multicelulares.

En este tipo de divisiones pueden participar determinantes extrínsecos o intrínsecos. Con los primeros las dos células hijas serán equivalentes, adquiriendo posteriormente diferentes compromisos celulares como resultado de la interacción de esa célula hija con su microambiente; sin embargo con los segundos, el mecanismo es distinto pues se van a generar dos células hijas que son ya diferentes desde su nacimiento. Por tanto, tres son los pasos necesarios para generar dos células intrínsecamente diferentes : primero la célula debe polarizarse, por lo que un extremo será diferente al otro; a continuación una serie de determinantes intrínsecos del compromiso celular se disponen en un sólo extremo de la célula y por último, el huso

mitótico se alinea a lo largo del eje de polaridad de la célula, de manera que los determinantes intrínsecos serán heredados por sólo una de las dos células hijas (**Figura 10**).

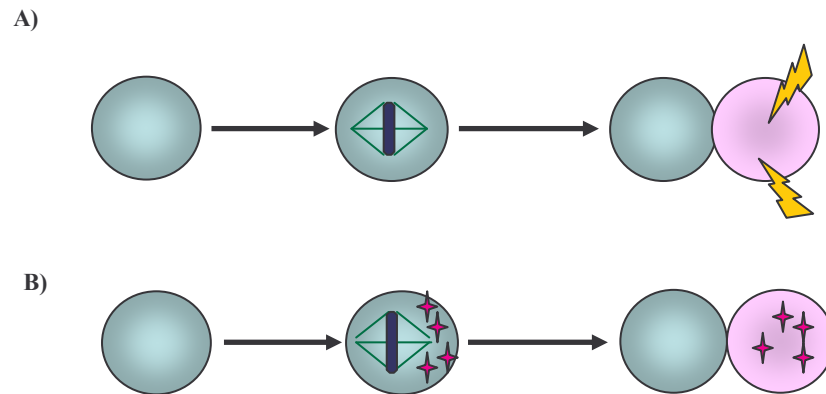


Figura 10. Modelo de división asimétrica dirigida por determinantes extrínsecos (A) o intrínsecos (B).

Con objeto de intentar conocer cuales son esos determinantes intrínsecos y el mecanismo por el que son capaces de dirigir este tipo de división, se han llevado a cabo numerosas investigaciones en todo tipo de organismos, destacando sobre todo los estudios llevados a cabo en el sistema nervioso de *Drosophila*.

Así, la proteína Numb fue descrita originariamente como una mutación que afectaba a la división binaria de la línea de precursores del organo sensorial en *Drosophila* [58]. Posteriormente, se descubrió que el gen *numb* codificaba una proteína localizada asimétricamente, es decir, que solo lo heredaba una de las dos células hijas, la cual adquiriría un compromiso celular diferente al de su célula hermana y además que era necesaria durante las decisiones binarias en el desarrollo del sistema nervioso periférico [59], central [60], muscular [61, 62] y cardíaco [63] en *Drosophila*.

Se consiguió describir la localización de Numb en cada fase de la mitosis durante el desarrollo de los neuroblastos en la mosca de la fruta [64]. Así, durante la interfase y profase temprana, la proteína se distribuye homogéneamente a lo largo de la membrana celular, comenzando a polarizarse hacia un extremo de la célula

en profase tardía, permaneciendo ya asimétrica durante la metafase, anafase y telofase, heredándola sólo una de las dos células hijas y volviendo a su distribución homogénea en esa célula tras la mitosis (**Figura 11**). También se comprobó que esa localización asimétrica de Numb era independiente de microtúbulos y de actina, pues si se bloqueaba tanto la formación del huso mitótico como la citocinesis, no había alteraciones en su disposición.

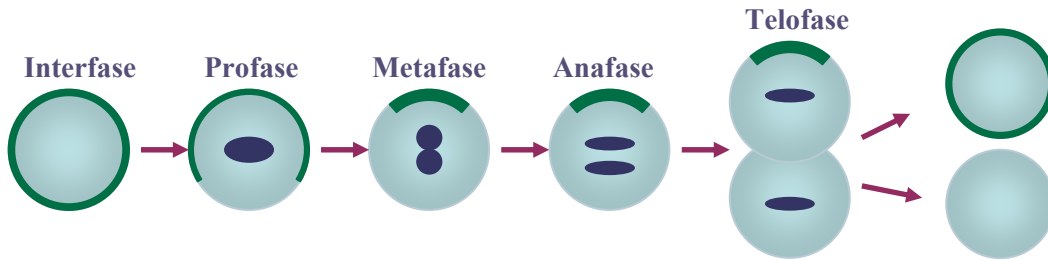


Figura 11. Esquema de la localización asimétrica de Numb durante la mitosis en *Drosophila*

Posteriormente se identificó un homólogo de Numb de *Drosophila* en ratón, el cual también estaba asimétricamente distribuido en la zona apical de la célula durante la neurogénesis cortical en los estadios de profase, metafase y anafase pero, sin embargo, en telofase se observaron casos donde ambas células hijas heredaban Numb y casos donde solo una de las células hijas la heredaba [65] (**Figura 12**), proponiéndose la teoría de que las divisiones simétricas serían predominantes sobre las asimétricas a nivel embrionario, lo cual mantendría un pool constante de progenitores necesarios para el desarrollo del sistema.

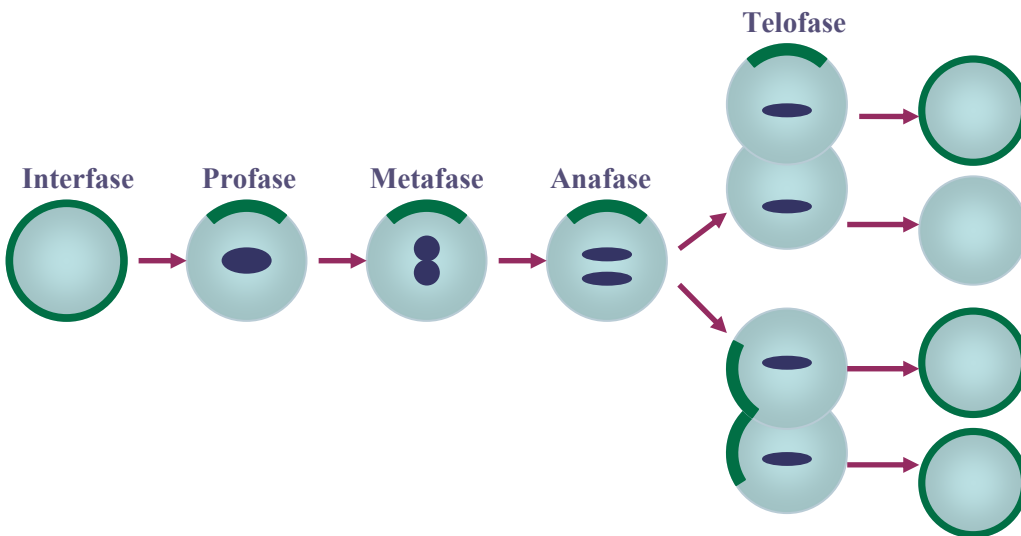


Figura 12. Esquema de la localización asimétrica de Numb durante la mitosis en ratón

Además, en este mismo estudio se determinó que la localización asimétrica de Numb en la zona apical de la membrana es independiente del plano de división, es decir, que Numb siempre se localiza en esa posición y el que la herede una o las dos células hijas dependerá del plano de división (**Figura 13**). Esto es lo contrario a lo que ocurre en *Drosophila*, ya que Numb siempre se localiza por encima de uno de los centrosomas.

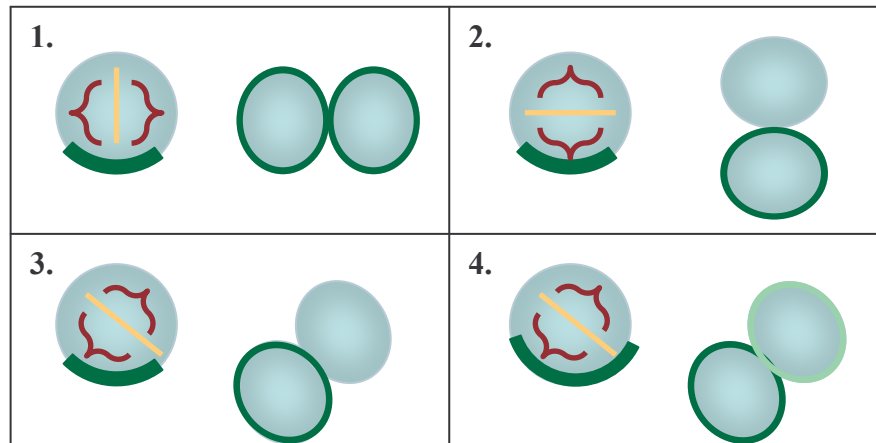


Figura 13. Modelo de divisiones simétricas o asimétricas para Numb según el plano de división.

Al igual que en *Drosophila*, también en ratón el gen que codifica para Numb es necesario para una correcta neurogénesis y su delección resulta ser letal [66].

En cuanto a cual es el linaje favorecido por la señalización por Numb, la controversia es indudable, ya que por ejemplo en *Drosophila*, en el sistema nervioso central, promueve la diferenciación hacia motoneurona sobre interneurona en algunas divisiones mientras que en otras lo hace al revés[60] y fuera del sistema nervioso es capaz de dirigir la diferenciación de células precursoras a varios tipos musculares [62]; mientras que en mamíferos, como en progenitores neurales, favorece el linaje progenitor sobre el neural pero paradójicamente también promueve la diferenciación neural [67].

Por tanto, ¿Como explicar que un mismo determinante intrínseco sea capaz de actuar en el desarrollo de diferentes sistemas, generando distintas identidades

de linaje? Lo que se cree es que Numb no es el responsable de especificar ningún linaje, sino que simplemente actúa como un interruptor que desactiva, en otras palabras, que inhibe al verdadero responsable de esa especificación hacia un linaje determinado, Notch [68, 69].

Por tanto, en la célula que no hereda Numb, la señalización por Notch está activa, dirigiendo a esa célula hacia un determinado linaje, mientras que en la célula que sí la hereda, esa señalización por Notch está inhibida, lo que promovería a la célula a mantener su linaje original.

El suponer que la proteína Numb actúa como un interruptor, puede explicar el por qué algunas células que en una primera decisión no expresan Numb, si lo hacen cuando necesitan volver a dividirse para generar otro linaje. Esto es lo que ocurre en el desarrollo del linaje SOP y en neuroblastos en *Drosophila*. (**Figura 14**).

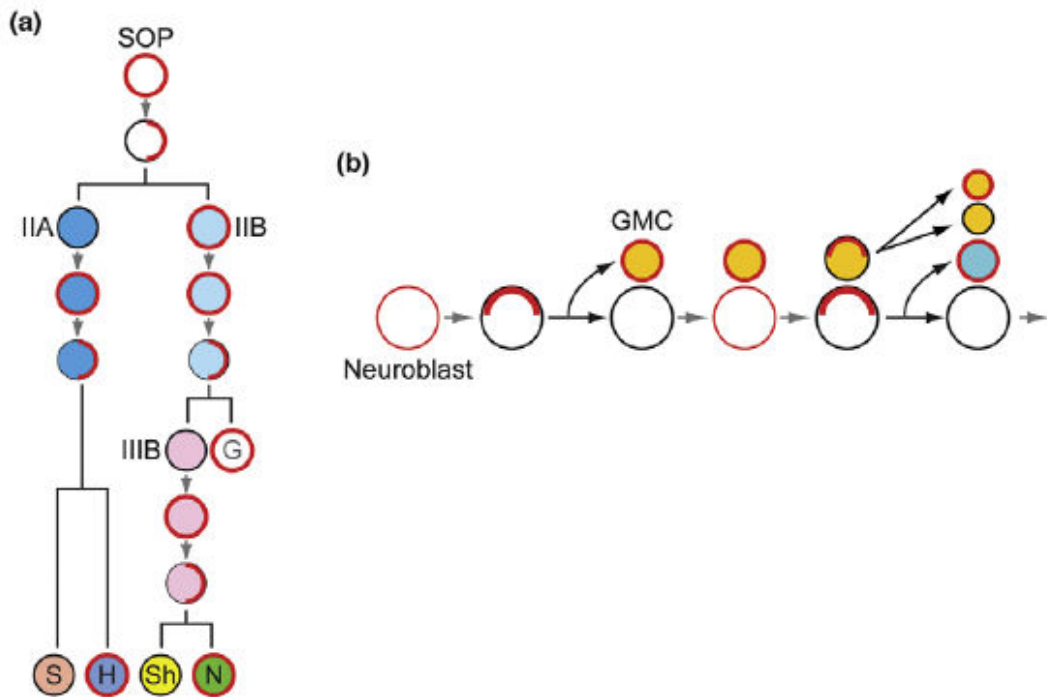


Figura 14. Uso reiterativo o no de Numb (rojo) asimétrico durante el desarrollo del linaje SOP (a) y neuroblastos (b) en *Drosophila*.

La siguiente pregunta que se plantea sería : ¿Cómo es la célula capaz de regular esa polarización de Numb?. Para responder a esta pregunta hay que dirigir la mirada hacia los mecanismos encargados de la polarización de Numb durante la mitosis.

Poco se sabe acerca de ellos pues estan empezando a ser estudiados ahora. En general, se han identificado un conjunto de proteínas llamadas PAR y una proteína quinasa atípica (aPKC) que son responsables del fenómeno de polaridad [70]. Así, en neuroblastos, células precursoras del organo sensorial (SOP) en *Drosophila* y en células basales epidermicas de mamíferos se ha demostrado que la distribución polarizada del complejo aPKC-Par3-Par6 es necesaria para una adecuada segregación de los determinantes intrínsecos entre las células hijas [71, 72]. Numb es sustrato de aPKC, siendo fosforilada tanto *in vivo* como *in vitro* en dos residuos de serina y esa fosforilación es necesaria para mantener su localización asimétrica en células epiteliales de mamíferos y en células SOP en *Drosophila* [73]. Pero este no parece ser el único mecanismo, pues también se ha descrito la participación de una proteína llamada PON [48].

Recientemente se ha propuesto, durante la neurogénesis en ratón, un nuevo modelo de mecanismo que utiliza la fragmentación del aparato de Golgi y su reconstitución durante el ciclo celular para regular la señalización de Numb durante la mitosis, a través del cambio de la distribución subcelular de una nueva proteína que se une a Numb y que ha sido llamada ACBD3 [74] . Esta proteína permitiría que la señalización por Numb sea activada sólo cuando las dos células hijas son generadas y ser desactivada despues de que ellas sean formadas.

De manera que la proteína ACBD3 se une a Numb por un dominio funcional y actúa de forma sinérgica con ella para regular el compromiso celular. Dado que Numb es citosólica y ACBD3 está unida al Golgi, pasando a ser citoplasmática durante la mitosis, ambas sólo podrán interactuar en ese momento, justo cuando la actividad de Numb es necesaria para distinguir las dos células hijas, perdiendo esa capacidad rapidamente al volver ACBD3 al Golgi tras la mitosis (**Figura 15**).

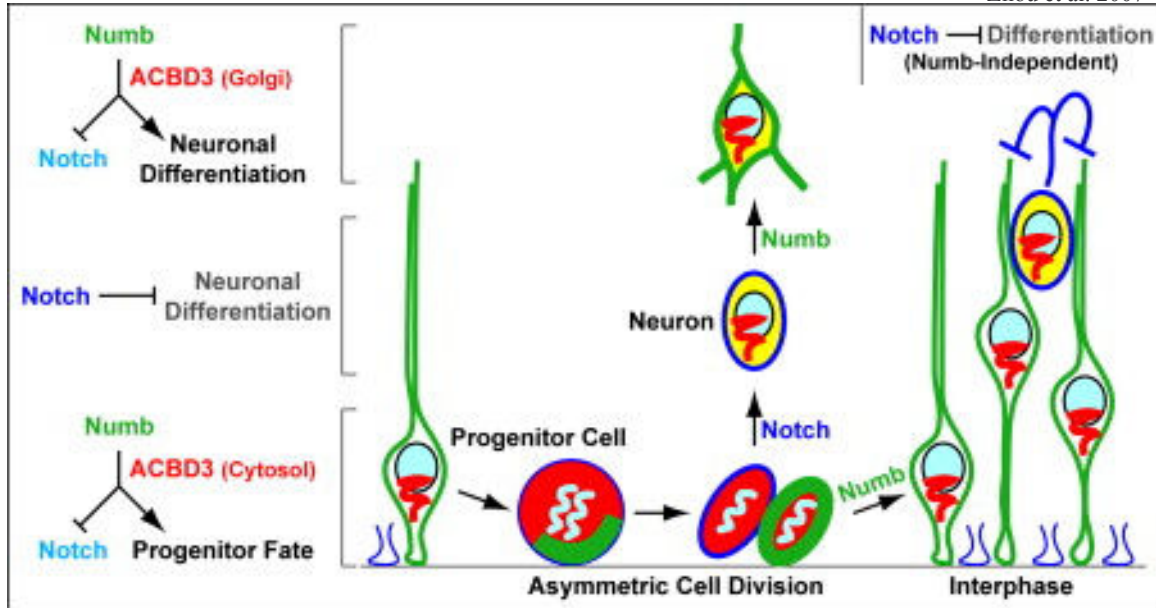


Figura 15. Modelo para la regulación de la señalización por Numb y Notch a través de la proteína ACBD3 durante la neurogénesis de mamíferos.

Según este modelo, Numb (en verde) inhibe la señalización por Notch, favoreciendo el compromiso hacia progenitor, pero sólo cuando ACBD3 (en rojo) se localiza en el citosol después de la fragmentación del Golgi durante la mitosis. Después de la mitosis, Numb vuelve a acumularse en la célula, inhibe a Notch y como ahora ACBD3 está en el Golgi, Numb promueve la diferenciación a neurona por una ruta diferente. Esta parte del modelo se ha demostrado porque la expresión forzada de ABCD3 en el citosol inhibe la diferenciación neuronal. Por tanto, Notch va a estar inhibida por Numb tanto si ABCD3 está en el citosol o en el Golgi, pero la posición de éste último determina un linaje u otro. Solo hay un caso en el cual la señalización por Notch es independiente de Numb y ocurre en interfase, cuando por un mecanismo de inhibición lateral [75] la célula que acumula Notch va a proteger a las células vecinas de adoptar el mismo compromiso que ella misma.

Por tanto, este complejo modelo intenta explicar la paradoja que se produce en la neurogénesis del ratón, donde Numb favorece el linaje progenitor sobre el neuronal pero a la vez es necesario para la diferenciación neural. Y quizás en otros

tejidos las células progenitoras utilicen este mecanismo para mantener el balance autoregeneración-diferenciación.

Los diferentes resultados obtenidos en los estudios llevados a cabo hasta ahora ponen de manifiesto la enorme complejidad del mecanismo encargado de dirigir el compromiso celular. Sin embargo, dentro de este “caos”, sí queda claro que la proteína Numb es fundamental en las decisiones de linaje durante el desarrollo de múltiples sistemas en diferentes organismos, necesitando aún muchas más investigaciones que aclaren el cómo, cuándo y por qué de su participación.

4.2.2. ENDOCITOSIS

La endocitosis hace referencia al tráfico de moléculas dentro de la célula a través de una serie de compartimentos vesiculares. Este proceso comienza con una internalización, es decir, la inclusión de moléculas dentro de una vesícula, la cual viajará hacia el endosoma y desde allí, esas moléculas serán transportadas bien al lisosoma para su degradación o bien de nuevo a la membrana.

Este proceso es un mecanismo necesario no sólo para la inhibición de una determinada ruta de señalización, ya que degrada receptores, sino que también esa internalización de un determinado receptor puede favorecer su translocación al núcleo y activar determinadas rutas, como es el caso de la señalización por Notch (véase más abajo).

Existe un tipo de endocitosis denominada *dependiente de clatrina*, que suele ser fundamental en la internalización de receptores. En este proceso participa una proteína adaptadora denominada AP-2, la cual es capaz de unirse a la membrana plasmática, a moléculas de clatrina y a secuencias de internalización presentes en los dominios intracelulares de receptores de membrana (**Figura 16**).

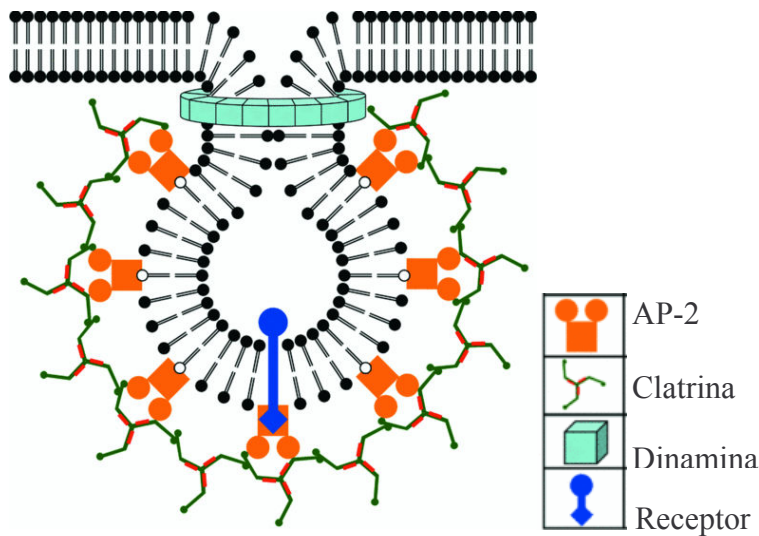


Figura 16. Esquema de endocitosis dependiente de clatrina

Pero no siempre participa esta proteína, pues hay receptores que sufren una internalización dependiente de clatrina, pero independiente de AP-2, son receptores con secuencias de internalización de tipo FXNPXY, como LDLR y EGFR [51].

Numb es una proteína adaptadora asociada con la internalización [53, 76] y/o degradación [49] de varios receptores de membrana, entre ellos Notch y EGFR. Puede mediar la internalización de estos receptores porque es una de las proteínas adaptadoras poseedoras de dominio PTB y motivos DPF y NPF, capaces de unirse tanto a la subunidad α -Adaptina del complejo AP-2 [77] como a dominios EH presentes en Eps15 [54].

Todas estas investigaciones parecen evidenciar la función de Numb como proteína adaptadora participante en la regulación de los niveles de expresión superficial de determinados receptores.

4.2.3. MODULACION NEGATIVA DE NOTCH

Como se ha mencionado anteriormente, Notch es una proteína fundamental en el desarrollo normal de múltiples tejidos y tipos celulares, ya que su señalización dirige en un sentido u otro el compromiso que adoptará una célula.

Su ruta de señalización comprende una serie de receptores (Notch1-4), ligandos (Deltalike/Jagged), inhibidores y factores de transcripción. La unión de Notch a sus ligandos inicia dos roturas proteolíticas del receptor: la primera, mediada por ADAM, en la región extracelular y la segunda mediada por un complejo γ -secretasa. Así, se libera un dominio intracelular de Notch que se transloca al núcleo y se une al factor de transcripción CSL, el cual pasa a ser activo, permitiéndose la transcripción de genes diana como Hes-1.

Varios son los mecanismos de regulación de esta ruta, destacando Numb, la cual es capaz de unirse a la región intracelular de Notch a través de su región PTB, mientras que por su extremo C-terminal se une a la ubiquitin-ligasa Itch, promoviendo la ubiquitinización y degradación del dominio IC-Notch [49] (**Figura 17**). Se ha demostrado esta función moduladora negativa de Numb sobre Notch, durante la división asimétrica en el desarrollo del sistema nervioso tanto en *Drosophila* como en ratón [65, 68].

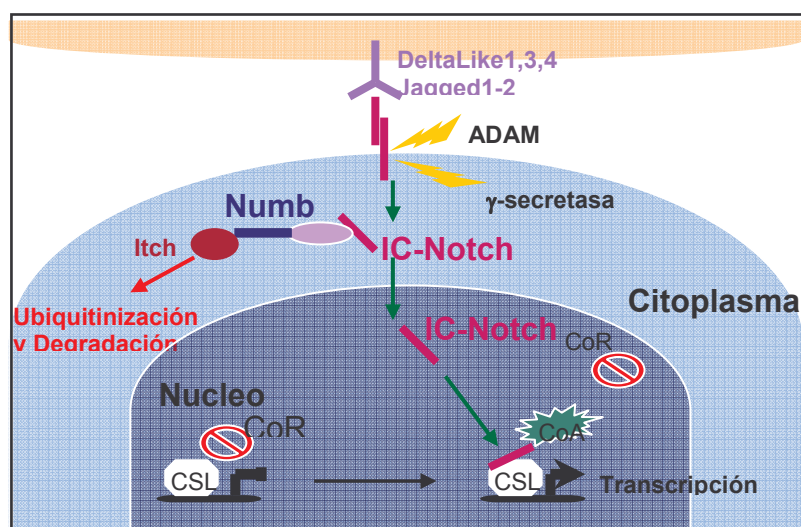


Figura 17. Ruta de señalización de Notch e inhibición por Numb

Debido a su capacidad para unirse tanto a dominios de proteínas que regulan la endocitosis, es el caso de los dominios α -Adaptina o EH de Eps15, como a ubiquitin-ligasas E3, encargadas de degradar proteínas a través del proteosoma, se ha propuesto otro mecanismo por el cual Numb participaría en la endocitosis mediada por clatrina del receptor Notch y de ahí al endosoma o proteosoma [76] (**Figura 18**), pero esta vía de inhibición de Notch por parte de Numb parece no ser imprescindible, ya que otros estudios han mostrado que la eliminación de algunos de esos dominios de unión a proteínas endocíticas o la inhibición del proteosoma, no afecta a la función de Numb de inhibir Notch [78].

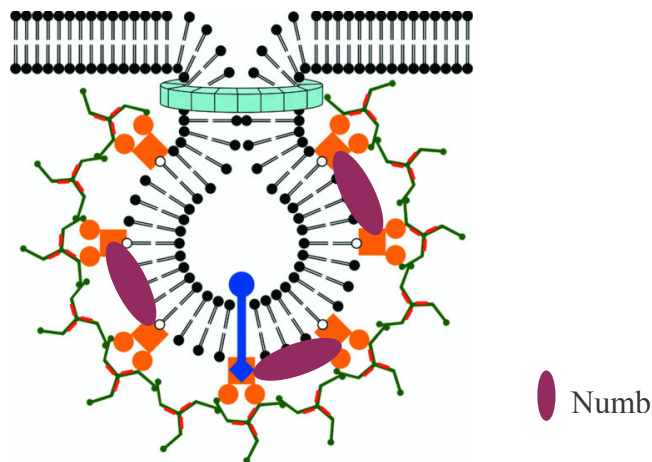


Figura 18. *Mecanismo de inhibición de Notch por Numb dependiente de endocitosis*

Por tanto, queda claro que Numb es capaz de especificar el compromiso celular mediante la inhibición de la proteína Notch, aunque queda sin aclarar cual es el mecanismo: bien es a través de su capacidad de interactuar con el dominio intracelular de Notch, como muestran algunas investigaciones, o a través de su participación en endocitosis del receptor, como muestran otros estudios, o quizás sea a través de ambas, utilizando una u otra vía dependiendo del sistema.

4.2.4. ONCOSUPRESION

El posible papel de Numb como proteína oncosupresora quizás sea el más desconocido y el que actualmente está empezando a investigarse.

Sí se sabe que la pérdida de su actividad, debido a un exceso de ubiquitinización y degradación proteosomal, genera cancer mamario en humanos [79], al provocar una señalización excesiva de Notch, ya que deja de estar controlado por Numb. En este mismo estudio y en otro posterior [80] se muestra como la reexpresión de nuevo de Numb en estos tumores normaliza los niveles de señalización por Notch y el tumor revierte.

Así mismo se ha descrito que Numb forma un complejo con el supresor de tumor p53 y con la ubiquitin-ligasa MDM2, evitando la ubiquitinización y degradación de p53 [81, 82].

También se ha demostrado que mutaciones en Numb provoca tumores en *Drosophila* [83] y que este tipo de tumores, neuroblastomas en este estudio, eran capaces de colonizar otros órganos. La causa de este tipo de tumores inducidos por mutaciones en Numb parecían deberse a alteraciones en la polaridad durante la división neuroblastica.

Así mismo, esta proteína también está implicada en proliferación de precursores tempranos en el sistema nervioso de ratón, pues ratones en los que se han deleccionado condicionalmente Numb y su homólogo Numblake presentan números reducidos de precursores, y en consecuencia graves alteraciones en el desarrollo del cerebro [84]. Esto se debe a que Numb y Numblake son esenciales controlando el balance entre precursores versus células diferenciadas. De manera que en la célula hija que hereda Numb estaría inhibido la señalización por Notch, favoreciendo su decisión a continuar siendo progenitora, mientras que en la que no hereda Numb, Notch ejerce su función de favorecer el linaje de neurona, y en el caso de estos dobles mutantes se

produce una proliferación masiva de neuronas, al dejar de estar controlada la señalización por Notch [67].

Estos estudios parecen evidenciar el carácter supresor de tumores de Numb, al controlar la ruta de una de las proteínas mas fuertemente implicadas en la generación de tumores, como es Notch [85].

4.3. NUMB EN EL SISTEMA INMUNE

Con respecto a la participación de Numb en el sistema inmune, pocas son las investigaciones realizadas hasta ahora.

Se comenzó demostrando la expresión de Numb en linfocitos [55], para posteriormente realizar experimentos de sobreexpresión de una de las isoformas de Numb [86] y experimentos de delección condicional de Numb [87], ya que la delección total es letal a nivel embrionario. Tanto en unos como en otros no se detectaron alteraciones en el desarrollo linfocítico, aunque en el primer caso sí se observó una expresión reducida de los genes diana de Notch. Esta ausencia total de fenotipo puede explicarse por el fenómeno de redundancia, es decir, probablemente otros homólogos como Numblake estén realizando la función de Numb. Así mismo, otro grupo de investigación creó ratones dobles knockout Numb/Numblake, detectándose un leve fenotipo de alteración en el desarrollo de células T [88].

También se ha podido comprobar que Numb colocaliza con el complejo del TCR en células T maduras, complejo del que también forma parte c-Cbl y además que Notch, Numb y TCR se unen físicamente durante la sinapsis inmunológica [87].

Recientemente se ha descrito cómo los linfocitos T tras la sinapsis inmunológica tienen la habilidad de dividirse asimétricamente, adoptando el compromiso de célula efectora o memoria según las moléculas que hereden y se ha observado como Numb también se segrega asimétricamente durante esta división [89].

JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS



La proteína adaptadora Numb es fundamental en los procesos de decisión de linaje durante el desarrollo de múltiples sistemas, al actuar como un determinante intrínseco de la división asimétrica, la cual, como se ha descrito anteriormente, es crucial durante el desarrollo. Sin embargo, poco se sabe de su participación durante el desarrollo linfocítico y aún menos de su más que posible papel como proteína oncosupresora en algunos tipos de cáncer.

Con objeto de intentar arrojar un poco más de luz sobre la función de esta proteína en el desarrollo de un sistema tan importante y fundamental para la supervivencia como el inmune, así como su probable función como proteína supresora de tumores, los objetivos de esta tesis fueron el estudio de:

- Papel de Numb en División Asimétrica durante el desarrollo temprano de timocitos, utilizando como modelo ratones que expresan un dominante negativo de Numb y ratones que sobreexpresan la proteína Numb completa.
- Papel de Numb en Proliferación y Señalización a través de pre-TCR en timocitos tempranos.
- Papel de Numb en Proliferación Oncogénica, usando como modelo experimental una línea celular eritroleucémica.

MATERIALES Y METODOS



MATERIALES

1. RATONES Y EMBRIONES

Los ratones salvajes y transgénicos para un dominante negativo de Numb o con sobreexpresión de Numb, bajo el promotor CD2, utilizados fueron C57BL/6, siendo cedidos por la Dra. B. J. Fowlkes y creados por la Dra. Matilde Cañelles. Los ratones Rag2 -/- fueron cedidos por la Dra. Cristina Hernández L. de Munaín. Los ratones adultos utilizados tenían 4 semanas de edad y los fetos 15 días.

2. LINEAS CELULARES

- **K562** : línea eritroleucémica humana (leucemia mieloide crónica). Su diferenciación se ve afectada por Notch, el cual favorece la diferenciación megacariocítica frente a la eritroide. Fue generosamente cedida por el Dr. Javier León (Universidad de Cantabria).

- **OP9/OP9DL1** : células estromales adherentes que expresan Delta-like1 (un ligando de Notch) y sobre las que se pueden cocultivar precursores hematopoyéticos (de cordón umbilical, timo fetal, hígado fetal), permitiendo la diferenciación in vitro de estas células. Fueron generosamente cedidas por el Dr. J.C. Zúñiga-Pflücker (Universidad de Toronto).

- **293T** : línea renal humana modificada para expresar el antígeno SV40T, permitiendo la réplica de los plásmidos que contienen el origen SV40. Se utilizaron como células empaquetadoras en la producción de vectores lentivirales. Fue generosamente cedida por el Dr. Francisco Martín (IPBLN).

3. MEDIOS DE CULTIVO

Se utilizaron 3 tipos diferentes de medios dependiendo del tipo celular, así para

K562 fue usado medio RPMI, para 293 se usó medio DMEM alto en glucosa y para OP9/OP9DL1 se usó α -MEM (Gibco). Todos los medios se suplementaron con 10% de suero fetal bovino (Gibco), previamente inactivado (56° durante 30 minutos) y 1% de Penicilina-Estreptomicina (Gibco), 1% de Gentamicina (Gibco), 1% de Glutamina (200mM Sigma).

Para la separación de las células adherentes se utilizó Tripsina-EDTA (Gibco)

4. REACTIVOS PARA TIPAJE DE RATONES (DIGESTION Y PCR)

Los reactivos necesarios para la digestión de las muestras fueron :

NOMBRE	FUENTE	USO	DOSIS
Muestra de oreja	ratones	Extracción de DNA	-
Proteinquinasa K	Amresco	Digestión de muestra	1mg/ml
Cloruro sódico	Amresco	Componente búfer de digestión	1M
SDS	Sigma	Componente búfer de digestión	10%
TrisHCl	Amresco	Componente búfer de digestión	1M
EDTA pH=8	Amresco	Componente búfer de digestión	1M
Agua DEPC	Gibco	Completar volumen	-

Los reactivos necesarios para la PCR del tipaje de las muestras fueron :

NOMBRE	FUENTE	USO	DOSIS
Oreja digerida	ratones	Fuente de DNA	1,2 μ l/muestra
DNA polimerasa	Biotools	Síntesis de cadena de DNA	0,2 μ l/muestra
Búfer del enzima	Biotools	Facilitar acción del enzima	3 μ l/muestra
Cloruro magnésico	Biotools	Facilitar reacción	1,2 μ l/muestra
dNTPs	Bioron	dexosirribonucleótidos	0,6 μ l/muestra
Oligos	IPBLN	Unión a secuencia específica	20 μ M
Agua DEPC	Gibco	Completar volumen	22,72 μ l

5. ANTICUERPOS UTILIZADOS EN CITOMETRIA

NOMBRE	COLOR	ESPECIFICIDAD	CLON	FUENTE
CD25	FITC	ratón	7D4	BD Pharmingen
CD4	FITC	ratón	L3T4	BD Pharmingen
CD8	FITC, PE, BIO	ratón	53-6.7	BD Pharmingen
CD4	PE, BIO	ratón	RM4-5	BD Pharmingen
CD11b	PE	ratón	M1/70	BD Pharmingen
TCR β	PE	ratón	H57-597	BD Pharmingen
TCR $\gamma\delta$	PE	ratón	GL3	BD Pharmingen
CD3	PE	ratón	145-2C11	BD Pharmingen
NK1.1	PE	ratón	PK136	BD Pharmingen
B220	PE	ratón	RA3-6B2	BD Pharmingen
CD44	CYC	ratón	IM7	BD Pharmingen
Streptavidin	APC	Anti-biotina	-	eBioscience
pre-TCR	PURIFICADO	anti-pT α ratón	2F5	BD Pharmingen
Bloqueo Fc	PURIFICADO	-	2.4G2	BD Pharmingen
Ig G1 κ	BIO	anti-IgG1 κ	A85-1	BD Pharmingen
Myc	BIO	anti-myc tag humano	9E10	Upstate

6. REACTIVOS PARA MEDIDA DE PROLIFERACION POR CITOMETRIA

NOMBRE	FUENTE	USO	DOSIS
CFSE	Sigma	Marcaje membranal	10 μ M
BRdU	Sigma	Marcaje nuclear	100ug/ml
Anti-BrdU-FITC	BD Pharmingen	Citometría	20 μ l
Solución de lisis	BD Bioscience	Lisis celular	1x
Paraformaldehído	Panreac	Fijación celular	1%
Nonidet-NP40	Sigma	Detergente aniónico	0,05%
DNasa I	Sigma	Digestión del ADN	50KU
IL-7	R&D System	Cocultivo OP9-timocitos	5ng/ml
PBS	Amresco	Lavado celular	1x

7. REACTIVOS PARA MEDIDA DE APOPTOSIS

NOMBRE	FUENTE	USO	DOSIS
AnnexinV-FITC	BD Pharmingen	Marcaje membran al	5ul
Búfer de unión	BD Pharmingen	Facilitar unión	1x

8. REACTIVOS PARA CONGELACION DE TIMOS FETALES

NOMBRE	FUENTE	USO	DOSIS
Paraformaldehído	Panreac	Fijación de tejido	4%
Solución de sucrosa	Sigma	Fijación de tejido	20%
Compuesto O.C.T.	Tissue Tek	Congelación de tejido	-
2-Metilbutano	Sigma	Congelación de tejido	-
PBS	Amresco	Lavado	1x
Criomolde	Tissue Tek	Molde de congelación	-
Hielo seco	IPBLN	Congelación de tejido	-

9. REACTIVOS PARA MICROSCOPIA CONFOCAL

NOMBRE	FUENTE	DOSIS
Paraformaldehído	Panreac	4%
TritónX-100	Sigma	0,2%
Cloruro amónico	Sigma	50mM
NGS	Invitrogen	5%
PBS	Amresco	1x
BSA	Sigma	3%
Medio de Montaje	Molecular Probes	-
Anti-conejo-Ubiquitina	Sigma	1:50
Anti-ratón-Ubiquitina	Biomol	1:500
Numb policlonal	Santa Cruz Bio.	1:100
Anti-ratón-c-Cbl	Santa Cruz Bio.	1:50
Anti-ratón-pTα	BD Pharmingen	1:100
Anti-Myc (9.E10)-Alexa-555	Upstate	1:50

Conejo-Ig G	Jackson & Immunoresearch.	1:10
Rata-Ig G	Jackson & Immunoresearch	1:10
Hamster-Ig G	Jackson & Immunoresearch	1.10
Bloqueo de Fc	BD. Pharmingen	1:100
Anti-conejo-Ig G-Alexa-647	Molecular Probes	1:100
Anti-conejo-Ig G-Alexa-488	Molecular Probes	1:50
Anti-ratón-Ig G-Alexa-488	Molecular Probes	1:50
Anti-ratón-Ig G-Alexa-555	Molecular Probes	1:50
Anti-ratón-CD25-Alexa555	Pharmingen/Molecular Probes	1:20
TOPRO-3 iodide	Molecular Probes	1:500
Anti-ratón-TCRβ-Alexa555	Pharmingen/Molecular Probes	1:20
Kit de marcaje Alexa-555	Molecular Probes	-

10. VECTORES PLAMIDICOS

- **p-GEM-T** (Promega): Vector de clonaje que posee residuos de desoxitimidina en los extremos 3'. Diseñado para el subclonado y secuenciación de fragmentos de DNA amplificados por PCR.

- **p-CEFL** : Vector de expresión bajo el promotor EF-1. Posee el gen Neo que le confiere resistencia al antibiótico Geneticina. Generosamente cedido por el Dr. Javier León, Universidad de Cantabria.

- **pCEFL-PTB** : Vector de expresión que contiene la región PTB de la proteína Numb, junto con una myc-tag para permitir su detección. Fue creado para esta tesis y utilizado para su expresión en células K562.

11. VECTORES LENTIVIRALES

A continuación se indican los vectores lentivirales utilizados en los experimentos de líneas celulares y que fueron realizados en colaboración con el Dr. Miguel Toscano y

el Dr. Francisco Martín, ambos del Inst. Parasitología “Lopez-Neyra” .

- **L-dnNb** : Vector Lentiviral que expresa el dominio PTB de la proteína Numb, bajo el promotor SFFV. Así como una secuencia de Myc para su detección.

- **L-SE** : Vector Lentiviral que expresa GFP, bajo el promotor SFFV. Fue utilizado como control.

Los reactivos usados para la construcción de los vectores lentivirales, así como para el vector plasmídico pCEFL-PTB fueron :

NOMBRE	FUENTE	USO
pGEM-T easy vector	Promega	Vector de clonaje
NotI, BamHI, XbaI, ECORI	NE Biolabs	Enzimas de restricción
Medio LB	Pronadisa	Crecimiento de bacterias
Ampicilina	Sigma	Antibiótico
Medio SOC	Invitrogen	Crecimiento de bacterias
Minipreps Kit	Invitrogen	Obtención de DNA plasmídico
Gel Extraction Kit	Invitrogen	Extracción DNA de gel de agarosa

12. REACTIVOS OBTENCION DE PARTICULAS VIRALES

NOMBRE	FUENTE	USO
Lipofectamina 2000	Invitrogen	Transfección
Optimem	Gibco	Favorecer la transfección
Células 293T	Dr. Francisco Martín	Células empaquetadoras
pCMVDR8.91	Dr. Francisco Martín	Plasmido empaquetador
pMD.G	Dr. Francisco Martín	Plásmido creador de la envuelta

13. REACTIVOS TRANSFECCION / SELECCION CON ANTIBIOTICOS

NOMBRE	FUENTE	USO	DOSIS
Jetpei	Invitrogen	Transfección	6ul
Cloruro sódico	Amresco	Favorecer la transfección	100ul
Geneticina	Gibco	Antibiótico de selección	200ug/ml

14. RT-PCR Y PCR SEMICUANTITATIVA

NOMBRE	FUENTE	USO
Rneasy kit	Qiagen	Extracción de RNA
I Script cDNA Synthesis	Biorad	RT-PCR
SYBR Green Supermix	Biorad	Real-Time PCR

15. REACTIVOS PARA WESTERN-BLOT

NOMBRE	FUENTE	USO
Bufer Lisis Celular-NP40	Invitrogen	Lisar células
PMSF	Roche	Inhibidor de proteasas
Aprotinina y Leupeptina	Sigma	Inhibidores de proteasas
Nupage 4-12%Bis-Tris Gel	Invitrogen	geles
Nupage LDS simple Buffer	Invitrogen	Bufer de carga
Nupage Mes SDS Running Buffer	Invitrogen	Bufer de Electroforesis
Nupage Transfer Buffer	Invitrogen	Bufer de Transferencia
Seebule Plus 2	Invitrogen	MarcadorPesoMolecular
PBS-Tween	Amresco	Lavados de membrana
Leche desnatada	Nestlé	Bloqueo de la membrana
Myc (9.E10)	Upstate	1:2000
Anti-ratón Ig G HRP	Abcam	1:2000
Actina	Santa Cruz	1:500
Anti-cabra Ig G-HRP	Abcam	1:5000
Immun-Star HRP Peroxide Buffer	Biorad	Reactivo de revelado
Immun-StarHRP Luminol/Enhancer	Biorad	Reactivo de revelado
Amersham Hyperfilm ECL	GE Healthcare	Películas de revelado

MÉTODOS

2.1. EXPERIMENTOS CON RATONES

1. CREACION DE RATONES DNNUMB TG Y NUMB TG

Fueron creados por la Dra. Matilde Cañelles por subclonaje de una forma dominante negativa de Numb en el vector p29Δ2 (Sal-). El ADN transgénico linealizado fue inyectado en oocitos C57BL/6. El mismo proceso fue repetido para la obtención de los ratones con sobreexpresión de Numb completa. Los animales fueron sacrificados a las 2-8 semanas para su análisis. El genotipado de los ratones dnNumb y Numb se realizó por PCR, a partir de muestras de oreja, usando los oligos siguientes:

Forward: 5' AACAAACTACGGCAAAGCTTCAGG 3'

Reverse: 5' CTTCTCCCGCTTCTGTTTACGCTC 3'

2. TIPAJE DE RATONES

Previo al tipaje se procedió a la digestión de las muestras de oreja tomadas de los ratones. Para ello, cada muestra fue incubada en un búfer de digestión (volumen 50μl) que contenía proteinquinasa K durante 2 horas a 55° C y en agitación en un Termoblot a 1300 rpm. Transcurrido ese periodo, el volumen era completado hasta 450μl con agua DEPC (Gibco).

Posteriormente se realizaban las PCR de tipaje. El volumen de reacción era de 30μl, el cual contenía muestra digerida, oligos (descritos en apartado anterior), DNTPs, Cloruro magnésico, búfer de la enzima y DNA polimerasa.

El programa de PCR utilizado fué :

95 °	1 minuto
95 °	30 segundos
61 °	1 minuto
72 °	1:30 minutos
72 °	7 minutos

Las muestras amplificadas eran cargadas en un gel de agarosa 1'8%, visualizándose en los ratones transgénicos una banda de 600 pb correspondiente al dominio PTB de Numb.

3. CITOMETRÍA DE FLUJO PARA ESTUDIO DE RATONES DNNUMB TG Y NUMB TG

Para estos experimentos se usaron ratones WT y dnNumb TG de 4 semanas de edad o ratones Numb TG de 6 semanas de edad. Una vez extraídos los timos, éstos fueron disgregados, obteniéndose los timocitos, que fueron lavados con PBS. A continuación se marcaron con los anticuerpos adecuados (véase Materiales) y se midieron en un FACs Calibur (Becton Dickinson).

En el caso de tinciones intracelulares, se siguió el mismo protocolo pero se utilizó el kit Cytotfix/Cytoperm (Becton Dickinson) para la permeabilización de la membrana.

Los resultados fueron analizados con el programa FlowJo.

4. WESTERN-BLOT PARA DETECCIÓN DE LA ISOFORMA SOBREENPRESADA DE NUMB EN RATONES NUMB TG Y DEL DOMINANTE NEGATIVO EN LA SUBPOBLACION DN EN RATONES DNNUMB TG

1×10^7 timocitos de ratones Numb TG fueron lisados por incubación, en 150 μ l de una solución de lisis con inhibidores de proteasas, durante 30 minutos en hielo. A

continuación se centrifugaron a 14000 rpm durante 10 minutos.

Para la detección del dominante negativo en la subpoblación DN en ratones dnNumb TG se siguió el procedimiento anterior, pero en esta ocasión, se aislaron timocitos fetales.

1×10^6 timocitos lisados fueron cargados en un gel del 4-12%. Tras la separación electroforética y la transferencia a membrana, ésta fue bloqueada con una solución que contenía leche en polvo y PBS-Tween durante 1 hora en agitación. A continuación y tras tres lavados de 10 minutos cada uno, la membrana se incubó toda la noche con el anticuerpo primario monoclonal c-myc, el cual nos permitirá detectar tanto la expresión de la isoforma sobreexpresada como el dominante negativo, ya que ambos llevaban la secuencia myc-tag en su estructura. Posteriormente se volvieron a realizar tres lavados de 10 minutos y se incubó la membrana 30 minutos con el anticuerpo secundario para myc.

Transcurrido ese tiempo, a las membranas se les añadieron los reactivos de revelado y se pudo detectar la expresión de la isoforma en los ratones Numb TG y la expresión del dominante negativo en la subpoblación DN en ratones dnNumb TG frente a la no expresión en los ratones WT.

5. PROLIFERACION Y COCULTIVO SOBRE OP9/OP9DL-1

Previamente hubo que poner a punto dos técnicas proliferativas :

1. **Incorporación de bromodeoxiuridina (BrdU), análogo de la timina.** La célula en división lo incorpora en su DNA; detectándose después por un anticuerpo monoclonal fluorescente contra BrdU y midiéndose por citometría de flujo. Para la puesta a punto del protocolo y tiempos de incubación se usó la línea celular K562.

2. **Medida de proliferación por CFSE,** el cuál se acopla a proteínas intracelulares y de membrana; cuando la célula se divide, el CFSE se divide por igual

entre las dos células hijas, que serán menos fluorescentes que las parentales. Es más sensible, y para ponerla a punto se usaron K562 y citometría de flujo.

Para estos experimentos se usaron fetos WT y fetos dnNumb de 15 días de edad. Estos timocitos fetales fueron incubados con CFSE durante 15 minutos a 37°C, siendo posteriormente incubados con FBS durante 1 minuto. A continuación fueron lavados con PBS dos veces antes de cultivarlos sobre una monocapa (2×10^4 células en placa de 24 pocillos) de OP9 y OP9DL durante 6 días a 37°C y 5% CO₂ y en presencia de 5 ng/ml de IL-7. Todos los cocultivos fueron mantenidos en medio α -MEM.

6. MEDIDA DE EXPRESION DE PRE-TCR

Se utilizaron tanto ratones WT y dnNumb TG de 4 semanas como fetos de 15 días de edad. Los timocitos se marcaron con los anticuerpos indicados por la casa comercial (BD) y midiéndose por FACs.

7. MEDIDA DE APOPTOSIS

Varios son los cambios a nivel de la membrana celular que se producen durante la apoptosis temprana. Uno de ellos consiste en la translocación de los fosfolípidos del interior al exterior de la membrana plasmática, como le ocurre a la fosfatidilserina. La Annexina-V permite detectar a nivel de la membrana la apoptosis temprana debido a su afinidad por fosfatidilserina.

Para medida de apoptosis, 1×10^6 timocitos de ratones WT y TG fueron incubados con 5 μ l de AnnexinV-FITC y 100 μ l de búfer de unión durante 15 minutos a 25°C y en oscuridad. A continuación se midió por FACs.

8. ANALISIS DE EXPRESION DE ARNm

El ARN total fue extraído con Rnasy kit y transformado en cDNA con I Script

cDNA Síntesis. La amplificación del cDNA fue analizado semicuantitativamente por incorporación de SYBR Green a la doble cadena de DNA. El volumen de reacción de la PCR fue de 25µl, incluyendo 1µg de cDNA, 20µM de cada oligo y SYBR Green Supermix.

Los valores están expresados en unidades arbitrarias relativas después de la normalización con el gen de referencia endógeno (*18S*). Se realizaron duplicados para todas las muestras.

El programa de PCR utilizado fue:

95 °	3 minutos
95 °	30 segundos
61 °	30 segundos
72 °	45 segundos
72 °	1 minuto

Los oligos utilizados fueron :

18S Forward : 5'- **CGGCTACCACATCCAAGGAA** -3'

18S Reverse : 5'- **GCTGGAATTACCGCGGCT** -3'

Hes1 Forward : 5'- **GCCAGTGTCAACACGACACCGG** -3'

Hes1 Reverse : 5'- **TCACCTCGTTCATGCACTCG** -3'

9. CONGELACION DE TIMOS FETALES

Timos fetales de ratones WT, dnNumb TG y Numb TG o timos adultos de ratones Rag 2-/- fueron fijados con una solución de Paraformaldehído al 4% en PBS, siendo posteriormente lavadas con PBS y tratadas con una solución de sucrosa al 20%.

A continuación y tras dos nuevos lavados en PBS, las secciones fueron inmersas en el compuesto O.C.T. y congeladas usando una mezcla de 2-metilbutano e hielo seco.

10. INMUNOFLUORESCENCIA Y MICROSCOPIA CONFOCAL

Secciones de 10 μm fueron obtenidas con un criostato. Estas secciones fueron fijadas con paraformaldehído 4% durante 15 minutos a temperatura ambiente, lavadas 2 veces con PBS y permeabilizadas por incubación durante 1 hora a temperatura ambiente con una solución que contenía Tritón-X100, BSA, NGS y PBS. A continuación, tras ser lavadas de nuevo 3 veces con PBS se incubaron con los anticuerpos primarios correspondientes toda la noche a 4°C. Posteriormente fueron lavadas e incubadas con los anticuerpos secundarios adecuados durante 1 hora y media a temperatura ambiente. Al tratarse de tinciones dobles, se incubaron con los anticuerpos de bloqueo correspondientes (véase Materiales) y se volvieron a incubar con el segundo anticuerpo primario durante 4 horas a 4°C y después con los segundos anticuerpos secundarios correspondientes 1 hora y media. Por último las secciones fueron tratadas con el medio de montaje adecuado, manteniéndose en drierita toda la noche a temperatura ambiente y selladas y congeladas a -20°C.

Las tinciones fueron visualizadas con un microscopio confocal Leica TCS SP5. Todas las imágenes poseen una resolución de 1024 x 1024 pixels y con un objetivo 63x. Las imágenes .lif fueron convertidas en .tiff y las figuras fueron preparadas con el programa Adobe Photoshop 7.0. En algunas figuras el contraste fue aumentado para facilitar su visualización. Cuando esto fue realizado, todas las imágenes fueron tratadas por igual.

2.2 EXPERIMENTOS CON LINEAS CELULARES

1. CONSTRUCCION DEL VECTOR pCEFL-PTB Y DEL LENTIVIRAL DNNB

El PTB de Numb fue amplificado a partir del plasmido p-EF-Numb por PCR utilizando los siguientes oligos y adicionando un Myc-tag :

Forward: 5'CCGGATCCCACCATGGAACAAAACTTATTTCTGAAGA
AGATCTGAACAAACTACGGCAAAGCTTCAGG-3'

Reverse:5'CGCGCGGCCGCCTACTACTACTTCTCCCGCTTCTGTTTA
CGCTC -3'

Tras chequear los fragmentos de PCR en agarosa 1%, el fragmento fue clonado en pGEM-T easy vector. Varios clones fueron seleccionados y secuenciados para verificar la secuencia. A continuación, el PTB de Numb fue extraído del vector pGEM-T por digestión BamHI-NotI y ligado directamente :

a) con el vector lentiviral pHR'SINcppt por extremos cohesivos. El vector lentiviral fue previamente digerido con BamHI-NotI y tratado con CIP.

b) con el vector pCEFL, previamente digerido con BamHI y NotI.

Las digestiones se realizaron a 37°C durante 2 horas.

2. TRANSFECCION DE K562 CON EL VECTOR pCEFL-PTB Y OBTENCION DE CLONES ESTABLES

5×10^4 células fueron cultivadas en placas de 24 pocillos. 3 μ g del vector pCEFL-PTB y 6 μ l de Jetpei fueron mezclados con 50 μ l de cloruro sódico cada uno. A continuación se mezclaron todos los componentes y se incubaron durante 30 minutos.

Transcurrido ese tiempo la mezcla fue añadida a las células. El mismo procedimiento se siguió para la transfección con el vector vacío pCEFL.

Tras 72 horas de incubación, el antibiótico de selección, Geneticina, se añadió a las células y se dejaron crecer durante una semana.

Para la obtención de clones estables de células con el vector vacío (pCEFL) y con el dominante negativo (pCEFL-PTB) se realizó una dilución límite en placas de 96 pocillos. Tras 20 días de incubación empezaron a obtenerse clones estables. En concreto se aislaron 4 clones estables de cada tipo celular.

3. DETECCION DE LA EXPRESION DEL DOMINANTE NEGATIVO EN LOS CLONES ESTABLES POR WESTERN-BLOT

10×10^7 células de cada clon fueron lisadas por incubación, en 150µl de una solución de lisis con inhibidores de proteasas, durante 30 minutos en hielo. A continuación se centrifugaron a 14000 rpm durante 10 minutos. El sobrenadante fue congelado a -80°C .

1×10^6 células lisadas de cada clon fueron cargadas en un gel del 4-12%. Tras la separación electroforética y la transferencia a membrana, ésta fue bloqueada con una solución que contenía leche en polvo y PBS-Tween durante 1 hora en agitación.

A continuación y tras tres lavados de 10 minutos cada uno, la membrana se incubó toda la noche con el anticuerpo primario monoclonal c-myc, el cual nos permitirá detectar la expresión del dominante negativo ya que éste llevaba la secuencia myc-tag en su estructura. Posteriormente se volvieron a realizar tres lavados de 10 minutos y se incubó la membrana 30 minutos con el anticuerpo secundario para myc.

Transcurrido ese tiempo, a la membrana se le añadieron los reactivos de revelado y se pudo detectar la expresión del dominante negativo en los 4 clones pCEFL-PTB frente a la no expresión en los clones control vacío pCEFL.

A continuación se repitió el mismo proceso pero para el anticuerpo actina, el cual fue utilizado como control de carga.

4. PROLIFERACION EN LOS CLONES ESTABLES pCEFL-PTB

50×10^4 células fueron cultivadas en placas de 24 pocillos junto con 100mg/ml de BrdU. A las 24 horas se recogieron, se lavaron con PBS y se incubaron 15 minutos a 25°C con solución de lisis.

Después se incubaron las células con una solución fijadora que contenía paraformaldehído y NP-40 durante 30 minutos a 4°C. Tras un lavado con PBS se añadió DNasa I, manteniéndose 30 minutos a 37°C. Por último se incubó con una solución que contenía anti-BrdU-FITC, FBS y NP-40 durante 45 minutos. Se lavaron dos veces y se midieron en FACs.

5. OBTENCION DE PARTICULAS VIRALES

Células 293T empaquetadoras fueron transfectadas con tres plásmidos (pCMVDR8.91, pMD.G and SE or dnNb) usando Lipofectamina 2000 (Invitrogen). El plásmido empaquetador pCMVDR8.91 codifica para *gag*, *pol*, *tat* y *rev*; el plásmido pMD.G codifica la glicoproteína G del virus de la estomatitis vesicular. Dos días después de la transfección, los sobrenadantes, poseedores de las partículas virales fueron recogidos, filtrados (0,22µm) y congelados a -80 °C hasta su uso.

6. TRANSDUCCION DE K562 CON LENTIVIRAL DNNB

20×10^4 células fueron cultivadas en placas de 24 pocillos junto con distintas dosis del vector lentiviral dnNb. Se incubaron a 37°C y 5% de CO₂ durante 5 días.

Posteriormente se recogieron y se incubó con 250µl de Cytosfix/Cytoperm

durante 15 minutos. Tras lavado con PBS se incubó 25 minutos con anti-myc-Biotin. A continuación se realizó un nuevo lavado con PBS y una nueva incubación con Streptavidin-APC. Se midió la eficiencia de la transducción por FACs.

7. PROLIFERACION EN K562 INFECTADAS CON LENTIVIRAL DNNB

30 x 10⁴ células fueron cultivadas en placas de 24 pocillos junto con 100mg/ml de BrdU. A las 24 horas se recogieron, se lavaron con PBS y se incubaron 15 minutos a 25°C con solución de lisis.

Después se incubaron las células con una solución fijadora que contenía paraformaldehído y NP-40 durante 30 minutos a 4°C. Tras un lavado con PBS se añadió DNasa I, manteniéndose 30 minutos a 37°C. Por último se incubó con una solución que contenía anti-BrdU-FITC, FBS y NP-40 durante 45 minutos. Se lavaron dos veces y se midieron en FACs.

8. ANALISIS DE EXPRESION DE ARNm

Se realizó como se describe en el apartado 8. de métodos en ratones.

Los oligos utilizados fueron :

18S Forward : 5'- ATGGTGACCACGGGTGACG -3'

18S Reverse : 5'- TTATTCCTAGCTGCGGTATCC -3'

Hes1 Forward : 5'- GGTGCTGATAACAGCGGAAT -3'

Hes1 Reverse : 5'- TGAGCAAGTGCTGAGGGTTT -3'

Myc Forward : 5'- TACCCTCTCAACGACAGCAG -3'

Myc Reverse : 5'- TCTTGACATTCTCCTCGGTG -3'

RESULTADOS



1. PAPEL DE NUMB EN DIVISIÓN ASIMÉTRICA : LOCALIZACIÓN DE NUMB DURANTE LA PROLIFERACION DE TIMOCITOS FETALES

La división asimétrica es clave durante el desarrollo de múltiples sistemas pues gracias a este proceso las células son capaces de mantener el equilibrio entre auto-regeneración y diferenciación.

Hasta ahora este proceso ha sido ampliamente estudiado en *Drosophila*, así como en ratón, principal modelo de estudio para mamíferos, donde el análisis de este tipo de división se ha centrado en el sistema nervioso.

Dado que el sistema inmune es fundamental para la supervivencia de cualquier individuo y un buen desarrollo de las células que lo constituyen es necesario para su correcto funcionamiento, quisimos analizar si durante el desarrollo temprano de timocitos también tenía lugar el proceso de división asimétrica y si uno de los principales determinantes intrínsecos de este tipo de división, la proteína Numb, seguía el mismo patrón de distribución que ya había sido descrito en el sistema nervioso.

Para llevar a cabo este análisis necesitábamos timocitos en etapas tempranas del desarrollo, es decir, en estadio doble negativo y como esta población es muy escasa en el timo adulto de ratón, utilizamos timos fetales en el día 14-15 del desarrollo, momento en el que los timocitos DN constituyen un 80% (**Figura 19A**), predominando fundamentalmente la población DN3, la principal subpoblación proliferante, lo cual pudo ser comprobado mediante inmunofluorescencia en una sección de timo fetal, con los marcadores de las subpoblaciones DN : CD25 y CD44 (**Figura 19B**).

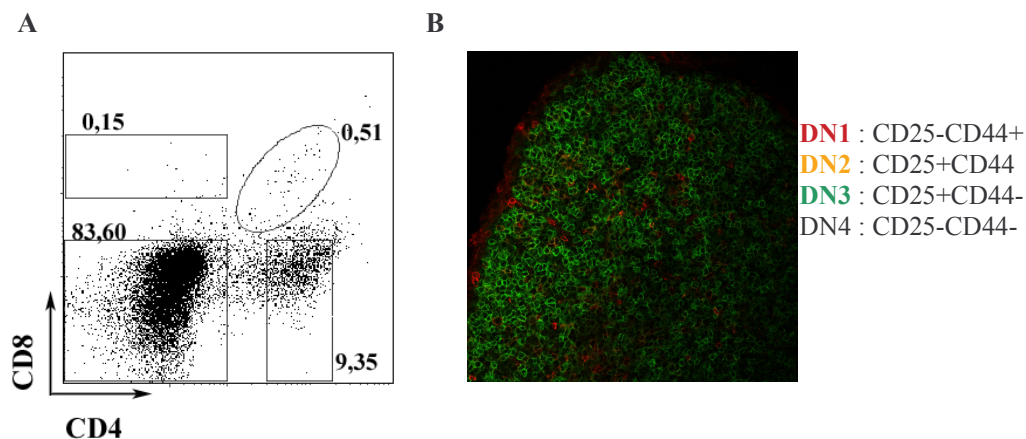


Figura 19. *Distribución de las poblaciones linfocíticas en un timo fetal.* (A) Análisis por citometría de flujo de las poblaciones timocíticas de un timo fetal de E14-15 teñido con CD4 y CD8. (B) Imagen por confocal de una sección de un timo fetal teñido con CD25 y CD44. Los datos son representativos de tres experimentos diferentes.

1.1. Numb es segregada asimétricamente durante la proliferación de timocitos.

Una vez comprobado que la utilización de secciones de timo fetal es válida para este tipo de estudio, comenzamos con el análisis de la división asimétrica y la localización de la proteína Numb. Para ello se usó un marcador de DNA llamado TOPRO, que nos permitiría detectar las distintas fases de la mitosis, un anticuerpo marcador de Numb que reconoce el dominio C-terminal de la proteína y un marcador de CD25, el cual detectaría no sólo a las células de interés, las DN3, sino también la membrana de cada célula, facilitando así la visualización de la división.

El resultado obtenido fue la detección de células tanto en interfase como en las diferentes etapas del proceso de mitosis (**Figura 20**). Con respecto a la localización de la proteína Numb, ésta varía según la etapa de división. Así, en interfase se observó un 43% de células donde Numb estaba polarizado y un 56% donde podía visualizarse situado por toda la célula; en profase y metafase, alrededor de un 93% de las células tenían a Numb polarizado; en anafase, la localización de Numb varía, dejando de estar polarizada y repartiéndose por la membrana y por el citoplasma; y en telofase, solo en el 30% de las células Numb era heredada por una de las dos células hijas.

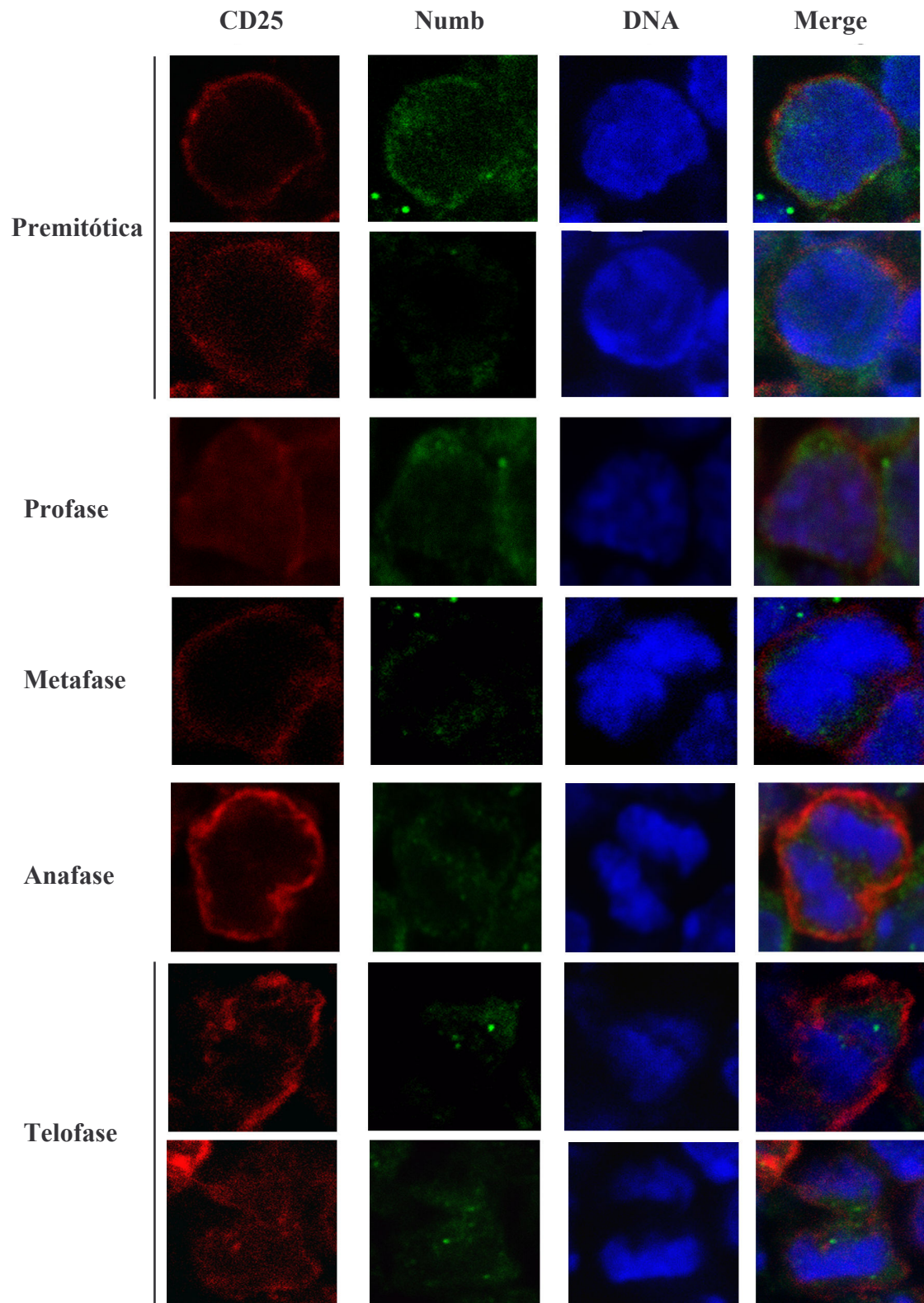


Figura 20. *División asimétrica en timo fetal normal.* Imágenes por confocal de timocitos fetales en las distintas fases mitóticas y teñidas con CD25 (rojo), Numb (verde) y TOPRO (azul).

N° SECCIONES DE TIMO FETAL ANALIZADAS = 12	
N° INTERFASES TOTALES =30	
% Numb Polarizado (n°células)	% Numb No Polarizado (n°células)
43% (13)	56% (17)
N° METAFASES TOTALES = 40	
% Asimétricas (n°células)	% Simétricas (n°células)
92,5% (37)	7,5% (3)
N° TELOFASES TOTALES= 20	
% Asimétricas (n°células)	% Simétricas (n°células)
30% (6)	70% (14)

Tabla III. *Análisis numérico de la distribución de Numb durante la mitosis*

Lo que muestran estos resultados es que durante el desarrollo de los timocitos hay segregación asimétrica de Numb en un porcentaje de ellos. Esto coincide con lo observado por varios grupos de investigación durante el desarrollo del sistema nervioso de ratón [65, 90], donde Numb es heredada por una de las células hijas no en la totalidad de ellas sino en un porcentaje variable. Esto indica que durante el desarrollo temprano de timocitos debe existir un equilibrio entre el número de células que deben seguir proliferando, las que heredarían Numb, y otras que deben diferenciarse, las que no heredarían Numb, permitiéndose así un correcto desarrollo del timo a nivel fetal.

1.2. El pre-TCR es segregado de forma simétrica durante la división en timocitos.

Durante el estadio DN3 comienza la señalización por pre-TCR, iniciándose los procesos proliferativos y de diferenciación. Para estudiar la localización del pre-TCR durante la división celular se realizó una tinción CD25, TOPRO y pT α , observándose, además del patrón característico de tinción del pre-TCR en clusters en membrana, que ambas células hijas lo heredan (**Figura 21**). Previamente se realizó una tinción control para el anticuerpo pre-TCR en timo adulto de un ratón WT (véase Fig.S1 en apartado Publicaciones).

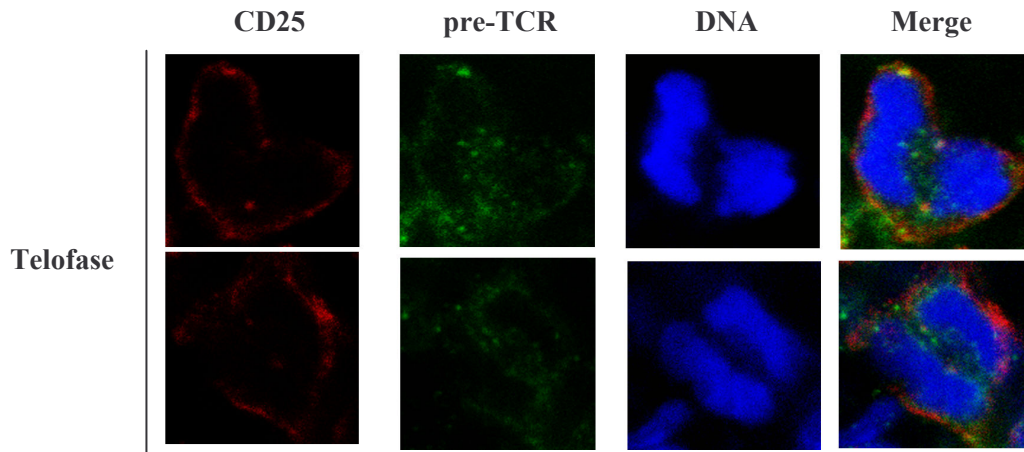


Figura 21. *Distribución simétrica del pre-TCR durante la división de timocitos.* Imagen por confocal de dos timocitos fetales en telofase teñidos con TOPRO (azul), pre-TCR (verde) y CD25 (rojo); Las imágenes son representativas de al menos tres experimentos diferentes.

El que observáramos a Numb polarizado en un porcentaje de células ya en interfase, y el hecho de que se haya demostrado que Numb se asocia con el complejo del TCR, nos hizo preguntarnos si esa polarización estaba relacionada con el comienzo de la señalización por pre-TCR. Tras realizar la tinción correspondiente pudimos comprobar que el pre-TCR también se polariza en las etapas tempranas de la mitosis (**Figura 22**).

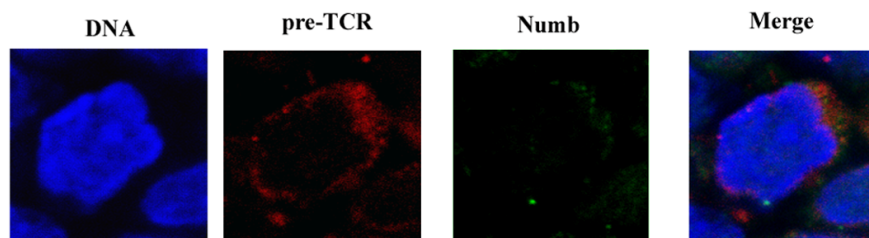


Figura 22. *Polarización del pre-TCR en etapas tempranas de la mitosis.* Imagen por confocal de un timocito teñido con TOPRO (azul), pre-TCR (rojo) y Numb (verde). Las imágenes son representativas de al menos tres experimentos diferentes.

Si, como todos los estudios parecen indicar, la segregación asimétrica de Numb es necesaria para una correcta diferenciación, aquellas mutaciones que alteren la diferenciación alterarán también la distribución de Numb. Para demostrar esta hipótesis analizamos la distribución de Numb en ratones Rag2^{-/-} (**Figura 23**), los cuales se caracterizan por ausencia de pre-TCR al no producirse los reordenamientos necesarios para su síntesis, provocándose un bloqueo en la diferenciación de los timocitos [91].

Comprobamos como la polarización de Numb desaparecía en todas las fases de la mitosis, demostrándose la importancia de una correcta distribución de Numb para que tenga lugar un adecuado equilibrio proliferación versus diferenciación.

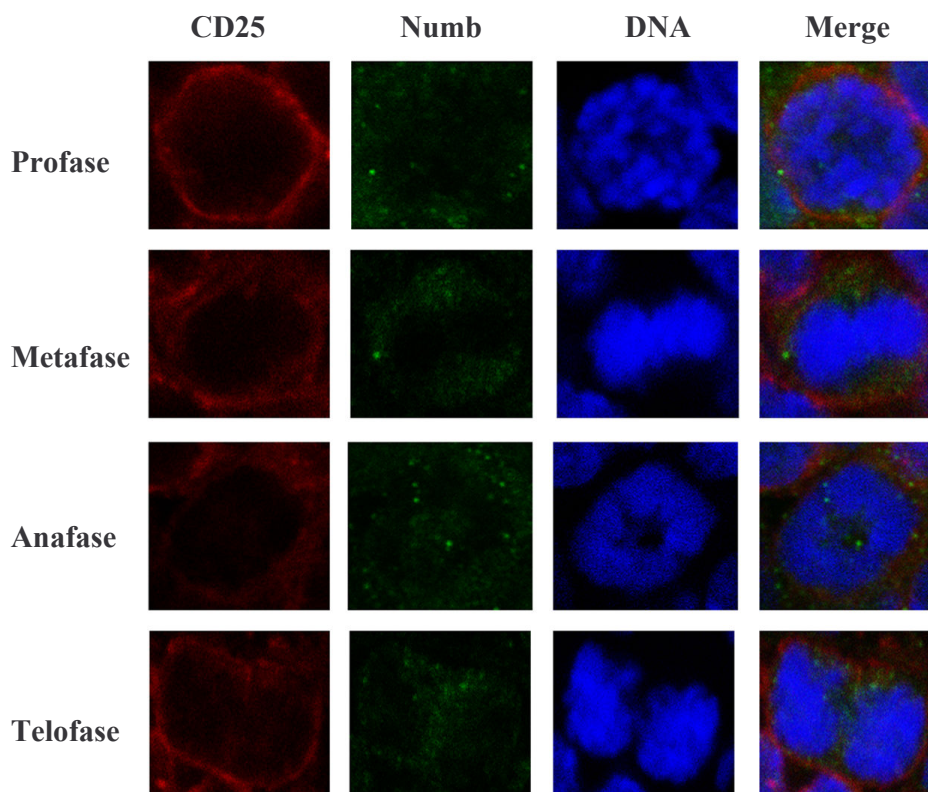


Figura 23. Alteración de la distribución de Numb en ratones *Rag2*^{-/-}. Imágenes por confocal de timocitos fetales de ratones *Rag2*^{-/-} en las distintas etapas de mitosis y teñidos con TOPRO (azul), CD25 (rojo) y Numb (verde). Las imágenes son representativas al menos tres experimentos diferentes.

Los resultados obtenidos aportan nuevos datos, hasta ahora desconocidos a nivel tímico, revelando que Numb es distribuido asimétrica y simétricamente durante el desarrollo de los timocitos, permitiéndose así un equilibrio proliferación versus diferenciación imprescindible para el correcto desarrollo del timo. Además, también por primera vez, se ha visualizado la segregación simétrica del pre-TCR y se ha podido establecer una relación entre polarización de Numb y comienzo de la señalización por pre-TCR.

El siguiente paso que nos planteamos fue estudiar si alteraciones en los niveles de expresión de Numb afectaban a esta división asimétrica, y por consiguiente a la señalización por pre-TCR en el estadio temprano de desarrollo de timocitos.

2. EFECTO DE LAS ALTERACIONES DE LOS NIVELES FUNCIONALES DE NUMB SOBRE EL DESARROLLO TEMPRANO DEL TIMO:

Para abordar el posible efecto que una alteración en los niveles de la proteína Numb podría provocar durante el desarrollo temprano de los timocitos, utilizamos dos estrategias de estudio: por un lado, quisimos analizar que fenotipo resulta en ratones transgénicos que sobreexpresan una de las isoformas de Numb y por otro lado, analizar el fenotipo provocado por la expresión de un dominante negativo de Numb.

Con objeto de limitar nuestra área de estudio al desarrollo linfocítico, se utilizó el promotor CD2 humano, el cual es expresado desde progenitores tempranos de linfocitos T hasta la periferia, permitiendo dirigir la expresión de genes de forma tejido-específica [92].

2.1. SOBREEXPRESIÓN DE NUMB

La estrategia de sobreexpresar una determinada proteína de forma constitutiva ha sido ampliamente utilizada para estudios de ganancia de función. Así, en nuestro laboratorio, disponíamos de una línea de ratones que sobreexpresaban la isoforma p71 de la proteína Numb (Numb TG), por lo que tras analizar el fenotipo se estudió cómo la sobreexpresión de Numb podría afectar al proceso de división asimétrica en el timo.

2.1.1. La sobreexpresión de Numb provoca un aumento de la celularidad de las poblaciones celulares del timo.

Tras comprobar mediante western-blot, usando un anticuerpo anti-Myc, que estos ratones Numb TG sobreexpresaban la proteína (**Figura 24A**), se procedió a analizar las distintas poblaciones celulares del timo de estos ratones (**Figura 24C-D**).

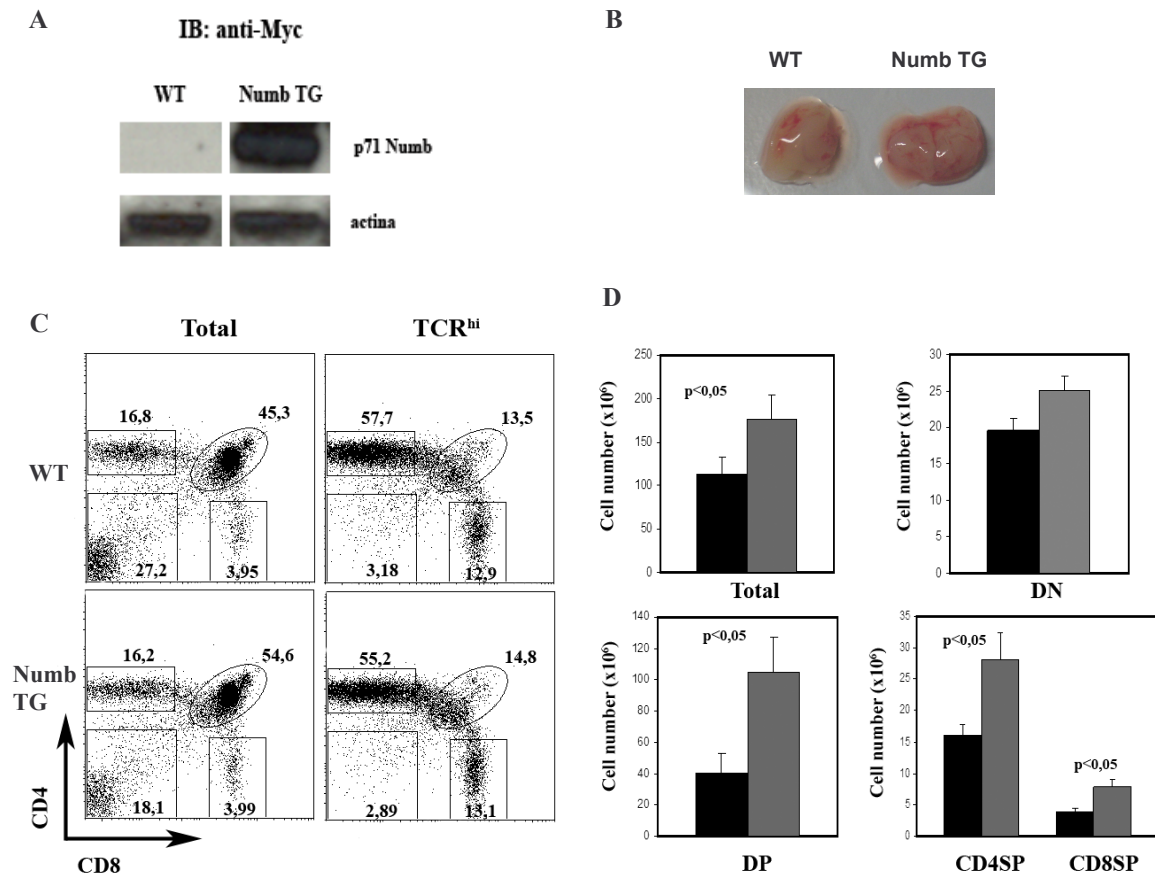


Figura 24. *Expresión Numb p71 y Celularidad aumentada en ratones Numb TG.* (A) Análisis por western-blot, usando un anti-Myc, de la expresión en timocitos de Numb p71 en WT y Numb TG; (B) Fotografía de un timo WT y Numb TG; (C) Análisis por citometría de las distintas poblaciones tímicas, tiñendo con CD4 y CD8; (D) Representación en barras del número total de timocitos y subpoblaciones tímicas DN, DP, SP en WT (negro) y Numb TG (gris); En (C) se representan porcentajes y en (D) se representan la media +/- SD. Para la comparación estadística se usó el test t-Student, siendo consideradas las diferencias significativas si $p < 0,05$. Los datos son representativos de tres experimentos independientes.

Como resultado de la sobreexpresión de Numb, estos ratones presentaban un timo de tamaño mayor (**Figura 24B**) y aumento en la celularidad total, número de DP, CD4SP y CD8SP.

2.1.2. La sobreexpresión de Numb provoca alteración en el proceso de división asimétrica.

Cuando procedimos a analizar la distribución de Numb durante la división de

timocitos DN3 en estos ratones Numb TG, el resultado que se encontró fue una alteración de esa localización de Numb.

Numb era distribuida simétricamente en metafase, anafase y telofase, siendo heredada por ambas células hijas (**Figura 25**).

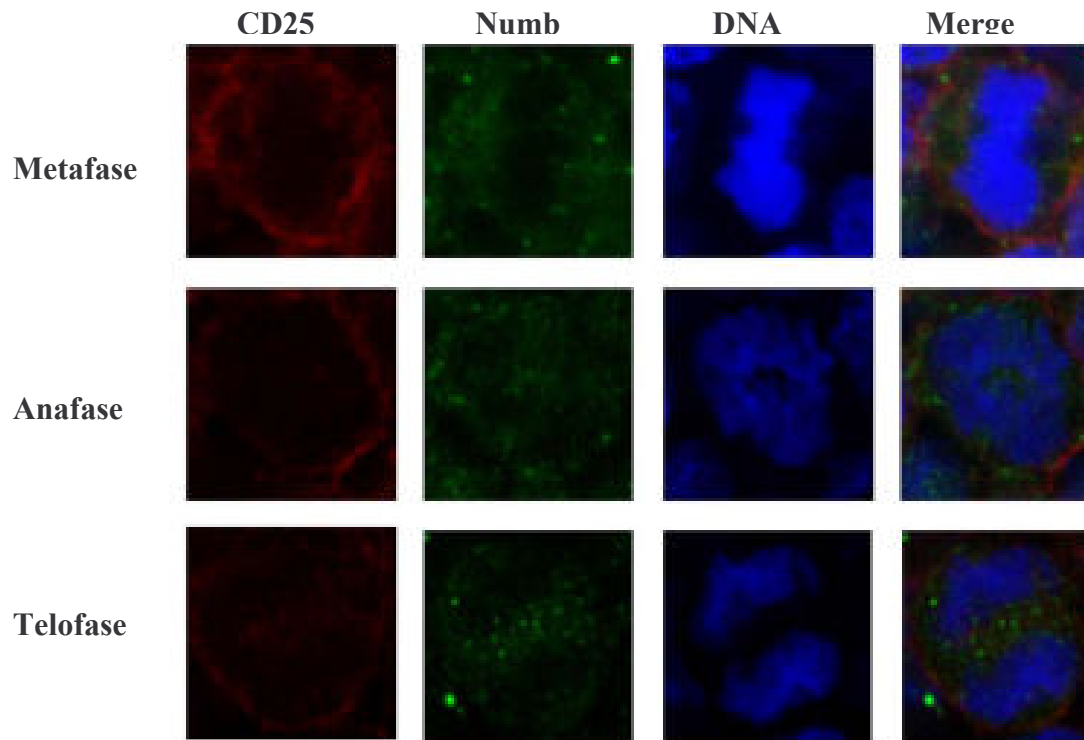


Figura 25. Alteración de la división asimétrica en ratones Numb TG. Imágenes por confocal de timocitos fetales de ratones Numb TG en metafase, anafase y telofase teñidos con TOPRO (azul), CD25 (rojo) y Numb (verde). Las imágenes son representativas al menos tres experimentos diferentes.

N° SECCIONES DE TIMO FETAL ANALIZADAS = 8	
N° METAFASES TOTALES = 21	
% Asimétricas (n°células)	% Simétricas (n°células)
0% (0)	100% (21)
N° TELOFASES TOTALES= 34	
% Asimétricas (n°células)	% Simétricas (n°células)
0% (0)	100% (34)

Tabla IV. Análisis numérico de la distribución de Numb durante la mitosis en ratones Numb TG.

Estos datos indicaban que la acumulación excesiva de la proteína Numb en el citoplasma parece alterar los mecanismos que controlan la distribución asimétrica de ésta, siendo heredada por ambas células. Así mismo, estos datos mostraban la importancia de una correcta regulación de los niveles de Numb para que pueda tener lugar una adecuada división asimétrica.

El siguiente paso fue comprobar cómo la inhibición de la proteína, mediante un dominante negativo, afectaba al desarrollo temprano de timocitos y si el fenotipo era igual u opuesto al observado en sobreexpresión.

2.2. EXPRESIÓN DE UN DOMINANTE NEGATIVO DE NUMB

El término “dominante negativo”, de aparición relativamente reciente, hace referencia a mutantes de proteínas capaces de bloquear rutas de señalización en una célula, al poder unirse a algunos de los ligandos naturales de la proteína a inhibir pero no a otros. De esta manera se bloquean las rutas de señalización en las que la proteína en cuestión participa.

Su uso lleva consigo numerosas ventajas [93, 94], pudiéndose resumir en :

a) El producto del gen dominante negativo puede actuar bloqueando la ruta de señalización, incluso cuando en esa ruta existen múltiples y redundantes señales de activación. De esta manera se evitan los fenómenos de compensación llevados a cabo por las isoformas de una proteína.

b) Son mutaciones dominantes, lo que permite evaluar sus efectos en la primera generación de individuos.

c) Se pueden analizar efectos dosis dependiente según la cantidad de expresión del dominante negativo sea mayor o menor.

Pero las ventajas pueden convertirse a veces en desventajas, ya que precisamente el no bloqueo de una sola ruta de señalización sino de varias, provoca la aparición de resultados inesperados y a veces difíciles de explicar.

2.2.1. Estructura de Numb dominante negativo

Para poder analizar cómo la inhibición de Numb afecta a la división asimétrica y señalización por pre-TCR, se utilizaron ratones transgénicos para un dominante negativo de Numb, el cual ya había sido descrito en anteriores investigaciones [45].

La estructura de este dominante negativo consistía únicamente en el dominio de unión a fosfotirosina o PTB, siendo dirigida su expresión bajo el promotor CD2 humano y habiéndosele introducido una secuencia diana del c-myc humano para favorecer su detección (**Figura 26**). Por tanto, estos ratones expresaban una proteína Numb truncada con sólo su dominio PTB.

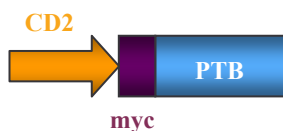


Figura 26. Esquema de la estructura del dominante negativo de Numb (*dnNb*).

Como dominante negativo, éste va a inhibir, no sólo a todas las isoformas de Numb, sino también a sus proteínas homólogas que en ausencia de ella pudieran llevar a cabo sus funciones. Es el caso de Numblake, Dab-2 y ARH.

Es importante tener en cuenta que el dominante negativo no altera la síntesis de la proteína endógena, pero sí su funcionalidad, al ocupar y bloquear los sitios de unión presentes en las proteínas sobre las que actúa y que son utilizados por la proteína endógena para llevar a cabo su función.

2.2.2. La expresión de un dominante negativo de Numb provoca una disminución importante del tamaño del timo.

El primer paso fue comprobar los niveles de expresión del dominante negativo en timocitos de estos ratones (dnNb TG) (Figura 27A), procediéndose a continuación al estudio de las distintas poblaciones celulares tímicas.

Estos ratones dnNb TG se caracterizan por un tamaño de timo reducido (Figura 27B), y niveles de celularidad total, así como de poblaciones DN y DP significativamente reducidas con respecto a los ratones WT (Figura 27C y D).

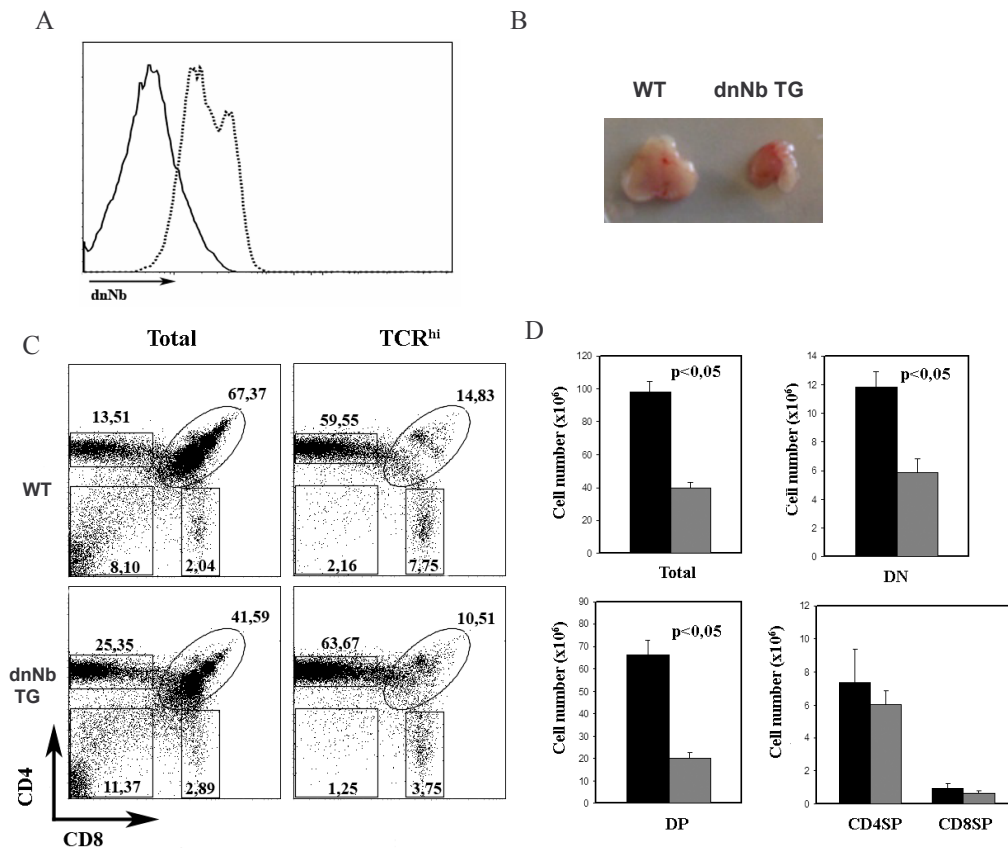


Figura 27. Expresión dnNb y Celularidad reducida en ratones dnNb TG. (A) Análisis por citometría de flujo intracelular, usando un anti-Myc, la expresión en timocitos de dnNb en WT (línea continua) y dnNumb TG (línea discontinua); (B) Fotografía de timos WT y dnNb TG; (C) Análisis por citometría de las distintas poblaciones tímicas, tiñendo con CD4 y CD8; (D) representación en barras del número total de timocitos y subpoblaciones tímicas DN, DP, SP en WT (negro) y dnNumb TG (gris); En (C) se representan porcentajes y en (D) se

representan la media \pm SD. Para la comparación estadística se usó el test t-Student, siendo consideradas las diferencias significativas si $p < 0,05$. Los datos son representativos de tres experimentos independientes.

Resultados similares fueron encontrados en una segunda línea de ratones dnNb TG, sin embargo tanto los niveles de expresión del transgen como el grado de las alteraciones, sobre todo a nivel de celularidad total, (**Figura 28**) era menor que en la línea anterior. Esto se atribuyó al menor número de copias del transgen que expresaba esta línea (unas 10 frente a 20 de la primera línea).

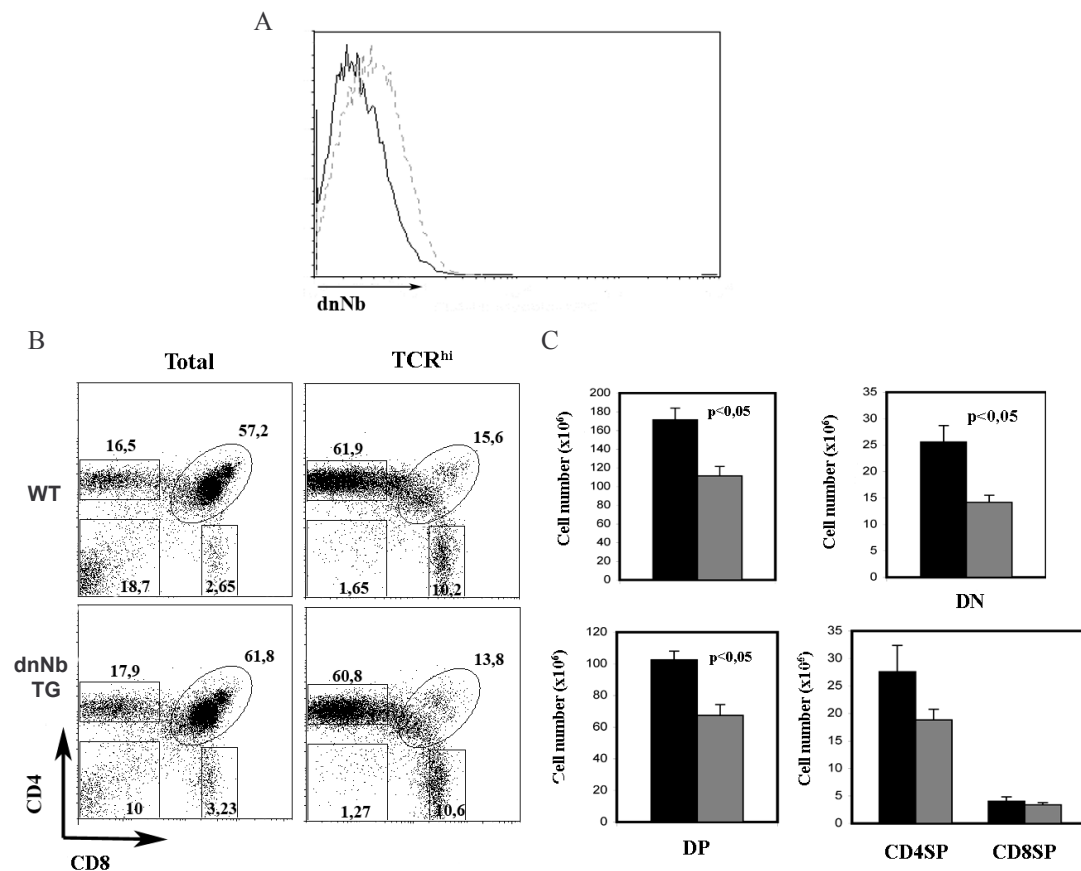


Figura 28. Expresión dnNb y Fenotipo en ratones dnNb TG con menor número de copias del transgen. (A) Análisis por citometría de flujo intracelular, usando un anti-Myc, la expresión en timocitos de dnNb en WT (línea continua) y dnNumb TG (línea discontinua); (B) Análisis por citometría de las distintas poblaciones tímicas, tiñendo con CD4 y CD8; (D) representación en barras del número total de timocitos y subpoblaciones tímicas DN, DP, SP en WT (negro) y dnNumb TG (gris); En (C) se representan porcentajes y en (D) se representan la media \pm SD. Para la comparación estadística se usó el test t-Student, siendo las consideradas las diferencias significativas si $p < 0,05$. Los datos son representativos de tres experimentos independientes.

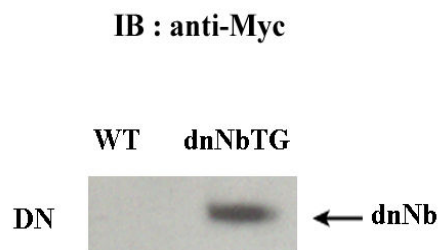
Estos resultados muestran la capacidad que tiene el dominante negativo de Numb de provocar una alteración en las poblaciones linfocíticas. El grado de alteración varía en función del número de copias del transgen que se expresen, es por esto que la línea elegida para todos los estudios a realizar para esta tesis fuese la que presentaba el fenotipo más fuerte.

2.2.3. Ratones dnNb TG presentan un bloqueo en DN3 así como una menor proliferación en el estadio DN.

Dado que nuestro objetivo era estudiar las alteraciones producidas por la inhibición de Numb a nivel de timocitos tempranos, se procedió a analizar en detalle la subpoblación DN.

En primer lugar se comprobó la expresión del dominante negativo en esa subpoblación DN (**Figura 29A**).

A



A continuación se analizó en detalle las diferentes subpoblaciones DN, observándose, tanto en adultos como en fetos, un bloqueo a nivel de DN3 (**Figura 29B**), con un incremento del doble en esta subpoblación y una reducción, también del doble, en DN4.

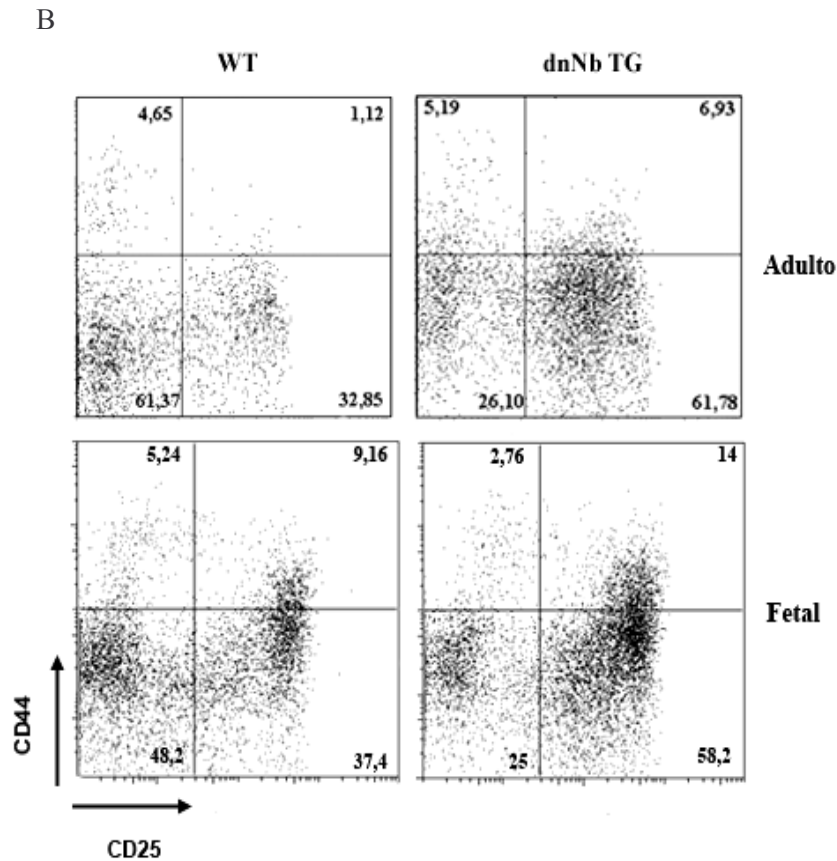


Figura 29. Fuerte bloqueo a nivel de DN3. (A) Análisis por western-blot, usando un anti-Myc, de la expresión del dominante negativo en timocitos DN en WT y dnNumb TG; (B) Análisis por citometría de flujo de las subpoblaciones DN1, DN2, DN3 y DN4 de timocitos adultos y fetales, siendo teñidos con CD25, CD44 y Lin. En cada cuadrante se representan porcentajes. Los datos son representativos de tres experimentos independientes.

Como el estadio DN3 se caracteriza por un importante fenómeno de proliferación dirigido por la señalización por pre-TCR, se estudió el posible efecto de la inhibición de Numb en este proceso.

Para ello se usó el sistema OP9, previamente descrito por J.C. Zuñiga-Pflücker [95]. Este sistema consiste en dos líneas, OP9 y OP9DL; ésta última expresa un ligando de Notch, llamado Deltalike, que permite la señalización por Notch, así como la diferenciación timocítica. Se ha demostrado que los precursores tímicos se desarrollan hasta DP cuando se cultivan sobre OP9DL [96], por lo que este sistema es óptimo para estudiar la proliferación en el estadio DN3.

Con respecto al método utilizado para la medida de proliferación se usó el CFSE, el cual se une a la membrana de la célula y cuando ésta se divide es repartido por igual a las dos células hijas, las cuales tendrán una menor fluorescencia (**Figura 30**).

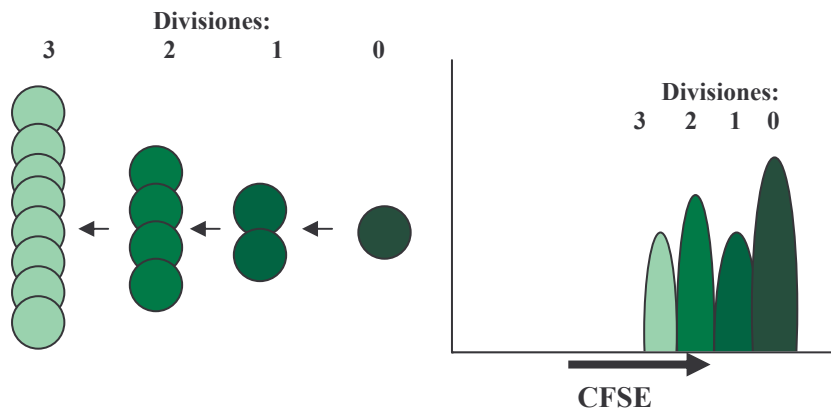


Figura 30. Esquema de tinción con CFSE

Una vez comprobada la idoneidad del sistema, al mantenerse el bloqueo durante el cocultivo sobre OP9DL (**Figura 31A y B**), y dado que los timos fetales de E14-15 son la mejor fuente de obtención de la subpoblación DN, timocitos fetales fueron extraídos y marcados con CFSE y cocultivados durante 6 días tanto sobre OP9, la línea control, como sobre OP9DL.

El análisis de la expresión de CFSE tras ese periodo de cocultivo mostró que los timocitos dnNb TG habían proliferado menos que los timocitos del ratón WT (**Figura 31C**).

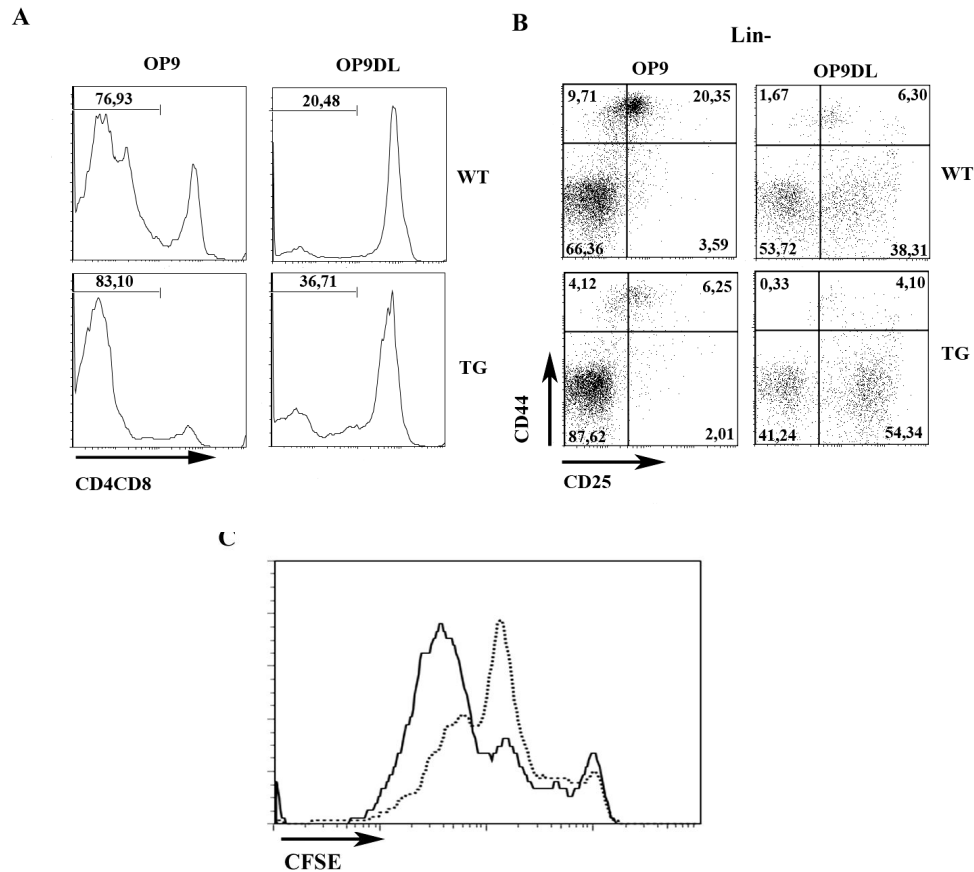


Figura 31. Defecto proliferativo de los timocitos *dnNb TG*. (A) Maduración de timocitos fetales hacia el estadio DP después de 6 días de cocultivo sobre OP9 y OP9DL. Las DP fueron detectadas por expresión de CD4 y CD8; (B) Diferenciación de timocitos DN tras 6 días de cocultivo sobre OP9/OP9DL. Los timocitos Lin⁻ fueron teñidos con CD44 y CD25; (C) Expresión de CFSE en timocitos fetales de WT (línea continua) y *dnNb TG* (línea discontinua) cultivados durante 6 días sobre OP9DL; Los datos son representativos de tres experimentos independientes.

2.2.4. El dominante negativo de *Numb* provoca una alteración de la división asimétrica.

Este defecto proliferativo quizás estaba causado por una alteración del proceso de división asimétrica en estos ratones transgénicos. Para poder comprobar esta hipótesis se realizaron tinciones por inmunofluorescencia de timocitos fetales en las diferentes etapas de mitosis. Pero previo a ello, se quiso detectar cual era la localización en la célula del dominante negativo, observándose distribuido en membrana y colocalizado en parte con la *Numb* endógena. Además parece ocupar los sitios de ésta, desplazándola quizás de sus sitios funcionales, ya que hay una mayor cantidad de la

endógena en el citoplasma con respecto a lo observado en ratones WT (**Figura 32**).

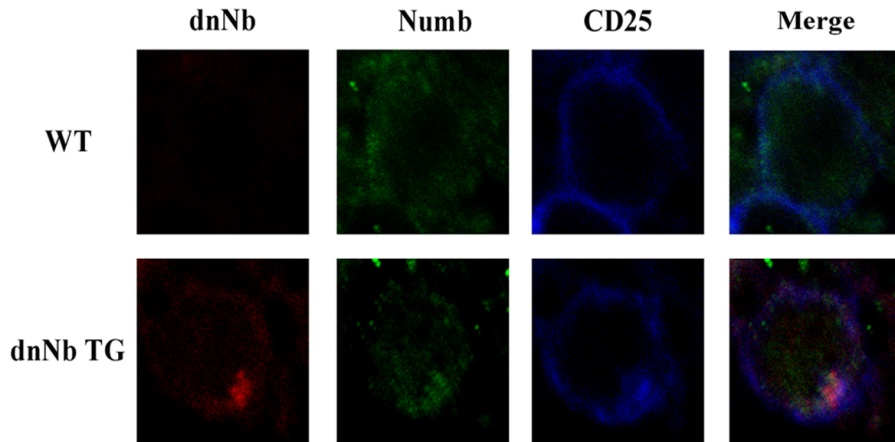


Figura 32. *El dominante negativo de Numb se localiza en membrana y desplaza a la proteína endógena.* Imagen por confocal de un timocito fetal WT y otro dnNb TG teñidos con CD25 (azul), dnNb (rojo) y Numb (verde). Para detectar dnNb se usó un anticuerpo anti-Myc contra la secuencia diana que solo posee el dominante negativo y para detectar Numb se utilizó un anticuerpo que reconoce el extremo C-terminal, carente en el dnNb. Las imágenes son representativas de tres experimentos diferentes.

Estos ratones dnNb TG presentaban una grave alteración en la división asimétrica (**Figura 33**), perdiendo Numb su localización polarizada en metafase, anafase y telofase (los porcentajes se detallan en la tabla V).

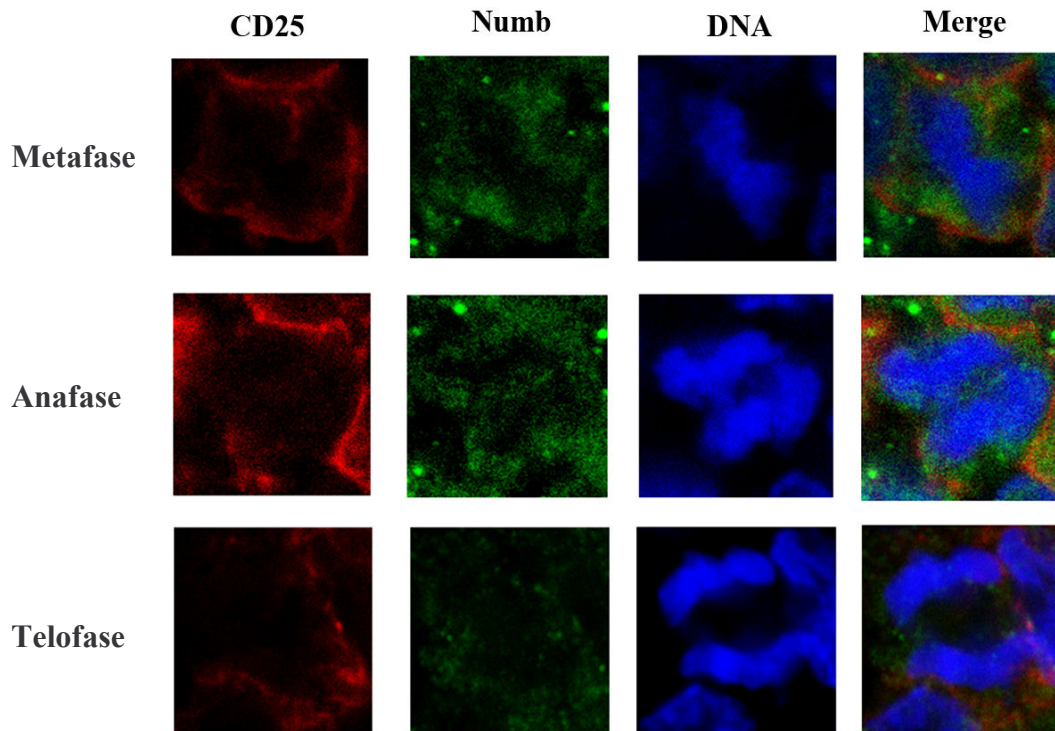


Figura 33. *Alteración de la división asimétrica en ratones dnNb TG.* Imágenes por

confocal de timocitos fetales de ratones dnNb TG en metafase, anafase y telofase teñidos con TOPRO (azul), CD25 (rojo) y Numb (verde). Las imágenes son representativas de al menos tres experimentos diferentes.

N° SECCIONES DE TIMO FETAL ANALIZADAS = 10	
N° METAFASES TOTALES = 44	
% Asimétricas (n°células)	% Simétricas (n°células)
15% (7)	81,8% (36)
N° TELOFASES TOTALES= 9	
% Asimétricas (n°células)	% Simétricas (n°células)
11% (1)	88% (8)

Tabla V. *Análisis numérico de la distribución de Numb durante la mitosis en ratones dnNb TG.*

A nivel de telofase, el porcentaje de células simétricas para Numb va aumentando ligera y gradualmente desde un 70% en WT, pasando a un 88% en dnNb TG, hasta llegar al 100% en Numb TG, lo cual va en paralelo con los niveles de Numb presentes en la célula.

Quisimos comprobar si esa simetría gradual también se producía con respecto al porcentaje de Numb heredado por cada célula hermana a nivel de telofase y el resultado obtenido fué que, en WT una de las células hijas hereda significativamente más Numb que su célula hermana, lo cual ya ocurre en anafase (**Figura 34A**). Igual ocurre en telofase de ratones dnNb TG, aunque ya se observa una tendencia hacia una herencia similar con respecto a cantidad de Numb entre las células hermanas, siendo el equilibrio alcanzado en ratones Numb TG donde ambas células hermanas heredan la misma cantidad de Numb (**Figura 34B**).

Este resultado lleva a pensar que son necesarios unos adecuados niveles de Numb en la célula para que pueda tener lugar una correcta segregación de la proteína, en cuanto a cantidad de ella heredada por cada célula hija, durante la división.

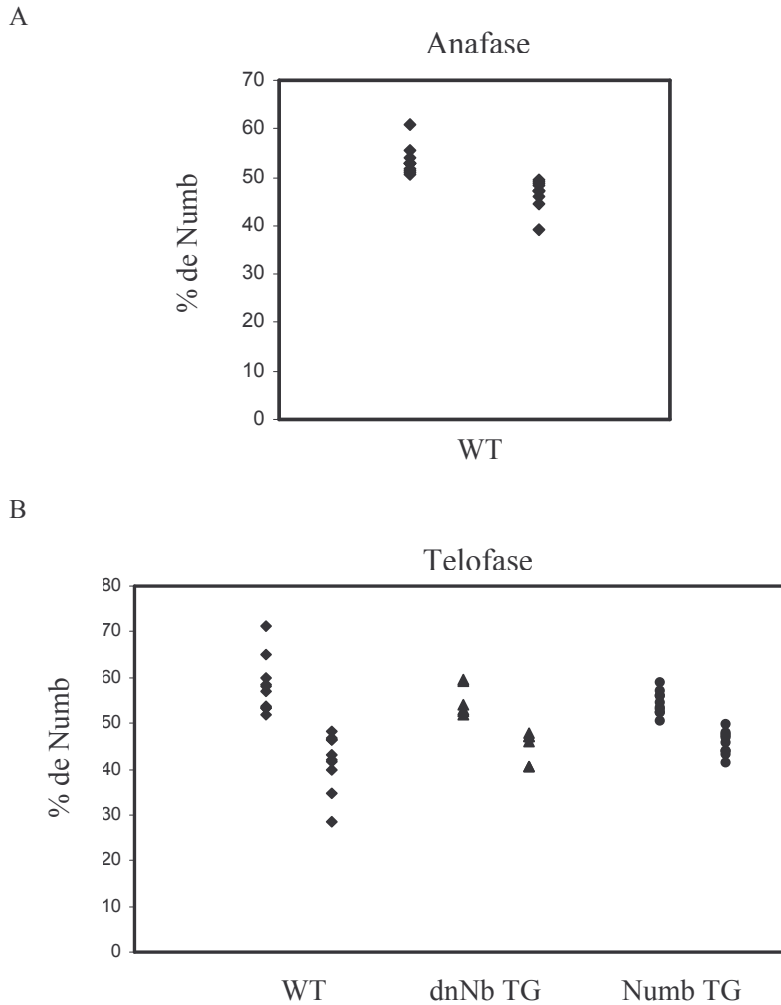


Figura 34. *Porcentaje de Numb heredado por cada célula hija.* (A) Diagrama donde se representa el porcentaje de Numb heredado por cada célula hija para 10 células analizadas en anafase en WT (♦); (B) Diagrama donde se representa el porcentaje de Numb heredado por cada célula hija para 10 células analizadas en telofase en WT (♦) y Numb TG (●) y 6 para dnNb TG (▲). Célula hija 1 que hereda más Numb (símbolos de la izquierda) y célula hija 2 que hereda menor cantidad de Numb (símbolos de la derecha) para cada línea de ratón. La cuantificación de Numb fue realizada con el programa LAS AF (Leica Microsystem), creándose una gate para cada célula hija y midiéndose la máxima intensidad del total de pixels de cada gate para cada z-stack (las gates fueron ajustándose para cada z-stack). Los pixels positivos para Numb fueron expresados como un porcentaje de la suma de los pixels de cada gates con respecto a los pixels totales de ambas gates.

Por otro lado, en los ratones dnNb TG se observó un escaso número de células en telofase y mayor en metafase de lo que se había observado en el caso de la sobreexpresión de Numb (**Figura 35**).

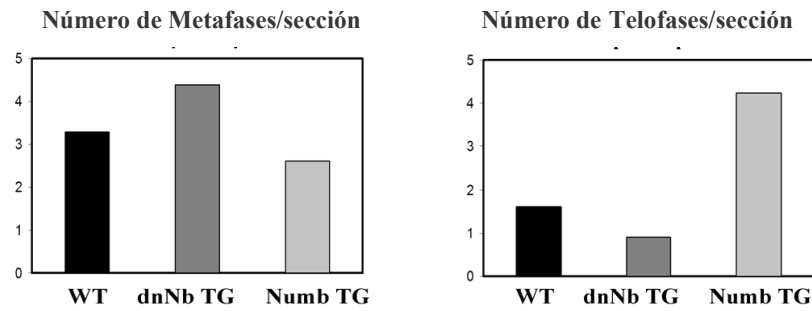


Figura 35. Representación en diagrama de barras de las Tablas III, IV y V

2.2.5. El dominante negativo de Numb inhibe la capacidad de Numb endógena de inhibir la señalización por Notch.

Si, como parecen evidenciar nuestros resultados, el dominante negativo está bloqueando la función de Numb, entonces la señalización por Notch debería estar aumentada y por tanto la expresión de sus genes diana, como Hes-1 debería ser elevada. Al analizar esos niveles de expresión del principal y más característico gen diana de Notch, Hes-1, obtuvimos en efecto, un aumento en la señalización por Notch (**Figura 36**).

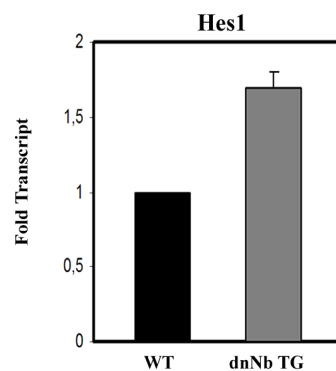


Figura 36. El dominante negativo aumenta la señalización por Notch. Diagrama de barras donde se representan los niveles de expresión del gen Hes-1 en dnNb TG (gris) con respecto al control WT (negro). La media +/- SD de tres experimentos independientes son representados.

Este resultado demuestra que el dominante negativo inhibe a Numb, pero el efecto que el aumento de señalización por Notch debería provocar en estos ratones transgénicos, no se corresponde con el observado, puesto que hay un importante

bloqueo en la diferenciación de los timocitos a nivel DN3, quizás como consecuencia de la distribución simétrica de Numb, igual a lo que ocurre en ratones Rag2^{-/-}, y además presentan un importante defecto proliferativo.

Estos resultados nos estaban insinuando que Numb debía estar relacionado con algún otro receptor además de Notch, y que el dominante negativo estaría también inhibiendo esta función de Numb.

2.2.6. Los ratones dnNb TG presentan una excesiva señalización por pre-TCR, provocando apoptosis y diferenciación prematura de la subpoblación DN3.

El principal candidato era el pre-TCR y su señalización, pues había varias evidencias que así lo indicaban como la existencia de un bloqueo en diferenciación y proliferación en DN3, procesos ambos controlados por el pre-TCR, y la alteración en división asimétrica, al igual que ocurría en ratones Rag2^{-/-}.

Por todo esto, se procedió al análisis en profundidad del pre-TCR y su señalización, comenzando con la medida de los niveles superficiales de pT α en la población DN, así como del principal indicador de señalización por pre-TCR, como es CD5 [97]. Ambos estaban incrementados en DN3 y DN4 de ratones dnNb TG (**Figura 37A**). Esto sugiere que podrían estar recibiendo una señalización excesiva por pre-TCR, que provocaría mayor apoptosis y un fenómeno de diferenciación prematura [98].

La mayor apoptosis fue demostrada mediante análisis con AnexinaV (**Figura 37A**) y mediante tinción con TOPRO de los núcleos de secciones de timo fetal dnNb TG (**Figura 37C y D**). Esta elevada apoptosis explicaría el escaso número de timocitos DN3 dnNb TG encontrados en telofase.

Con respecto a la diferenciación prematura, ésta ya fue observada en ratones

deficientes para Numb y Numlike, donde los progenitores neurales se diferenciaban prematuramente antes de proliferar [67]. Para investigar este proceso en los timocitos DN de nuestros ratones utilizamos como marcadores CD25 y pT α , ya que la expresión de ambos debe desaparecer en el estadio DP. Tras el análisis por citometría comprobamos que los niveles de pT α , CD25, así como CD5 estaban incrementados en la población DP (**Figura 37B**).

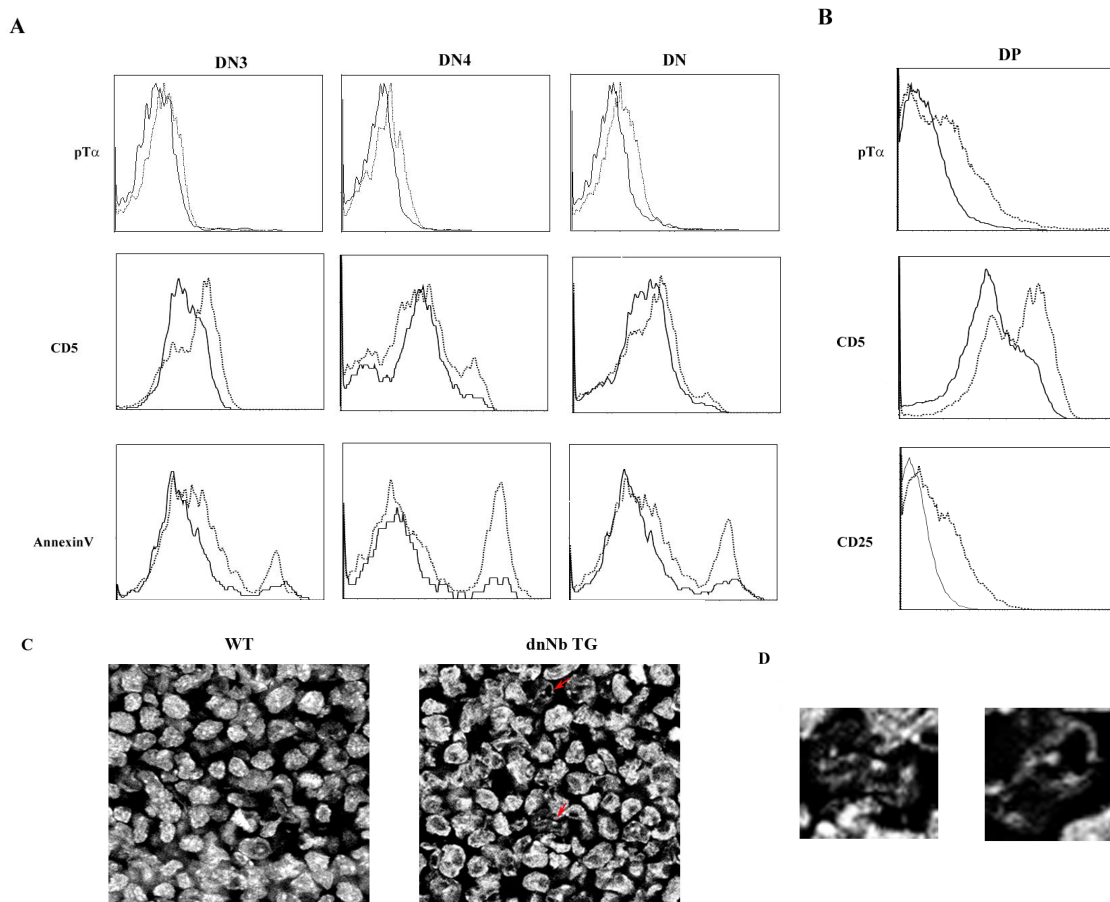


Figura 37. *Excesiva señalización por pre-TCR provoca apoptosis y diferenciación prematura en la subpoblación DN de ratones dnNb TG.* (A) Análisis de los niveles superficiales de pT α y CD5 por citometría en las subpoblaciones DN, DN3 y DN4, así como de apoptosis tras ser marcadas con AnexinaV; (B) Análisis de los niveles superficiales de pT α , CD5 y CD25 por citometría en la población DP; (C) Imágenes de secciones de timo fetal WT y dnNb TG tratados con TOPRO para detectar DNA. Núcleos apoptóticos son señalados con flechas de color rojo; (D) Imágenes a mayor aumento de los núcleos señalados en (C); Todos los datos son representativos de al menos tres experimentos diferentes.

Todos estos datos nos llevaron a hipotetizar que, el aumento de los niveles superficiales del pre-TCR probablemente resulta en su excesiva señalización,

lo cual provoca una diferenciación prematura DN3 a DP, evitándose el fenómeno proliferativo y además aumentando la muerte por apoptosis, resultando todo ello en una menor celularidad.

2.2.7. La excesiva señalización por pre-TCR correlaciona con elevados niveles de TCR β

Se quiso analizar si también había alteraciones en los niveles de expresión de la cadena TCR β . El resultado que obtuvimos fue un aumento de expresión del TCR β en la población DN3 de los ratones dnNb TG, localizándose fundamentalmente en membrana (**Figura 38 A y B**).

Esto sugiere que el bloqueo ocurre después del reordenamiento del TCR β y apoya nuestra hipótesis de que la excesiva señalización por pre-TCR está provocando una señal aumentada en intensidad y duración que desencadena fenómenos como la apoptosis y la diferenciación prematura.

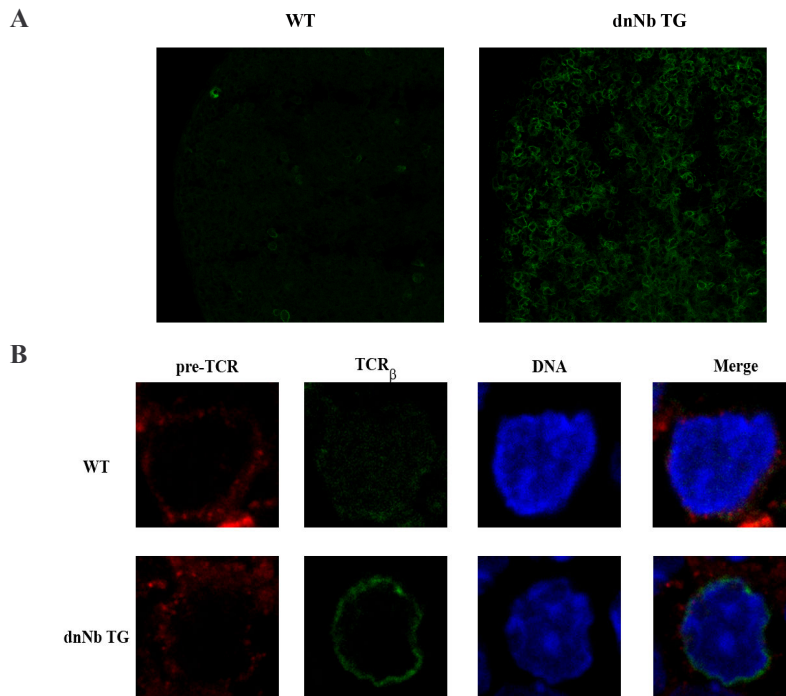


Figura 38. Niveles aumentados de TCR β en membrana. (A) Imagen por confocal de

secciones de timo fetal de WT y dnNb TG teñidas con anti-TCR β -Alexa555; (B) Detalle de un timocito fetal WT y dnNb TG teñidos con pT α (rojo), TCR β (verde) y TOPRO. Todos los datos son representativos de al menos tres experimentos diferentes.

2.2.8. Bloqueo del mecanismo degradativo del pre-TCR en timocitos DN3 de ratones dnNb TG.

La presencia en los ratones dnNb TG de un aumento en los niveles superficiales de pre-TCR, y como consecuencia un aumento de señalización, nos llevó a querer estudiar si esto era causa de un bloqueo del mecanismo degradativo del pre-TCR.

El resultado que obtuvimos fue un mayor grado de colocalización de pre-TCR y ubiquitina en acúmulos del primero en membrana y un menor número de vesículas de pre-TCR positivas para ubiquitina en el citosol, mientras que, por el contrario, en WT había un mayor número de vesículas positivas para ubiquitina y pre-TCR en citoplasma (**Figura 39**).

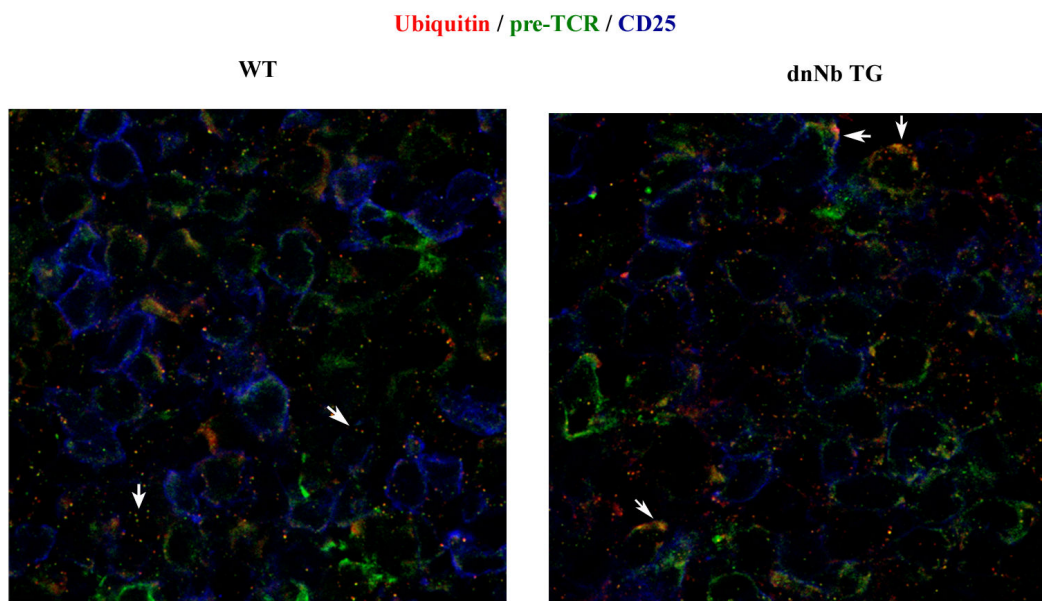


Figura 39. *pre-TCR retenido en membrana en ratones dnNb TG.* Zoom de una sección de timo fetal WT y dnNb TG teñidas con ubiquitina (rojo), pT α (verde) y CD25 (azul). Las zonas de colocalización son indicadas con flechas. Las imágenes son representativas de por lo menos tres experimentos independientes.

Esto parece evidenciar que el mecanismo de degradación del pre-TCR está bloqueado, impidiéndose la formación de las vesículas endocíticas y su evolución hacia endosomas.

2.2.9. La localización endosomal de c-Cbl está alterada en timocitos DN de ratones dnNb TG

En el proceso de degradación del pre-TCR y del TCR participa una ubiquitin-ligasa llamada c-Cbl, cuya función es inducir la endocitosis de ambos receptores, promoviendo y manteniendo su ubiquitinización desde la formación de la vesícula hasta su degradación en el lisosoma. El mecanismo por el cual realiza esta función permanece aún sin aclarar pues la mayoría de las investigaciones se han centrado en su papel como regulador de la señalización del TCR y muy poco se sabe acerca de como actúa sobre el pre-TCR. Lo que se conoce es que promueve la ubiquitinización de la cadena ζ del TCR, a través del adaptador ZAP-70 [99] y que la ausencia de c-Cbl origina una señalización mantenida y excesiva por parte del TCR y pre-TCR [100, 101].

Con respecto a su papel sobre el pre-TCR pocas investigaciones se han llevado a cabo. Si se sabe que c-Cbl es específicamente reclutado a membrana y activado mediante fosforilación constitutiva en tirosina, en células que expresan pre-TCR [13]. El modelo propuesto es que podría ser reclutado por kinasas como p56Lck y Zap-70, regulando negativamente la señalización del pre-TCR por una endocitosis y degradación lisosomal posterior vía ubiquitina. Así mismo, también se sabe que c-Cbl puede mediar la internalización de receptores mediante el reclutamiento de endofilinas, las cuales se encargan de inducir la invaginación de la membrana [102, 103]. Mutaciones en dominios de c-Cbl, como ratones knockout para c-Cbl han puesto de manifiesto el papel clave de esta ubiquitin-ligasa en la degradación del pre-TCR [19] y en la exclusión alélica de la cadena α del TCR [104].

Todo esto, junto con el hecho de que Numb es una proteína endocítica que participa en endocitosis de receptores, al unirse a la subunidad α -adaptina del complejo

AP2, y que además, inmunoprecipita con el complejo del TCR en células T maduras, complejo del que también forma parte c-Cbl. Sumando a esto que ratones knockout para c-Cbl [19, 104] presentaban un fenotipo similar al de los ratones dnNb TG, se puede hipotetizar que el dominante negativo podría estar bloqueando la localización de c-Cbl.

Para estudiar esta hipótesis analizamos por microscopía confocal, en secciones de timo fetal, la localización de Numb endógena (rojo) y de c-Cbl (verde). Lo que se observó fue un diferente patrón de localización de c-Cbl, pues mientras que en WT se localizaba fundamentalmente en vesículas, en el dnNb TG lo hacía en membrana (**Figura 40A**). Y cuando ambas proteínas, Numb y c-Cbl eran observadas conjuntamente (amarillo), se pudo distinguir una menor colocalización c-Cbl+Numb en vesículas en el dnNb TG (**Figura 40B**).

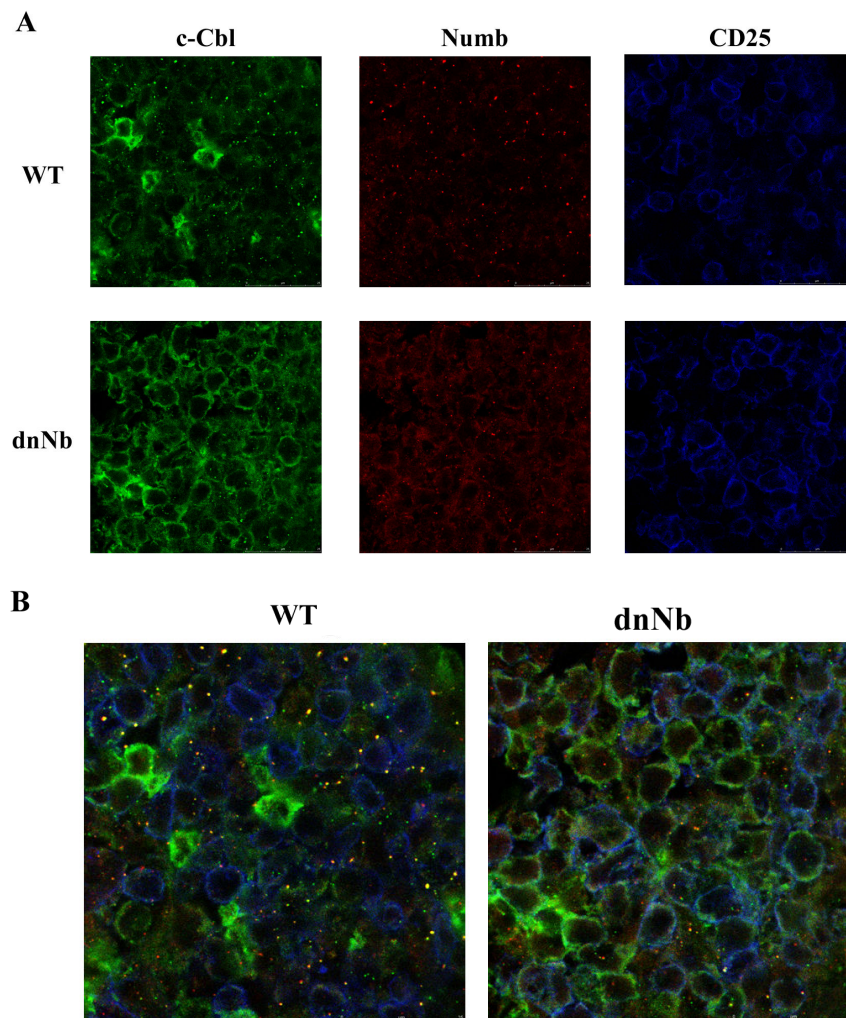


Figura 40. Menor colocalización c-Cbl/Numb en endosomas. (A) Imágenes por confocal de

Resultados

secciones de timo fetal teñidos con c-Cbl (verde), Numb (rojo) y CD25 (azul); (B) Imagen de la superposición de los tres colores mostrados en (A). Las imágenes son representativas de al menos tres experimentos independientes.

Cuando realizamos una cuantificación detallada de las vesículas que sólo contenían a Numb, sólo a c-Cbl o a ambas proteínas en timocitos CD25+, obtuvimos un importante descenso tanto en el número de vesículas que contenían sólo a c-Cbl como las que contenían a Numb+c-Cbl en los ratones dnNb TG (**Figura 41**).

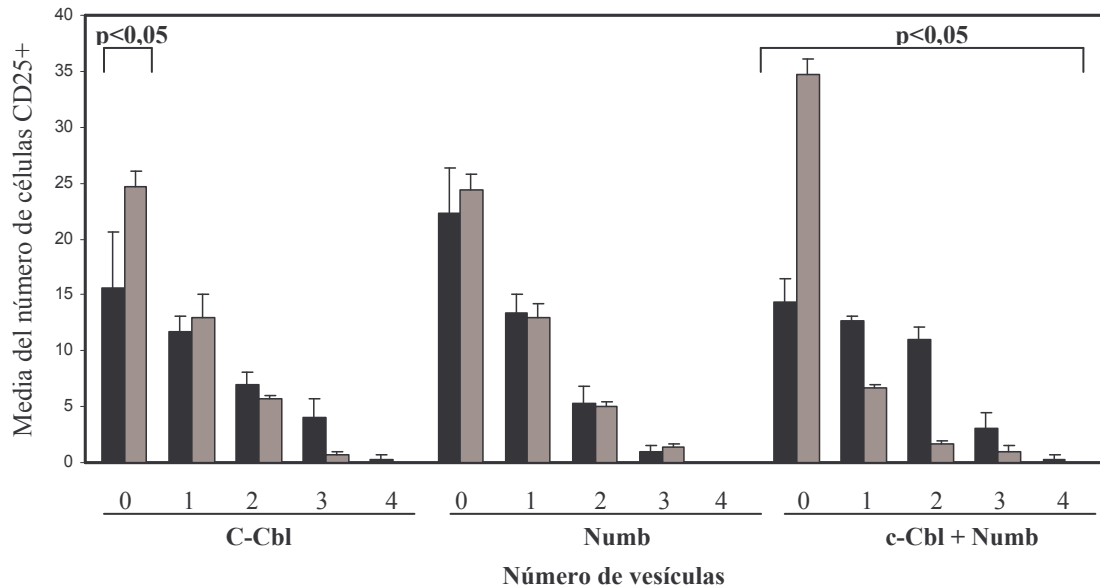


Figura 41. *Cuantificación del número de células CD25+ que contiene vesículas de c-Cbl, Numb y c-Cbl+Numb.* Cálculo del número de células CD25+ que contienen desde cero a cuatro vesículas de c-Cbl, Numb y c-Cbl+Numb. Cuatro imágenes independientes por cada timo WT (negro) y dnNb TG (gris) fueron analizadas. Para la colocalización, se realizó un estudio mediante la creación de máscaras para c-Cbl (verde) y para Numb (rojo) con Photoshop 7.0. Número de vesículas por cada célula CD25+ en cada máscara fueron contadas. El mismo análisis se realizó para las vesículas que contenían ambas proteínas. Se analizaron 34 células CD25+ en WT y 45 en dnNb TG. Todos los datos son representativos de al menos tres experimentos independientes.

Además, quisimos comprobar si esas vesículas eran endosomas, para lo cual teñimos con ubiquitina y observamos que tanto las vesículas que contenían a Numb (**Figura 42A**) como a c-Cbl (**Figura 42B**) eran positivas para ubiquitina.

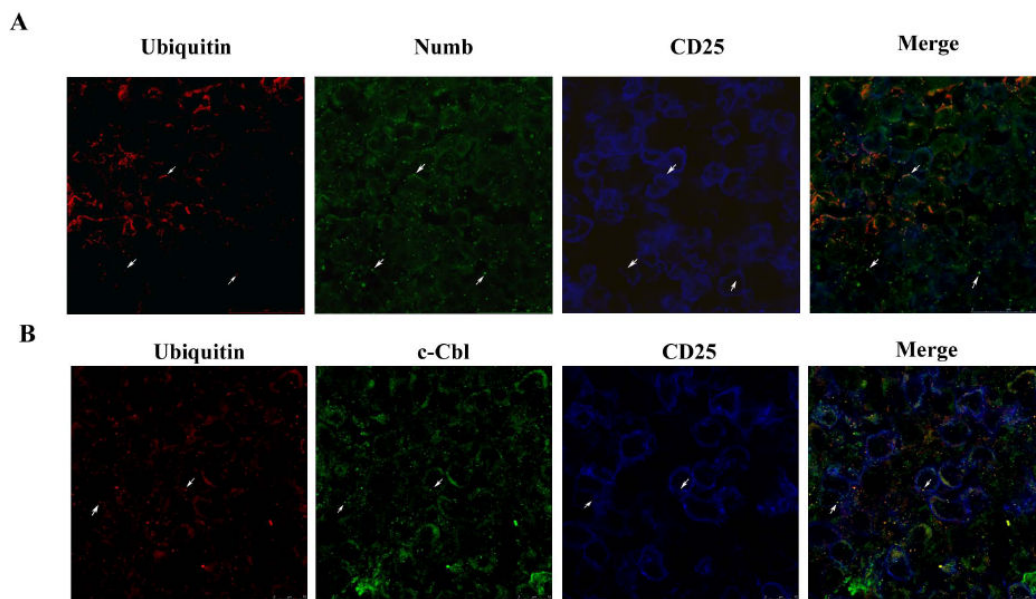


Figura 42. *Numb* y *c-Cbl* colocalizan con vesículas de Ubiquitina. Imágenes por confocal de secciones de timo fetal WT teñidas con ubiquitina (rojo), CD25 (azul) y Numb (verde) en (A) y *c-Cbl* (verde) en (B). Las imágenes son representativas de al menos tres experimentos independientes.

Estos datos indicaban que Numb podría ser un mediador en la función de *c-Cbl* como inductor de la formación de la vesícula de endocitosis y posterior formación del endosoma, ya que la presencia de un dominante negativo de Numb no impide el reclutamiento de *c-Cbl* a la membrana por parte del pre-TCR, mecanismo imprescindible por el que el pre-TCR regula su degradación, pero sí provoca la retención de *c-Cbl* en membrana e impide que se forme la invaginación de la misma y se inicie la endocitosis mediada por clatrina, bloqueándose la formación del endosoma encargado de transportar al receptor, en este caso el pre-TCR, al lisosoma.

Por otro lado, la no formación de las vesículas degradativas provoca una acumulación de Numb endógeno, el cual deja de poder ser redistribuido de forma correcta durante la división asimétrica, de ahí que el fenotipo observado a nivel de división asimétrica sea el mismo que el que presentaban los ratones Numb TG.

3. EFECTO DE LA EXPRESIÓN DE UN DOMINANTE NEGATIVO DE NUMB SOBRE UNA LÍNEA CELULAR LEUCÉMICA: ESTUDIO DE SU CARÁCTER ONCOSUPRESOR

Numb es considerada una proteína oncosupresora, siendo varias las evidencias que parecen demostrarlo y que han sido comentadas con anterioridad. Todas las investigaciones realizadas hasta ahora parecen confirmar que Numb previene la proliferación celular, bien a través de la inhibición de Notch o bien controlando la expresión de p53 [82].

Sin embargo, como se ha mostrado en el apartado de resultados de esta tesis, la inhibición de Numb desemboca en una menor proliferación durante el desarrollo de timocitos tempranos. Esto parece ser debido a que la inhibición de Numb a través de un dominante negativo resulta en alteraciones de la señalización por pre-TCR, lo cual a su vez resulta en apoptosis e inhibición de la proliferación, es decir, esta disminución proliferativa es un efecto secundario de Numb.

En base a esto, se estudió un sistema diferente, la línea eritroleucémica K562, carente de pre-TCR, para analizar si el dominante negativo realmente puede potenciar la proliferación.

Con respecto a las estrategias utilizadas para la inhibición de Numb en esta línea fueron dos: la primera consistió en la construcción de un plásmido-vector del dominante negativo que fue transfectado en las células, obteniéndose posteriormente clones estables y la segunda fue mediante la creación de un vector lentiviral.

El resultado obtenido a nivel de proliferación fue significativamente diferente según se usara una estrategia u otra. Esto será detallado a continuación.

3.1. La expresión de un dominante negativo mediante un plásmido-vector ocasiona un ligero aumento proliferativo en células K562.

Para poder estudiar si la inhibición de Numb está directamente relacionada con proliferación celular, se insertó el dominio PTB de Numb, en el vector de expresión pCEFL. Este vector contenía además una secuencia diana del gen myc humano, para facilitar su detección, así como el gen Neo de resistencia a geneticina (**Figura 43**).



Figura 43. Esquema del vector *DnNb* expresado en K562

Una vez obtenida la construcción, ésta y el vector vacío (pCEFL) se transfectaron en K562 y tras varias semanas se pudieron obtener 4 clones estables para cada uno, en los cuales fue chequeada la expresión del dominante negativo (**Figura 44**).

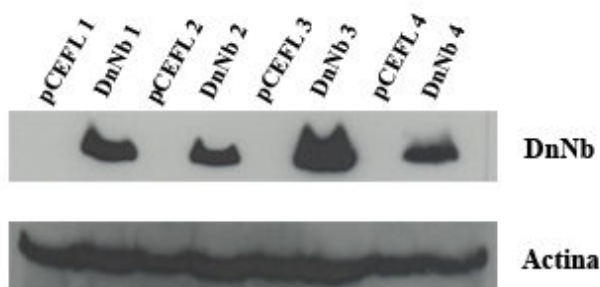


Figura 44. Expresión del dominante negativo en 4 clones *DnNb* y *pCEFL*. Análisis por western-blot de la expresión del dominante negativo usando un anticuerpo anti-Myc. El control de carga fue detectado mediante un anticuerpo contra Actina.

A continuación se eligieron 2 de los clones en base a su mayor expresión del dominante negativo y se procedió al experimento de proliferación mediante el uso de

bromodeoxiuridina (BrdU). Ésta, a diferencia del CFSE utilizado en los estudios de timo, no se une a membrana sino al DNA, incorporándolo la célula cuando se divide. Posteriormente se realiza un tratamiento con Dnasa, permitiendo así la unión del anticuerpo anti-BrdU (**Figura 45**).

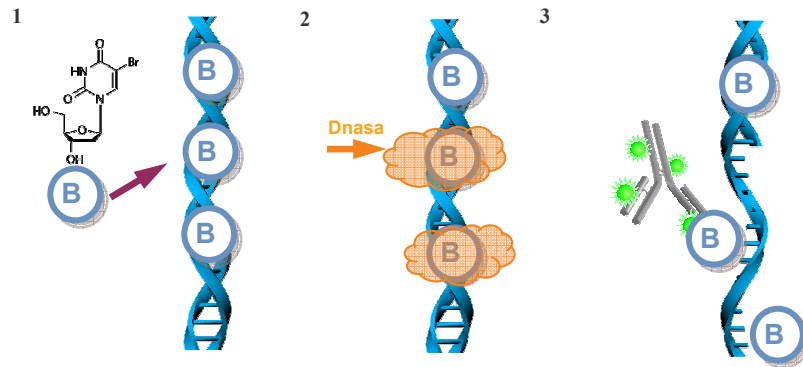


Figura 45. Esquema de tinción con BrdU.

El resultado obtenido tras el análisis por citometría, reveló un leve incremento en proliferación para los clones que expresaban el plásmido-vector DnNb (**Figura 46**).

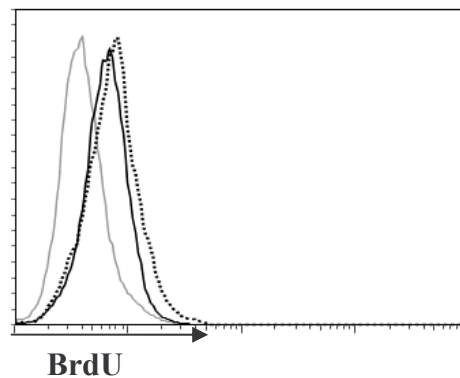


Figura 46. Leve incremento proliferativo en clones que expresan el plásmido-vector *DnNb*. Análisis por citometría de proliferación mediante incorporación por BrdU en K562-Vector vacío (línea continua negra) y K562-DnNb (línea discontinua negra); Control de isotipo BrdU (línea gris). Los datos son representativos de tres experimentos independientes.

Este resultado nos llevó a pensar que quizás era necesario un mayor nivel de expresión del dominante negativo por parte de las células transfectadas para poder

observar el verdadero efecto del dominante negativo. Ello es debido a que del número de copias de éste expresado por una célula, va a depender enormemente que se inhiba o no la proteína, siendo una de las desventajas ya descritas en el uso de dominantes negativos para la inhibición de proteínas.

3.2. La expresión de un dominante negativo mediante un vector lentiviral provoca un importante aumento proliferativo en células K562.

Para hacer frente a la desventaja anteriormente descrita se creó un vector lentiviral. Los vectores lentivirales son retrovirus complejos a los que se les ha eliminado su capacidad patógena. Poseen numerosas ventajas que los convirtieron en buenos candidatos a utilizar en nuestro estudio. Entre esas ventajas destacan conseguir un 100% de transducción sin que la viabilidad celular se vea afectada y que la expresión del transgén es estable en el tiempo. Además, se pueden transducir células que no se están dividiendo, lo cual podría ser de potencial interés para estudios futuros.

Así, se construyó un lentiviral L-dnNb y otro L-SE. El primero, contenía solo el dominio PTB de Numb junto a una secuencia del gen Myc humano, para permitir su detección, y el segundo expresaba GFP, siendo utilizado como control. La expresión de ambos estaba inducida bajo el promotor SFFV (Spleen Focus Forming Virus), el cual es un promotor fuerte, constitutivo y que se expresaba muy bien en células hematopoyéticas. Ambos también poseían la secuencia empaquetadora ψ y la secuencia WPRE que potencia la expresión del transgén, estabilizando el RNA mensajero (**Figura 47**).

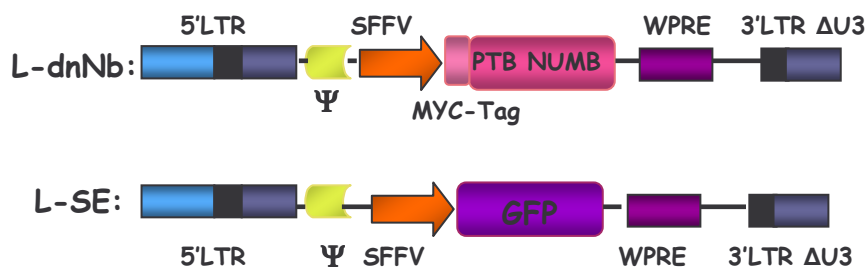


Figura 47. Esquema de la estructura de los vectores lentivirales L-dnNb y L-SE.

Una vez creadas ambas construcciones, se obtuvieron las partículas virales correspondientes y se realizó la transducción en las K562. Cinco días después fue analizada la expresión del transgén dnNb y GFP (**Figura 48**).

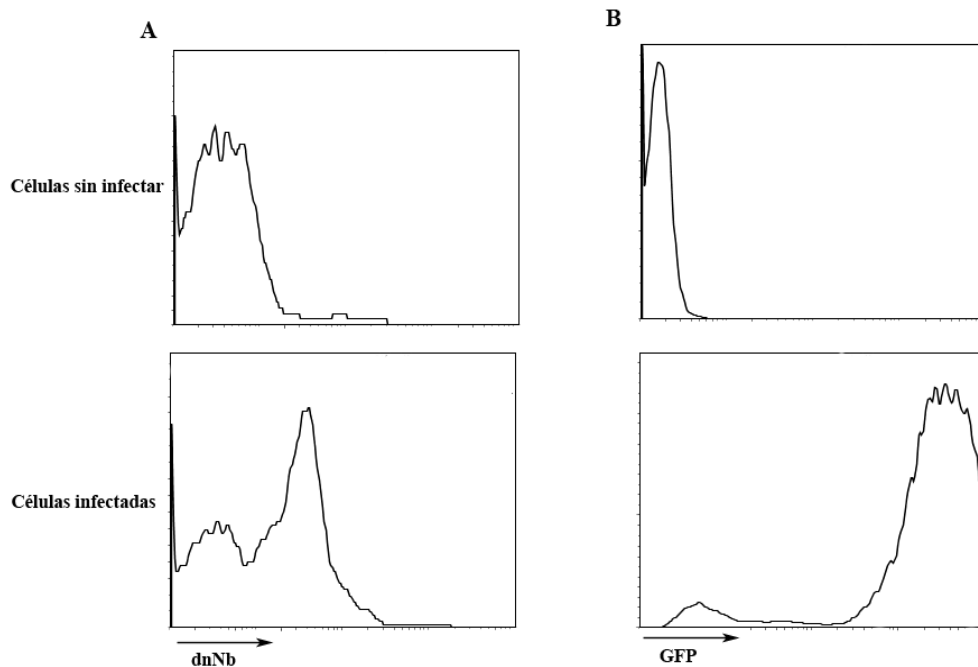


Figura 48. Niveles de expresión de los lentivirales *L-dnNb* y *L-SE*. (A) Análisis por citometría de flujo de la expresión del dominante negativo en K562 sin infectar (panel superior) y en K562 infectadas con *L-dnNb* (panel inferior), usando un anti-Myc; (B) análisis por citometría de la expresión de GFP en K562 sin infectar (panel superior) y en K562 infectadas con *L-SE* (panel inferior). Los datos son representativos de tres experimentos diferentes.

Así mismo se comprobó que la expresión del transgén no era tóxica (**Figura 49**).

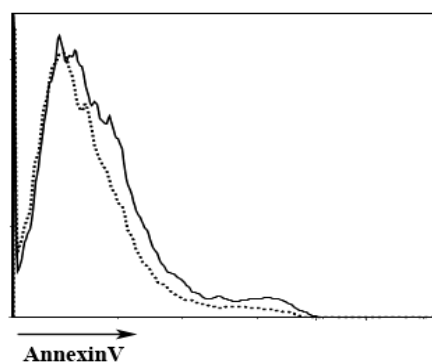


Figura 49. El lentiviral *L-dnNb* no provoca apoptosis. Análisis por citometría del grado de apoptosis usando anexina V en K562 sin infectar (línea negra continua) y K562 infectadas con *L-dnNb* (línea negra discontinua); Los datos son representativos de tres experimentos independientes.

A continuación se analizó la cinética de proliferación, incubando células K562 sin infectar y células K562-LdnNb con BrdU durante 24 horas. El resultado obtenido fue un incremento bastante significativo de la capacidad proliferativa en aquellas K562 que tenían inhibida la función de Numb (**Figura 50**).

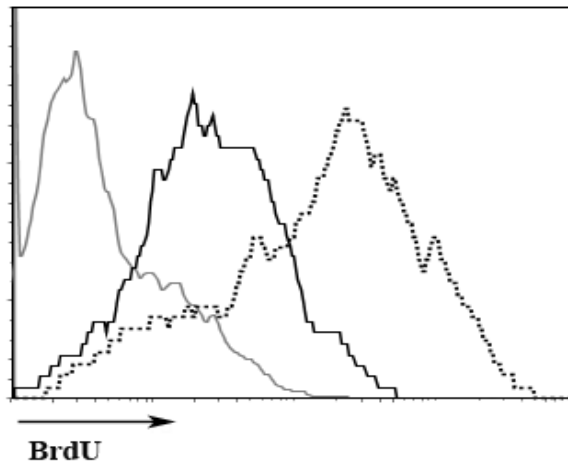


Figura 50. Aumento de la capacidad proliferativa en K562 que expresan el dominante negativo de Numb. Análisis por citometría de la incorporación de BrdU en K562 sin BrdU (línea gris), K562 sin infectar (línea negra continua) y K562 infectadas con L-dnNb (línea negra discontinua). Los datos son representativos de tres experimentos independientes.

Así mismo, se quiso comprobar si la expresión del vector vacío, es decir, el que solo expresa GFP, provocaba alteración en proliferación con respecto a las K562 sin infectar. Como se esperaba, no se observaron cambios a nivel de proliferación entre ambas (**Figura 51**).

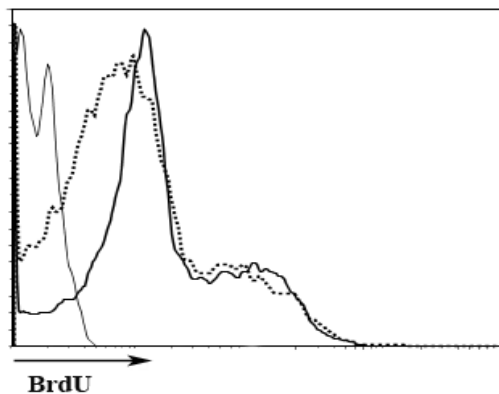


Figura 51. Similar capacidad proliferativa entre K562 que expresan el vector vacío L-SE y K562. Análisis por citometría de la incorporación de BrdU en K562 sin BrdU (línea gris), K562 sin infectar (línea negra continua) y K562 infectadas con L-SE (línea negra discontinua). Los datos son representativos de tres experimentos independientes.

3.3. El aumento proliferativo va acompañado de aumento en la expresión de *Hes-1* y *Myc* a nivel de mRNA.

El siguiente paso fue analizar si esa elevada capacidad de proliferación podía ser explicada por un aumento de la señalización por Notch, implicado en numerosos tipos de cáncer y que queda desregulado por la inhibición de Numb. Para ello se estudió por RT-PCR el principal gen diana de la ruta Notch, *Hes-1*, y también se analizó el protooncogen *c-Myc*, que ha sido descrito recientemente como un gen diana de Notch en leucemias [105, 106], encontrándose ambos incrementados (**Figura 52**).

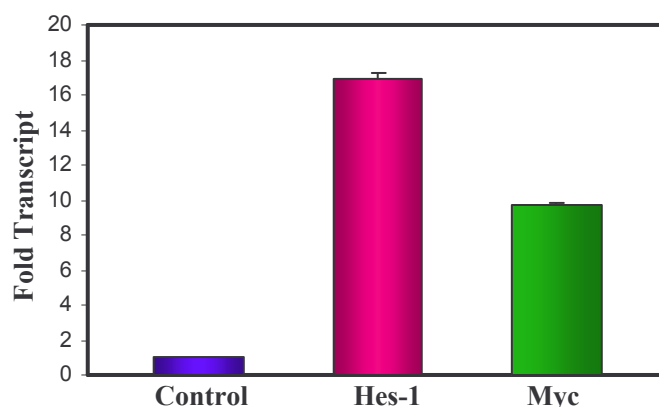


Figura 52. Elevada expresión de la ruta de Notch y *Myc*. Diagrama de barras donde se representan los niveles de expresión del gen *Hes-1* y *Myc* en K562L-dnNb con respecto al control K562 sin infectar. Se representa la media \pm SD de dos experimentos independientes.

Estos datos muestran que, en una línea cancerosa, la inhibición de Numb resulta en un agravamiento del fenotipo maligno, asociado con una elevación de la señalización por Notch y un aumento de expresión de *Myc*. Por tanto, la inhibición funcional de Numb puede resultar bien en un bloqueo proliferativo en condiciones normales de desarrollo, o bien en un agravamiento de la enfermedad en casos de patologías cancerosas.

Es importante tener en cuenta estos efectos opuestos de la misma manipulación funcional de una proteína, especialmente en el contexto de posibles protocolos de terapia génica.

DISCUSSION



El proceso de división asimétrica permite que una célula madre genere una célula hija, que se diferenciará, y otra que mantendrá el fenotipo progenitor y seguirá proliferando para favorecer el desarrollo del órgano en cuestión. Recientemente se ha propuesto la teoría de que este proceso está íntimamente relacionado y controlado por procesos de endocitosis de receptores y/o ubiquitinización de ligandos, pues alteraciones en este mecanismo regulador han desembocado en graves alteraciones de la división asimétrica [107].

En este estudio hemos querido investigar ambos procesos y si la alteración de uno provoca alteración en el otro mediante el estudio de la proteína adaptadora Numb, principal determinante intrínseco del compromiso celular durante la división asimétrica, y además proteína participante en los procesos de endocitosis dependientes de clatrina. El sistema de estudio elegido fue, el desarrollo temprano de timocitos, sistema en el que ambas funciones de Numb no habían sido estudiadas hasta ahora.

Así, en este estudio se ha descrito por primera vez el fenómeno de división asimétrica durante el desarrollo temprano de timocitos, siendo Numb distribuida tanto asimétrica como simétricamente en progenitores en división, manteniéndose, por tanto, un equilibrio entre los compromisos progenitor versus diferenciador, aunque predominando el primero, debido a que durante el desarrollo del timo a nivel fetal, es necesario un mayor pool de progenitores que lleven al desarrollo de un timo completo. Este resultado coincide con lo descrito por otros investigadores durante la neurogénesis cortical en el ratón[65, 90].

También se describe por primera vez cómo el pre-TCR, clave en los procesos de proliferación y diferenciación durante el estadio temprano DN3, es heredado por ambas células hijas y cómo se encuentra polarizado en las etapas tempranas de la mitosis, lo cual se asocia con señalización [108]. Esto lleva a pensar que aunque la señalización por pre-TCR es independiente de ligando, sí es posible que esa señalización sea más

eficiente cuando el pre-TCR se polariza en clusters de membrana asociados a dominios rafts. Además, el hecho de que el pre-TCR no se segregue asimétricamente, a diferencia de Numb, coincide con el mecanismo de actuación de Numb en progenitores neuronales, descrito por otros autores, donde Notch se segrega simétricamente mientras que es la segregación de Numb la que marca el destino de las dos células hijas.

Para comprobar esta teoría se usó como estrategia un dominante negativo que solo contenía el dominio PTB de Numb, el cual inhibiría no sólo a la proteína endógena sino también a todos sus homólogos, evitando así fenómenos de redundancia. Al expresar una truncación de este tipo, cabía la posibilidad de que se inhibieran otras proteínas no relacionadas con Numb, pero que a su vez contuvieran un dominio PTB. Esta posibilidad fue descartada en el laboratorio mediante un experimento consistente en el cruce de ratones que expresaban el dominante negativo con aquellos que sobreexpresaban Numb, y tal como se esperaba se revertía el fenotipo mutante, pudiéndose establecer una correlación de los niveles funcionales de Numb con la celularidad tímica. Otra ventaja adicional de la utilización de un dominante negativo para inhibir a una proteína adaptadora es que no va a permitir que las proteínas que normalmente se unen a Numb lo hagan, bloqueando de este modo los complejos de señalización.

Como consecuencia de la inhibición de Numb, los ratones que expresaban el dominante negativo poseían una reducida celularidad tímica y una serie de graves alteraciones en el estadio de dobles negativas, como fueron: importante bloqueo a nivel de DN3, elevados niveles superficiales de pre-TCR y diferenciación prematura, pudiéndose comprobar que este fenotipo era consecuencia de una elevada señalización por pre-TCR. Esto llevó a pensar que Numb podría participar de forma activa en la endocitosis de este receptor, proceso llevado a cabo por una ubiquitin-ligasa denominada c-Cbl. Además, esta teoría fue apoyada por el hecho de que ratones doble knockout para c-Cbl/b-Cbl presentaban un fenotipo muy similar a nuestros ratones dnNb TG [19, 104].

El proceso de regulación de expresión del pre-TCR es iniciado por él mismo, reclutando a c-Cbl a membrana, momento en el que esta ubiquitin-ligasa inicia la ubiquitinización del receptor y además, por medio de su unión a endofilinas, favorece la invaginación de la membrana, produciéndose la endocitosis dependiente de clatrina del receptor y acompañando ya al endosoma hasta su degradación lisosomal [13].

Cuando se analizó si la función de ubiquitinización y formación del endosoma por parte de c-Cbl estaba afectada en estos ratones dnNb TG, pudimos comprobar un mayor reclutamiento de c-Cbl a membrana, lo cual correlaciona con unos mayores niveles superficiales de pre-TCR. Sorprendentemente, la ubiquitinización del receptor no estaba afectada pero sí la formación de las vesículas endosomales, quedando c-Cbl retenido en membrana e impidiéndose por tanto la degradación del pre-TCR.

Dado que Numb es una proteína adaptadora que participa en la endocitosis de receptores, siendo capaz de unirse a la subunidad α -adaptina del complejo AP2 a través de los motivos situados en su extremo carboxi-terminal, el uso de un dominante negativo puede estar impidiendo que Numb endógeno se una al complejo AP2 y seguramente impidiendo también la unión necesaria de c-Cbl a este complejo para iniciar la invaginación de la membrana y posterior endocitosis, lo cual sería una nueva función desconocida hasta ahora para Numb: Numb es un adaptador clave y necesario para el acceso de c-Cbl a la maquinaria endocítica dependiente de clatrina.

Además, los ratones que expresan el dominante negativo también poseen una alteración de la división asimétrica, elevándose con respecto al WT el porcentaje de telofases simétricas e iniciándose una tendencia a heredar ambas células hijas una cantidad equivalente de niveles de Numb, hecho que alcanza su punto máximo en ratones que sobreexpresan la proteína. El que, en los ratones que expresan el dominante negativo, Numb sea heredada de forma simétrica es irrelevante, pues en ellos la función de Numb endógeno está bloqueada. Por tanto, se puede deducir que no es en sí la cantidad de Numb endógeno que herede cada célula hija lo que marca el que

las dos células hijas adquieran linajes diferentes, sino el hecho de que en una de ellas Numb sea funcional y en la otra no.

Los datos mostrados en esta tesis nos permiten proponer un modelo válido para el papel de Numb en el desarrollo temprano de timocitos (**Figura 53**).

Según este modelo, durante el desarrollo normal, un porcentaje de células van a transmitir Numb a sus dos células hijas, inhibiéndose la señalización por Notch y pre-TCR y llevando a que adquieran un compromiso proliferativo, mientras que otro porcentaje de células no transmite Numb a una de las dos células hijas, la cual recibirá la señal de Notch y pre-TCR para diferenciarse. En el caso de un exceso de expresión de Numb funcional (ratones Numb TG), prácticamente todas las células van a transmitir Numb a sus dos células hijas, induciendo a éstas a proliferar. Cuando Numb es inhibida por un dominante negativo (en este caso Numb endógena sigue expresándose pero no es funcional), ambas células hijas carecerán de Numb funcional y se favorecerá la diferenciación, ya que al dejar de ser degradada tanto ella como el pre-TCR, se ocasionaría un aumento de la señalización por pre-TCR.

Así, este estudio demuestra un papel dual de Numb en el desarrollo de timocitos como inhibidor de Notch y pre-TCR en el estadio doble negativo, lo cual permite una correcta regulación de los niveles de Notch y pre-TCR. Además, se aportan datos que apoyan la teoría, surgida recientemente, de que la división asimétrica está regulada por procesos de endocitosis, dependiendo de ellos el compromiso celular a adquirir por las células hijas.

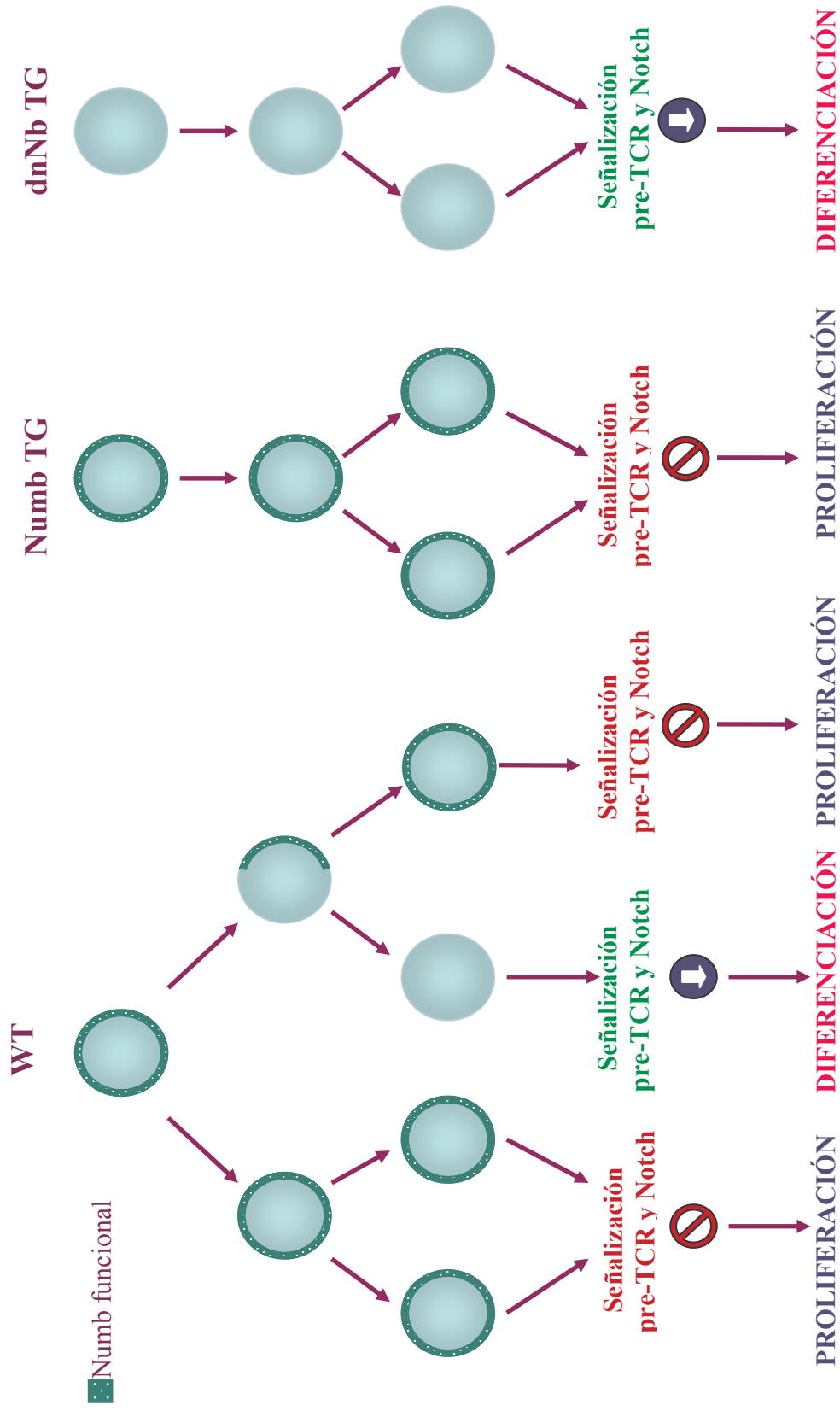


Figura 53. Modelo del papel de Numb durante el desarrollo de timocitos.

Por otro lado, en esta tesis se han aportado datos que son coincidentes con varios estudios, sobre la relación entre Numb y la progresión tumoral.

Así, hemos podido comprobar como la inhibición de Numb, utilizando un dominante negativo, es capaz de incrementar la capacidad proliferativa de una línea cancerosa y, además, ese incremento es concomitante con un aumento en la señalización por Notch, una de las principales proteínas implicadas en cáncer.

Por tanto, estos resultados, además de representar la primera evidencia experimental directa de que la ausencia de Numb desemboca en proliferación, vienen a confirmar el recientemente descrito nuevo papel de esta proteína como supresora de tumores, siendo necesarias más investigaciones que lleven en un futuro a diseñar nuevas estrategias contra determinados tipos de tumores en los que parece que Numb juega un papel importante, como es el caso de los tumores mamarios humanos.

Con los estudios llevados a cabo en esta tesis se han aportado nuevos datos sobre la proteína Numb, los cuales han permitido proponer un nuevo modelo de su papel como determinante del compromiso celular en el timo como inhibidor de Notch y mediante su participación en endocitosis y, además, ha permitido demostrar experimentalmente su función oncosupresora. Esto abre el camino hacia nuevas líneas de investigación, las cuales deberán estar enfocadas en profundizar y concretar los mecanismos moleculares por los que Numb lleva a cabo sus funciones como regulador del desarrollo e inhibidor de la progresión tumoral.

CONCLUSIONES



1. Durante el desarrollo normal del timo se produce división asimétrica, siendo Numb distribuida tanto asimétrica como simétricamente para mantener un equilibrio entre proliferación y diferenciación, procesos ambos necesarios para la organogénesis.

2. Se ha diseñado un método potente de inhibición de Numb y sus homólogos consistente en un dominante negativo que contiene únicamente su región de unión a fosfotirosina.

3. Alteraciones funcionales de Numb son responsables de que las células hijas obtenidas en el mecanismo de división asimétrica vean afectado su compromiso celular.

4. Numb es indispensable para una correcta modulación del pre-TCR durante el desarrollo temprano de timocitos, revelándose una nueva función de esta proteína como adaptador clave durante la degradación y endocitosis del pre-TCR por la proteína c-Cbl.

5. Numb se ha revelado como una nueva proteína supresora de tumores debido a su función como modulador negativo del oncogen Notch.

BIBLIOGRAFIA



1. van Ewijk, W., et al., *Thymic microenvironments, 3-D versus 2-D?* Semin Immunol, 1999. **11**(1): p. 57-64.
2. Aw, D., et al., *Phenotypical and morphological changes in the thymic microenvironment from ageing mice.* Biogerontology, 2008.
3. Mohtashami, M. and J.C. Zuniga-Pflucker, *Three-dimensional architecture of the thymus is required to maintain delta-like expression necessary for inducing T cell development.* J Immunol, 2006. **176**(2): p. 730-4.
4. Boyd, R.L., et al., *The thymic microenvironment.* Immunol Today, 1993. **14**(9): p. 445-59.
5. Anderson, G. and E.J. Jenkinson, *Lymphostromal interactions in thymic development and function.* Nat Rev Immunol, 2001. **1**(1): p. 31-40.
6. Lind, E.F., et al., *Mapping precursor movement through the postnatal thymus reveals specific microenvironments supporting defined stages of early lymphoid development.* J Exp Med, 2001. **194**(2): p. 127-34.
7. Zuniga-Pflucker, J.C. and M.J. Lenardo, *Regulation of thymocyte development from immature progenitors.* Curr Opin Immunol, 1996. **8**(2): p. 215-24.
8. Wu, L., *T lineage progenitors: the earliest steps en route to T lymphocytes.* Curr Opin Immunol, 2006. **18**(2): p. 121-6.
9. Xiao, S.Y., Y. Li, and W.F. Chen, *Kinetics of thymocyte developmental process in fetal and neonatal mice.* Cell Res, 2003. **13**(4): p. 265-73.
10. Jotereau, F., et al., *Cell kinetics in the fetal mouse thymus: precursor cell input, proliferation, and emigration.* J Immunol, 1987. **138**(4): p. 1026-30.
11. Ceredig, R., H.R. MacDonald, and E.J. Jenkinson, *Flow microfluorometric analysis of mouse thymus development in vivo and in vitro.* Eur J Immunol, 1983. **13**(3): p. 185-90.
12. Porritt, H.E., et al., *Heterogeneity among DNI prothymocytes reveals multiple progenitors with different capacities to generate T cell and non-T cell lineages.* Immunity, 2004. **20**(6): p. 735-45.
13. Panigada, M., et al., *Constitutive endocytosis and degradation of the pre-T cell receptor.* J Exp Med, 2002. **195**(12): p. 1585-97.
14. Carrasco, Y.R., M.N. Navarro, and M.L. Toribio, *A role for the cytoplasmic tail of the pre-T cell receptor (TCR) alpha chain in promoting constitutive internalization and degradation of the pre-TCR.* J Biol Chem, 2003. **278**(16): p. 14507-13.

15. Lacorazza, H.D., H.E. Porritt, and J. Nikolich-Zugich, *Dysregulated expression of pre-Talpha reveals the opposite effects of pre-TCR at successive stages of T cell development.* J Immunol, 2001. **167**(10): p. 5689-96.
16. Yamasaki, S., et al., *Mechanistic basis of pre-T cell receptor-mediated autonomous signaling critical for thymocyte development.* Nat Immunol, 2006. **7**(1): p. 67-75.
17. Borowski, C., et al., *Pre-TCRalpha and TCRalpha are not interchangeable partners of TCRbeta during T lymphocyte development.* J Exp Med, 2004. **199**(5): p. 607-15.
18. Aifantis, I., et al., *A critical role for the cytoplasmic tail of pTalpha in T lymphocyte development.* Nat Immunol, 2002. **3**(5): p. 483-8.
19. Huang, F., et al., *Establishment of the major compatibility complex-dependent development of CD4+ and CD8+ T cells by the Cbl family proteins.* Immunity, 2006. **25**(4): p. 571-81.
20. Hoyne, G.F., *Notch signaling in the immune system.* J Leukoc Biol, 2003. **74**(6): p. 971-81.
21. Felli, M.P., et al., *Expression pattern of notch1, 2 and 3 and Jagged1 and 2 in lymphoid and stromal thymus components: distinct ligand-receptor interactions in intrathymic T cell development.* Int Immunol, 1999. **11**(7): p. 1017-25.
22. Singh, N., et al., *Expression of notch receptors, notch ligands, and fringe genes in hematopoiesis.* Exp Hematol, 2000. **28**(5): p. 527-34.
23. Pui, J.C., et al., *Notch1 expression in early lymphopoiesis influences B versus T lineage determination.* Immunity, 1999. **11**(3): p. 299-308.
24. Wilson, A., H.R. MacDonald, and F. Radtke, *Notch 1-deficient common lymphoid precursors adopt a B cell fate in the thymus.* J Exp Med, 2001. **194**(7): p. 1003-12.
25. Huang, E.Y., et al., *Surface expression of Notch1 on thymocytes: correlation with the double-negative to double-positive transition.* J Immunol, 2003. **171**(5): p. 2296-304.
26. Washburn, T., et al., *Notch activity influences the alphabeta versus gammadelta T cell lineage decision.* Cell, 1997. **88**(6): p. 833-43.
27. Robey, E., et al., *An activated form of Notch influences the choice between CD4 and CD8 T cell lineages.* Cell, 1996. **87**(3): p. 483-92.
28. Izon, D.J., et al., *Notch1 regulates maturation of CD4+ and CD8+ thymocytes by modulating TCR signal strength.* Immunity, 2001. **14**(3): p. 253-64.

29. Minter, L.M., et al., *Inhibitors of gamma-secretase block in vivo and in vitro T helper type 1 polarization by preventing Notch upregulation of Tbx21*. *Nat Immunol*, 2005. **6**(7): p. 680-8.
30. Wolfer, A., et al., *Inactivation of Notch1 impairs VDJbeta rearrangement and allows pre-TCR-independent survival of early alpha beta Lineage Thymocytes*. *Immunity*, 2002. **16**(6): p. 869-79.
31. Reizis, B. and P. Leder, *Direct induction of T lymphocyte-specific gene expression by the mammalian Notch signaling pathway*. *Genes Dev*, 2002. **16**(3): p. 295-300.
32. Ciofani, M., et al., *Obligatory role for cooperative signaling by pre-TCR and Notch during thymocyte differentiation*. *J Immunol*, 2004. **172**(9): p. 5230-9.
33. Maillard, I., et al., *The requirement for Notch signaling at the beta-selection checkpoint in vivo is absolute and independent of the pre-T cell receptor*. *J Exp Med*, 2006. **203**(10): p. 2239-45.
34. Weng, A.P., et al., *Activating mutations of NOTCH1 in human T cell acute lymphoblastic leukemia*. *Science*, 2004. **306**(5694): p. 269-71.
35. Ellisen, L.W., et al., *TAN-1, the human homolog of the Drosophila notch gene, is broken by chromosomal translocations in T lymphoblastic neoplasms*. *Cell*, 1991. **66**(4): p. 649-61.
36. Bleul, C.C. and T. Boehm, *Chemokines define distinct microenvironments in the developing thymus*. *Eur J Immunol*, 2000. **30**(12): p. 3371-9.
37. Takahama, Y., *Journey through the thymus: stromal guides for T-cell development and selection*. *Nat Rev Immunol*, 2006. **6**(2): p. 127-35.
38. Plotkin, J., et al., *Critical role for CXCR4 signaling in progenitor localization and T cell differentiation in the postnatal thymus*. *J Immunol*, 2003. **171**(9): p. 4521-7.
39. Misslitz, A., et al., *Thymic T cell development and progenitor localization depend on CCR7*. *J Exp Med*, 2004. **200**(4): p. 481-91.
40. Murray, R., et al., *IL-7 is a growth and maintenance factor for mature and immature thymocyte subsets*. *Int Immunol*, 1989. **1**(5): p. 526-31.
41. Peschon, J.J., et al., *Early lymphocyte expansion is severely impaired in interleukin 7 receptor-deficient mice*. *J Exp Med*, 1994. **180**(5): p. 1955-60.
42. von Freuden-Jeffry, U., et al., *The earliest T lineage-committed cells depend on IL-7 for Bcl-2 expression and normal cell cycle progression*. *Immunity*, 1997. **7**(1): p. 147-54.

43. Van De Wiele, C.J., et al., *Thymocytes between the beta-selection and positive selection checkpoints are nonresponsive to IL-7 as assessed by STAT-5 phosphorylation*. J Immunol, 2004. **172**(7): p. 4235-44.
44. Balciunaite, G., et al., *The role of Notch and IL-7 signaling in early thymocyte proliferation and differentiation*. Eur J Immunol, 2005. **35**(4): p. 1292-300.
45. Verdi, J.M., et al., *Mammalian NUMB is an evolutionarily conserved signaling adapter protein that specifies cell fate*. Curr Biol, 1996. **6**(9): p. 1134-45.
46. Uhlik, M.T., et al., *Structural and evolutionary division of phosphotyrosine binding (PTB) domains*. J Mol Biol, 2005. **345**(1): p. 1-20.
47. Chien, C.T., et al., *Numb-associated kinase interacts with the phosphotyrosine binding domain of Numb and antagonizes the function of Numb in vivo*. Mol Cell Biol, 1998. **18**(1): p. 598-607.
48. Lu, B., et al., *Partner of Numb colocalizes with Numb during mitosis and directs Numb asymmetric localization in Drosophila neural and muscle progenitors*. Cell, 1998. **95**(2): p. 225-35.
49. McGill, M.A. and C.J. McGlade, *Mammalian numb proteins promote Notch1 receptor ubiquitination and degradation of the Notch1 intracellular domain*. J Biol Chem, 2003. **278**(25): p. 23196-203.
50. Dho, S.E., et al., *The mammalian numb phosphotyrosine-binding domain. Characterization of binding specificity and identification of a novel PDZ domain-containing numb binding protein, LNX*. J Biol Chem, 1998. **273**(15): p. 9179-87.
51. Traub, L.M., *Sorting it out: AP-2 and alternate clathrin adaptors in endocytic cargo selection*. J Cell Biol, 2003. **163**(2): p. 203-8.
52. Dho, S.E., et al., *Dynamic regulation of mammalian numb by G protein-coupled receptors and protein kinase C activation: Structural determinants of numb association with the cortical membrane*. Mol Biol Cell, 2006. **17**(9): p. 4142-55.
53. Santolini, E., et al., *Numb is an endocytic protein*. J Cell Biol, 2000. **151**(6): p. 1345-52.
54. Salcini, A.E., et al., *Binding specificity and in vivo targets of the EH domain, a novel protein-protein interaction module*. Genes Dev, 1997. **11**(17): p. 2239-49.
55. Dho, S.E., et al., *Characterization of four mammalian numb protein isoforms. Identification of cytoplasmic and membrane-associated variants of the phosphotyrosine binding domain*. J Biol Chem, 1999. **274**(46): p. 33097-104.
56. Verdi, J.M., et al., *Distinct human NUMB isoforms regulate differentiation vs. proliferation in the neuronal lineage*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(18): p. 10472-6.

57. Horvitz, H.R. and I. Herskowitz, *Mechanisms of asymmetric cell division: two Bs or not two Bs, that is the question*. Cell, 1992. **68**(2): p. 237-55.
58. Uemura, T., et al., *numb, a gene required in determination of cell fate during sensory organ formation in Drosophila embryos*. Cell, 1989. **58**(2): p. 349-60.
59. Rhyu, M.S., L.Y. Jan, and Y.N. Jan, *Asymmetric distribution of numb protein during division of the sensory organ precursor cell confers distinct fates to daughter cells*. Cell, 1994. **76**(3): p. 477-91.
60. Spana, E.P., et al., *Asymmetric localization of numb autonomously determines sibling neuron identity in the Drosophila CNS*. Development, 1995. **121**(11): p. 3489-94.
61. Carmena, A., et al., *Inscuteable and numb mediate asymmetric muscle progenitor cell divisions during Drosophila myogenesis*. Genes Dev, 1998. **12**(3): p. 304-15.
62. Ruiz Gomez, M. and M. Bate, *Segregation of myogenic lineages in Drosophila requires numb*. Development, 1997. **124**(23): p. 4857-66.
63. Park, M., L.E. Yaich, and R. Bodmer, *Mesodermal cell fate decisions in Drosophila are under the control of the lineage genes numb, Notch, and sanpodo*. Mech Dev, 1998. **75**(1-2): p. 117-26.
64. Knoblich, J.A., L.Y. Jan, and Y.N. Jan, *Asymmetric segregation of Numb and Prospero during cell division*. Nature, 1995. **377**(6550): p. 624-7.
65. Zhong, W., et al., *Asymmetric localization of a mammalian numb homolog during mouse cortical neurogenesis*. Neuron, 1996. **17**(1): p. 43-53.
66. Zhong, W., et al., *Mouse numb is an essential gene involved in cortical neurogenesis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(12): p. 6844-9.
67. Petersen, P.H., et al., *Progenitor cell maintenance requires numb and numbl like during mouse neurogenesis*. Nature, 2002. **419**(6910): p. 929-34.
68. Spana, E.P. and C.Q. Doe, *Numb antagonizes Notch signaling to specify sibling neuron cell fates*. Neuron, 1996. **17**(1): p. 21-6.
69. Guo, M., L.Y. Jan, and Y.N. Jan, *Control of daughter cell fates during asymmetric division: interaction of Numb and Notch*. Neuron, 1996. **17**(1): p. 27-41.
70. Suzuki, A. and S. Ohno, *The PAR-aPKC system: lessons in polarity*. J Cell Sci, 2006. **119**(Pt 6): p. 979-87.
71. Betschinger, J. and J.A. Knoblich, *Dare to be different: asymmetric cell division in Drosophila, C. elegans and vertebrates*. Curr Biol, 2004. **14**(16): p. R674-85.

72. Lechler, T. and E. Fuchs, *Asymmetric cell divisions promote stratification and differentiation of mammalian skin*. Nature, 2005. **437**(7056): p. 275-80.
73. Smith, C.A., et al., *aPKC-mediated phosphorylation regulates asymmetric membrane localization of the cell fate determinant Numb*. Embo J, 2007. **26**(2): p. 468-80.
74. Zhou, Y., et al., *The mammalian Golgi regulates numb signaling in asymmetric cell division by releasing ACBD3 during mitosis*. Cell, 2007. **129**(1): p. 163-78.
75. Artavanis-Tsakonas, S., M.D. Rand, and R.J. Lake, *Notch signaling: cell fate control and signal integration in development*. Science, 1999. **284**(5415): p. 770-6.
76. Berdnik, D., et al., *The endocytic protein alpha-Adaptin is required for numb-mediated asymmetric cell division in Drosophila*. Dev Cell, 2002. **3**(2): p. 221-31.
77. Tokumitsu, H., et al., *Phosphorylation of Numb regulates its interaction with the clathrin-associated adaptor AP-2*. FEBS Lett, 2006. **580**(24): p. 5797-801.
78. Tang, H., et al., *Numb proteins specify asymmetric cell fates via an endocytosis- and proteasome-independent pathway*. Mol Cell Biol, 2005. **25**(8): p. 2899-909.
79. Pece, S., et al., *Loss of negative regulation by Numb over Notch is relevant to human breast carcinogenesis*. J Cell Biol, 2004. **167**(2): p. 215-21.
80. Stylianou, S., R.B. Clarke, and K. Brennan, *Aberrant activation of notch signaling in human breast cancer*. Cancer Res, 2006. **66**(3): p. 1517-25.
81. Juven-Gershon, T., et al., *The Mdm2 oncoprotein interacts with the cell fate regulator Numb*. Mol Cell Biol, 1998. **18**(7): p. 3974-82.
82. Colaluca, I.N., et al., *NUMB controls p53 tumour suppressor activity*. Nature, 2008. **451**(7174): p. 76-80.
83. Caussinus, E. and C. Gonzalez, *Induction of tumor growth by altered stem-cell asymmetric division in Drosophila melanogaster*. Nat Genet, 2005. **37**(10): p. 1125-9.
84. Petersen, P.H., et al., *Continuing role for mouse Numb and Numbl in maintaining progenitor cells during cortical neurogenesis*. Nat Neurosci, 2004. **7**(8): p. 803-11.
85. Allenspach, E.J., et al., *Notch signaling in cancer*. Cancer Biol Ther, 2002. **1**(5): p. 466-76.
86. French, M.B., et al., *Transgenic expression of numb inhibits notch signaling in immature thymocytes but does not alter T cell fate specification*. J Immunol, 2002. **168**(7): p. 3173-80.

87. Anderson, A.C., et al., *The Notch regulator Numb links the Notch and TCR signaling pathways*. J Immunol, 2005. **174**(2): p. 890-7.
88. Wilson, A., et al., *Normal hemopoiesis and lymphopoiesis in the combined absence of numb and numblake*. J Immunol, 2007. **178**(11): p. 6746-51.
89. Chang, J.T., et al., *Asymmetric T lymphocyte division in the initiation of adaptive immune responses*. Science, 2007. **315**(5819): p. 1687-91.
90. Shen, Q., et al., *Asymmetric Numb distribution is critical for asymmetric cell division of mouse cerebral cortical stem cells and neuroblasts*. Development, 2002. **129**(20): p. 4843-53.
91. Shinkai, Y., et al., *RAG-2-deficient mice lack mature lymphocytes owing to inability to initiate V(D)J rearrangement*. Cell, 1992. **68**(5): p. 855-67.
92. Zhumabekov, T., et al., *Improved version of a human CD2 minigene based vector for T cell-specific expression in transgenic mice*. J Immunol Methods, 1995. **185**(1): p. 133-40.
93. Perlmutter, R.M. and J. Alberola-Ila, *The use of dominant-negative mutations to elucidate signal transduction pathways in lymphocytes*. Curr Opin Immunol, 1996. **8**(2): p. 285-90.
94. Cantrell, D.A., *Transgenic analysis of thymocyte signal transduction*. Nat Rev Immunol, 2002. **2**(1): p. 20-7.
95. Schmitt, T.M. and J.C. Zuniga-Pflucker, *Induction of T cell development from hematopoietic progenitor cells by delta-like-1 in vitro*. Immunity, 2002. **17**(6): p. 749-56.
96. de Pooter, R. and J.C. Zuniga-Pflucker, *T-cell potential and development in vitro: the OP9-DL1 approach*. Curr Opin Immunol, 2007. **19**(2): p. 163-8.
97. Azzam, H.S., et al., *CD5 expression is developmentally regulated by T cell receptor (TCR) signals and TCR avidity*. J Exp Med, 1998. **188**(12): p. 2301-11.
98. Dose, M., et al., *c-Myc mediates pre-TCR-induced proliferation but not developmental progression*. Blood, 2006. **108**(8): p. 2669-77.
99. Wang, H.Y., et al., *Cbl promotes ubiquitination of the T cell receptor zeta through an adaptor function of Zap-70*. J Biol Chem, 2001. **276**(28): p. 26004-11.
100. Naramura, M., et al., *c-Cbl and Cbl-b regulate T cell responsiveness by promoting ligand-induced TCR down-modulation*. Nat Immunol, 2002. **3**(12): p. 1192-9.
101. Thien, C.B., et al., *Loss of c-Cbl RING finger function results in high-intensity TCR signaling and thymic deletion*. Embo J, 2005. **24**(21): p. 3807-19.

102. Soubeyran, P., et al., *Cbl-CIN85-endophilin complex mediates ligand-induced downregulation of EGF receptors*. Nature, 2002. **416**(6877): p. 183-7.
103. Petrelli, A., et al., *The endophilin-CIN85-Cbl complex mediates ligand-dependent downregulation of c-Met*. Nature, 2002. **416**(6877): p. 187-90.
104. Niederberger, N., et al., *Allelic exclusion of the TCR alpha-chain is an active process requiring TCR-mediated signaling and c-Cbl*. J Immunol, 2003. **170**(9): p. 4557-63.
105. Sharma, V.M., et al., *Notch1 contributes to mouse T-cell leukemia by directly inducing the expression of c-myc*. Mol Cell Biol, 2006. **26**(21): p. 8022-31.
106. Weng, A.P., et al., *c-Myc is an important direct target of Notch1 in T-cell acute lymphoblastic leukemia/lymphoma*. Genes Dev, 2006. **20**(15): p. 2096-109.
107. Coumailleau, F. and M. Gonzalez-Gaitan, *From endocytosis to tumors through asymmetric cell division of stem cells*. Curr Opin Cell Biol, 2008. **20**(4): p. 462-9.
108. Navarro, M.N., et al., *Identification of CMS as a cytosolic adaptor of the human pTalpha chain involved in pre-TCR function*. Blood, 2007. **110**(13): p. 4331-40.

PUBLICACIONES



TITLE

Numb plays a crucial role during thymocyte development

AUTHORS: Aguado R. ^{*}, Martin-Blanco N. ^{*}, Canelles M. ^{*,†}

AFFILIATIONS

* Instituto de Parasitología y Biomedicina, CSIC, P. T. Ciencias de la Salud, 18100

Granada, Spain.

CONTACT INFORMATION

† To whom correspondence should be addressed:

Matilde Canelles

mcanelles@ipb.csic.es

Tel: 34-958-181660

Fax: 34-958-181632

ABSTRACT

Despite being widely involved in precursor asymmetric division and receptor internalization, the role of Numb in thymocytes has remained elusive. Here we have shown that Numb is crucial to balance proliferation and differentiation in developing thymocytes. We have visualized double negative thymocytes asymmetrically segregating Numb, but not the pre-TCR, during cell division. Data from transgenic mice expressing different levels of Numb showed that adult thymic size correlates with functional Numb levels: transgenic expression of dominant negative Numb caused enhanced Notch signaling, apoptosis, excessive pre-TCR signaling and premature differentiation, while constitutive Numb expression led to loss of asymmetric division and increased thymic size. Therefore, Numb controls both asymmetric division and pre-TCR degradation, ultimately determining the size and quality of the pool from which DP thymocytes are selected.

INTRODUCTION

The mammalian thymus contains several cell types that originate from precursors that initially are equivalent. These precursors undergo several rounds of division before differentiating. It is unknown whether they divide asymmetrically, but it is likely, given the growing evidence of asymmetric division in many developing organs ^{1, 2}. Asymmetric cell division is any division that generates two sister cells with different fates. Normally, this is achieved by generating cells with different levels of Notch signaling, as a consequence of unequal segregation of the so called “cell fate determinants”. The most known of them, Numb, is a plasma membrane-associated protein that contains a phosphotyrosine binding domain and antagonizes Notch signaling. Numb function was first described in *Drosophila* sensory organ precursor cells ³, where loss of Numb resulted in both daughter cells adopting the fate of the cell that normally inherits Notch, and Numb overexpression gave the opposite result ⁴⁻⁶. In mammals, asymmetric division and Numb have been studied most extensively during neurogenesis ⁷. Numb and its homologue, Numbl, have redundant functions and both can inhibit Notch. Deletion of both Numb and Numbl resulted in loss of neural progenitors and block of neurogenesis in mouse embryos ⁸. This was a result of progenitor over-differentiation, together with death of young neurons. An additional function for Numb in brain development, as adherence regulator, has been postulated ⁹. Besides these functions, in other systems Numb does also bind to integrins ¹⁰ and Src family kinases ¹¹, mediates receptor internalization ^{12, 13} and participates in clathrin dependent endosomal association ¹⁴. Thus, so far it is known that Numb plays multiple and important roles in development and signaling, however new approaches will be needed to dissect the pathways involved in all these functions. In this aspect, immune system development provides a superb model since one can physically separate

developing cell subsets (by flow cytometry), and visualize their interactions inside the tissue (by microscopy).

T lymphocytes develop in the thymus from precursors that undergo a series of cell fate decisions resulting in differentiation into single positive (SP) thymocytes, the immediate precursors of fully functional CD4 and CD8 T lymphocytes^{15, 16}. The initial CD4/CD8 double negative (DN) stages of this differentiation are influenced by signals from the pre-TCR¹⁷⁻¹⁹. Only those DN thymocytes which receive proper pre-TCR signals during the double negative 3 (DN3) and double negative 4 (DN4) stages are able to evolve into the intermediate CD4/CD8 double positive (DP) $\alpha\beta$ lineage stage; since pre-TCR signaling is autonomous, its internalization and degradation is very important for correct signaling²⁰⁻²². As a consequence of pre-TCR signaling, DN thymocytes undergo several rounds of proliferation, which guarantees the presence of normal numbers of DP thymocytes in the adult thymus^{23, 24}.

It is known that Numb and its homologue Numbl like are expressed in hemopoietic stem cells²⁵ and lymphoid tissues^{11, 26, 27}, also Numb co-localizes with the TCR complex in mature T cells²⁸ and segregates asymmetrically in hemopoietic stem cells²⁹ and mature T lymphocytes³⁰. Moreover, Numb over-expression in thymocytes results in reduction of Notch activity²⁷. All these data strongly suggest that Numb may play a role during the DN stage of thymocyte development, however attempts to study thymic development in mice by conditionally deleting both Numb and Numbl like showed a very mild developmental block²⁵. There are many cases where knockout mice have not been able to provide functional information about important proteins, usually because other proteins in the same complexes are able to compensate their function, or because even traces of the studied protein are able to ensure normal functionality. In these cases other approaches, involving the introduction of mutations in proteins of interest, are used to complement the information obtained from knockout mice³¹.

Here we have shown that double negative thymocytes segregate Numb, but not the pre-TCR, asymmetrically during developmental cell division. In order to analyze the precise role of Numb during asymmetric division in thymocytes, we have studied thymic development in transgenic mice expressing dominant negative Numb in lymphoid precursors. Numb inhibition by this method resulted in a smaller adult thymus, associated with a developmental block at the DN stage, enhanced Notch and pre-TCR signaling and abnormal pre-TCR localization. The observed block was reverted by transgenic Numb over-expression. These results delineate a model in which the two daughter cells of dividing double negative thymocytes decide to proliferate or to differentiate into double positive thymocytes, depending on their levels of Numb expression.

RESULTS

Double negative thymocytes segregate Numb, but not the pre-TCR, asymmetrically during cell division

Based on the accumulating evidence from other systems, it was highly likely that thymocytes undergo asymmetric division, however this cannot be studied in adult thymus, where a very small percentage of the cells is dividing. Therefore, we focused on fetal day-15 thymus, where most thymocytes are at the DN stage, as evidenced by flow cytometry (most cells at this stage do not express CD4 or CD8, Fig. 1A) and immunofluorescence (high frequency of CD25⁺ cells, Fig. 1B). The use of CD25 as a cell marker was justified by two facts: first, it is only expressed on thymocytes at the DN2/DN3 stages of development; second, it is an excellent membrane marker to guarantee that the detected Numb protein is localized inside the studied cells, since it is not polarized or asymmetrically segregated (our own unpublished observations). We analyzed frozen sections of day 15 fetal thymus by immunofluorescence, using TOPRO (to detect DNA), and antibodies against CD25 and Numb. Using CD25 and TOPRO staining, we were able to localize high numbers of CD25⁺ dividing cells in all the stages of mitosis (Fig. 1C). These cells must be at the DN3 stage, since DN2 thymocytes do not divide, and DN4 thymocytes do not express CD25. We observed Numb polarization in 43% of CD25⁺ pre-mitotic cells, while the rest of the non-proliferating cells showed Numb uniformly distributed both on the membrane and in the cytoplasm (data not shown). A more complex situation was found when analyzing dividing DN3 thymocytes. In these, there was differential Numb distribution depending on the stage of mitosis. Numb was polarized in most cells at the prophase and metaphase stages of mitosis (Fig. 1C, higher panels). At the anaphase stage Numb did not look polarized: it was widely distributed both on the membrane (including the nascent membrane) and

cytoplasm (Fig. 1C, middle panel). At the telophase stage, we found that Numb was inherited exclusively by one of the daughter cells in 30% of the cases, while it was equally segregated into both daughter cells in the rest of the cases (Fig. 1C, lower panels). It seemed unlikely that, in 30% of fetal thymocytes, Numb would first polarize (prophase and metaphase), then distribute homogeneously (anaphase) and later polarize again to be inherited by just one daughter cell. We hypothesized that, although visually Numb seemed homogeneously distributed in all DN3 thymocytes at the anaphase stage, there could exist some degree of asymmetry that would not be detected by simple visual examination. To study this possibility, we quantified Numb positive pixels in the two daughter cells on Z-stacks of dividing fetal thymocytes at the anaphase stage. We used CD25 staining to mark the nascent and cytoplasmic membranes and to separate the two daughter cells on each separate picture of the Z-stacks, then quantified Numb signal in each daughter cell, designating for each Z-stack “dividing cell #1” (DC#1) the daughter cell that contained more Numb, and “dividing cell #2” (DC#2) the daughter cell that contained less Numb. If Numb were always distributed homogeneously on the two daughter cells at anaphase, the values for Numb intensity on DC#1 and DC#2 would always be similar. However, this was not the case, as shown by graphically representing percentages of Numb on dividing anaphase cells (Fig. 1D). Although some pairs of cells had equal Numb inheritance percentages at the anaphase stage, there was a significant difference in 3 of the 10 analyzed Z stacks (Table 1, see column marked DC#1/DC#2). Most probably, these pairs corresponded to dividing cells that were going to segregate Numb asymmetrically at the telophase stage. Therefore, as expected, the percentage of cells that presented asymmetric Numb segregation was similar at the anaphase and telophase stages but, logically, the difference in Numb expression between the daughter cells is greater at later stages of mitosis. Therefore, the progression of Numb localization during mitosis would be as follows: polarized at prophase and metaphase; symmetrical

(70% of the cases) or partially asymmetrical (30% of the cases) at telophase; symmetrical (70% of the cases) or asymmetrical (30% of the cases) at anaphase. Taking into account that Numb is a marker of asymmetric division, these data show that a subset of developing thymocytes divides asymmetrically.

Since DN dividing thymocytes express and receive signals through the pre-TCR, and Numb is co-localized with the TCR machinery in mature lymphocytes^{28 30}, we hypothesized that asymmetric Numb segregation might be related in some way to pre-TCR signaling in daughter cells. Therefore, we analyzed by confocal microscopy pre-TCR segregation in dividing fetal thymocytes, and we did not find asymmetric pre-TCR segregation: all the telophases showed uniform membrane (including the nascent membrane) and cytoplasmic pre-TCR localization (Fig. 2A). In order to exclude the possibility that the observed pre-TCR staining on sections might be unspecific we stained fetal thymic sections using an isotype control and observed no unspecific staining caused by the secondary antibody (data not shown). There was still the possibility that the primary anti-preT α antibody could be binding unspecifically to other proteins inside thymocytes. To exclude this possibility we stained adult thymic sections using anti-preT α together with CD4 (a marker of DP and SP thymocytes) and cytokeratin (mostly expressed on thymic medullary stromal cells, see³²). If the anti-preT α antibody is specific, there should be no staining on thymocytes located either in the adult cortex (DPs) or medulla (SPs). Indeed, we could not detect any pre-TCR staining on CD4+ thymocytes (Fig. S1A and B). We could detect some degree of staining in the medulla, but it always correlated with cytokeratin, and was not inside the thymocytes (Fig. S1A and B). Since d15 fetal thymus has no medulla, cytokeratin expressing cells are virtually absent in this tissue (our own observations), therefore the observed staining on fetal thymic sections corresponded to the pre-TCR. Together, these data indicate that Numb might play a role in asymmetric division of pre-TCR expressing

thymocytes, in a way similar to Notch-expressing precursors in *Drosophila*, where both cells inherit Notch, but only one inherits its inhibitor Numb². If, similar to its effect on Notch, Numb is able to inhibit pre-TCR signaling, then, in those cases where Numb is asymmetrically segregated, only one of the daughter cells would receive pre-TCR signals.

Thus, Numb and the pre-TCR are not always equally segregated between dividing cells. This leads to a related question: is the pre-TCR polarized during the prophase, similar to Numb? In order to answer this question, we analyzed dividing fetal thymocytes at the prophase stage, and could observe that the pre-TCR is always polarized at the prophase and metaphase stages, similar to Numb (Fig. 2B). This indicates that Numb polarization during the prophase in thymocytes is related to signaling, not to asymmetric division. The next related question was whether thymocytes that do not receive any kind of pre-TCR signals would polarize Numb during the prophase. To address this question, we analyzed Numb localization in dividing *Rag*^{-/-} thymocytes and, accordingly with our hypothesis that Numb localization in dividing thymocytes is related to pre-TCR signaling, we found that Numb is neither polarized or asymmetrically segregated in dividing *Rag*^{-/-} thymocytes (Fig. 2C). Together, these data indicate that Numb may be needed for pre-TCR signaling (or for modulation of surface pre-TCR levels, which would result in modulation of pre-TCR signaling) at the DN stage, together with its role in asymmetric division.

Functional Numb levels in thymocytes influence adult thymic size.

The results described above are compatible with an important role for Numb during thymocyte development. In order to investigate the possible dual Numb role in thymocytes we used mice where functional Numb levels had been modified in thymic precursors. These were transgenic mice expressing a dominant negative Numb (dnNb

TG mice) or full length Numb (Numb TG mice) under the human CD2 promoter. DnNb TG mice express a truncated Numb protein that contains just its PTB domain, while Numb TG mice over-express the p71 Numb isoform. A truncated protein similar to dnNb had shown before a dominant negative effect ¹¹. Also, we crossed dnNb TG mice with Numb TG mice, to obtain mice that express at the same time both the dominant negative and the full length Numb protein (dnNb x Numb TG mice). We expected that, if dnNb really acted as a Numb dominant negative, mice expressing both dnNb and Numb would resemble WT mice.

First, we wanted to verify that all the mice expressed the transgenic proteins. For this, we took advantage of the fact that both the dnNb and the Numb construct contained the human Myc tag. We used an anti-hMyc tag antibody in order to detect by western blotting the transgenic protein in thymocytes of the three lines of mice described above. We found that, while there was no detectable hMyc epitope in WT mice, both Numb and dnNb TG thymocytes expressed large amounts of transgenic protein, and these could be distinguished by their size, since dnNb is a truncated product (Fig. 3A). Taking advantage of the size difference, we observed that dnNb x Numb TG mice expressed both transgenic proteins (Fig. 3A). Additionally, we performed western blotting to detect dnNb protein in DN thymocytes, and could confirm the expression of high quantities of the transgenic protein in this cell subset (Fig. 3B).

The role of Numb in asymmetric division is related to the decision between proliferation and differentiation, accordingly Numb deletion has resulted before in precursor depletion. However, in other systems where cell countings are impossible, or subpopulations cannot be characterized by flow cytometry, it has been difficult to assess this question. The thymus constitutes an excellent model for this kind of studies, since thymocytes can be easily disaggregated and counted; moreover, thymocyte subpopulations have been extensively characterized and can be easily analyzed by flow cytometry. On

the other hand, the thymus is a compact organ that can also be studied by microscopy. Using these two complementary approaches on our transgenic model, we investigated whether manipulation of functional Numb levels would result in any change in total cellularity and/or the size of precursor subpopulations in the thymus.

We observed in Numb TG mice, compared with WT mice, an increase in cellularity of both the DN and the DP compartments (Fig. 3C). Conversely, dnNb TG mice showed a marked decrease in absolute numbers of these two thymic subpopulations, as compared with WT mice (Fig. 3D). These same results were obtained for two independent lines of either dnNb or Numb TG mice (Supplementary Fig. 2 and our own observations). Since DP thymocytes do not divide, differences in DP cellularity are normally originated at the DN stage, therefore we analyzed by flow cytometry the different DN thymocyte subpopulations. We observed an important block at the DN3 stage in dnNb TG mice, as compared with WT mice, with a 2-fold increase in the percentage of DN3 and a 2-fold reduction in the percentage of DN4 thymocytes (Fig. 3E). This block was absent in Numb TG and was reverted by Numb over-expression in dnNb x Numb TG mice, (Fig. 3E). The last result, together with the fact that dnNb x Numb TG mice have normal thymic cell numbers (Fig. 3F), indicate that dnNb is exclusively inhibiting Numb, and not other PTB containing proteins, since the sole expression of Numb is able to revert the dnNb phenotype. Interestingly, we observed a gradation in thymic cell numbers when functional levels of Numb increased, starting with dnNb TG mice and ending with Numb TG mice (Fig. 3F). Together, these data indicate, first, that certain levels of functional Numb are required to achieve a normal transition from the DN to the DP stage during thymocyte development, and secondly, that the quantity of Numb on thymocytes determines thymic size.

Impaired proliferation in the thymus of dnNb TG mice.

The results described above suggest that dominant negative Numb interferes seriously with thymic development. We wanted to further investigate the mechanism by which this occurs. Since both proliferation and pre-TCR signaling start during the DN3 stage, we wanted to study the possible effect of Numb inhibition on both processes. To study thymocyte proliferation, we used the OP9 system³³, which consists on two cell lines, OP9 and OP9-DL1, the later expressing a Notch ligand that enhances Notch signaling and differentiation into the DP stage. This makes the system optimal for studying DN thymocyte proliferation. Therefore, we labeled d15 fetal WT or dnNb TG thymocytes with CFSE and co-incubated them with OP-9 or OP9-DL1 cells for 6 days. While few thymocytes expressing CD4 and/or CD8 developed on OP9 cells after a 6-day incubation, the number increased considerably for both WT and dnNb TG mice when fetal thymocytes were incubated with OP9-DL1 cells (Fig. 4A). As expected, very few DN3 and DN4 cells developed on OP9 cells, but these numbers were higher when incubated on OP9-DL1 cells, and the observed DN3 block in dnNb TG thymocytes was still observed (Fig. 4B). Thus, as previously described by Schmitt et al., normal development up to the DP stage can be mimicked using the OP9-DL1 system, and the developmental difference between WT and dnNb TG thymocytes is preserved under these conditions. Analysis of CFSE binding on the recovered thymocytes showed that dnNb thymocytes had proliferated to a lesser extent than WT thymocytes (Fig 4C). Thus, Numb inhibition results in decreased proliferative potential in DN thymocytes.

We wondered whether dnNb inhibited Numb by competing for specific Numb binding sites, where dnNb would not be able to exert Numb function because of lack of the C-terminus. Therefore, we analyzed Numb and dnNb localization on CD25+ fetal thymocytes by confocal microscopy. The Numb antibody used in our studies is raised against the Numb C-terminus, which is absent in the dnNb protein, therefore it only

recognizes endogenous Numb, while dnNb can be detected using an anti-Myc antibody, that obviously does not detect endogenous Numb. We observed that, as we hypothesized, dnNb is located at the cell membrane, and polarizes together with endogenous Numb in CD25⁺ thymocytes (Fig. 4D). This is consistent with competition between Numb and dnNb for binding sites, probably in this way dnNb partially blocks Numb access to its physiological sites. This, together with the data on Numb/pre-TCR colocalization in DN3 thymocytes, indicates that the dnNb protein interferes with endogenous Numb function during pre-TCR signaling.

Increased Notch signaling and pre-TCR surface expression in dnNb TG DN thymocytes

Given that Numb is a Notch inhibitor, we hypothesized that Numb inhibition would result in an increase in Notch signaling, evidenced by increased Hes-1 mRNA levels in thymocytes. This was, indeed, the result obtained by analyzing Hes-1 expression in WT and dnNb thymocytes by RT-PCR (Fig. 5A). Therefore, it can be concluded that dnNb is competing with Numb for binding sites, and causing increased Notch signaling. Given the observed parallelism in symmetric protein segregation between Notch and pre-TCR and the fact that Numb co-localizes with the pre-TCR, we wanted to investigate whether Numb inhibition would also enhance pre-TCR signaling, in a similar way to its effect on Notch.

We first analyzed pre-TCR expression and localization in DN thymocytes of WT and dnNb TG mice. We looked first at pre-TCR surface levels by flow cytometry using an antibody against the pT α chain, and observed that dnNb TG DN thymocytes express higher pT α surface levels than WT DN thymocytes (Fig 5B). Increased pre-TCR levels on the surface of developing thymocytes would result in enhanced pre-TCR signaling, therefore we analyzed CD5 (a marker of pre-TCR signaling) expression on DN

thymocytes of WT and dnNb TG mice. We found that CD5 expression was also increased at both the DN3 and DN4 stages in dnNb TG thymocytes, as compared with WT thymocytes (Fig. 5B).

The fact that DN thymocytes in dnNb TG mice express higher surface pre-TCR levels and present increased CD5 expression strongly suggests that these cells receive enhanced pre-TCR signals, which may result in death or premature differentiation³⁴. In order to assess whether a higher fraction of DN thymocytes is undergoing cell death in dnNb TG compared to WT mice we performed Annexin-V staining and observed that indeed, there is more cell death in DN thymocytes of dnNb TG mice (Fig. 5B). However, the thymus of dnNb TG mice contained DP and SP thymocytes, indicating that the developmental block in dnNb TG mice is not complete; we therefore wanted to investigate how excessive pre-TCR levels affects those DN thymocytes that end up developing into SP cells. In mice deficient for Numb and Numbl like, neural progenitors differentiate prematurely, before expanding⁸, therefore we analyzed this possibility in dnNb TG mice. We hypothesized that DN thymocytes receiving enhanced pre-TCR signaling would bypass the proliferation burst associated with the DN-DP transition, differentiating prematurely into DP thymocytes, which would result in the observed decrease in thymic size. Since DN thymocytes must down-regulate both CD25 and pre-TCR levels previous to transitioning to the DP stage, an indicator of premature differentiation would be high surface CD25 and/or pre-TCR expression at the DP stage. Thus, we measured surface expression of these two proteins in DP thymocytes of WT and dnNb TG mice. As expected, we observed increased surface levels of both proteins in DP thymocytes of dnNb mice, as compared with WT mice (Fig. 5C). In addition, CD5 levels were also increased in DP thymocytes of dnNb TG mice (Fig. 5C). Using TOPRO, we observed an increase of apoptotic nuclei, with the characteristic DNA fragmentation, in dnNb TG fetal thymii, as compared with WT thymii (Fig. 5D and E).

Together, these results indicate that excessive pre-TCR signaling due to increased pre-TCR surface levels induces cell death in a subset of DN thymocytes, and a premature DN3-DP transition in the surviving DN thymocytes of dnNb TG mice.

We suspected that such changes in proliferation must affect the number of thymocytes that are undergoing each stage of the cell cycle, therefore we counted the number of metaphases and telophases on fetal thymic sections of WT, dnNb TG or Numb TG mice, stained with TOPRO. We found more metaphases and less telophases in dnNb TG than in WT fetal thymii, conversely there were less metaphases and more telophases in Numb TG than in WT fetal thymii (Fig. 5F). This may indicate that thymocytes progress faster through cell cycle in Numb TG mice than in either WT or dnNb mice, while the opposite effect is caused by Numb inhibition in dnNb TG mice.

Defect in c-Cbl endosomal localization in dnNb TG DN thymocytes

In view of the data presented above, we hypothesized that dnNb must be interacting (perhaps even more efficiently than endogenous Numb) with proteins (to which endogenous Numb does normally bind) implicated in pre-TCR signaling in thymocytes. If this happened, endogenous Numb would be excluded from sites where its function is needed for normal development. The ubiquitin ligase c-Cbl is an essential player in pre-TCR signaling and early thymocyte development³⁵, also it co-immunoprecipitates with Numb²⁸, therefore it is a likely candidate. There is a remarkable parallelism between the c-Cbl/Cbl-b double KO and the dnNb TG phenotypes, with reduced thymic size and abnormal pre-TCR surface expression on both DN and DP thymocytes. In order to assess whether dnNb expression is affecting c-Cbl localization in dnNb TG thymocytes, we stained 15-day WT and dnNb TG fetal thymic sections using antibodies against Numb and c-Cbl. C-Cbl was expressed at high levels in both WT and dnNb TG thymii. There was, however, an obvious difference in

localization: while c-Cbl was mostly localized in vesicles in fetal WT thymocytes, it was mostly on the membranes of dnNb TG fetal thymocytes (Fig. 6A). Interestingly, Numb expression presented a similar punctate pattern in WT thymii, however in contrast with c-Cbl, this pattern was largely conserved in dnNb TG mice (Fig. 6A). When both proteins were observed on the same image (Fig. 6A, Merge), there was an evident loss of “yellow dots” (c-Cbl+ Numb+ vesicles) in dnNb TG thymii, as compared with WT. Detailed quantification of vesicles containing Numb, c-Cbl, or both in CD25+ fetal thymocytes showed that, while the average number of Numb containing vesicles per cell did not change in dnNb TG mice with respect to WT mice, there was an important decrease in the average number of both c-Cbl+ and double positive Numb+/c-Cbl+ vesicles per cell in dnNb TG mice, as compared with WT mice (Fig. 6B).

We wanted to investigate whether the observed vesicles corresponded to endosomes, therefore we stained fetal thymic sections with an antibody against ubiquitin, together with either Numb or c-Cbl. We found that both Numb and c-Cbl containing vesicles also contained ubiquitin (Fig. S3A and B). The fact that c-Cbl access to endosomes is blocked in dnNb TG mice suggests, on one hand, that dnNb must be able to access sites normally occupied by endogenous Numb and, on the other hand, that dnNb must be able to displace endogenous Numb from those sites. These data indicate that Numb may be a mediator in c-Cbl access to endosomes, therefore expressing a truncated Numb protein blocks this process, thereby interfering with pre-TCR degradation. This would result in more pre-TCR bound to ubiquitin on the surface of dnNb TG CD25+ thymocytes than WT thymocytes, and this is exactly what we observed by visualizing pre-TCR together with ubiquitin on fetal thymic sections (Fig. 6C). Also, we would expect changes in TCR β localization in dnNb TG thymocytes. We analyzed TCR β expression on CD25+ fetal thymocytes and could observe that TCR β is expressed predominantly on the membrane in dnNb TG mice (Fig. S3C). This is in agreement with the observed excessive pre-TCR signaling in dnNb TG thymocytes.

Symmetric Numb segregation in both Numb and dnNb TG mice

The data presented above indicate that dominant negative Numb interferes with endogenous Numb access to endosomes, therefore dnNb over-expression should result in the presence of increased quantities of endogenous Numb on the cell surface. The same effect should be obtained by over-expressing full length Numb. This raised the question of how would this affect Numb segregation during thymocyte division. In order to assess this matter we performed confocal analysis of Numb and dnNb TG fetal thymii. Visualization of Numb expression on cycling Numb TG CD25⁺ DN thymocytes on fetal sections revealed homogeneous, high Numb expression on both daughter cells at all stages of cell division (Fig. 7A, higher panels). Similar results were obtained in dnNb TG mice (Fig. 7A, lower panels). Quantification of Numb signal on Z-stacks corresponding to dividing DN3 thymic cells at the telophase stage of WT, Numb TG and dnNb TG mice, using the method described above, showed that, while there was a high degree of asymmetry in WT mice at telophase (higher than at the anaphase stage, see Table 2), in both Numb TG and dnNb TG mice Numb was segregated in a more symmetric fashion (Fig. 7B and Table 2). Given that Numb and dnNb TG mice show opposite phenotypes in terms of thymic cellularity, the fact that dnNb TG mice show a higher degree of symmetric Numb segregation seems irrelevant, since endogenous Numb function is blocked by dominant negative Numb. It is rather a demonstration that such block exists. Together, these data show that, during asymmetric division in the thymus, it is not inherently the quantity of Numb inherited by each cell, but its functionality as an internalization adapter, what determines the different daughter cell fates. Therefore, Numb must be able to access the endosomes in order to exert its function as a cell fate determinant.

DISCUSSION

Although asymmetric division is associated with precursor differentiation in an increasing number of developing organs, the question of whether this also applies to thymocyte development had remained elusive. We have explored this matter by visualizing dividing thymocytes on frozen sections obtained from fetal thymii. We have observed Numb asymmetric segregation in approximately 30% of dividing fetal thymocytes, which is in good agreement with the observed pattern of Numb distribution during mouse cortical neurogenesis^{7, 36}. The observation that both Numb and the pre-TCR polarize early during the cell cycle was the first indication that Numb may play a role in pre-TCR signaling. Localization of the pre-TCR on lipid rafts³⁷ and its polarization associated with signaling³⁸ had been observed before. This, together with our own results, indicates that, despite its capacity to signal in a ligand-independent fashion, the pre-TCR is probably able to signal more efficiently when the TCR signaling machinery is polarized, and Numb seems to be associated to this machinery in DN thymocytes. Also, the fact that most DN3 thymocytes at early stages of mitosis show pre-TCR and Numb polarization indicates that pre-TCR signaling and cell division are concomitant at the DN stage. However, at later stages of cell division, Numb and pre-TCR distribution in the daughter cells differed. Together, these observations suggest a dual function for Numb during thymocyte division: signaling adapter at earlier stages versus cell fate determinant at later stages. Thus, in the case of asymmetric division, the cell inheriting Numb would continue proliferating (because of lack of Notch and pre-TCR signaling), while the cell without Numb would differentiate (as a consequence of enhanced pre-TCR and Notch signaling). In fetal thymus it is, therefore, logical that just 30% of the thymocytes divide asymmetrically, since at this stage of development proliferation should be promoted at the expense of differentiation. It is possible that at

later stages of development (e.g. adult thymus) differentiation may be promoted at the expense of proliferation, by changing the rate between asymmetric and symmetric division.

In this context, the partial block at the DN3 stage obtained in mice where Numb and Numbl like had been conditionally deleted (see Fig. 4C in ²⁵) and the down-modulation of Notch target genes in thymocytes of mice over-expressing Numb ²⁷ support the idea that Numb may modulate important signaling events at early stages of development. The mentioned studies must be interpreted in the light of the data showing that as little as 5% of normal levels of Numb or Numbl like are enough to guarantee normal asymmetric division and development in *Drosophila* and mammals ³⁹, therefore it should be only possible to inhibit Numb and Numbl like by leaving no traces of functional protein in the precursors. It is possible that this goal cannot be achieved starting with precursors that express 100% of both Numb and Numbl like by conditionally deleting both genes at the same time. To avoid these problems related to knockout models, we have used a different approach. A dominant negative protein binds to the same ligands as the part of the endogenous protein used for the truncated construct, but (unlike the endogenous protein) the dominant negative protein is functionally defective. This may be achieved by different ways, for example mutation of active sites in enzymes. In the case of dnNb TG mice, the dnNb protein should bind to the same ligands as the Numb PTB, but any proteins that normally bind to the Numb C-terminus will be excluded from these complexes. We have demonstrated this effect for c-Cbl and pre-TCR: both proteins are associated to endogenous Numb in endosomes of WT, but not dnNb TG DN thymocytes, therefore dnNb binds to them but is unable to bind to endosomes. This is in agreement with the similarity of the c-Cbl/Cbl-b knockout and dnNb TG thymic phenotypes. These data indicate a direct role for Numb in facilitating c-Cbl access to the endosomes, which indirectly affects pre-TCR degradation and

signaling. It is important to note that protein degradation plays an essential role during development⁴⁰ and asymmetric division^{41, 42}. The only difference between dnNb TG and c-Cbl/Cbl-b double KO mice is that there are no changes in the degree of DN thymocyte proliferation in c-Cbl/Cbl-b double KO mice, while dnNb TG thymocytes proliferate less than WT thymocytes. This difference may be explained either by a difference in experimental procedures (induction of proliferation in thymocytes versus observation of steady state thymus) or because expression of dnNb results in enhanced Notch signaling, in addition to its effect on c-Cbl. Another indication about the mechanism by which dnNb blocks Numb function comes from visualization of endogenous Numb localization in DN dnNb TG thymocytes. While dnNb shows membrane and polarized distribution, parallel to pre-TCR, Numb localization is more diffuse in premitotic thymocytes. This indicates that dnNb associates with pre-TCR complexes and allows pre-TCR ubiquitylation, but does not allow its translocation to endosomes because lacking the C-terminus. As a consequence, ubiquitylated pre-TCR stays on the surface and does not circulate in dnNb TG mice, resulting in enhanced signaling and premature differentiation. The fact that Numb over-expression compensated the dnNb phenotype excluded the possibility that dnNb might be acting on other adapter proteins containing a PTB. Besides, the opposite effects in terms of thymic cellularity obtained by either inhibiting or over-expressing Numb support the idea that Numb is a key factor in thymocyte decisions between proliferation and differentiation.

The data presented support a model in which Numb plays a key role in DN thymocytes as modulator of Notch and pre-TCR signaling, to such an extent that the balance between symmetric and asymmetric Numb segregation between daughter cells ultimately determines thymic size. This is in agreement with the proposed role of asymmetric division as a way to diversify cell progeny and to ensure correct cell numbers in the adult organ⁴³. It also supports the increasingly accepted idea that protein

ubiquitylation is a key process involved in development, and its alteration results in multiple pathologies⁴⁴.

METHODS

Mice, embryos and cell lines. 15d embryos or 4 week old mice were used for experiments with fetal and adult thymus, respectively. OP9 and OP9DL cells were provided by Dr. J.C. Zúñiga-Pflücker. All experimental procedures involving mice were performed in agreement with the CSIC Ethical Committee directives.

Antibodies. The following antibodies were obtained from BD Pharmigen: FITC anti-CD25 (7D4), CD4 (L3T4), CD8 (53-6.7), CD5 (53-7.3), AnnexinV; PE anti-TCR β (H57-597), Lin [CD4 (RM4-5), CD8 (53-6.7), CD3 (145-2C11), CD11b (M1/70), NK1.1 (PK136), TCR β (H57-597), TCR $\gamma\delta$ (GL3), B220 (RA3-6B2)]; CyC anti-CD44 (IM7); Biotinylated anti-CD4 (RM4-5), CD8 (53-6.7), pre-T α (2F5), Fc Block (2.4G2), IgG1 (A85-1). Biotinylated Myc-tag (9E10, Upstate). Biotinylated antibodies were revealed with Streptavidin-APC (eBioscience). Monoclonal FITC anti-pan cytokeratin was obtained from Sigma.

Western blotting. 1×10^7 thymocytes were lysed in 100 μ l NP40 cell lysis buffer (Sigma) supplemented with protease inhibitor cocktail (Sigma) and 1mM PMSF for 30 min on ice. The lysates run on a NuPAGE 4-12% Bis-Tris Gel (Invitrogen) and transferred to nitrocellulose, after membrane was blocked 30min at room temperature with blocking buffer (5% nonfat dry milk, PBS 0,1% Tween-20). Subsequently, membrane was blotted for c-myc (9E10 Upstate), Numb (H70 Santa Cruz) or GADPH (71.1 Sigma), after membrane was washed and incubate in secondary antibodies coupled to HRP (Santa Cruz) and was detected by using enhanced chemiluminescence (Bio-Rad)

Flow cytometry and intracellular staining. Adult or fetal thymocytes were washed twice with PBS and then stained for 15 minutes at 4°C with antibodies. For intracellular staining, cells were incubated with Cytofix/Cytoperm (BD Bioscience) and then stained with antibodies. Analysis was performed on a FACs Calibur (Becton Dickinson). Files were analyzed with software (FlowJo; Tree Star, Inc.).

CFSE labelling. Fetal thymocytes were incubated with 10 µM CFSE (Sigma) for 15 minutes at 37°C and then incubated with FBS for 1 minute. Afterwards, they were washed twice with PBS before being plated onto OP9 or OP9DL monolayers (2x10⁴ cells/well in 24-well culture dishes). Cell division of CFSE-labelled cells was analyzed by flow cytometry.

OP9/OP9DL co-cultures. Fetal thymocytes were cultured onto OP9/OP9DL monolayers for 6 days at 37°C and 5% CO₂, in the presence of 5ng/ml IL-7 (RD System). All co-cultures were maintained in complete α-MEM (Gibco) medium supplemented with 10% FBS (Gibco) and antibiotics (Gibco).

Immunofluorescence and Confocal Microscopy. Fetal thymii were fixed with a 4% paraformaldehyde solution in PBS, then washed with PBS and treated with a 20% sucrose solution in PBS. After a second wash, the fetal thymii were immersed in O.C.T. compound (Tissue Tek) and snap frozen using a mixture of 2-methylbutane (Sigma) and dry ice. Afterwards, 10 µm sections were obtained using a cryostat. The sections were fixed with 4% paraformaldehyde in PBS, permeabilized with Triton-X100 and stained with the indicated antibodies in a solution containing 5% normal goat serum and 3% bovine serum albumin. Sections were mounted with ProLong Antifade (Molecular Probes). The following primary antibodies were used for immunofluorescence: polyclonal rabbit anti-Numb (Santa Cruz Biotechnology Inc.), monoclonal mouse anti-c-Cbl (Santa Cruz Biotechnology Inc.), monoclonal mouse anti-CD25 (BD Pharmingen), monoclonal mouse Ubiquitin (Biomol), rabbit anti-Ubiquitin (Sigma), monoclonal

mouse anti-pT α , monoclonal mouse anti-TCR β (BD Pharmingen), TOPRO-3 iodide (Molecular Probes). The secondary antibodies used were anti-rabbit Alexa-647 (Molecular Probes), anti-rabbit Alexa-488 (Molecular Probes), anti-mouse Alexa-488 (Molecular Probes), anti-mouse Alexa-555 (Molecular Probes). The sections were analyzed using a Leica TCS SP5 confocal microscope. Images were collected at 8-bit depth, with a resolution of 1024 x 1024 pixels. LIF images were converted to TIFF files and figures were presented using Adobe Photoshop 7.0 software. In some figures contrast enhancement was used to make the published images easier to view. When this was done, all images in the figure were treated equally.

Quantification of fluorescence staining in z-stacks of dividing cells. The software LAS AF (Leica Microsystem) was used to analyse fluorescent images. Inside each picture, one gate for each daughter cell was drawn, using CD25 as a marker, and threshold intensities of total pixels were determined for Numb. The positively staining pixels on each daughter cell were expressed as a percentage of the total pixels in the sum of the two gates, for each picture. This was performed for all pictures of each z-stack. As a result, each daughter cell was associated with a percent of positive pixels (which corresponds to the percent of inherited Numb protein).

RNA Analysis. Total RNA from mice was extracted with RNasy Kit (Quiagen). RT-PCR was carried out with a I Script cDNA Synthesis Kit (Biorad). The resulting cDNA pool was amplified by 40 cycles of PCR. The RT-PCR primers used in this study were mouse 18S (5' sense, CGGCTACCACATCCAAGGAA; 3' antisense, GCTGGAATTACCGCGGCT), Hes1 (5' sense GCCAGTGTCAACACGACACCGG; 3' antisense, TCACCTCGTTCATGCACTCG). Fold differences were calculated after normalizing cDNA levels of 18S transcripts each samples.

Statistical Analysis. Statistical comparisons were made using the Student *t*-test. Differences were considered statistically significant if $p < 0.05$.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Drs. Weimin Zhong and Ellen Robey for critical reading of the manuscript, B.J. Fowlkes for providing the Numb and dnNb TG mice, Juan Carlos Zuniga-Pflucker for providing OP9 and OP9-DL1 cells, Sabine Hilfiker for helpful scientific discussion and advice, Francisco Ferrer and Maria Isabel Gutierrez for expert technical mouse work, Jose Luis Luque for expert technical help with microscopy. The work was funded by grants BFU2004-01771 and BFU2007-67476 from the Spanish Science and Education Ministry and a Special Intramural CSIC (Spanish Science Council) .

REFERENCES

1. Cayouette, M. & Raff, M. Asymmetric segregation of Numb: a mechanism for neural specification from *Drosophila* to mammals. *Nat Neurosci* **5**, 1265-1269 (2002).
2. Knoblich, J.A. Mechanisms of asymmetric stem cell division. *Cell* **132**, 583-597 (2008).
3. Rhyu, M.S., Jan, L.Y. & Jan, Y.N. Asymmetric distribution of numb protein during division of the sensory organ precursor cell confers distinct fates to daughter cells. *Cell* **76**, 477-491 (1994).
4. Frise, E., Knoblich, J.A., Younger-Shepherd, S., Jan, L.Y. & Jan, Y.N. The *Drosophila* Numb protein inhibits signaling of the Notch receptor during cell-cell interaction in sensory organ lineage. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 11925-11932 (1996).
5. Guo, M., Jan, L.Y. & Jan, Y.N. Control of daughter cell fates during asymmetric division: interaction of Numb and Notch. *Neuron* **17**, 27-41 (1996).
6. Spana, E.P. & Doe, C.Q. Numb antagonizes Notch signaling to specify sibling neuron cell fates. *Neuron* **17**, 21-26 (1996).
7. Zhong, W., Feder, J.N., Jiang, M.M., Jan, L.Y. & Jan, Y.N. Asymmetric localization of a mammalian numb homolog during mouse cortical neurogenesis. *Neuron* **17**, 43-53 (1996).
8. Petersen, P.H., Zou, K., Hwang, J.K., Jan, Y.N. & Zhong, W. Progenitor cell maintenance requires numb and numbl like during mouse neurogenesis. *Nature* **419**, 929-934 (2002).
9. Rasin, M.R. *et al.* Numb and Numbl are required for maintenance of cadherin-based adhesion and polarity of neural progenitors. *Nat Neurosci* **10**, 819-827 (2007).
10. Calderwood, D.A. *et al.* Integrin beta cytoplasmic domain interactions with phosphotyrosine-binding domains: a structural prototype for diversity in integrin signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 2272-2277 (2003).
11. Verdi, J.M. *et al.* Mammalian NUMB is an evolutionarily conserved signaling adapter protein that specifies cell fate. *Curr Biol* **6**, 1134-1145 (1996).
12. Santolini, E. *et al.* Numb is an endocytic protein. *J Cell Biol* **151**, 1345-1352 (2000).
13. Berdnik, D., Torok, T., Gonzalez-Gaitan, M. & Knoblich, J.A. The endocytic protein alpha-Adaptin is required for numb-mediated asymmetric cell division in *Drosophila*. *Dev Cell* **3**, 221-231 (2002).
14. Traub, L.M. Sorting it out: AP-2 and alternate clathrin adaptors in endocytic cargo selection. *J Cell Biol* **163**, 203-208 (2003).
15. Robey, E. & Fowlkes, B.J. Selective events in T cell development. *Annu Rev Immunol* **12**, 675-705 (1994).
16. Germain, R.N. T-cell development and the CD4-CD8 lineage decision. *Nat Rev Immunol* **2**, 309-322 (2002).
17. von Boehmer, H. Unique features of the pre-T-cell receptor alpha-chain: not just a surrogate. *Nat Rev Immunol* **5**, 571-577 (2005).
18. Yamasaki, S. & Saito, T. Molecular basis for pre-TCR-mediated autonomous signaling. *Trends Immunol* **28**, 39-43 (2007).
19. Aifantis, I., Mandal, M., Sawai, K., Ferrando, A. & Vilimas, T. Regulation of T-cell progenitor survival and cell-cycle entry by the pre-T-cell receptor. *Immunol Rev* **209**, 159-169 (2006).

20. Carrasco, Y.R., Navarro, M.N., de Yébenes, V.G., Ramiro, A.R. & Toribio, M.L. Regulation of surface expression of the human pre-T cell receptor complex. *Semin Immunol* **14**, 325-334 (2002).
21. Panigada, M. *et al.* Constitutive endocytosis and degradation of the pre-T cell receptor. *The Journal of experimental medicine* **195**, 1585-1597 (2002).
22. Garcia-Peydro, M., de Yébenes, V.G. & Toribio, M.L. Notch1 and IL-7 receptor interplay maintains proliferation of human thymic progenitors while suppressing non-T cell fates. *J Immunol* **177**, 3711-3720 (2006).
23. Tourigny, M.R., Mazel, S., Burtrum, D.B. & Petrie, H.T. T cell receptor (TCR)-beta gene recombination: dissociation from cell cycle regulation and developmental progression during T cell ontogeny. *The Journal of experimental medicine* **185**, 1549-1556 (1997).
24. Vasseur, F., Le Campion, A. & Penit, C. Scheduled kinetics of cell proliferation and phenotypic changes during immature thymocyte generation. *Eur J Immunol* **31**, 3038-3047 (2001).
25. Wilson, A. *et al.* Normal hemopoiesis and lymphopoiesis in the combined absence of numb and numblake. *J Immunol* **178**, 6746-6751 (2007).
26. Dho, S.E., French, M.B., Woods, S.A. & McGlade, C.J. Characterization of four mammalian numb protein isoforms. Identification of cytoplasmic and membrane-associated variants of the phosphotyrosine binding domain. *J Biol Chem* **274**, 33097-33104 (1999).
27. French, M.B. *et al.* Transgenic expression of numb inhibits notch signaling in immature thymocytes but does not alter T cell fate specification. *J Immunol* **168**, 3173-3180 (2002).
28. Anderson, A.C. *et al.* The Notch regulator Numb links the Notch and TCR signaling pathways. *J Immunol* **174**, 890-897 (2005).
29. Takano, H., Ema, H., Sudo, K. & Nakauchi, H. Asymmetric division and lineage commitment at the level of hematopoietic stem cells: inference from differentiation in daughter cell and granddaughter cell pairs. *The Journal of experimental medicine* **199**, 295-302 (2004).
30. Chang, J.T. *et al.* Asymmetric T lymphocyte division in the initiation of adaptive immune responses. *Science* **315**, 1687-1691 (2007).
31. Saveliev, A. & Tybulewicz, V.L. Lymphocyte signaling: beyond knockouts. *Nature immunology* **10**, 361-364 (2009).
32. Canelles, M., Park, M.L., Schwartz, O.M. & Fowlkes, B.J. The influence of the thymic environment on the CD4-versus-CD8 T lineage decision. *Nature immunology* **4**, 756-764 (2003).
33. Schmitt, T.M. & Zuniga-Pflucker, J.C. Induction of T cell development from hematopoietic progenitor cells by delta-like-1 in vitro. *Immunity* **17**, 749-756 (2002).
34. Dose, M. *et al.* c-Myc mediates pre-TCR-induced proliferation but not developmental progression. *Blood* **108**, 2669-2677 (2006).
35. Huang, F. *et al.* Establishment of the major compatibility complex-dependent development of CD4+ and CD8+ T cells by the Cbl family proteins. *Immunity* **25**, 571-581 (2006).
36. Zhou, Y. *et al.* The mammalian Golgi regulates numb signaling in asymmetric cell division by releasing ACBD3 during mitosis. *Cell* **129**, 163-178 (2007).
37. Saint-Ruf, C. *et al.* Different initiation of pre-TCR and gammadeltaTCR signalling. *Nature* **406**, 524-527 (2000).
38. Navarro, M.N. *et al.* Identification of CMS as a cytosolic adaptor of the human pTalpha chain involved in pre-TCR function. *Blood* **110**, 4331-4340 (2007).

39. Petersen, P.H., Tang, H., Zou, K. & Zhong, W. The enigma of the numb-Notch relationship during mammalian embryogenesis. *Dev Neurosci* **28**, 156-168 (2006).
40. Seto, E.S., Bellen, H.J. & Lloyd, T.E. When cell biology meets development: endocytic regulation of signaling pathways. *Genes Dev* **16**, 1314-1336 (2002).
41. Shen, Q. & Temple, S. Creating asymmetric cell divisions by skewing endocytosis. *Sci STKE* **2002**, PE52 (2002).
42. Giebel, B. & Beckmann, J. Asymmetric cell divisions of human hematopoietic stem and progenitor cells meet endosomes. *Cell Cycle* **6**, 2201-2204 (2007).
43. Morrison, S.J. & Kimble, J. Asymmetric and symmetric stem-cell divisions in development and cancer. *Nature* **441**, 1068-1074 (2006).
44. Bhoj, V.G. & Chen, Z.J. Ubiquitylation in innate and adaptive immunity. *Nature* **458**, 430-437 (2009).

FIGURE LEGENDS AND TABLES

Figure 1- *Asymmetric Numb segregation in dividing thymocytes.* (A) CD4 and CD8 expression in fetal thymocytes of WT mice, analyzed by flow cytometry. (B) Confocal image of a 15d fetal frozen thymus from a WT mouse stained with CD25 in red. (C) Confocal images of mitotic WT fetal thymocytes stained with antibodies against Numb (green), CD25 (red) and treated with TOPRO-3 iodide (blue). The images are representative of at least three independent experiments. (D) Percentage of Numb protein contained in each daughter cell at the anaphase stage. Quantification of Numb signal was performed as indicated in Methods. DC #1 and #2 represent the daughter cells that inherited more or less Numb on each z-stack, respectively. A total of ten anaphases were analyzed.

Figure 2- *Symmetric pre-TCR segregation in dividing thymocytes* (A) Confocal images of fetal mitotic thymocytes at the telophase stage stained with antibodies against CD25 (red), pre-TCR (green) and treated with TOPRO-3 iodide (blue). (B) Confocal images of fetal mitotic thymocytes at the prophase (upper panels) and metaphase (lower panels) stages stained with antibodies against pre-TCR (red), Numb (green) and treated with TOPRO-3 iodide (blue). (C) Confocal images of mitotic Rag2^{-/-} thymocytes in prophase, metaphase, anaphase and telophase stages stained with antibodies against CD25 (red), Numb (green), and treated with TOPRO-3 iodide (blue). The images are representative of at least three independent experiments.

Figure 3- *Levels of functional Numb correlate with thymic cellularity.* (A) Western-blot analysis, using an anti-Myc tag antibody, of dnNb and p71 Numb expression in thymus of WT, Numb TG, dnNb TG and dnNb x Numb TG mice. (B) Western-blot analysis, using an anti-Myc tag antibody, of dnNb expression in DN thymocytes of WT and dnNb TG mice. (C) Absolute numbers of DN and DP cell subsets in thymus

of WT (black) and Numb TG (grey) mice. (D) Absolute numbers of DN and DP cell subsets in thymus of WT (black) and dnNb TG (grey) mice. (E) CD25 and CD44 expression in Lin⁻ thymocytes of 4-week old WT, Numb TG, dnNb TG and dnNb x Numb TG mice. (F) Total cell numbers in dnNb TG (grey), dnNb x Numb TG (white), WT (black) and Numb TG (light grey) adult thymus. Means \pm SD of at least three independent experiments are plotted.

Figure 4- *Proliferation block in DN thymocytes of dnNb TG mice.*

(A) Maturation of fetal (15d) thymocytes to the DP stage after 6 days of co-culture with OP9 or OP9-Deltalike cells. The DP stage was monitored by expression of CD4 and CD8. (B) Differentiation of fetal DN thymocytes after 6 days of co-culture with OP9 or OP9-Deltalike. Lin⁻ thymocytes were stained with CD44 and CD25. (C) CFSE expression in fetal thymocytes of WT (solid line) or dnNb TG (broken line) mice cultured for 6 days over OP9-Deltalike cells. (D) Confocal images of fetal thymocytes of WT (upper panels) and dnNb TG (lower panels) stained with Numb (green), dnNb (anti-Myc, red) and CD25 (blue). Data are representative of at least three independent experiments.

Figure 5- *Increased surface pre-TCR levels, apoptosis and premature differentiation in dnNb TG thymocytes.*

(A) HES-1 gene expression levels, measured by RT-PCR, in WT (black) and dnNb TG (grey) thymocytes. (B) Pre-TCR (upper panel), CD5 (middle panel) and Annexin V (bottom panel) flow cytometry measurement of DN3, DN4 or total DN WT or dnNb TG thymocytes. WT-solid line; dnNb TG- broken line. (C) Pre-TCR (upper panel), CD5 (middle panel) and CD25 (lower panel) flow cytometry measurement of WT or dnNb TG DP thymocytes. WT-solid line; dnNb TG- broken line. (D) Confocal images of fetal thymic frozen sections treated with TOPRO-3 to detect DNA. Apoptotic nuclei are marked with red arrows. (E) High magnification images of the nuclei marked with red arrows in (d). (F) Average number

of metaphases (left panel) and telophases (right panel) per fetal thymic section of WT (black), dnNb TG (dark grey) or Numb TG (light grey) mice. All data are representative of at least three independent experiments.

Figure 6- *Less endosomal Numb and more ubiquitylated membrane pre-TCR in fetal dnNb TG thymocytes.* (A) Confocal images of fetal thymic frozen sections stained with antibodies against Numb (red), c-Cbl (green) and CD25 (blue). (B) Average number of CD25⁺ cells containing from zero to four c-Cbl⁺, Numb⁺ and c-Cbl⁺Numb⁺ vesicles. Four independent images for each (WT and dnNb TG thymii) were processed. For colocalization, analysis masks for c-Cbl (green color) and for Numb (red color) were made with Photoshop 7.0. Numbers of vesicles per CD25⁺ cell in each mask were counted. The same analysis was performed in masks containing Numb and c-Cbl together (yellow color). An average of 34 and 45 CD25⁺ cells per image were counted for WT (black bars) and dnNb TG (grey bars), respectively. (C) Confocal images of fetal thymic frozen sections of WT (left panel) or dnNb TG (right panel) mice, stained with antibodies against ubiquitin (red), pre-TCR (green) and CD25 (blue). White arrows point to cells with intracellular ubiquitin⁺/pre-TCR⁺ vesicles (left panel) or membrane ubiquitin⁺/pre-TCR⁺ accumulations (right panel). All data are representative of at least three independent experiments.

Figure 7- *Symmetric Numb segregation in Numb and dnNb TG DN thymocytes.* (A) Confocal images of mitotic Numb TG (upper panels) or dnNb TG (lower panels) fetal thymocytes at metaphase, anaphase and telophase stages stained with antibodies against CD25 (red), Numb (green) and treated with TOPRO-3 iodide (blue). The images are representative of at least three independent experiments. (B) Percentage of Numb inherited by each daughter cell at the telophase stage in WT (◆), Numb TG (●) and dnNb TG (▲) mice. A total of 10 (WT and Numb TG mice) and 6 (dnNb TG mice) Z-stacks were analyzed.

Figure S1- *pre-TCR staining is absent in DP and SP WT thymocytes* (A) Low magnification and (B) High magnification confocal pictures of adult thymic sections stained with pre-TCR (red), cytokeratin (green) and CD4 (blue).

Figure S2- *Reduced thymic size and differentiation block in mice expressing dnNb (line H3).* (A) Analysis by flow cytometry using an anti-Myc tag antibody of dnNb expression levels in WT (solid line) and dnNb TG (broken line) thymocytes; (B) Total cell numbers of thymus and DN, DP thymic cell numbers in WT (black) and dnNb TG (grey) mice. Means \pm SD of three independent experiments were plotted.

Figure S3 – *Numb/Ubiquitin and c-Cbl/Ubiquitin co-localization in vesicles of WT thymus and increased TCR β expression in dnNb TG mice.* (A) Confocal images of WT fetal thymic frozen sections stained with antibodies against ubiquitin (red), Numb (green) and CD25 (blue). (B) Confocal images of WT fetal thymic frozen sections stained with antibodies against ubiquitin (red), c-Cbl (green) and CD25 (blue). (C) Confocal images of fetal thymocytes stained with antibodies against pT α (red), TCR β (green) and treated with TOPRO-3 iodide (blue). All images are representative of at least three independent experiments.

Table I. Percentages of Numb in each daughter cell at anaphase

DC# 1	DC# 2	DC#1/DC#2
60,69	39,00	1,56
55,44	44,56	1,24
54,00	46,00	1,17
53,00	47,00	1,13
52,86	47,14	1,12
52,75	47,25	1,12
51,56	48,44	1,06
51,30	48,70	1,05
51,00	49,00	1,04
50,72	49,27	1,03

Table II. Percentages of Numb inherited by each daughter cell at telophase

WT		Numb TG		dnNb TG	
DC#1	DC#2	DC#1	DC#2	DC#1	DC#2
71,36	28,64	58,77	41,23	59,50	40,50
65,14	34,86	56,90	43,00	59,32	40,68
60,00	40,00	56,00	44,00	54,00	46,00
58,49	41,51	56,00	44,00	52,91	47,09
58,00	42,00	54,52	45,48	52,72	47,28
57,00	43,00	53,32	46,68	52,00	48,00
53,60	46,39	53,00	47,00		
53,44	46,56	52,40	47,60		
53,24	46,76	52,20	47,80		
51,96	48,04	50,34	49,66		

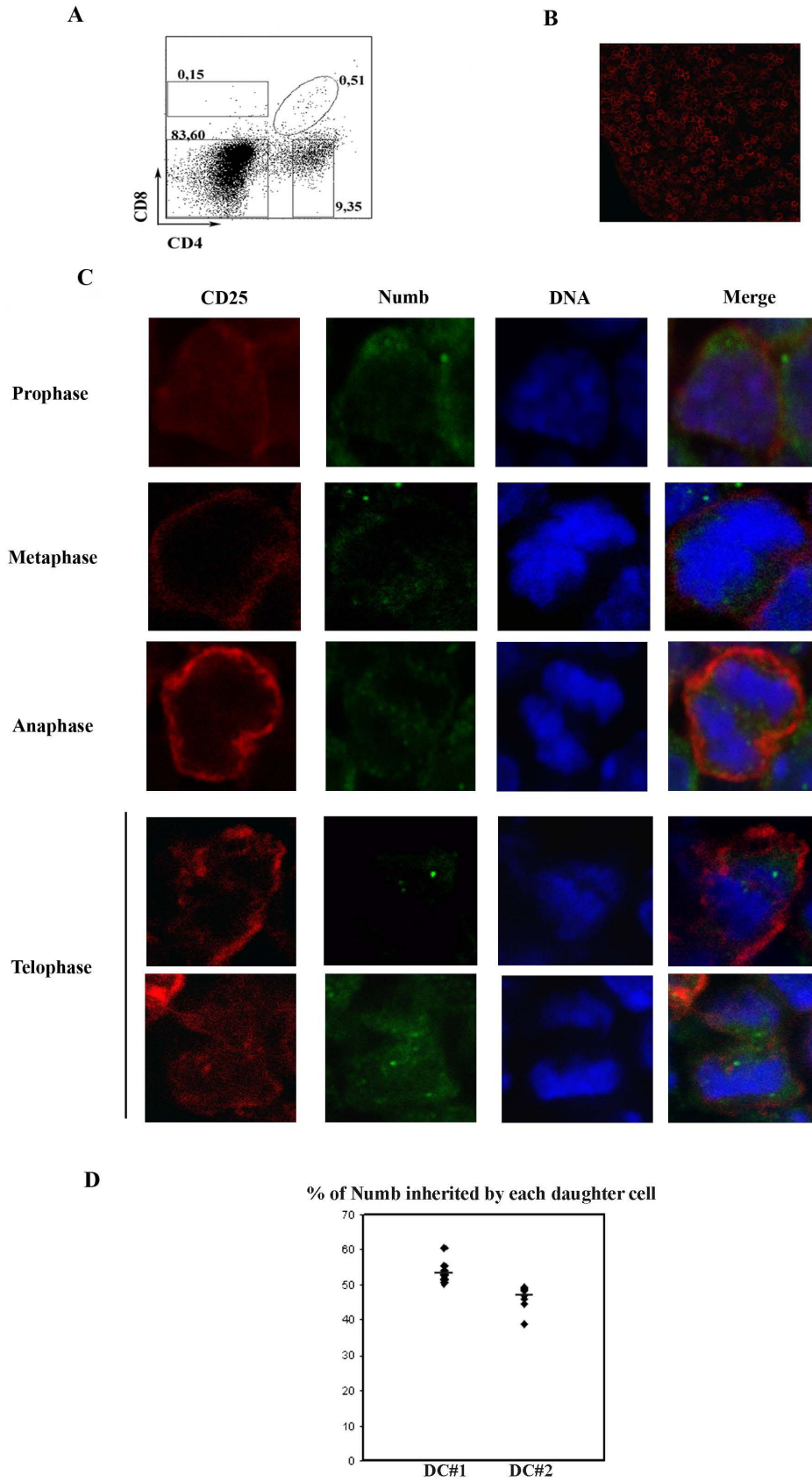
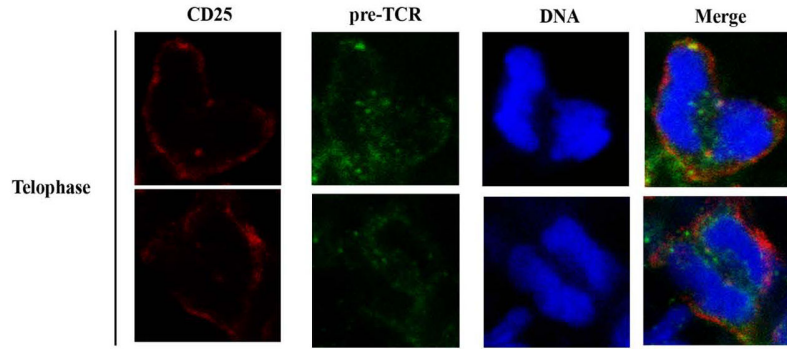
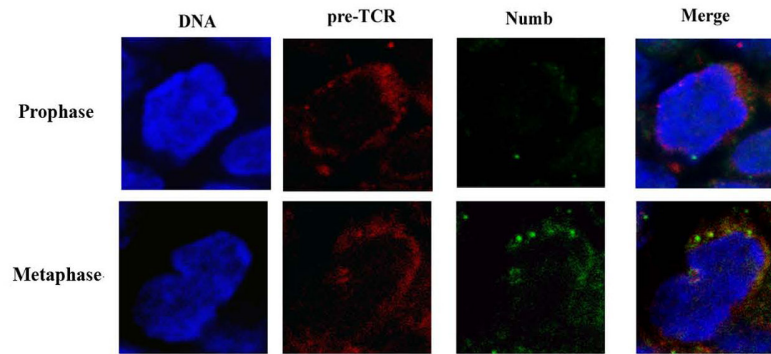


Fig.1

A



B



C

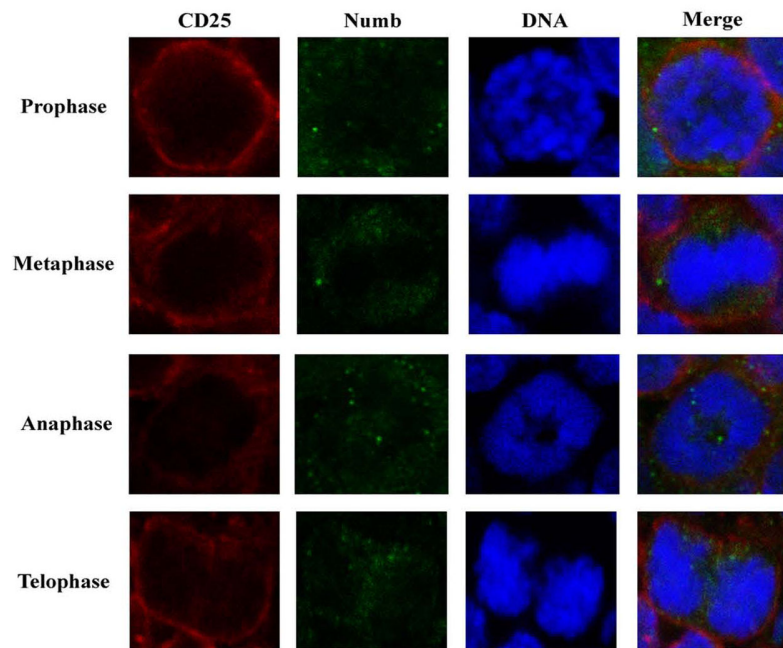


Fig.2

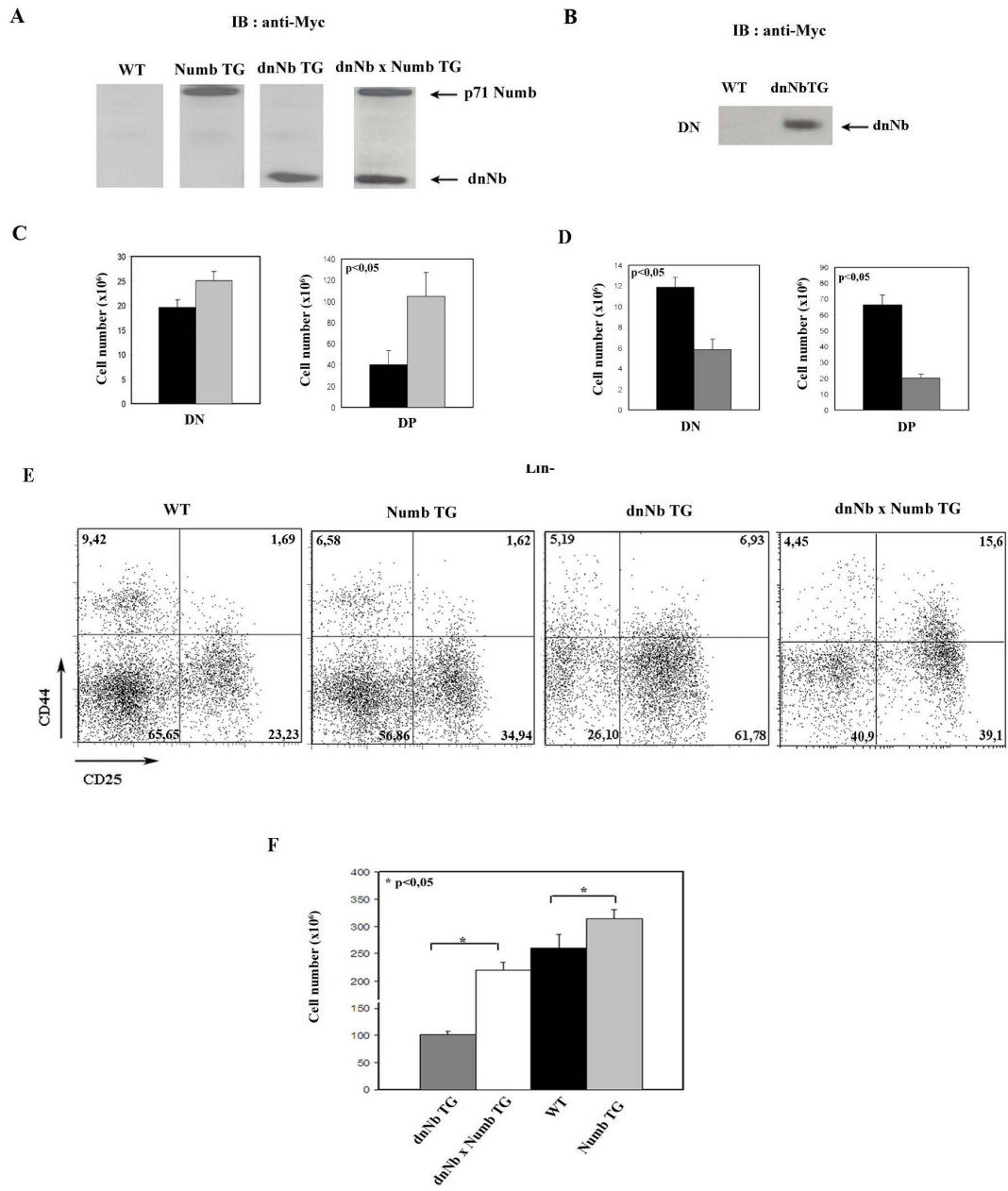


Fig.3

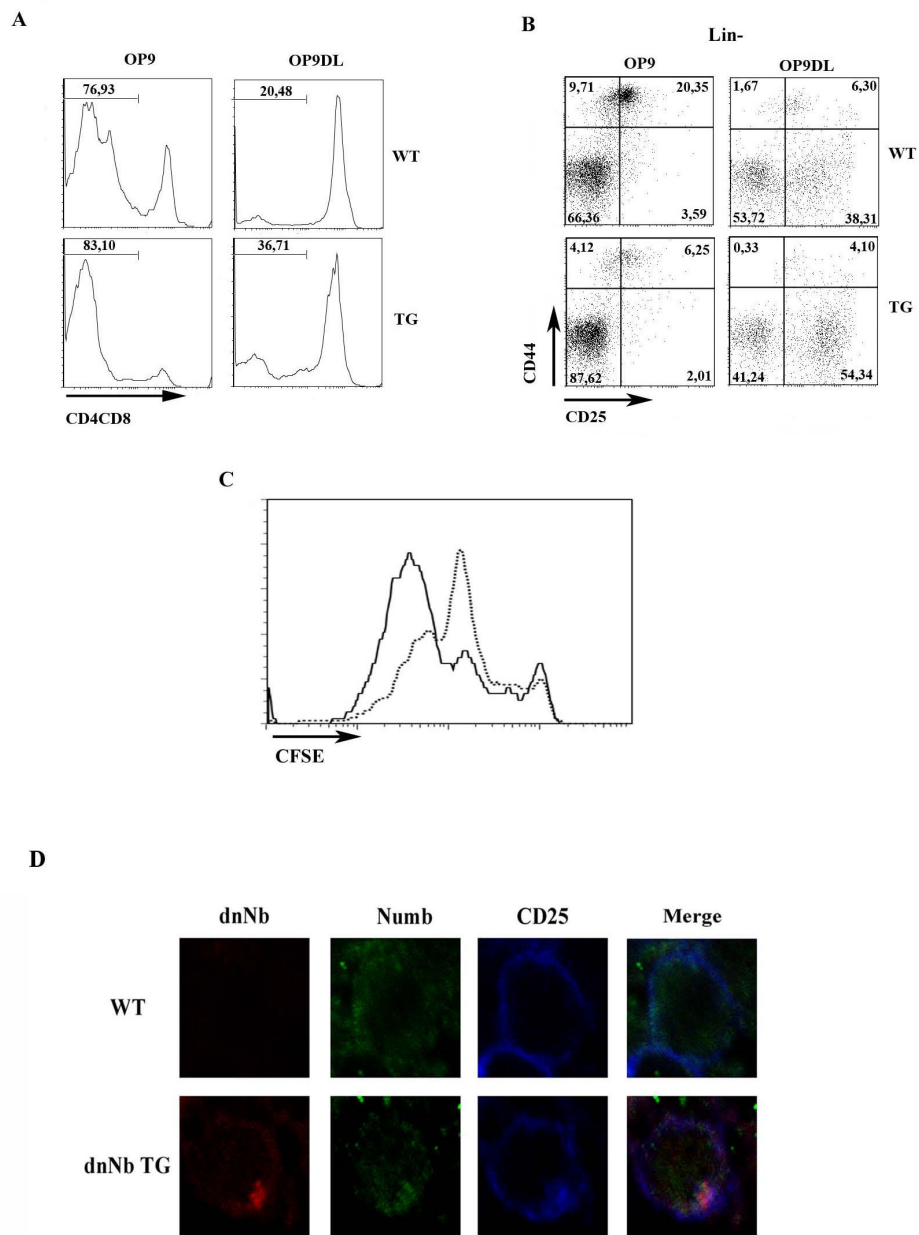


Fig.4

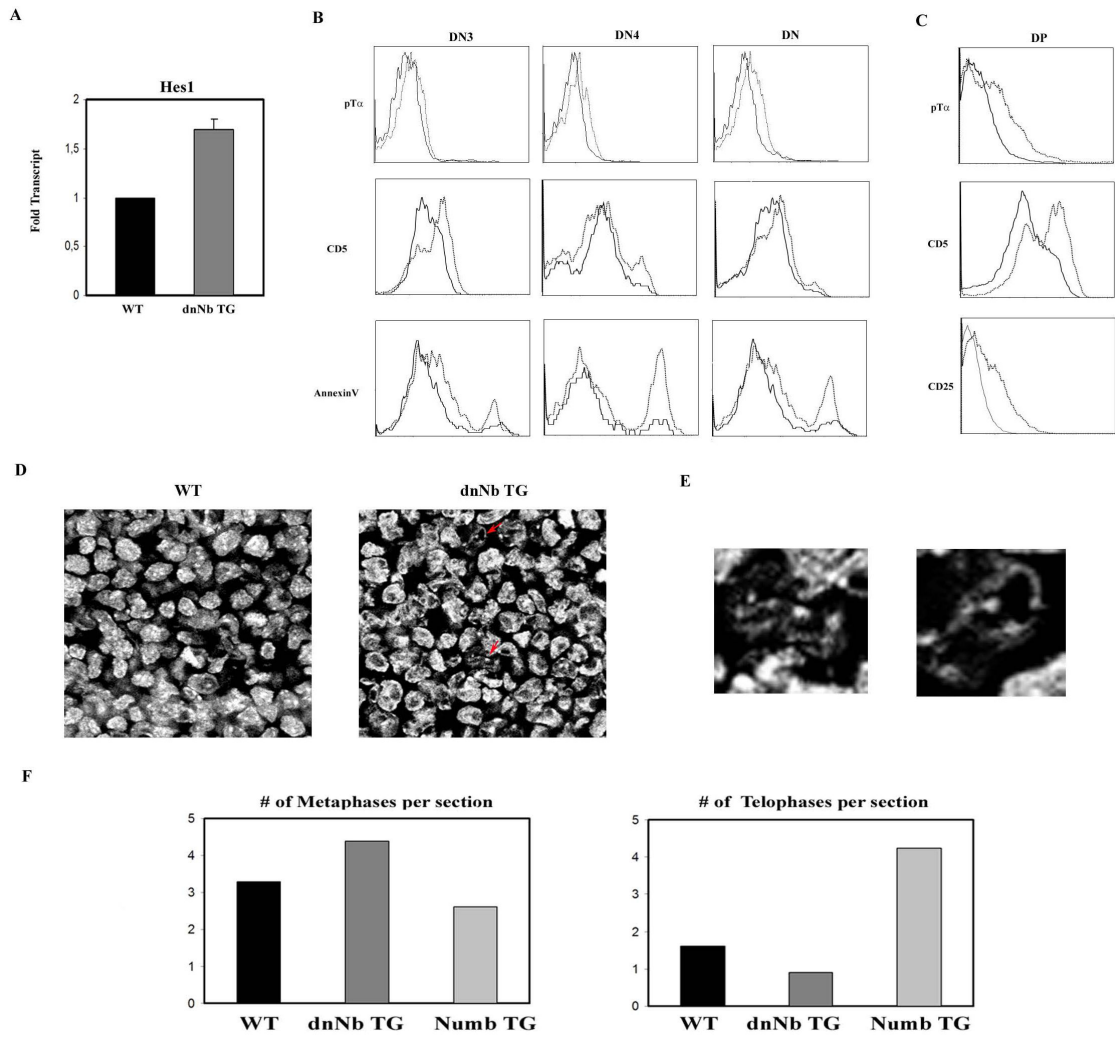


Fig.5

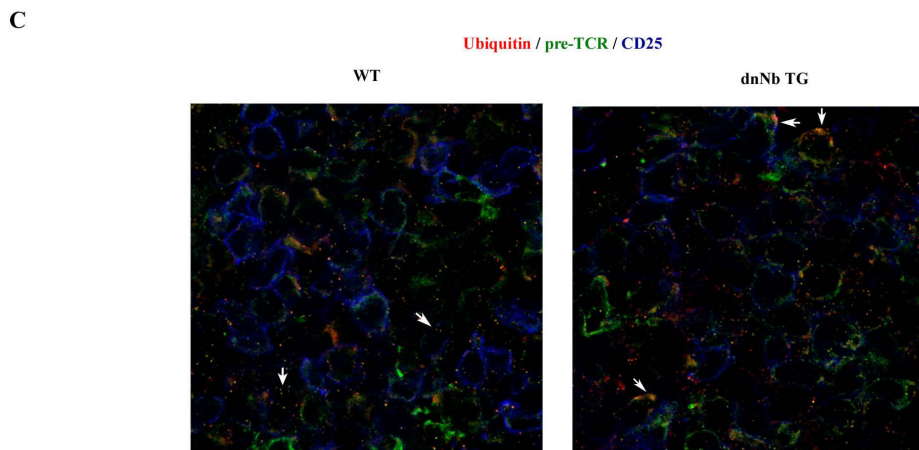
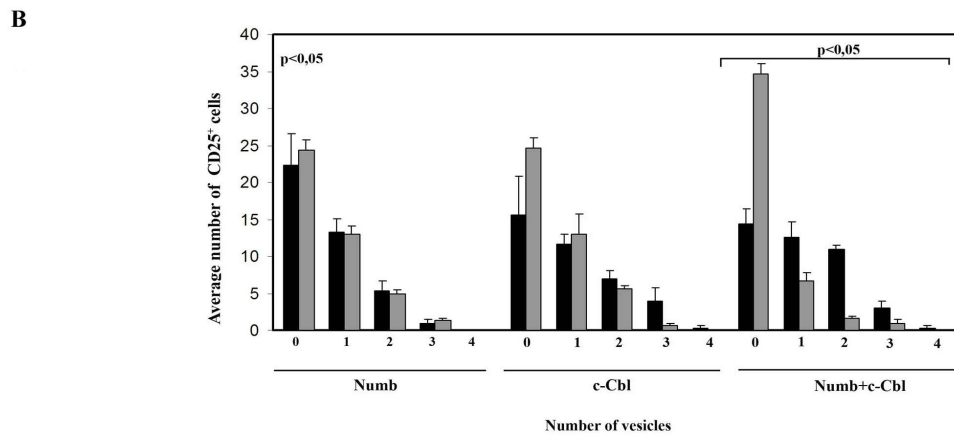
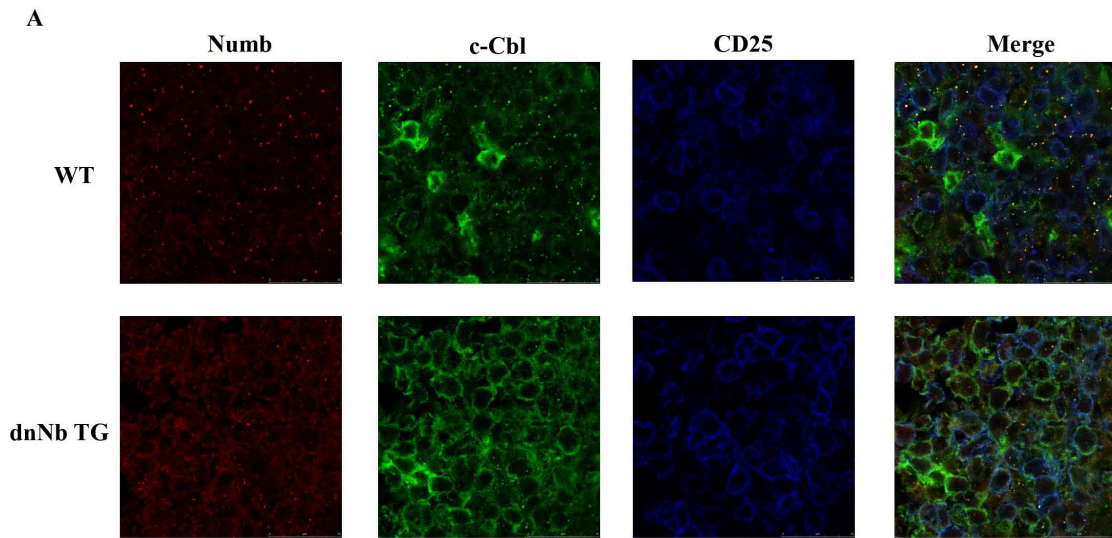
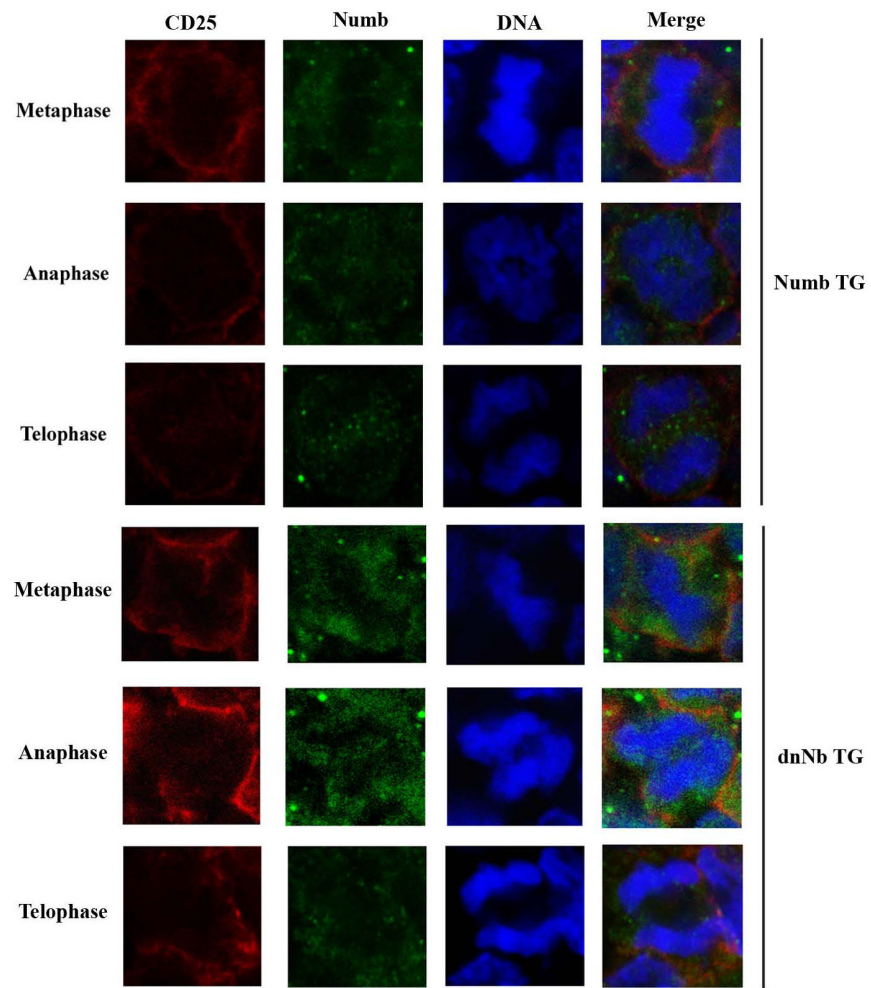


Fig.6

A



B

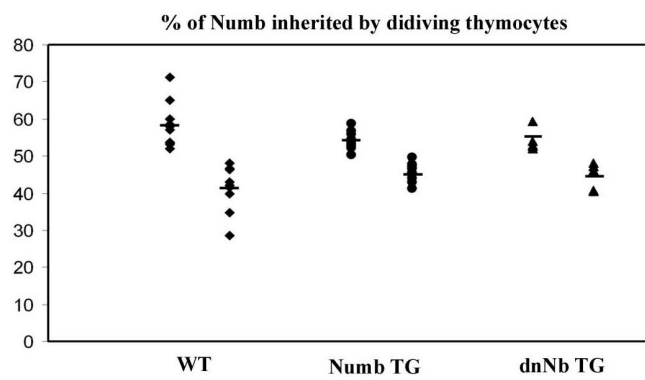
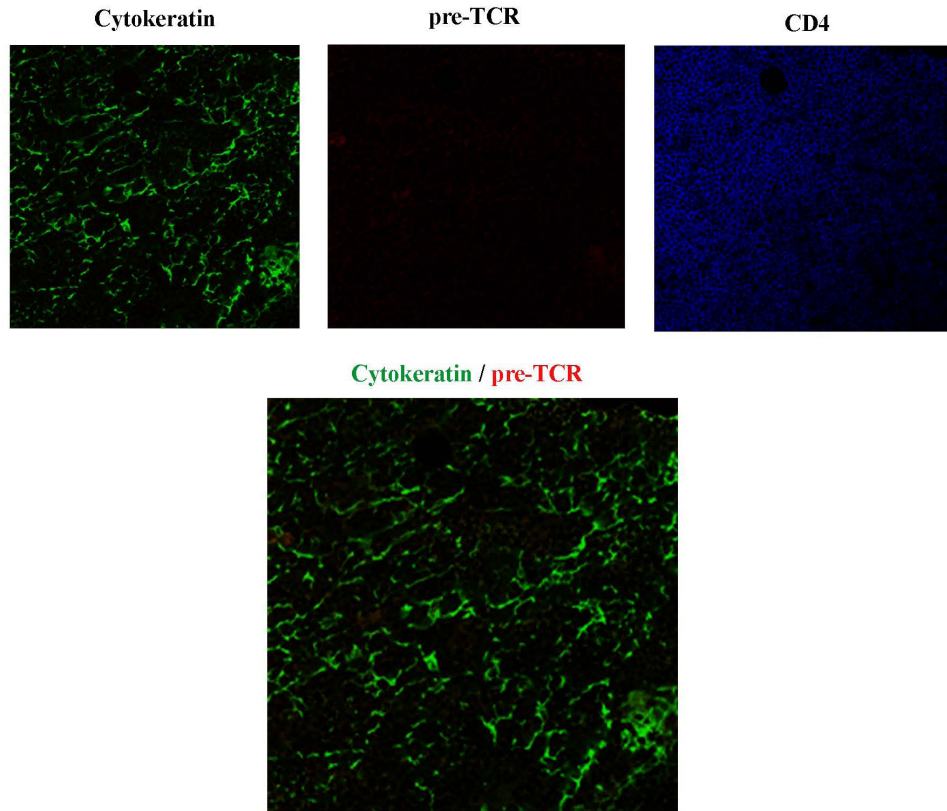


Fig.7

A



B

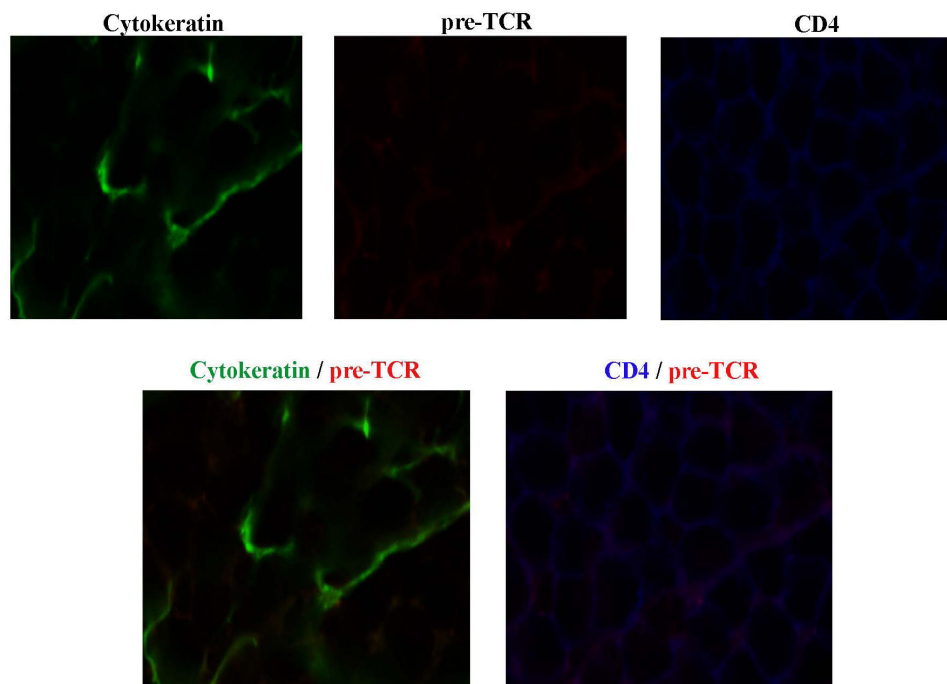
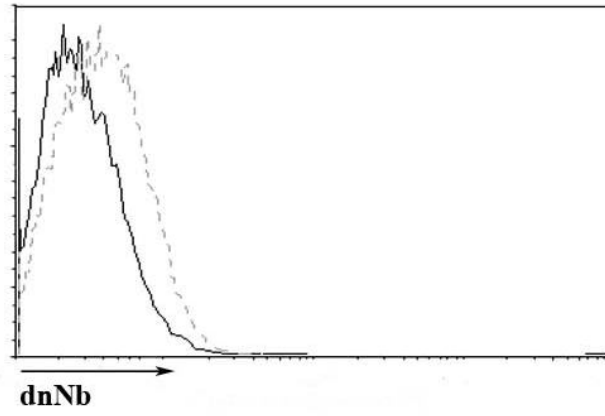


Fig.S1

A



B

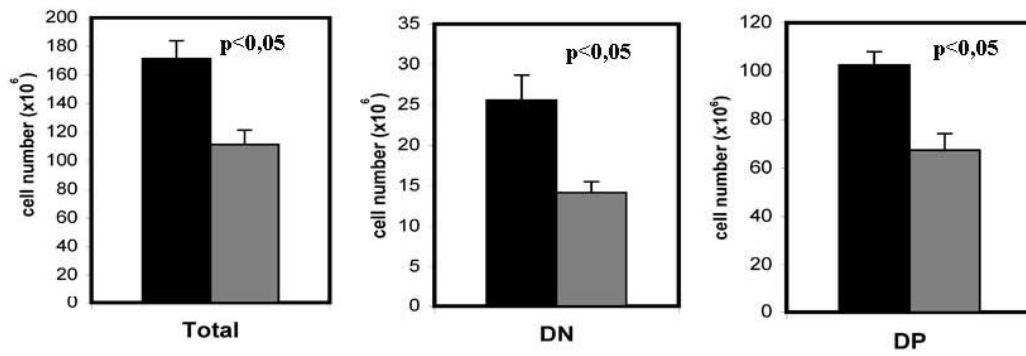


Fig.S2

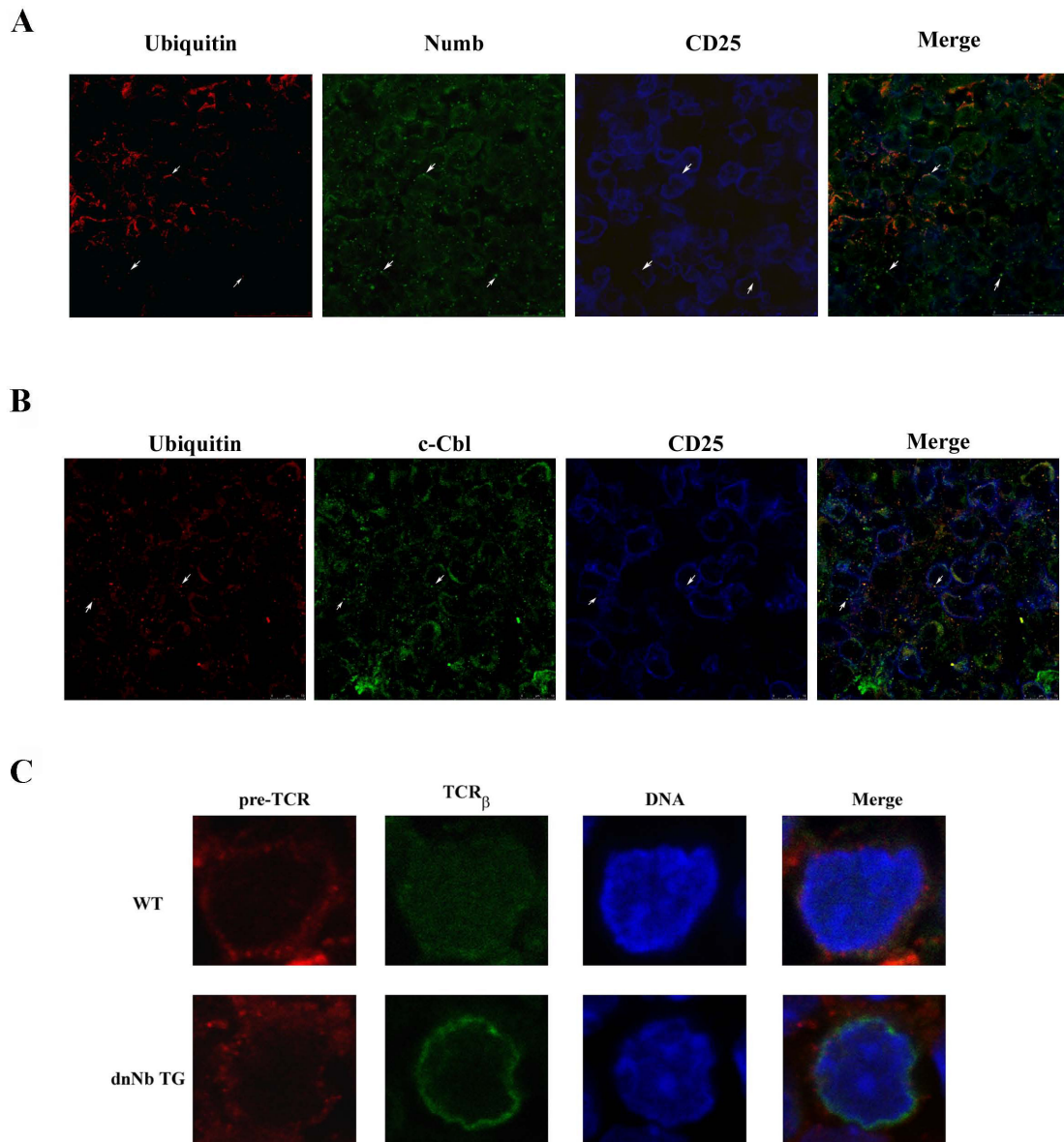


Fig.S3