

Papel de la proteína DLK1/Pref-1 en los diferentes sistemas celulares

Ricardo A. Puertas-Avendaño^{1,2*}, Luis G. Hernández-Abad¹, Ibrahim González-Marrero¹, Ana Canerina-Amaro², Raquel Marín², Miriam González-Gómez¹.

¹Departamento de Ciencias Médicas Básicas, Facultad de Medicina, Universidad de La Laguna, La Laguna, Tenerife. Islas Canarias. España.

²Departamento de Fisiología, Laboratorio de Neurobiología Celular, Facultad de Medicina, Universidad de La Laguna, La Laguna, Tenerife. Islas Canarias. España.

*Correspondencia: rapabio@hotmail.com

Recibido: 22-noviembre-2016, revisado: 21-diciembre-2016, aceptado 24-diciembre-2016

Resumen

Papel de la proteína DLK1/Pref-1 en los diferentes sistemas celulares

El ligando no canónico (no clásico) de la ruta de señalización Notch, Delta like-1 (DLK1) se expresa durante todo el desarrollo fetal y se limita a pocos órganos y/o tejidos en la edad adulta. Actualmente, DLK1 es el ligando no clásico de Notch mejor estudiado, e in vitro actúa inhibiendo Notch, pero in vivo, su acción es poco clara. Niveles de expresión de Dlk1 determinan el curso de la diferenciación y la proliferación celular, y en tejidos como la glándula hipofisaria su expresión es necesaria para el mantenimiento de la población de células somatotropas (GH) y la homeostasis de los diferentes ejes adenohipofisarios. Alteraciones en la ruta Delta-Notch han sido asociadas a diversos procesos fisiopatológicos tales como; Prolactinomas, carcinoma hepático, y cáncer gástrico, entre otras. Los estudios analizados en esta revisión muestran tres aspectos a resaltar. Primero, que los mecanismos de señalización y/o regulación Delta-Notch son cruciales en el control de la proliferación celular y el mantenimiento indiferenciado de células madre. Segundo, que la impronta paterna de Dlk1 es clave para la compresión de procesos patológicos y tercero, que existe la necesidad de realizar más estudios in vivo sobre la expresión de Dlk1, los cuales arrojarían mayor claridad en el papel de este gen.

Palabras clave: DLK1, ruta de señalización Delta-Notch, ligando no canónico de Notch (no clásico).

Summary

Role of DLK1 / Pref-1 protein in different cell systems

The non-canonical (non-classical) ligand of the Notch signaling pathway, Delta like-1 (DLK1) is expressed throughout fetal development, and is limited to few organs or tissues in adulthood. Presently, DLK1 is the best studied non-classical ligand of Notch. In vitro, this gen acts inhibiting Notch whereas, in vivo, its action is unclear. The

levels of DLK1 expression determine the course of cell differentiation and proliferation. In some tissues, such as the pituitary gland, DLK1 expression is required for the maintenance of the somatotropic (GH) cells population, and also for the homeostasis of the different adenohipophysial axes.

Alterations in the Delta-Notch pathway have been associated with several pathophysiological processes such as, prolactinomas, hepatic carcinoma, and gastric cancer, among others. The studies discussed in this review tackle three important aspects of DLK1 regulation and function. First, that the mechanisms of signaling and/or regulation of Delta-Notch are crucial in the control of cell proliferation, and undifferentiated maintenance of stem cells. Secondly, that the paternal imprint of DLK1 is key to the compression of pathological processes and third, that there is a need for further in vivo studies on the expression of DLK1, in order to further clarify the role of this gene.

Keywords: DLK1, Delta-Notch signalling pathway, non-canonical Notch ligand (non-classical).

Introducción

Delta like-1 (DLK1) también es conocido como factor preadipocítico 1 (Pref-1) dada su acción reguladora en la diferenciación adipocítica [49], es una proteína transmembrana que pertenece a la familia Notch/serrate/delta [50,49]. DLK1 fue aislado e identificado por primera vez en humanos y ratón, posteriormente se identificó en líquido amniótico humano del segundo trimestre de gestación y se le denominó antígeno fetal 1 (FA1) [40]. Además se le ha llamado con otros nombres: pG2 (aislado a partir de un clon de cDNA el cual se encontraba sobre expresado en feocromocitomas [52] y ZOG (factor específico de la zona del glomérulo de la glándula adrenal) el cual es homólogo a Dlk1 en ratas. Todos estos genes codifican para la misma proteína, DLK1.

Diversos estudios han informado que Dlk1 es un gen con impronta paterna debido a una metilación diferencial de los alelos paterno y materno [85, 96,103]. Teniendo en cuenta el papel desempeñado por los genes con impronta parental en el crecimiento y desarrollo fetal [67,77,101], y que Dlk1 está altamente expresado en los tejidos embrionarios, es probable que, además del control de varios procesos de diferenciación, Dlk1 participe en el control del crecimiento celular in vivo. Por otro lado, la elevada expresión de Dlk1 en células endoteliales que recubren el vaso sanguíneo fetal del laberinto placentario [104] argumenta a favor de un importante papel de Dlk1 en el control del crecimiento fetal. De hecho, los ratones deficientes en Dlk1 muestran en el nacimiento un retraso del crecimiento [65].

Estructura de la proteína DLK1

DLK1 se sintetiza como una proteína de 385 aminoácidos [94], con una secuencia señal en su extremo N-terminal. Posee una región intracelular corta, un dominio transmembrana y un dominio extracelular en el que se encuentran seis secuencias repetitivas similares al factor de crecimiento epidérmico (Epidermal Growth Factor, EGF) que contiene 6 cisteínas conservadas para la formación de 3 enlaces disulfuro, así como otros aminoácidos característicos de las proteínas que presentan estos dominios de repetición tipo EGF [49] (Figura. 1). La secuencia extracelular de DLK1 es homóloga a la secuencia encontrada en proteínas EGF, tales como los receptores Notch y sus ligandos: Serrate, Jagget y especialmente Delta. Con este último, DLK1 guarda mayor homología, de ahí el nombre de DLK1 (Delta-like 1) [49].

Esta proteína se procesa proteolíticamente en un sitio próximo a la membrana y al extremo N-terminal para generar las formas solubles, una porción mayor de 50 kDa y una más pequeña de 25 kDa. Este procesamiento de la proteína tiene lugar por medio de una proteasa de la familia ADAM, la enzima convertidora de TNF- α (TACE, ADAM17) [101]. Debido al empalme alternativo (alternative splicing) que se da a nivel del transcrito primario de ARNm de Dlk1 se produce una reorganización de las secuencias repetitivas de tipo EGF, ubicándose más próximas a la membrana celular [2,26]. Por ello, es posible encontrar varias isoformas de la proteína DLK1 [90].

En años anteriores, se describió que Dlk1 se encuentra en un grupo de genes regulados por la impronta genómica paterna ("patern imprinted") [45,85,103]. La impronta parental supone que un gen se expresa exclusivamente a partir de solo uno de los alelos, del padre o de la madre. Esta modificación epigenética se originó en mamíferos hace más de cien millones de años, posiblemente como resultado del conflicto interparental para regular el crecimiento fetal dentro del útero materno [43]. En este sentido, los genes expresados

a partir del alelo paterno tienden a estimular el crecimiento fetal a expensas de los genes de la madre (Los genes expresados por el alelo materno tienden a frenar el efecto estimulador del crecimiento). En el caso de Dlk1, tal como lo hemos mencionado, se expresa a partir del alelo paterno y se encuentra localizado en la zona distal del cromosoma 12 del ratón (12F1), y en el brazo largo del cromosoma 14 en humanos (14q32) [60,9,10].

Se ha demostrado que la organización y la impronta del dominio Dlk1-Dio3 están altamente conservadas en humano, ratón y cordero [73,16,66]. Este dominio además es muy importante en la generación de células madre pluripotentes inducidas, ya que la generación de estas células normalmente da lugar al silenciamiento epigenético del cluster. Dicho dominio se encuentra activado en células totalmente pluripotentes y reprimido en células parcialmente pluripotentes. Así, el grado de activación de esta región está directamente relacionado con el nivel de pluripotencia de las células madre [93]. Por ello, la modulación de la impronta genómica en las células madre aporta un nuevo nivel de regulación epigenética para establecer y mantener estas células.

En el ratón, Dlk1 se expresa en el decimoprimer día del período embrionario, aumentando su expresión hasta el final de la gestación [104]. A los 12,5 días del período embrionario los niveles de expresión de Dlk1 son elevados en la glándula hipofisaria, páncreas, pulmón, glándula adrenal, placenta y tejidos derivados del mesodermo (músculo esquelético y cartílago) [87,28,95,26]. Sin embargo, en la edad adulta del ratón, Dlk1 se expresa en pocos tejidos entre los cuales están; la glándula hipofisaria, glándula adrenal, testículo, músculo esquelético, neuronas monoaminérgicas en el sistema nervioso central, próstata y ovarios [87,15,34].

Comparativamente, embriones humanos, la expresión de Dlk1 es similar a la encontrada en ratón. Pero en la edad adulta, solo se ha reportado la expresión de Dlk1 en células β -pancreáticas, células somatotropas y demás células productoras de hormonas adenohipofisarias, medula ósea, glándula adrenal y musculo esquelético [40,85,28,75].

La proteína DLK1 fue una de las primeras proteínas descritas como ligando no canónico (ligando no clásico) de la ruta de Notch, debido a la homología estructural que tiene con la familia de proteínas Notch/Delta/Serrate. Sin embargo no contiene el dominio DSL (Delta-Serrate-LAG2) que sí presentan los ligandos canónicos (clásicos) de Notch en la región extracelular, y que es necesario para que se dé el reconocimiento y la interacción entre el ligando y el receptor [97,33]. En su lugar presenta un dominio DOS (Delta y OSM-11) en su extremo N-terminal. Este dominio está presente en algunos ligandos canónicos de los receptores

Notch, y en proteínas solubles y/o ancladas a la membrana, que van a colaborar en la activación de la ruta de Notch con los ligandos que contienen el dominio DSL [46,47].

Hasta la fecha, se sabe poco sobre los mecanismos moleculares de acción de DLK1. Tanto la estructura de DLK1 como el patrón de expresión, sugieren que podría funcionar de manera similar a otros miembros de la familia de proteínas homeóticas de tipo EGF, desencadenando una señal específica a través de la interacción de sus repeticiones de tipo EGF con dominios específicos de otras proteínas. Sin embargo, DLK1 carece de dominios específicos funcionales característicos de los receptores o ligandos pertenecientes a la familia de EGF [7], lo que aumenta la dificultad de esclarecer los mecanismos de acción de DLK1. Por ejemplo, y según Baladrón y cols, [7] es complejo determinar si DLK1 actúa como un receptor o funciona como un ligando, basado en homología estructural. Sin embargo, la falta de los dominios funcionales DSL, abre la posibilidad de que DLK1 puede actuar como una molécula reguladora, modulando la función de los ligandos de EGF o receptores que, a su vez, regulan el crecimiento y la diferenciación celular. Hay un gran número de evidencias experimentales que demuestran que DLK1 participa en estos procesos. Entre otras funciones, DLK1 regula la adipogénesis y modula la señalización activada por los receptores de insulina/IGF-I [87,88,31,81]. DLK1 no solo modula a la IL7, necesaria para el crecimiento y proliferación de las células pre-B [8], sino que afecta el desarrollo de los timocitos [42] e inhibe la formación de colonias progenitoras hematopoyéticas [72]. DLK1 también se ha implicado en la cicatrización de heridas [83] y otros procesos de crecimiento y diferenciación [50].

Además, tenemos que mencionar que según los resultados obtenidos por Ohno y cols, [72] y Baladrón y cols, [6], DLK1 interactúa con sí misma, lo que sugiere que la dimerización podría ser una forma de regulación de la función de DLK1. La dimerización de DLK1 podría afectar también a la interacción de DLK1 con Notch o sus ligandos. Por lo tanto, los niveles de expresión de Dlk1 pueden influir en el grado de dimerización, y esto podría ser un camino por el cual la interacción entre DLK1 y Notch1 podría, a su vez, ser modulada. En este sentido, también es importante mencionar que DLK1 es una proteína fuertemente glicosilada [48] y que su capacidad de interactuar con sí misma y con Notch, puede ser también controlado de esta manera.

Función de DLK1 en diversos sistemas celulares.

Desde su descubrimiento, la proteína DLK1, dada su múltiple expresión diferencial, ha sido asociada a diversos sistemas celulares, incluida la diferenciación celular a partir de progenitores mesenquimales derivados de médula ósea [12]. La

proteína DLK1 también es un marcador de células madre y recientemente se ha demostrado la implicación de DLK1 en la neurogénesis [27]. La forma soluble de la proteína secretada por los astrocitos se une a la forma de DLK1 anclada en la membrana de las células madre neuronales, manteniendo así la capacidad de autorenovación de las mismas [27]. También es un marcador de células madre en el hígado fetal humano [62], y además está implicado en el proceso de condrogénesis temprana a partir de células progenitoras [35]. De tal modo, que la expresión del gen *Dlk1* y sus variantes pueden determinar el curso de la diferenciación celular [68].

DLK1, ligando no canónico de Notch en sistemas de diferenciación celular.

Hemos mencionado que *Dlk1* se expresa en muchos tejidos embrionarios con altos niveles de expresión en placenta, hígado, tejido adiposo, músculo esquelético, pulmón, vértebras, adrenal y glándula hipofisaria. En contraste, en el adulto la expresión de *Dlk1* está restringida a tejidos neuroendocrinos como la glándula hipofisaria, adrenal, páncreas, neuronas monoaminérgicas del sistema nervioso central, testículo, próstata y ovarios. En todos ellos se encuentran activadas las rutas de señalización de Notch [51,30,32,96,34].

El hecho de que *Dlk1* sea un gen con impronta paterna, junto a su participación en las rutas de señalización de Notch, sugieren un importante papel para DLK1 durante la maduración y el destino de diversos grupos celulares y/o tejidos. Además, DLK1 mediante cascadas de señalización Notch, ha sido asociado a diversos procesos fisiopatológicos en niños, tales como hepatoblastomas, neuroblastomas y nefroblastomas [56,29,58] y en adultos a algunos tumores malignos como el síndrome mielodisplásico, tumores hipofisarios, carcinomas mamarios, carcinomas colon y próstata. Todo lo anterior pone de manifiesto el papel de DLK1 en el destino celular, incluido tejidos en edad adulta.

DLK1 en el desarrollo muscular.

La mutación llamada Callipyge (CLPG) en ovinos se caracteriza por una hipertrofia muscular esquelética (aumento de las fibras de tipo IIB de la miosina en los cuartos traseros de estos animales) y está asociada a una sobre-expresión de *Dlk1* postnatal. Este efecto también es observado en un modelo transgénico de ratón en donde son elevados los niveles de expresión de *Dlk1* [23]. Por otra parte, en modelos carentes de *Dlk1* se ha reportado una reducción en la masa muscular esquelética y disminución en el número de miofibras [99]. Estos hallazgos muestran que *Dlk1* participa en la regulación del crecimiento de las fibras musculares durante el desarrollo y que postnatalmente persiste la expresión de *Dlk1* en el músculo esquelético contribuyendo directamente en la hipertrofia muscular observada en ovinos CLPG.

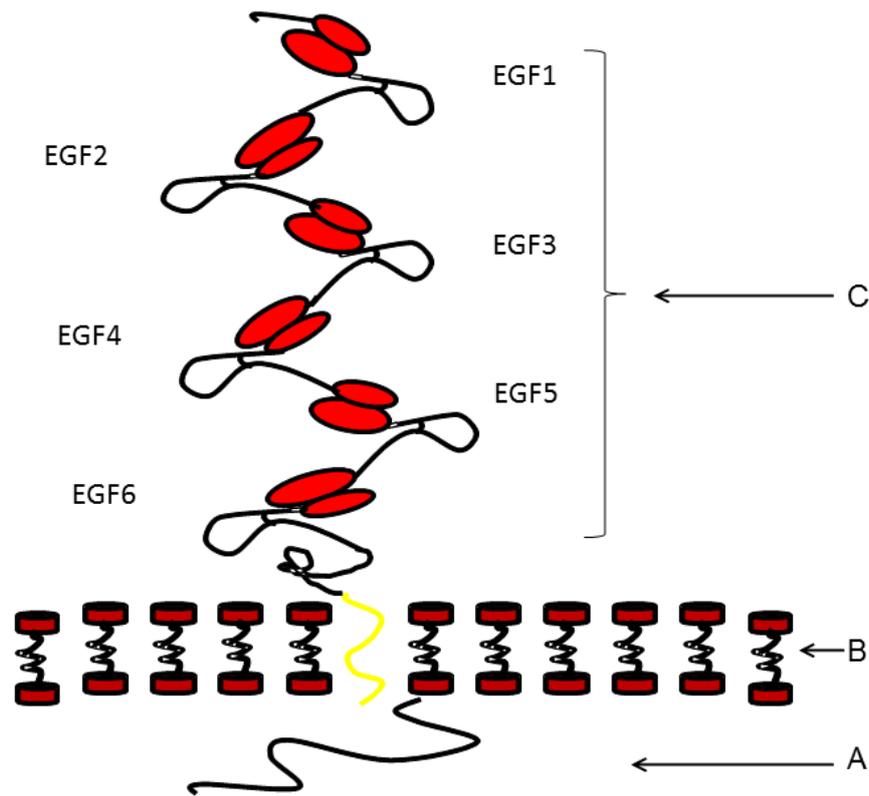


Figura 1. Dibujo esquemático de la proteína integral de membrana DLK1, en la que se representa la región intracelular corta (A), un dominio transmembrana (B) y una región extracelular con seis repeticiones en tándem de tipo EGF (C)

DLK1 en el desarrollo del hígado fetal.

Dlk1, Notch1, Notch2 y Jagged1 son algunos de los genes transcritos más abundantes en hígado embrionario de ratón y prácticamente son indetectables justo antes del nacimiento [57,95,94]. Las células DLK1 inmunoreactivas del hígado fetal muestran un alto potencial proliferativo y son capaces de diferenciarse en hepatocitos y colangiocitos en comparación con las células DLK1 no inmunoreactivas. Lo cual implica que las células del hígado DLK1 inmunopositivas, aún son hepatoblastos [95].

DLK1 en la reparación tisular.

En la cepa de ratones Murphy Roth Large (MRL) con lesiones infligidas en el tejido de la oreja, se ha detectado expresión de Dlk1 en células mesenquimales no diferenciadas adyacente a la zona de reparación, sugiriendo la implicación de Dlk1 en procesos de cierre de heridas. Interesantemente, es en ésta cepa de ratones donde más se expresa Dlk1 y los que mayor capacidad de reparación tisular presentan [79,29].

DLK1 en la adipogénesis.

Dlk1/Pref-1 está altamente expresado en preadipocitos de murinos, y según Smas y Sul, [87]

su expresión está totalmente ausente en adipocitos maduros. Sin embargo actualmente existen evidencias de una débil expresión de Dlk1 en tejido adiposo diferenciado de ratón [76]. Adicionalmente, Marit y cols, [61] han demostrado que DLK1 se expresa en tejido adiposo blanco subcutáneo y visceral de humanos adultos. Sin embargo, la línea celular 3T3L1 es frecuentemente usada para el estudio de los mecanismos de diferenciación adipocítica después de la inducción hormonal [8,20]. En el caso de la adipogénesis en cultivos de líneas celulares, los incrementos en los niveles de expresión de Dlk1 están relacionados con una disminución de los niveles de ARNm de Notch, lo que resulta en una inhibición de la adipogénesis [80]. Este hallazgo, apoya la hipótesis de que Dlk1 actúa como un regulador negativo en la ruta de señalización Notch [80]. Este mismo efecto inhibitorio de la adipogénesis también es observado en ausencia de expresión de Dlk1 [87]. Niveles intermedios de expresión de Dlk1, en particular aquellos que favorecen la expresión de las variantes de membrana frente a las variantes que generan isoformas secretadas facilitan la diferenciación adipocítica en respuesta a inductores

de la diferenciación como la insulina/IGF-1 [63]. Estos hallazgos indican que Dlk1 no es solo un inhibidor de la adipogénesis, sino que su papel “adipogénico” es dependiente del contexto biológico. Datos recientes muestran que Dlk1 puede actuar sobre la adipogénesis (sobre las células adipocíticas), modulando directa o indirectamente la expresión de receptores de hormonas hipofisarias implicadas en la diferenciación adipocítica, específicamente a través del receptor de TSH, y a nivel hipofisario, regulando al menos, la proliferación de células GH [76].

Otro efecto directo de Dlk1 en la adipogénesis, detectado en ratones transgénicos con sobreexpresión de Dlk1 en adipocitos específicos, está sustentado en la observación del decrecimiento en el tamaño de todos los tejidos adiposos, incluido el pardo [53].

Ahora bien, numerosos datos indican que los niveles de expresión de Dlk1 afectan en gran medida la diferenciación adipocítica de las células 3T3-L1 [31,63]. Sin embargo, este proceso requiere de la expresión de Notch1 durante la adipogénesis de las células 3T3-L1 [30]. En consistencia con lo anterior, Sciaudone y cols, [84] han promovido la diferenciación de adipocitos de células estromales de médula ósea murina, usando un promotor de Notch1 en presencia de cortisol. Adicionalmente, los datos reportados por Baladrón y cols, [5] concuerdan con un papel de DLK1 en la regulación de la adipogénesis mediante la modulación de la señalización de Notch. Además, con anterioridad Garcés y cols, [31] demostraron que el péptido DLK1 de forma plegada, pero no desplegada, correspondiente a la quinta repetición de DLK1 similar a EGF, fue capaz de inhibir la diferenciación adipocítica cuando se añade al medio de cultivo de células 3T3-L1, inducidas a someterse a la adipogénesis. Por su parte, Baladrón y cols, [5] mostraron que los péptidos de forma plegada de DLK1 similares a las secuencias 4, 5 y 6 del EFG inhiben la actividad de Notch.

Por otra parte, es importante recordar en este punto, que las variantes secretadas (solubles) de DLK1 inhiben la diferenciación adipocítica, mientras que las variantes ancladas a la membrana no lo hacen, de hecho, estas variantes ancladas parecen jugar un efecto positivo en la diferenciación [31,63]. Por lo tanto, las variantes secretadas de DLK1 podrían ser antagonistas de la señalización Notch, mientras que las variantes de membrana pueden no tener un efecto inhibitorio o incluso puede funcionar como un agonista.

En resumen, todos los datos indican la existencia de una nueva forma de regulación de la actividad de Notch1 en los vertebrados a través de la interacción de Notch1 con DLK1, una proteína que sólo está presente en animales superiores [49]. Diferentes

trabajos sugieren que DLK1 se une a Notch1 y compete con la unión de sus ligandos, inhibiendo su activación, que a su vez regula HES-1 y posiblemente otros blancos activados por Notch1. Estos resultados abren el campo a la nueva investigación sobre el papel de DLK1 en la modulación de la señalización de Notch en diferentes sistemas, incluido, pero no por ello limitados a la adipogénesis, la hematopoyesis, la diferenciación del sistema nervioso, y el cáncer.

DLK1 en la diferenciación celular y función endocrina.

La proteína DLK1/FA1 puede ser un marcador de subtipos celulares con potencial regenerativo (células madre) y de células con una función endocrina o neuroendocrina [28]. En tal sentido, Ferrón y cols, [27], mostraron que en ratones deficientes para Dlk1 exhiben defectos en la neurogénesis postnatal dentro de la zona subventricular. Por otro lado, y sustentando el papel endocrino de DLK1 está la observación de una correlación inversa entre los niveles de DLK1 en suero y la hormona de crecimiento (GH) [59,104,70]. Así cuando hay niveles elevados de GH circulante, la cantidad de DLK1 soluble en suero es baja. La hormona de crecimiento ejerce muchos de sus efectos estimulando la producción de IGF-1, y la sobreexpresión de Dlk1 disminuye la señalización del factor de crecimiento de insulina 1 (IGF-1), lo que refleja la capacidad de Dlk1 para disminuir GH [59,104,70].

DLK1 en células adenohipofisarias del ratón adulto.

En el período embrionario, embriogénesis, la glándula hipofisaria experimenta la activación de una cascada de factores de transcripción y vías de señalización [11] que contribuyen a la aparición de los diferentes tipos celulares productores de hormonas adenohipofisarias y neurohipofisarias, y aunque el número de células de cada población aumenta después del nacimiento [13] puede variar a lo largo de la vida en respuesta a las demandas fisiológicas [54]. Estos cambios en el número de células y su función están bajo el control de señales hipotalámicas y periféricas [54,55]. No obstante, también se considera la participación de factores paracrinos y autocrinos [24]. Los factores paracrinos están implicados en la regulación de la diferenciación de progenitores multipotentes o células madre hipofisarias, descrito por Rizzoti y cols, [78]. En este sentido, la vía de Delta-Notch es una vía de señalización conservada evolutivamente que controla una amplia gama de procesos en el desarrollo embrionario incluido la determinación del destino celular, la diferenciación terminal y la proliferación celular en diversos sistemas celulares, así como en la glándula hipofisaria [17,4,26].

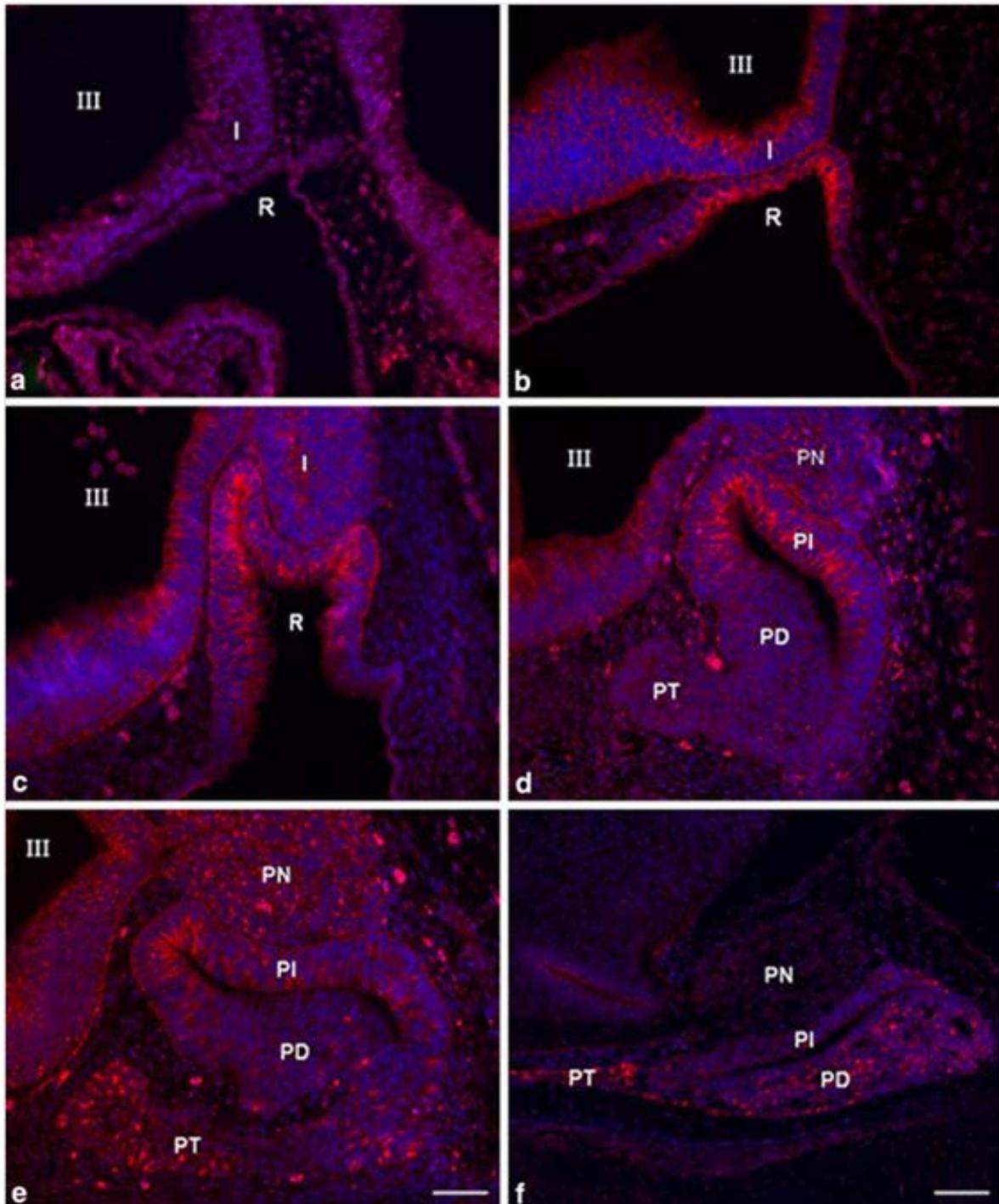


Figura 2. Inmunolocalización de DLK1 en la glándula hipofisaria de la rata durante el desarrollo embrionario. (a) No se observan células DLK1 inmunopositivas en la bolsa de Rathke's (R) y el infundíbulo (I) del estadio E10.5. (b) La inmunotinción para DLK1 (rojo) se observa en (R) en la línea interna y externa a lo largo del III ventrículo y el infundíbulo en el E11.5. (c) DLK1 (rojo) fue observado de manera similar en el E12.5. (d) DLK1 (rojo) también es observado en el E14.5 en la pars distalis (PD), pars intermedia (PI) y pars nervosa (PN). (e) DLK1 (rojo) se observa en todas las partes de la hipófisis en el E15.5. (f) En el E19.5, DLK1 (rojo) se observa en PD y pars tuberalis (PT), pero no en PI y PN. Los núcleos se presentan teñidos con DAPI (azul). Escala de barra (a-e) 50µm, en (f) 100 µm. Tomado de Nakakura y cols, [71].

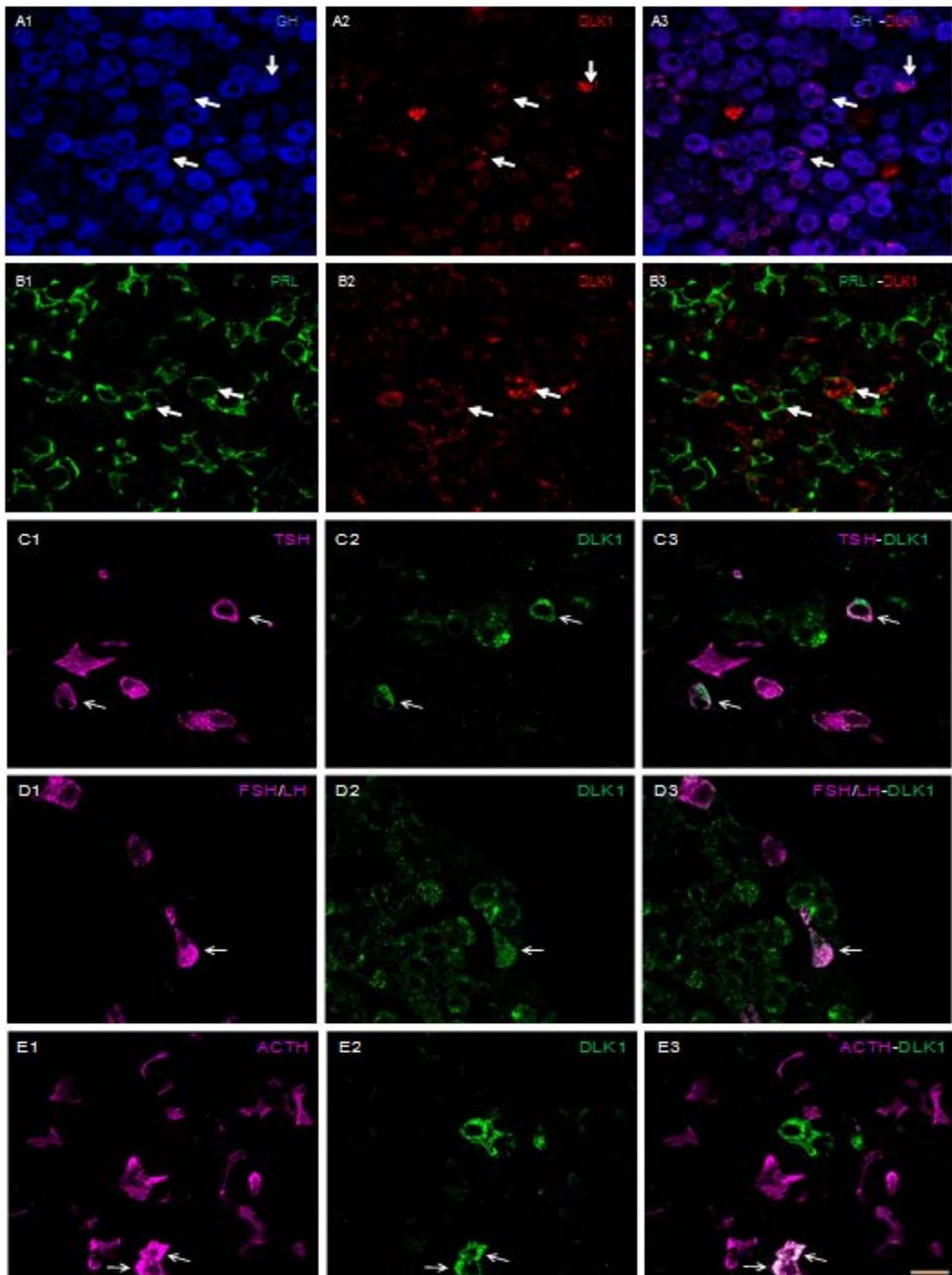


Figura 3. Identificación de células adenohipofisarias productoras de hormonas que expresan DLK1 mediante doble marcaje. La primera columna muestra los tipos celulares productoras de hormonas, la segunda las células DLK1 positivas y la tercera las células doblemente marcadas (flechas). Las imágenes se han ordenado en orden decreciente de colocalización, es decir, de mayor a menor porcentaje de tipos celulares que presentan DLK1. Barra de escala: 10 μ m. Tomado de: Puertas-Avendaño R.A [76].

Los receptores Notch y sus ligandos son proteínas transmembrana que pertenecen a la familia de proteínas del Factor de Crecimiento Epidérmico (EGF). En mamíferos, se han descrito cuatro receptores Notch (Notch1-4) y cinco ligandos activadores canónicos o clásicos (Jagged1, Jagged2, DLL1, DLL3 y DLL4). Además de los ligandos canónicos, los ligandos no canónicos o no clásicos pueden unirse a receptores Notch, pero la función precisa de estos ligandos sigue siendo poco clara [69]. La proteína DLK1, es el ligando no canónico de Notch mejor estudiado, se ha demostrado que actúa como un inhibidor de la señalización de Notch *in vitro* [7,68]. Estudios del patrón de expresión de Dlk1, demuestran que los niveles de ARN dependen del estadio del desarrollo embrionario del ratón, decreciendo gradualmente a partir del E18.5 hasta la edad adulta [103,94]. Así mismo, en el desarrollo de la glándula hipofisaria de la rata, sitúan a DLK1 en todo el desarrollo de esta glándula y su expresión permanece incluso en

la edad adulta [71] (Figura 2), y es éste uno de los pocos órganos que mantiene su expresión después del nacimiento y la edad adulta [103, 67,19].

Durante el desarrollo de la glándula hipofisaria entre las semanas E11 y E17 todos los tipos celulares productores de hormonas están completamente diferenciados [98,91], periodo en el que hay niveles muy bajos de expresión hipofisaria de Dlk1, así como del receptor Notch y sus ligandos [105]. La observación de la expresión de DLK1 en el desarrollo hipofisario, sugiere que este ligando no clásico, puede tener un papel primordial en la regulación y diferenciación de los diferentes tipos celulares adenohipofisarios mediante mecanismos de señalización Notch [26,19]. Adicionalmente, Larsen y cols, [51], Floridón y cols, [28], Hedlund y cols, [36], Yevtodiyyenko y Schmidt, [103], Ansell y cols, [3], han demostrado que DLK1 regula la transcripción del ARNm de la hormona de crecimiento (GH).

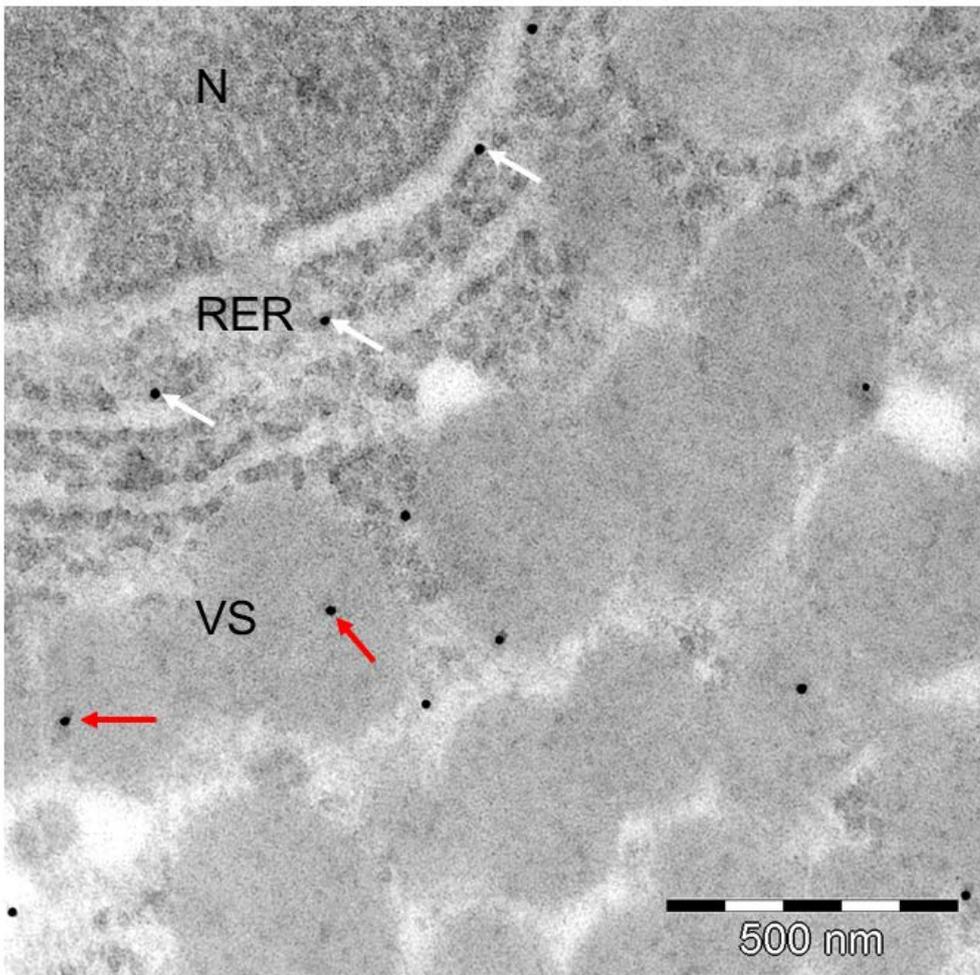


Figura 4. Microfotografía electrónica ilustrando la localización subcelular de DLK1 en el retículo endoplasmático rugoso (RER; flechas blancas) adyacente al núcleo (N) y dentro de las vesículas de secreción (VS; flechas rojas). Barra de escala: 500 nm. Esta microfotografía forma parte del estudio de la Tesis Doctoral de: Puertas-Avendaño R.A [76].

Ahora bien, otros estudios también señalan la presencia de DLK1 en la glándula hipofisaria en la edad adulta [51,2,103,3] reportando su expresión en la región Golgi de células somatotropas y lactotropas. No obstante, Nakakura y cols, [71] reportan la inmuno-expresión de DLK1 en la glándula hipofisaria en el desarrollo y la edad adulta de la rata, ubicando su presencia en todos los tipos celulares productores de hormonas adenohipofisarias, mayoritariamente en células somatotropas y lactotropas. Del mismo modo, Puertas-Avendaño y cols, [75], demuestran que todos los tipos celulares adenohipofisarios del ratón adulto expresan la proteína DLK1, y usando ratones deficientes (Knockout) para *Dlk1*^{-/-}, mostraron que el número de células GH estuvo significativamente disminuido respecto a los ratones control, lo que pone de manifiesto el papel de DLK1 en el mantenimiento de esta población celular. Adicionalmente y en un estudio reciente, Puertas-Avendaño [76] demostró que las células productoras de hormonas adenohipofisarias que mayoritariamente expresan DLK1 son las células somatotropas (GH), seguido de lactotropas (PRL), tirotropas (TSH), gonadotropas (FSH/LH) y corticotropas (ACTH). Tabla 1 y (Figura 3). A este respecto e interesantemente, Cheung y cols, [18] demostraron que en los ratones Knockout para *Dlk1*, los ejes adenohipofisarios estaban alterados en comparación con los ratones control, sugiriendo que la expresión de la proteína DLK1 en las células

adenohipofisarias ejerce un papel modulador de estas hormonas.

Por otra parte, Puertas-Avendaño y cols, [75], informan por primera vez, la ubicación subcelular de DLK1 en el retículo endoplasmático rugoso (RER) y dentro de las vesículas de secreción de las células adenohipofisarias (Figura 4), lo que sugiere la presencia de la forma soluble de la proteína. No obstante, en un trabajo previo por Smas y col, [88] plantearon que la forma soluble de DLK1 deriva de la escisión proteolítica de esta proteína asociada a la membrana. Sin embargo, el hecho de que DLK1 se encuentre dentro de las vesículas de secreción indica que la escisión también puede tener lugar en el aparato Golgi, y que la forma soluble de DLK1 se libera desde las vesículas de secreción junto con la hormona GH o las otras hormonas adenohipofisarias que la contienen y una vez liberada, puede actuar de forma paracrina sobre las células vecinas o de forma endocrina, liberándose a la sangre. En tal sentido, Ferrón y cols, [27] demostraron que durante la neurogénesis postnatal, la isoforma de DLK1 secretada por nichos de astrocitos es requerida por la isoforma de DLK1 anclada a la membrana de células madre neural, lo que estimula su auto-renovación. Ello permite sugerir que, la forma soluble de DLK1 liberada desde las vesículas de secreción podría actuar autocrina o paracrinamente, uniéndose a la forma anclada a la membrana, o bien, contribuir a los niveles séricos de DLK1 en sangre [75].

Células productoras de hormonas adenohipofisarias, CPHA-DLK1	% de células doblemente inmunopositivas
Células GH-DLK1	70.0%
Células PRL-DLK1	49.3%
Células TSH-DLK1	11.0%
Células FSH/LH-DLK1	7.6%
Células ACTH-DLK1	6.7%

Tabla 1. Distribución porcentual de células productoras de hormonas adenohipofisarias (CPHA) que son DLK1-inmunopositivas en el ratón adulto. Porcentaje de células productoras de hormonas adenohipofisarias que también son DLK1 inmunopositivas (CPHA-DLK1), en el lóbulo anterior de ratones adultos silvestres. GH: células somatotropas; PRL: células lactotropas; TSH: células tirotropas; FSH/LH: células gonadotropas; ACTH: células corticotropas. Tomado de: Puertas-Avendaño R.A [76]

DLK1 en la regulación endocrina de la hipófisis y el tejido adiposo.

Apoyando el papel de DLK1 como regulador endocrino, tal como ya lo hemos mencionado anteriormente, está el hecho de que se expresa en todos los tipos celulares productores de hormonas adenohipofisarias, fundamentalmente en células somatotropas y lactotropas [71,75,76,19]. Ejerciendo en estas células funciones relacionadas con la diferenciación celular en el desarrollo y la secreción de hormonas [71,75]. Además, de expresarse en otras células endocrinas como las β -pancráticas en donde se le ha sugerido un papel en la diferenciación y crecimiento de estas células [14]. Por otro lado, actualmente numerosos estudios sitúan a DLK1 y sus variantes en el control de la diferenciación del mayor órgano endocrino descrito hasta el momento, el tejido adiposo [49,87,8,65,76].

Dlk1, factor epigenético. Epigenética. Concepto

Aunque la Epigenética sea normalmente considerada como una disciplina muy moderna, fue Aristóteles (384-322 a.C.) quien utilizó ya un concepto de epigénesis: el desarrollo de la forma orgánica del individuo a partir de materia amorfa. La definición que la RAE da de epigénesis es la de teoría según la cual los rasgos que caracterizan a un ser vivo se modelan en el curso del desarrollo, sin estar preformados en el germen. La definición más usual es “el estudio de cambios heredables en la función génica que se producen sin un cambio en la secuencia del ADN” [25].

Con mayor precisión, Holliday [37] definió la Epigenética como “los cambios en la función de los genes que son heredables por mitosis y por meiosis, que no entrañan una modificación en la secuencia del ADN y que pueden ser reversibles”. De acuerdo con ello, las funciones de los genes pueden ser de dos niveles: a) transmisión del material genético de generación en generación, lo que sería el campo de la genética; b) ¿cómo funcionan durante el desarrollo de un organismo desde la fertilización del óvulo hasta el adulto?, lo que sería el campo de la epigenética.

Ahora bien, el dominio Dlk1-Dio3 contiene el gen Dlk1 y como ya sabemos, este es un gen con “impronta paterna” es decir, está normalmente implicado en el desarrollo embrionario, pero ocasionalmente también puede funcionar incorrectamente como oncogén y/o gen supresor de tumores [19,38]. Dlk1-Dio3 está diferencialmente expresado en varias patologías humanas y ha sido implicado en la patogénesis de varias enfermedades humanas, especialmente cáncer [10]. En el cáncer de pulmón de pacientes fumadores, se ha informado de una hipometilación de este locus [66]. Y por otro lado, en Lupus de Murino está asociado con una hipometilación global del DNA de éste locus [22] y en Lupus Humano, Dlk1-Dio3 se expresa de manera desregulada [90,10].

Dlk1, un gen con “impronta” que podría contribuir en el carcinoma hepatocelular humano.

DLK1 se expresa fuertemente en el hígado fetal de ratón hasta la etapa E16.5, pero no se expresa en hígado adulto [41]. Lo que implica que DLK1 está involucrado en el desarrollo del hígado. De igual modo, DLK1 se expresa clara y fuertemente en la regeneración de hígado de rata en un modelo de hepatectomía [82]. Por su parte, Huang y cols, [38] encontraron que DLK1 se sobreexpresa frecuentemente en muestras de carcinoma hepatocelular humano (HCC), un cáncer común en todo el mundo, lo que implica que el HCC podría proceder de hepatoblastos primitivos o incluso de células madre hepáticas. Este grupo de investigadores demostró que el papel oncogénico de Dlk1 implica, una hipometilación del promotor del gen Dlk1 y/o una hipermetilación de la región control de impronta (ICR).

Dlk1 controla la activación de Notch1 en el cáncer gástrico.

El cáncer gástrico (CG) es aún el cuarto tipo de cáncer más común y la segunda causa principal de muertes relacionadas con el cáncer [39].

La señalización de Notch es una vía clave en la renovación de las células madre, la determinación del destino celular y la diferenciación durante el desarrollo embrionario, posnatal y la homeostasis de célula adulta [44]. Sin embargo, se sabe que Notch puede funcionar como un oncogén en varios tumores [64]. Dentro de los ligandos de Notch, DLK1, se ha demostrado que participa con frecuencia en la asignación del destino de linaje celular [21]. Un desequilibrio de la homeostasis de la auto-renovación es un requisito esencial para la tumorigénesis y la expresión desregulada de los componentes de señalización Notch con frecuencia ocurre en los tumores [64,86]. Por su parte, Piazza y cols, [74] demostraron que Dlk1 se regula por cambios epigenéticos (hipermetilación del promotor de Dlk1) en líneas celulares de GC y que la expresión Dlk1 activa la señalización de Notch 1. Los resultados de este grupo proporcionan pruebas, de que la activación Notch1 en GC es controlado por el silenciamiento epigenético del ligando DLK1, y que la inhibición de Notch1 se asocia con el tipo difuso de cáncer gástrico.

Conclusión

Desde su descubrimiento [49], Dlk1 ha sido asociado a diversos procesos que van desde la autorenovación de células madre hasta la diferenciación de diversos tejidos (destino celular), tanto en el desarrollo como en la edad adulta. La proteína DLK1 es el ligando no clásico de los receptores Notch, mejor estudiados hasta el momento, y su implicación en la adipogénesis es uno de los procesos que mayor interés despierta en

la comunidad científica, y según Smas y Sul [87] sólo se expresa en células preadipocíticas de la línea celular 3T3-L1 (estudios in vitro), estando totalmente ausente en adipocitos maduros. No obstante, recientemente se ha informado que DLK1, también se expresa en adipocitos maduros/diferenciados, in vivo, tanto en humanos como ratón [61,76]. Este hallazgo, pone de manifiesto la necesidad de estudiar mejor la proteína DLK1 y su expresión génica en modelos in vivo.

Conflicto de Intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Agradecimientos

Parte de los datos aquí mostrados (figuras 3, 4 y tabla 1) formaron parte de la Tesis Doctoral del autor principal de esta revisión y para ello se contó con la financiación de la Consejería de Educación y Ciencia. Junta de Comunidades de Castilla-La Mancha. (Ref. PIII109-0065-8194 de Dra. Carmen Diaz Delgado).

Bibliografía

1. Abdallah BM, Kassem M. New factors controlling the balance between osteoblastogenesis and adipogenesis. *Bone*. 2012; 50: 540-545.
2. Altenberger T, Bilban M, Auer M, Knosp E, Wolfsberger S, Gartner W, Mineva I, Zielinski C, Wagner L, Luger A. Identification of DLK1 variants in pituitary- and neuroendocrine tumors. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006; 340: 995-1005.
3. Ansell PJ, Zhou Y, Schjeide BM, Kerner A, Zhao J, Zhang X, Klibanski A. Regulation of growth hormone expression by Delta-like protein 1 (Dlk1). *Mol Cell Endocrinol*. 2007; 271: 55-63.
4. Artavanis-Tsakonas MA, Muskavitch. Notch: the past, the present, and the future, *Curr. Top. Dev. Biol*. 2010; 92: 1-29.
5. Baladrón V, Ruiz-Hidalgo MJ, Gubina E, Bonvini E, Laborda J. Specific regions of the extracellular domain of dlk, an EGF-like homeotic protein involved in differentiation, participate in intramolecular interactions. *Front Biosci*. 2001; 1: A25-A32.
6. Baladrón V, Ruiz-Hidalgo MJ, Gubina E, Bonvini E, Notario V, Laborda J. The EGF-like homeotic protein dlk affects cell growth and interacts with growth-modulating molecules in the yeast two-hybrid system. *Biochem Biophys Res Commun*. 2002; 22: 193-204.
7. Baladrón V, Ruiz-Hidalgo MJ, Nueda ML, Díaz-Guerra MJ, García-Ramírez JJ, Bonvini E, Gubina E, Laborda J. dlk Acts as a negative regulator of Notch1 activation through interactions with specific EGF-like repeats. *Exp Cell Res*. 2005; 303: 343-359.
8. Bauer SR, Ruiz-Hidalgo MJ, Rudikoff EK, Goldstein J, Laborda J. Modulated expression of the epidermal growth factor-like homeotic protein dlk influences stromal-cell-pre B-cell interactions, stromal cell adipogenesis, and pre-B-cell interleukin-7 requirements. *Mol Cell Biol*. 1998; 18: 5247-5255.
9. Benetatos L, Voulgaris E, Vartholomatos G. DLK1-MEG3 imprinted domain microRNAs in cancer biology. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*. 2012; 22(1): 1-15.
10. Benetatos L, Hatzimichael E, Londin E, Vartholomatos G, Loher P, Rigoutsos I, Briasoulis E. The microRNAs within the DLK1-DIO3 genomic region: involvement in disease pathogenesis. *Cell Mol Life Sci*. 2013; 70: 795-814.
11. Brinkmeier ML, Davis SW, Carninci P, MacDonald JW, Kawai J, Ghosh D, Hayashizaki Y, Lyons RH, Camper SA. Discovery of transcriptional regulators and signaling pathways in the developing pituitary gland by bioinformatics and genomic approaches. *Genomics*. 2009; 93: 449-460.
12. Caplan AL, Bruder SP. Mesenchymal stem cells: Building blocks for molecular medicine in the 21 st century. *Trends Mol Med*. 2001; 6: 259-264.
13. Carbajo-Perez E, Watanabe YG. Cellular proliferation in the anterior pituitary of the rat during the postnatal period. *Cell Tissue Res*. 1990; 261: 333-338.
14. Carlsson C, Tornehave D, Lindberg K, Galante P, Billestrup N, Michelsen B, Larsson LI, Nielsen JH. Growth hormone and prolactin stimulate the expression of rat preadipocyte factor-1/delta-like protein in pancreatic islets: molecular cloning and expression pattern during development and growth of the endocrine pancreas, *Endocrinology*. 1997; 138: 3940-3948.
15. Ceder JA, Jansson L, Helczynski L, Abrahamsson PA. Delta-like 1 (Dlk-1), a novel marker of prostate basal and candidate epithelial stem cells, is of the human prostate, *Eur. Urol*. 2008; 54: 1344-1353.
16. Charlier C, Segers K, Karim L, Shay T, Gyapay G, Cockett N, Georges M. The callipyge mutation enhances the expression of coregulated imprinted genes in cis without affecting their imprinting status. *Nat. Genet*. 2001; 27: 367-369.
17. Chen J, Gremeaux L, Fu Q, Liekens D, VanLaere S, Van Kelecom H. Pituitary progenitor cells tracked down by side population dissection. *Stem Cells*. 2009; 27: 1182-1195.

18. Cheung LYM, Rizzoti K, Lovell-Badge R, Tissier PR. Pituitary Phenotypes of Mice Lacking the Notch Signalling Ligand Delta-Like 1 Homologue. *Journal of Neuroendocrinology*. 2013; 25: 391-401.
- 19-Chu-Fan Mo, Fang-Chun Wu, Kang-Yu Tai, Wei-Chun Chang, Kai-Wei Chang, Hung-Chih Kuo,Hong-Nereng Ho, Hsin-Fu Chen, Shau-Ping Lin. Loss of non-coding RNA expression from the DLK1-DIO3 imprinted locus correlates with reduced neural differentiation potential in human embryonic stem cell lines. *Stem Cell Research & Therapy* 2015, 6:1.
20. Cowherd RM, Lyle RE, McGehee RE Jr. Molecular regulation of adipocyte differentiation. *Semin Cell Dev Biol*. 1999; 10: 3-10.
21. Crosnier C, Vargesson N, Gschmeissner S, Ariza-McNaughton L, Morrison A, Lewis J. Delta-Notch signaling controls commitment to a secretory fate in the zebrafish intestine. *Development*. 2005; 132: 1093-1104.
22. Dai R, Lu R, Ahmed SA. The Upregulation of Genomic Imprinted DLK1-Dio3 miRNAs in Murine Lupus Is Associated with Global DNA Hypomethylation. *PLoS ONE*. 2016; 12.
23. Davis E, Jensen CH, Schroder HD, Famir F, Shay-Had eld T, Kliem A, Cockett N, Georges M, Charlier C. Ectopic expression of DLK1 protein in skeletal muscle of padumnal heterozygotes causes the callipyge phenotype. *Curr. Biol*. 2004; 14: 1858-1862.
24. Deneff C. Paracrinicity: the story of 30 years of cellular pituitary crosstalk. *J Neuroendocrinol*. 2008; 20: 1-70.
25. Diccionario de la Lengua Española (RAE). 23ª edición 2014.
26. Falix FA, Aronson DC, Lamers WH, Gaemers IC. Possible roles of DLK1 in the Notch pathway during development and disease. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2012; 1822: 988-995.
27. Ferrón SR, Charalambous M, Radford E, McEwen K, Wildner H, Hind E, Morante-Redolat JM, Laborda J, Guillemot F, Bauer SR, Fariñas I, Ferguson-Smith AC. Postnatal loss of Dlk1 imprinting in stem cells and nicheastrocytes regulates neurogenesis. *Nature*. 2012; 475 (7356): 381-385.
28. Floridon C, Harken Jensen C, Thorsen P, Nielsen O, Lone Sunde Jes Grabow Westergaard, Thomsen SG, Teisner B. Does Fetal antigen 1 (FA1) identify cells with regenerative, endocrine and neuroendocrine potentials? A study of FA1 in embryonic, fetal, and placental tissue and in maternal circulation. *Differentiation*. 2000; 66: 49-59.
29. Fukuzawa R, Heathcott RW, Morison IM, Reeve AE. Imprinting, expression, and localisation of DLK1 in Wilms tumours, *J. Clin. Pathol*. 2005; 58: 145-150.
30. Garcés C, Ruiz-Hidalgo MJ, de Mora JF, Park C, Miele L, Goldstein J, Bonvini E, Porras A, Laborda J. Notch-1 controls the expression of fatty acid-activated transcription factors and is required for adipogenesis, *J. Biol. Chem*. 1997; 272: 29729-29734.
31. Garcés C, Ruiz-Hidalgo MJ, Bonvini E, GoldsteinJ, Laborda J, Adipocyte differentiation is modulated by secreted delta-like (dlk) variants and requires the expression of membrane-associated dlk. *Differentiation*.1999; 64: 103-114.
32. Gasperowicz M, Otto F. The notch signalling pathway in the development of the mouse placenta, *Placenta*. 2008; 29: 651-659.
33. Gordon WR, Arnett KL, Blacklow SC. The molecular logic of Notch signaling—a structural and biochemical perspective. *J Cell Sci*. 2008; 121: 3109 3119.
34. Guseh JS, Bores SA, Stanger BZ, Zhou Q, Anderson WJ, Melton DA, Rajagopal J. Notch signaling promotes airway mucous metaplasia and inhibits alveolar development, *Development*. 2009; 136: 1751-1759.
35. Harheness L, Taipaleenmaki H, Mahmood A, Frandsen U, Saamanen AM, Kassem M, Abdallah BM. Isolation and differentiation of chondrocytes cells derived from human embryonic stem cells using dlk1/FA1 as a novel surface marker. *Stem Cell rev*. 2009; 5(4): 353-368.
36. Hedlund GP, Carlsson HE, Shieck E, Nilsson I, Lundblad C, Arons S, Iversen AK, Looman C, Jensen HE, Hau J. Fetal antigen 1 (FA1) in the adult rat adrenal gland, ovary and pituitary gland. *In Vivo*. 2003; 17: 1-4.
37. Holliday R. Epigenetics comes of age in the twenty first century. *Journal of Genetics*. 2002; 81: 1-4.
38. Huang J, Zhang X, Zhang M, Jing-De Zhu J, Yun-Li Zhang, Yun Lin, Ke-Sheng Wang, Xiao-Fei, Zhang Q, Guang-Zhen Liu, Yu J, Ying Cui, Peng-Yuan Yang, Zhi-Qin Wang, Ze-Guang H. Up-regulation of DLK1 as an imprinted gene could contribute to human hepatocellular carcinoma. *Carcinogenesis*. 2007; 28: 1094-1103.
39. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin*. 2011; 61: 69-90.
40. Jensen CH, Krogh TN, Hojrup P, Clausen PP, Skjodt K, Larsson LI, Enghild JJ, Teisner B. Protein structure of fetal antigen 1 (FA1). A novel circulating human epidermal-growth-factor-like protein expressed in neuroendocrine tumors and its relation to the gene products of dlk and pG2. *Eur J Biochem*. 1994; 225: 83-92.

41. Jensen CH. Transit-amplifying ductular (oval) cells and their hepatocytic progeny are characterized by a novel and distinctive expression of delta-like protein/preadipocyte factor 1/fetal antigen 1. *Am. J. Pathol.* 2004; 164: 1347-1359.
42. Kaneta M, Osawa M, Sudo K, Nakauchi H, Farr AG, Takahama Y. A role for pref-1 and HES-1 in thymocyte development, *J. Immunol.* 2000; 164: 256-264.
43. Killian Jk, Nolan CM, Stewart N, Munday BL, Andersen NA, Nicol S, Jirtle RL. MOnotreme IGF2 expression and ancestral origin of genomic imprinting. *J Exp Zool.* 2001; 15; 291: 205-212.
44. Kim TH, Shivdasani RA. Notch signaling in stomach epithelial stem cell homeostasis. *J Exp Med.* 2011; 208: 677-688.
45. Kobayashi S, Wagatsuma H, Ono R, Ichikawa H, Yamazaki M. Mouse Peg9/Dlk1 and human PEG9/DLK1 are paternally expressed imprinted genes closely located to the maternally expressed imprinted genes: mouse Meg3/ Gtl2 and human MEG3. *Genes Cells.* 2000; 5: 1029-1037.
46. Komatsu H, Chao MY, Larkins-Ford J, Corkins ME, Somers GA, Tucey T, Dionne HM, White JQ, Wani K, Boxem M, Hart AC. OSM-11 facilitates LIN-12/Notch signaling during *Caenorhabditis elegans* vulval development, *PLoS Biol.* 2008; 6: e196.
47. Kopan R, Ilagan MX. The canonical Notch signaling pathway: unfolding the activation mechanism, *Cell.* 2009; 137: 216-233.
48. Krogh TN, Bachmann E, Teisner B, Skjødt K, Højrup P. Glycosylation analysis and protein structure determination of murine fetal antigen 1 (mFA1), the circulating gene product of the delta-like protein (dlk), preadipocyte factor 1 (Pref-1) and stromal-cell-derived protein 1 (SCP-1) cDNAs. *Eur J Biochem.* 1997; 244: 334-342.
49. Laborda J, Sausville EA, Hoffman T, Notario V. dlk1 a Putative Mammalian Homeotic Gene Differentially Expressed in Small Cell Lung Carcinoma and Neuroendocrine Tumor Cell Line. *The Journal of Biological Chemistry.* 1993; 268: 3817-3820.
50. Laborda J. The role of the epidermal growth factor-like protein dlk in cell differentiation. *Histol Histopathol.* 2000; 15: 119-129.
51. Larsen JB, Jensen CH, Schroder HD, Teisner B, Bjerre P, Hagen C. Fetal antigen 1 and growth hormone in pituitary somatotroph cells. *Lancet.* 1996; 347: 191.
52. Lee YL, Helman L, Hoffman T, Laborda J. dlk, pG2 and Pref-1 mRNAs encode similar proteins belonging to the EGF-like superfamily. Identification of polymorphic variants of this RNA. *Biochim Biophys Acta.* 1995; 1261: 223-232.
53. Lee K, Villena JA, Moon YS, Kee-Hong Kim, Lee S, Kang C, Sul HS. Inhibition of adipogenesis and development of glucose intolerance by soluble preadipocyte factor-1 (Pref-1). *J. Clin. Invest.* 2003; 111: 453-461.
54. Levy A. Physiological implications of pituitary trophic activity. *J Endocrinol* 2002; 174: 147-155.
55. Lewinski A, Konopacki J, Pawlikowski M, Lewinska MK, Smith NK, Reiter RJ. Effects of intraventricular injections of 6-hydroxydopamine on anterior pituitary cell proliferation. *Anat Rec.* 1984; 208: 421-426.
56. Limpt van V, Chan A, Caron H, Sluis PV, Boon K, Hermus MC, Versteeg R. SAGE analysis of neuroblastoma reveals a high expression of the human homologue of the *Drosophila* Delta gene. *Med. Pediatr. Oncol.* 2000; 35: 554-558.
57. Loomes KM, Taichman DB, Glover CL, Williams PT, Markowitz JE, Piccoli DA, Baldwin HS, Oakey RJ. Characterization of Notch receptor expression in the developing mammalian heart and liver, *Am. J. Med. Genet.* 2002; 112: 181-189.
58. Lopez-Terrada D, Gunaratne PH, Adesina AM, Pulliam J, Hoang DM, Nguyen Y, Mistretta TA, Margolin J, Finegold MJ. Histologic subtypes of hepatoblastoma are characterized by differential canonical Wnt and Notch pathway activation in DLK+ precursors, *Hum. Pathol.* 2009; 40: 783-794.
59. Lupu F, Terwilliger JD, Lee K, Segre GV, Efstratiadis A. Roles of growth hormone and insulin-like growth factor 1 in mouse postnatal growth. 2001; 229: 141-162.
60. Luk JM, Burchard J, Zhang C, Liu AM, Wong KF, Shek FH, Lee NP, Fan ST, Poon RT, Ivanovska I, Philippar U, Cleary MA, Buser CA, Shaw PM, Lee CN, Tenen DG, Dai H, Mao M. DLK1-DIO3 genomic imprinted microRNA cluster at 14q32.2 defines a stemlike subtype of hepatocellular carcinoma associated with poor survival. *J Biol Chem.* 2011; 286: 30706-30713.
61. Marit E, Zwierzina, Ejaz A, Bitsche M, Blumer MJF, Mitterberger MC, Mattesich M, Amann A, Kaiser A, Pechriggl E, Hörl S, Rostek U, Pierer G, Fritscha H, Zwerschke W. Characterization of DLK1(PREF1)+/CD34+ cells in vascular stroma of human white adipose tissue. *Stem Cell Research.* 2015; 15: 403-418.
62. Metsuyanin S, Harari-Steinberg O, Buzhor E, Omer D, Pode-Shakked N, Ben-Hur H, Halperin R, Schneider D, Dekel B. Expression of stem cell markers in the human fetal kidney. *Plos One.* 2009; 21: 4(8): e6709.
63. Mei B, Zhao L, Chen L, Sul HS. Only the large soluble form of preadipocyte factor-1 (Pref-1), but not the small soluble and membrane forms,

- inhibits adipocyte differentiation: role of alternative splicing, *Biochem. J.* 2002, 364: 137-144.
64. Miele L. Notch signaling. *Clin Cancer Res.* 2006; 12: 1074-1079.
 65. Moon YS, Smas CM, Lee K, Villena JA, Kim KH, Yun EJ, Sul HS. Mice lacking paternally expressed Pref-1/Dlk1 display growth retardation and accelerated adiposity. *Mol. Cell Biol.* 2002; 22: 5585-5592.
 66. Molina-Pinelo S, Salinas A, Moreno-Mata N, Ferrer I, Suarez R, Andrés-León E, Rodríguez-Paredes M, Gutekunst J, Jantus-Lewintre E, Camps C, Carnero A, Paz-Ares LI. Impact of DLK1-DIO3 imprinted cluster hypomethylation in smoker patients with lung cancer. *Oncotarget*, Advance Publications. 2016.
 67. Murphy SK, Jirtle RL. Imprinting evolution and the price of silence. *Bioessays.* 2003; 25: 577-588.
 - 68-46. Nueda ML, Baladrón V, García-Ramírez J, Sánchez-Solana B, Desamparados M, Rivero S, Ballesteros M, Monsalve E. The novel gene EGFL9 / Dlk2, highly homologous to Dlk1, functions as a modulator of adipogenesis. *J Mol Biol.* 2007; 367: 1270-1280.
 69. Nueda ML, Baladrón V, Sánchez-Solana B, Ballesteros MA, Laborda J. The EGF-like protein dlk1 inhibits notch signaling and potentiates adipogenesis of mesenchymal cells. *J. Mol. Biol.* 2007; 367: 1281-1293.
 70. Nueda María-Luisa, García-Ramírez JJ, Laborda J, Baladrón V. dlk1 Specifically Interacts with Insulin-Like Growth Factor Binding Protein 1 to Modulate Adipogenesis of 3T3-L1 Cells. *J. Mol. Biol.* 2008; 379: 428-442.
 71. Nakakura T, Sato M, Suzuki M, Hatano O, Takemori H, Taniguchi Y, Minoshima Y, Tanaka S. The spatial and temporal expression of delta-like protein 1 in the rat pituitary gland during development. *Histochem Cell Biol.* 2008; 131: 141-153.
 72. Ohno N, Izawa A, Hattori M, Kageyama R, Sudo T. dlk inhibits stem cell factor-induced colony formation of murine hematopoietic progenitors: Hes-1-8 independent effect, *Stem Cells.* 2001; 19: 71-79.
 73. Paulsen M, Takada S, Youngson NA, Benchaib M, Charlier C, Segers K, Georges M, Ferguson-Smith AC. Comparative Sequence Analysis of the Imprinted Dlk1-Gtl2 Locus in Three Mammalian Species Reveals Highly Conserved Genomic Elements and Refines Comparison with the Igf2-H19 Region. *Genome Research.* 2001; 11: 2085-2094.
 74. Piazzi G, Fini L, Selgrad M, Garcia M, Daoud Y, Wex T, Malfertheiner P, Gasbarrini A, Romano M, Meyer RL, Genta RM, Fox JG, Boland R, Bazzoli F, Ricciardiello L. Epigenetic regulation of Delta-Like1 controls Notch1 activation in gastric cancer. *Oncotarget*, 2011; 12.
 75. Puertas-Avendaño RA, Gonzalez-Gomez MJ, Ruvira MD, Ruiz-Hidalgo MJ, Morales-Delgado N, Laborda J, Diaz C, Bello AR. Role of the noncanonical Notch ligand DLK1 in hormone-producing cells of the adult male mouse pituitary. *J Neuroendocrinol.* 2011; 23: 849-859.
 76. Puertas-Avendaño RA. Papel de la proteína DLK1 en la regulación hipofisaria de las células adiposas en el ratón adulto. Tesis Doctoral. Universidad de La laguna, Tenerife-España. 2016.
 77. Rand E, Cedar H. Regulation of imprinting: a multi-tiered process. *J. Cell Biochem.* 2003; 88: 400-407.
 78. Rizzoti K. Adult pituitary progenitors/stem cells: from in vitro characterization to in vivo function. *Eur J Neurosci.* 2010; 32: 2053-2062.
 79. Rodríguez P, Higuera MA, González-Rajal A, Alfranca A, Fierro-Fernández M, García-Fernández RA, Ruiz-Hidalgo MJ, y cols. The non-canonical NOTCH ligand DLK1 exhibits a novel vascular role as a strong inhibitor of angiogenesis. *Cardiovas Res.* 2012; 1: 232-241.
 80. Ross DA, Rao PK, Kadesch T. Dual roles for the Notch target gene Hes-1 in the differentiation of 3T3-L1 preadipocytes, *Mol. Cell. Biol.* 2004; 24: 3505-3513.
 81. Ruiz-Hidalgo MJ, Gubina E, Tull L, Baladrón V, Laborda J. dlk modulates mitogen-activated protein kinase signaling to allow or prevent differentiation, *Exp. Cell Res.* 2002; 274: 118-178.
 82. Sakatani, T. Loss of imprinting of Igf2 alters intestinal maturation and tumorigenesis in mice. *Science.* 2005; 307: 1976-1978.
 83. Samulewicz SJ, Seitz A, Clark L, Heber-Katz E. Expression of preadipocyte factor-1 (Pref-1), a delta-like protein, in healing mouse ears. *Wound Repair Regen.* 2002; 10: 215-221.
 84. Sciaudone M, Gazzero E, Priest L, Delany AM, Canalis E. Notch 1 impairs osteoblastic cell differentiation, *Endocrinology.* 2003; 144: 5631-5639.
 85. Schmidt JV, Matteson PG, Jones BK, Guan X, Tilghman SM. The Dlk1 and Gtl2 genes are linked and reciprocally imprinted. *Genes* 2000; *Dev.* 14: 1997-2002.
 86. Scoville DH, Sato T, He XC, Li L. Current view: intestinal stem cells and signaling. *Gastroenterology.* 2008; 134: 849-864.
 87. Smas CM, Sul HS. Pref-1, a protein containing EGF-like repeats inhibit adipocyte differentiation. *Cell*, 1993; 73: 725-734.
 88. Smas CM, Chen L, Sul HS. Cleavage of membrane-associated pref-1 generates a soluble inhibitor of adipocyte differentiation. *Mol Cell Biol.* 1997; 17: 977-988.

89. Smas CM, Green D, Sul HS. Structural characterization and alternate splicing of the gene encoding the preadipocyte EGF-like protein pref-1. *Biochemistry*. 1994; 33: 9257-65.
90. Shen N, Liang D, Tang Y, de Vries N, Tak PP. MicroRNAs—novel regulators of systemic lupus erythematosus pathogenesis. *Nature reviews Rheumatology*. 2012; 8: 701-709.
91. Sheng HZ, Westphal H. Early steps in pituitary organogenesis. *Trends Genet*. 1999; 15: 236-240.
92. Stadtfeld M, Apostolou E, Ferrari F, Choi J, Walsh RM, Chen T, Oi S, Kim SY, Bestor T, Shioda T, Park PJ, Hochedlinger K. Ascorbic acid prevents loss of Dlk1-Dio3 imprinting and facilitates generation of all-iPS cell mice from terminally differentiated B cells. *Nat Genet*. 2013; 44: 398-S2.
93. Sul, HS. Pref-1: role in adipogenesis and mesenchymal cell fate. *Mol. Endocrinol*. 2009; 23: 1717-1725.
94. Tanimizu N, Nishikawa M, Saito H, Tsujimura T, Miyajima A. Isolation of hepatoblasts based on the expression of Dlk/Pref-1, *J. Cell Sci*. 2003; 116: 1775-1786.
95. Tanimizu N, Miyajima A. Notch signaling controls hepatoblast differentiation by altering the expression of liver-enriched transcription factors, *J. Cell Sci*. 2004; 117: 3165-3174.
96. Takada S, Tevendale M, Baker J, Georgiades P, Campbell E, Freeman T. et al. Delta-like and gtl2 are reciprocally expressed, differentially methylated linked imprinted genes on mouse chromosome 12. *Curr. Biol* 2000; 10: 1135-1138.
97. Tax FE, Yeagers JJ, Thomas JH. Sequence of *C. elegans lag-2* reveals a cell-signalling domain share with Delta and Serrate of *Drosophila*. *Nature*. 1994; 10: 368 (6467): 150-154.
98. Voss JW, Rosenfeld MG. Anterior pituitary development: short tales from dwarf mice. 1992; 21: 527-530.
99. Waddell JN, Zhang P, Wen Y, Gupta SK, Yevtdiyenko A, Schmidt JV, Bidwell CA, Kumar A, Kuang S. Dlk1 is necessary for proper skeletal muscle development and regeneration, *PLoS One*. 2010; 5: e15055.
100. Wang Y, Sul HS. Ectodomain shedding of preadipocyte factor 1 (Pref-1) by tumor necrosis factor alpha converting enzyme (TACE) and inhibition of adipocyte differentiation. *Mol Cell Biol*. 2006; 26: 5421-5435.
101. Wilkins JF, Haig D. What good is genomic imprinting: the function of parent-specific gene expression. *Nature Rev. Genet*. 2003; 4: 359-368.
102. Wylie AA, Murphy SK, Orton TC, Jirtle RL. Novel imprinted DLK1/GTL2 domain on human chromosome 14 contains motifs that mimic those implicated in IGF2/H19 regulation. *Genome Res*. 2000; 10: 1711-1718.
103. Yevtdiyenko A, Schmidt JV. Dlk1 expression marks developing endothelium and sites of branching morphogenesis in the mouse embryo and placenta. *Dev Dyn* 2006; 235: 1115-1123.
104. Zhang H, Noohr J, Jensen CH, Petersen RK, Bachmann E, Teisner B. et al. Insulin-like growth factor-1/insulin bypasses Pref-1/FAI-mediated inhibition of adipocyte differentiation. *J. Biol. Chem*. 2003; 278: 20906-20914.
105. Zhu X, Zhang J, Tollkuhn J, Ohsawa R, Bresnick EH, Guillemot F, Kageyama R, Rosenfeld MG. Sustained Notch signaling in progenitors is required for sequential emergence of distinct cell lineages during organogenesis. *Genes Dev*. 2006; 20: 2739-2753.