



**Universidad de Chile**  
**Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas**  
**Departamento de Bioquímica y Biología Molecular**

**Neogenina 1 actúa como un blanco transcripcional  
directo de la vía Sonic Hedgehog / Gli en línea celular de  
neuroblastoma humano**

**NATALIE ANDREA ESPINOZA GIACOMOZZI**

**MEMORIA PARA OPTAR AL TÍTULO PROFESIONAL DE  
BIOQUÍMICO**

**Director de Memoria**

Dra. Verónica Palma Alvarado  
Laboratorio de Células Troncales y  
Biología del Desarrollo  
FONDAP  
Facultad de Ciencias  
Universidad de Chile

**Profesor Patrocinante**

Dra. Daniela Seelenfreund Hirsch  
Laboratorio de Bioquímica  
Depto. Bioquímica y Biología Molecular  
Facultad de Ciencias Químicas y  
Farmacéuticas  
Universidad de Chile

**Santiago - Chile**  
**2012**

*Dedicado a mi Madre, mi referente e incondicional conmigo. Gracias mamita por tu amor, apoyo en todos mis años de vida, todo lo que tengo y soy es gracias a ti.*

*Dedicado a mi Amor y Vida Julio, Te Amo. Gracias por tu maravilloso amor y constante apoyo en todo este tiempo, sin tu luz no lo hubiera logrado.*

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco a todos quienes colaboraron en mi formación durante todo el desarrollo de este trabajo de tesis, en particular a Luis Milla, quien estuvo siempre acompañándome y guiándome codo a codo en el mesón y de quien aprendí muchísimo, a Janito por su alegría, humor, apoyo e infinita amistad desde hace ya varios años, a mi amiga y partner de tesis Andreita por su especial sentido del humor y forma de ser, que alegraba mis tardes en el mesón, y a mi querida Carolilla por su alegría, dulzura y compañía. A Roger Yefi y a Rodrigo “Tagua” Aguilar por su enorme ayuda y generosidad. Quiero agradecer también a las personas que conforman el VPLab, Pablo, Gabi, Cynthia, Cata, Mati, de quienes recibí ayuda alguna vez y también quiero agradecer de manera muy especial a Vero, mi directora de tesis, por jugársela, confiar en mi y recibirme en el laboratorio sin siquiera conocerme, por su orientación, apoyo y por contribuir de enorme manera a mi formación como bioquímico, a mi profe Daniela por su apoyo, ayuda y preocupación siempre.

Daniel, Panchi, Luchito, Mati y Sofi, muchas gracias amigos!!

## **FINANCIAMIENTO**

Proyecto FONDECYT 1110237

# INDICE GENERAL

DEDICATORIA.....	ii
AGRADECIMIENTOS.....	iii
FINANCIAMIENTO .....	iv
INDICE GENERAL.....	v
INDICE DE FIGURAS .....	ix
INDICE DE TABLAS.....	xi
ABREVIATURAS .....	xii
RESUMEN .....	xiv
SUMMARY .....	xvi
<b>1. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
1.1 SHH en desarrollo .....	1
1.2 SHH en la vida adulta.....	3
1.3 Síntesis, procesamiento y secreción de SHH.....	3
1.4 Recepción y transducción de SHH.....	3
1.5 Factores transcripcionales Gli: una mirada molecular de la Vía de SHH .....	5
1.6 SHH y Neuroblastoma.....	6
1.7 SHH y Neogenina 1 .....	7
1.8 Neogenina 1: estructura y función .....	9
<b>2. HIPÓTESIS .....</b>	<b>14</b>
2.1 Hipótesis .....	14
2.2 Objetivo general.....	14
2.3 Objetivos específicos .....	14

<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>15</b>
3.1 Materiales.....	15
3.1.1 Cultivos celulares .....	15
3.1.2 Líneas celulares .....	15
3.1.3 Fármacos .....	15
3.1.4 RT-PCR y Síntesis de ADN complementario .....	15
3.1.5 Western blot .....	15
3.1.6 Inmunofluorescencia .....	16
3.1.7 Plasmidios .....	16
3.1.8 Transfecciones.....	16
3.1.9 Ensayo de cuantificación de actividad luciferasa.....	16
3.1.10 Inmunoprecipitación de cromatina.....	16
3.2 Métodos .....	18
3.2.1 Cultivos celulares .....	18
3.2.2 Tratamientos farmacológicos .....	18
3.2.3 Extracción de ARN .....	18
3.2.4 Síntesis de ADN complementario .....	19
3.2.4.1 Tratamiento con DNAsa .....	19
3.2.4.2 Síntesis de ADN complementario.....	19
3.2.5 RT-PCR.....	19
3.2.6 Western blot.....	19
3.2.7 Inmunofluorescencia .....	20
3.2.8 Búsqueda <i>in silico</i> de putativos GBS en la secuencia de <i>Neogenina 1</i> .....	21

3.2.9 Inmunoprecipitación de cromatina.....	21
3.2.10 Clonamiento de secuencia GBS a un plásmido de expresión del gen reportero luciferasa .....	22
3.2.11 Mutaciones sitio-dirigidas .....	23
3.2.12 Transfecciones de células HEK293.....	23
3.2.13 Ensayo luciferasa.....	24
3.2.14 Análisis estadístico.....	25
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>26</b>
4.1 Detección de la expresión de la proteína Neogenina 1 en las células de neuroblastoma humano SH-SY5Y.....	26
4.2 Detección de cambios en la expresión de Neogenina 1 al producir alteraciones en la vía de SHH/Gli.....	28
4.3 Búsqueda de sitios putativos de unión de Gli (GBS) tanto en secuencia promotora como en primer intrón del gen <i>Neogenina 1</i> humano .....	30
4.4 Detección de unión de los factores de transcripción Gli en regiones regulatorias putativas en la secuencia promotora y primer intrón del gen <i>Neogenina 1</i> .....	32
4.5 Estudio de la funcionalidad de los putativos GBS presentes en <i>Neogenina 1</i> .....	34
<b>5. DISCUSIÓN.....</b>	<b>38</b>
5.1 Neogenina 1 es expresada por la línea de neuroblastoma humano SH- SY5Y y alteraciones farmacológicas de la vía de SHH/Gli afectan la expresión de la proteína en esta línea celular.....	40
5.2 Existen tres GBS en las secuencias analizadas del gen <i>Neogenina 1</i> .....	41

5.3 Gli 2 reconoce y se une directamente al GBS 3 dentro del primer intrón de Neogenina 1 .....	43
5.4 Sólo el sitio GBS 3 fue activado por el factor de transcripción Gli 2 .....	44
5.5 Neogenina 1 en el contexto de la vía de SHH/Gli .....	46
5.6 Neogenina 1 y Cáncer.....	47
<b>5. CONCLUSIONES.....</b>	<b>50</b>
<b>6. REFERENCIAS .....</b>	<b>51</b>



## INDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Esquema de la acción de SHH como morfógeno en un corte transversal del tubo neural en desarrollo.....	2
<b>Figura 2:</b> SHH induce mitosis en progenitores granulares cerebelares en el desarrollo del SNC.....	2
<b>Figura 3:</b> Señalización de la vía SHH/Gli en el contexto de cilio primario .....	4
<b>Figura 4:</b> Análisis de expresión de <i>neogenina 1</i> mediante qPCR .....	8
<b>Figura 5:</b> Hibridaciones <i>in situ</i> mostrando la expresión del gen <i>neogenina 1</i> en embriones de pez cebra silvestres y mutantes para los componentes de la vía SHH/Gli.....	9
<b>Figura 6:</b> Esquema del transcrito y de la proteína Neogenina 1 .....	10
<b>Figura 7:</b> ¿Es <i>Neogenina 1</i> un gen blanco transcripcional directo de la vía de señalización de SHH/Gli en un modelo celular humano? .....	13
<b>Figura 8:</b> Esquema de los plásmidos reporteros generados mediante el clonamiento de las secuencias GBS .....	22
<b>Figura 9:</b> Neogenina 1 se expresa en la línea celular de neuroblastoma SH-SY5Y.....	27
<b>Figura 10:</b> Expresión de Neogenina 1 en diferentes líneas celulares .....	28
<b>Figura 11:</b> Disminución de la expresión de la proteína Neogenina 1 en ausencia de la vía SHH/Gli.....	29
<b>Figura 12:</b> Ubicación de los sitios putativos de unión a Gli en la secuencia del gen <i>Neogenina 1</i> .....	31

<b>Figura 13:</b> El factor de transcripción Gli2 se une a un elemento de respuesta putativo ubicado en el primer intrón del gen <i>Neogenina 1</i> .....	33
<b>Figura 14:</b> Sistema de transfección responde de manera dosis dependiente al factor de transcripción Gli2 .....	35
<b>Figura 15:</b> El sitio GBS 3 fue activado por el factor de transcripción Gli 2 .....	38
<b>Figura 16:</b> Esquema de la secuencia génica de <i>Neogenina 1</i> en humanos .....	41
<b>Figura 17:</b> Modelo de la regulación transcripcional ejercida por la vía de señalización de SHH/Gli sobre la expresión del gen <i>Neogenina 1</i> en el modelo de neuroblastoma humano SH-SY5Y .....	49

## INDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1:</b> Diseño de partidores usados para RT-PCR, ChIP y mutagénesis sitio dirigida .....	17
<b>Tabla 2:</b> Programa de la reacción de PCR realizado para las mutaciones sitio dirigidas .....	23
<b>Tabla 3:</b> Se muestran los sitios GBS silvestre y mutados que se utilizaron en el ensayo de reportero luciferasa.....	37

## ABREVIATURAS

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ARN: ácido ribonucleico

CDO: *CAM/related downregulated by oncogenes* ( relacionado a CAM disminuído por oncogenes)

CGE: Células de la granulosa externa

CGI: Células de la granulosa interna

ChIP: Inmunoprecipitación de Cromatina

Cic: Ciclopamina

CMV: Citomegalovirus

CP: Células de Purkinje

DCC: *Deleted colorectal cancer*

GAPDH: Gliceraldehído Fosfato Deshidrogenasa

GBS: *Gli Binding Site* (sitio de unión a Gli)

Nc: Notocorda

Fp: *Floor Plate* (placa del piso)

Kb: Kilo Bases

KDa: Kilo Daltons

PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa (del inglés *polymerase chain reaction*)

Pb: Pares de bases

PBS: Solución de tampón fosfato

PBST: Solución de tampón fosfato con *tween*

Ptch1: "Patched 1"

Pur: Purmorfamina

qPCR: PCR en tiempo real

RGM: *Repulsive Guidance Molecule* (molécula de orientación axonal repulsiva)

RT-PCR: Transcripción inversa y reacción en cadena de la polimerasa

RGD: Raíz de los ganglios dorsales

SBF: Suero Bovino Fetal

SHH: “Sonic Hedgehog”

Smo: “Smothened”

SNC: Sistema Nervioso Central

SVZ: Zona Subventricular

## RESUMEN

El desarrollo embrionario en vertebrados es coordinado por una red de señales y factores de crecimiento que comandan diferentes procesos celulares. Sonic Hedgehog (SHH), es un ligando considerado como un regulador maestro que dirige los procesos de proliferación celular, migración, apoptosis, supervivencia y diferenciación celular.

SHH es liberado al medio y una vez que llega a su célula blanco, ésta activa una compleja vía de señalización intracelular, que finalmente, moviliza a los factores transcripcionales Gli. Estos últimos activan la expresión de genes blanco de la vía reconociendo secuencias específicas en el ADN llamadas GBS (del inglés “*Gli Binding Site*”). Además, se sabe que una desregulación en la vía de SHH/Gli puede llevar al desarrollo de cáncer, como ocurre en los casos del meduloblastoma y el cáncer de células basales de la piel, entre otros.

Recientemente, por resultados obtenidos en el laboratorio, se estableció que en los modelos de ratón y pez cebra, el gen *neogenina 1* es un blanco transcripcional de la vía SHH/Gli. Considerando la conservación evolutiva de la vía de SHH/Gli y la característica multifuncional de la proteína Neogenina 1, un receptor de membrana que responde a diferentes ligandos, sumado a su reciente implicancia en cáncer, se planteó estudiar a *Neogenina 1* como un nuevo blanco transcripcional directo de la vía SHH/Gli, en un modelo celular de neuroblastoma humano, una patología donde se sabe que la vía está activada.

En ensayos de pérdida de función farmacológica de SHH realizados en cultivos celulares de neuroblastoma humano, se observó que la expresión de Neogenina 1 disminuía de manera dosis dependiente. A partir de este resultado, se realizó un análisis *in silico* que determinó la existencia de tres posibles GBS en la secuencia de *Neogenina 1*: GBS 1 ubicado a los 18,6 Kb río arriba desde el inicio de la traducción, GBS 2 y GBS 3, localizados dentro del primer intrón, a 39,1 y 54,4 Kb desde el inicio de la traducción, respectivamente. Luego, se estudió el reconocimiento y la unión de factores

transcripcionales Gli a los posibles GBS mediante ensayo de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) en células de neuroblastoma. Sólo el sitio GBS 3 fue reconocido por Gli 2. Finalmente, para evaluar la funcionalidad de los GBS encontrados en *Neogenina 1*, éstos se clonaron río arriba del gen reportero luciferasa. Concordante con el resultado del ChIP, sólo el sitio GBS 3 activó la expresión de luciferasa en respuesta a la activación con Gli 2.

Por lo tanto, este trabajo de tesis permite establecer a *Neogenina 1* como un nuevo gen blanco transcripcional directo de la vía SHH/Gli en modelo celular de neuroblastoma humano. Con esto, se pretende aportar al entendimiento de los mecanismos celulares que hacen a SHH contribuir en procesos tan diversos durante el desarrollo embrionario y que probablemente subyacen al desarrollo de cáncer.

## SUMMARY

***Neogenin 1* is a direct transcriptional target of the Sonic Hedgehog signaling pathway in a human neuroblastoma cell line.**

The patterning and growth of a multicellular embryo is orchestrated by a number of developmental signaling pathways, such as the Sonic Hedgehog (SHH) signaling pathway. SHH is considered a master regulator controlling a variety of complex processes such as proliferation, cellular migration, apoptosis, differentiation and cellular survival.

SHH is secreted by a group of specialized cells and once reaching its receptors in target cells, activates a complex intracellular signaling pathway that finally mobilizes the Gli transcriptional factors. These factors move to the nucleus and recognize specific sequences in the DNA known as Gli Binding Sites (GBS), activating the transcription of their target genes. It is known that a deregulation of the SHH pathway drives the development of several cancers, like medulloblastoma and basal cell carcinoma.

Recently our laboratory established *neogenin 1* as a transcriptional target of the SHH/Gli pathway both in the mouse and zebra fish models. Considering the evolutionary conservation of the SHH/Gli pathway and the multifunctional properties of Neogenin 1, a transmembrane receptor that binds different ligands, and that has been implicated in cancer, we proposed to study human *Neogenin 1* gene as a new and direct transcriptional target of the SHH/Gli pathway using a human cell line of neuroblastoma, a cancer where this pathway is constitutively active.

In pharmacological SHH-loss of function assays made in neuroblastoma cell cultures, we observed that Neogenin 1 expression was decreased in a dose-dependent manner. Based on this result, we performed an *in silico* analysis that showed the presence of three putative GBS in the *Neogenin 1* sequence: GBS 1, located 18.6 Kb upstream from the translation start, and GBS 2 and GBS 3, which were located within the first intron, 39.1 Kb and 54.4 Kb from the translation start, respectively. Next, we studied the Gli



transcriptional factor recognition and binding to these putative GBS through chromatin immunoprecipitation (ChIP) in neuroblastoma cells. We found that only Gli 2 activator recognized only GBS 3. Finally, in order to evaluate the *Neogenin 1* GBS functionality, we cloned them upstream of the luciferase reporter gene. Concordant with the ChIP result, only the GBS 3 induced luciferase expression upon Gli 2 stimulation. In summary, this thesis proposes *Neogenin 1* as a new direct transcriptional factor of the SHH/Gli pathway in a human neuroblastoma cell model. Our results aim to contribute to the understanding of how the SHH pathway is involved in diverse processes during embryonic development, and also, to the cellular mechanisms that explain the role of SHH in cancer.

## 1. INTRODUCCIÓN

El modelamiento, crecimiento y desarrollo de organismos multicelulares corresponden a procesos finamente regulados por la acción de diferentes vías de transducción de señales, cuyas acciones son mediadas por un conjunto de factores secretados. En vertebrados, existe una compleja red de señales secretadas, que incluyen a la familia de factores de crecimiento llamados Hedgehog (HH), compuesta por Indian Hedgehog (IHH), Desert Hedgehog (DHH) y Sonic Hedgehog (SHH), siendo SHH el ligando más ampliamente expresado.

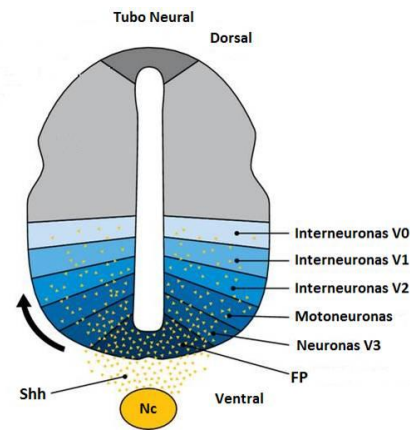
### 1.1 SHH en desarrollo

Para llevar a cabo su función en el desarrollo de tejidos y órganos, SHH es un ligando que coordina diversos procesos celulares como proliferación, diferenciación, muerte, migración y supervivencia celular [Varjosalo & Taipale, 2008].

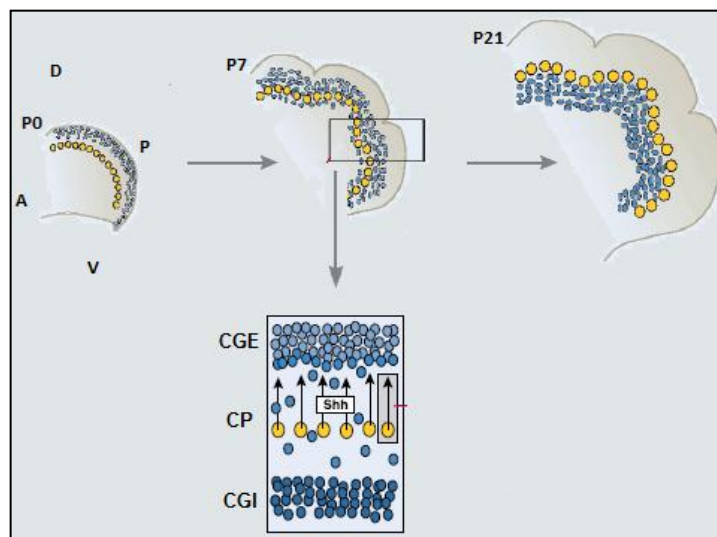
Tempranamente durante el desarrollo embrionario, SHH dirige el establecimiento de patrones en el embrión (*patterning*), determinando los ejes dorso-ventral y antero-posterior, procesos bien estudiados en el desarrollo del Sistema Nervioso Central (SNC) y las extremidades, respectivamente [Varjosalo & Taipale, 2008]. Se ha descrito muy bien la acción de SHH como morfógeno, es decir, como un ligando que es generado a partir de un centro organizador y que puede actuar de forma autocrina o paracrina. De este modo, genera diferentes gradientes de concentración en los tejidos. Estos gradientes son codificados e interpretados por las células receptoras para adquirir diferentes destinos y comportamientos celulares [Fuccillo y cols., 2006; Varjosalo & Taipale, 2008].

Durante el desarrollo del SNC, SHH se expresa y secreta ventralmente a partir de dos estructuras ubicadas en el tubo neural: (i) la notocorda y (ii) la placa del piso, difundiendo y estableciendo así su gradiente dorso-ventral con el cual inducirá a los progenitores neurales a comprometerse en diferentes linajes celulares, tales como interneuronas y motoneuronas (figura 1). Una vez establecido el *patterning*, SHH adquiere una importante acción mitogénica induciendo la proliferación de los progenitores neurales en el cerebro dorsal, contribuyendo así el crecimiento y desarrollo de estructuras tales como la

neocorteza, el cerebelo y el tectum (figura 2) [Palma y cols., 2004, Traiffort y cols., 2010, Fejioo y cols., 2011].



**Figura 1: Esquema de la acción de SHH como morfógeno en un corte transversal del tubo neural en desarrollo.** El gradiente de SHH define subtipos neuronales durante el *patterning*. SHH (puntos amarillos) es secretado a partir de las células de la placa del piso (FP) y la notocorda (Nc) para generar un gradiente de concentraciones en el eje dorso-ventral del tubo neural. En el desarrollo, el gradiente de SHH establece una organización espacial de las células progenitoras neurales, las que progresivamente, definen diferentes tipos celulares (interneuronas V0-V3, motoneuronas y neuronas V3) a lo largo del eje dorso-ventral. Adaptado de Tierney, 2011.



**Figura 2: SHH induce mitosis en progenitores granulares cerebelares en el desarrollo del SNC.** SHH es secretado desde las CP y actúa sobre las CGE para inducir su proliferación. Luego de este período de intensa proliferación dependiente de SHH, las CGE comienzan a diferenciarse y migran hacia las capas celulares más internas del cerebelo para formar el estrato CGI en el cerebelo maduro. CP: células de Purkinje. CGE: Células Granulares Externas. CGI: Células Granulares Internas. P0: día post-natal cero. P7: día

post-natal 7. P21: día post-natal 21. AP: eje antero-posterior, DV: eje dorsal-ventral. Adaptado de Curran & Romer, 2005.

## **1.2 SHH en la vida adulta**

SHH no sólo juega un rol fundamental durante el desarrollo embrionario, sino que también sigue siendo importante en los estadios postnatales y en la vida adulta. Existen dos estructuras en el SNC adulto donde ocurre la neurogénesis: la capa subgranular del giro dentado en el hipocampo y la zona subventricular (SVZ) en las paredes de los ventrículos laterales. Se ha visto que SHH se expresa endógenamente en estos nichos neurogénicos. Además, su secreción corresponde a un mecanismo crítico en la mantención de los linajes de las células madre y en el proceso de la neurogénesis, eventos necesarios para una adecuada homeostasis de los tejidos en la vida adulta [Lai y cols., 2003; Palma y cols., 2005; Traiffort y cols., 2010].

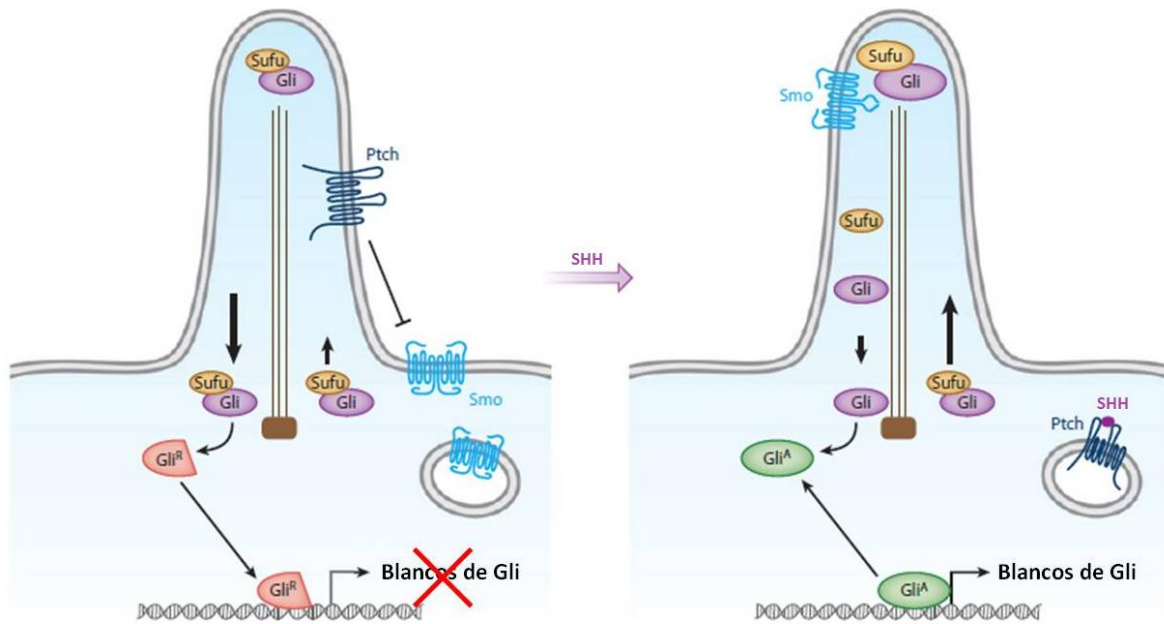
## **1.3 Síntesis, Procesamiento y Secreción de SHH**

SHH se sintetiza como un precursor de 45 KDa y luego éste cataliza su propia hidrólisis mediada por su extremo C-terminal. Esta hidrólisis genera dos péptidos: uno de 25 KDa sin actividad biológica conocida y otro de 19 KDa, biológicamente activo que corresponde al extremo N-terminal de SHH (SHHN). Luego, el péptido SHHN sufre dos modificaciones lipídicas: la unión covalente de una molécula de colesterol en su C-terminal y la unión de una molécula de ácido palmítico en su extremo N-terminal. Estas modificaciones se relacionan directamente con la localización, secreción, difusión y actividad de SHH. Las células que secretan SHH requieren de la presencia del transportador Dispatched, una proteína integral de membrana con doce dominios transmembrana a través de la cual SHH llega al espacio extracelular y difunde en gradiente hacia los tejidos blanco [Simpson y cols., 2009; Traiffort y cols., 2010, Hui & Angers, 2011].

## **1.4 Recepción y Transducción de SHH**

La recepción de SHH en sus células blanco ocurre en un organelo altamente especializado llamado cilio primario. Este organelo se proyecta desde la superficie celular y funciona como un centro o antena de señalización, en el cual ocurren diferentes vías de transducción de señales. Una vez secretado hacia la matriz extracelular, SHH interactúa con su receptor

Patched/Ptch/Ptch1, una proteína integral de membrana localizada en la base del cilio primario. El complejo SHH/Ptch1 es internalizado por endocitosis y es llevado a degradación lisosomal. A su vez, la interacción de SHH con Ptch1 revierte la represión que constitutivamente ejerce Ptch1 sobre Smoothened (Smo), una proteína con siete dominios transmembrana. Smo es liberada por un mecanismo que no es del todo conocido, y es desplazada por medio de vesículas intracelulares a la membrana del cilio primario. Una vez en el cilio, Smo gatilla una compleja cascada de señalización que lleva a la activación de los factores transcripcionales Gli, los que se desplazan al núcleo y activan la transcripción de genes blanco de la vía (figura 3) [Varjosalo & Taipale, 2008; Traiffort y cols., 2010; Goetz & Anderson, 2010].



**Figura 3: Señalización de la vía SHH/Gli en el contexto de cilio primario. A.** En ausencia de SHH, Ptch1 se localiza en la membrana del cilio primario e impide la entrada de Smo a él. Los factores transcripcionales Gli son preferentemente desplazados hacia fuera del cilio primario y procesados a sus formas represoras, inhibiendo así la expresión de los genes blanco de la vía. **B.** Cuando SHH está presente en el medio, interacciona con su receptor Ptch1, el complejo Ptch1/SHH es endocitado, al mismo tiempo, Smo comienza a acumularse en la membrana ciliar. Esto induce la entrada de los factores Gli a la punta del cilio. Smo promueve la disociación de los factores Gli con SuFu, un regulador negativo de

la vía, liberándolos y dirigiéndolos al núcleo para activar la transcripción de los genes blanco de la vía. Adaptado de Hui, 2011.

La figura 7 muestra un esquema simplificado de la vía de SHH. En éste, se indica la acción de los fármacos tradicionalmente utilizados como agonista (purrmorfamina) y antagonista (ciclopamina) de la vía de SHH. Purrmorfamina es un derivado de purinas que actúa uniéndose específicamente a Smo [Sinha & Chen, 2005]. Ciclopamina, un alcaloide natural extraído a partir de la especie *Veratrum californicum*, es un potente inhibidor de la vía de SHH, cuyos efectos teratogénicos son ampliamente conocidos dados los fenotipos producidos en los animales de granja que consumen esta hierba [Chen y cols., 2002]. Al igual que purrmorfamina, ciclopamina ejerce su efecto uniéndose directamente a Smo [Chen, 2002; Kamenetsky y cols., 2002].

### **1.5 Factores Transcripcionales Gli: una mirada molecular de la vía SHH**

En vertebrados, los factores transcripcionales Gli comprenden una familia de proteínas, compuesta por los factores Gli 1, Gli 2 y Gli 3, con dominios altamente conservados entre ellos. Se unen directamente al ADN a través de dominios de dedos de Zinc, reconociendo secuencias específicas o sitios consenso 5' GACCACCCA 3' descritos originalmente para el genoma humano, también conocidos como GBS (*Gli Binding Site* en inglés) [Kinzler & Vogelstein, 1990]. Esta secuencia es conservada y funcional en ratón [Sasaki y cols., 1997]. Sin embargo, recientemente se ha reportado que estos factores transcripcionales pueden reconocer y responder a secuencias en el ADN que son catalogadas como GBS no consenso. Estas secuencias presentan al menos un cambio de base en comparación con la secuencia GBS consenso [Winklmayr y cols., 2010], inclusive se ha reportado casos con dos o tres cambios respecto del GBS consenso, como ocurre en la región promotora del gen *Fgf15*, que codifica para el Factor de crecimiento 15 de fibroblastos, donde ambos GBS encontrados presentan las sustituciones 1T2G9G y 1T2G9T respecto de la secuencia consenso [Winklmayr y cols., 2010].

Los estudios funcionales de las proteínas Gli han determinado que tanto Gli 1, Gli 2 y Gli 3 tienen un dominio de activación en sus extremos C-terminal, en cambio sólo Gli 2 y Gli 3 poseen un dominio de represión en su extremo N-terminal. En consecuencia, dependiendo del contexto y de la presencia de SHH en el medio extracelular, las proteínas Gli se

comportan como activadores o represores de la transcripción. En ausencia de SHH, Gli 1 es reprimido transcripcionalmente, mientras que Gli 2 y Gli 3 se retienen en el citosol, se proteolizan por complejos enzimáticos y se procesan a sus formas represoras, inhibiendo la expresión de los genes blanco de la vía. Inversamente, cuando la vía es activada, se acciona la expresión transcripcional de Gli 1 y se inhibe el procesamiento proteolítico de Gli 2 y de Gli 3. Gli 2 se transforma en el principal activador transcripcional de la vía, se transloca al núcleo y activa a los genes blancos de la vía. Entre los genes blanco que se activan están *Gli 1* y *Ptch1*, lo que gatilla un mecanismo de retroalimentación positiva y negativa de la propia vía, respectivamente [Ruiz i Altaba y cols., 2007; Hui & Angers, 2011].

El balance intracelular que existe entre las funciones activadoras y represoras de las proteínas Gli, que a su vez está determinado por el gradiente de SHH presente en el medio, parece determinar un programa transcripcional definido, o código Gli, en los múltiples blancos de la vía que finalmente comandarán el fenotipo y el comportamiento celular en respuesta a SHH [Ruiz i Altaba y cols., 2007; Hui & Angers, 2011].

## **1.6 SHH y Neuroblastoma**

La vía de señalización de SHH/Gli no sólo dirige la proliferación de células progenitoras durante el desarrollo embrionario y su posterior diferenciación, sino que también en la adultez. Es así como la vía de SHH/Gli cumple un importante rol como un modulador en la homeostasis de los tejidos, manteniéndolos y reparándolos. El correcto control de la homeostasis ejercido por SHH se logra regulando el comportamiento y la auto-renovación de las células madres/troncales y progenitoras. De acuerdo a lo anterior, una desregulación en la vía de SHH puede conducir al desarrollo de cáncer [Merchant & Matsui, 2010; Stecca & Ruiz i Altaba, 2010]. En la mayoría de los casos clínicos, se presenta una mutación de pérdida de función en el gen del receptor de la vía SHH, *Ptch1*, llevando a la activación de la vía independiente de ligando. Esto ha sido muy bien establecido para el caso de Carcinoma de Células Basales y Meduloblastoma, donde mutaciones puntuales en el receptor *Ptch1*, producen una activación constitutiva de la vía de SHH conduciendo al desarrollo de estas patologías [Caro & Low, 2010; Hatten & Roussel, 2011; Li y cols., 2011]. Sin embargo, en otros casos se presenta una mutación de ganancia de función a

nivel del gen del co-receptor Smo o una mutación de SUFU, un regulador negativo de la vía de SHH/Gli [Crowson, 2006].

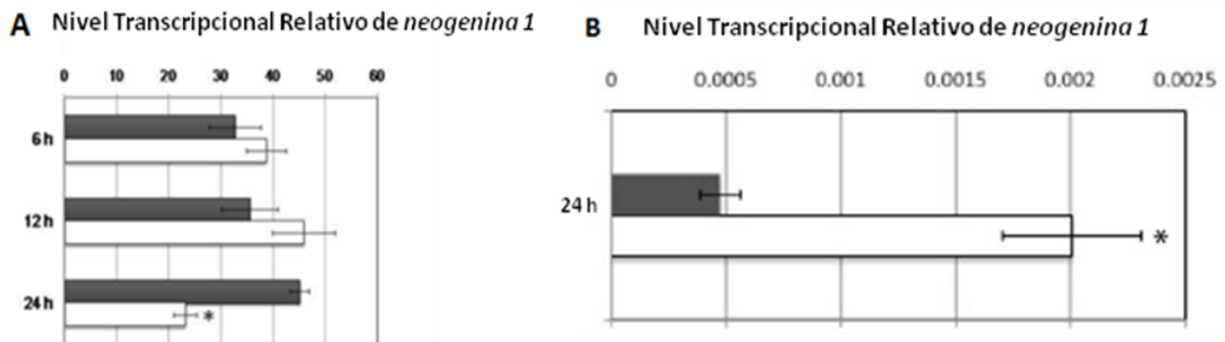
No obstante lo anterior, sólo recientemente se ha estudiado el rol de la vía SHH/Gli en el desarrollo de neuroblastoma, una neoplasia iniciada muy tempranamente en el desarrollo. El neuroblastoma se origina de la cresta neural, durante la embriogénesis, y puede aparecer en cualquiera de los sitios anatómicos a lo largo de la cadena ganglionar simpática desde el cuello a la pelvis, así como en la glándula suprarrenal. Se postula que particularmente deriva a partir de la desregulación en las células de la cresta neural o más tardíamente, en las células de la raíz de los ganglios dorsales (RGD). Además el neuroblastoma constituye el segundo tumor sólido extra-craneal más frecuente en niños [Shahi y cols., 2009; Kamijo & Nakagawara, 2012]. Al respecto, se sabe que diferentes líneas celulares de neuroblastoma y muestras tumorales de pacientes, tienen una alta expresión de los componentes de la vía, como lo son SHH, Ptch1, Smo, Gli 1 y Gli 2 [Mao y cols., 2009; Sousaki y cols., 2010; Shahi y cols., 2011; Xu y cols., 2012]. Además, se ha reportado que la inhibición farmacológica de la vía de SHH/Gli usando el inhibidor ciclopamina o induciendo un silenciamiento transiente del factor de transcripción Gli 2, principal factor activador de la vía, produce una disminución en la capacidad proliferativa de las células de neuroblastoma. Concomitantemente, se produce un aumento en el número de células en fase G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> del ciclo celular, aumenta la apoptosis y hay una disminución en la capacidad de formación de colonias, es decir, se genera un deterioro en la capacidad clonogénica y tumoral de las células de neuroblastoma [Mao y cols., 2009; Xu y cols., 2012]. Sin embargo, el mecanismo subyacente de SHH para promover la supervivencia y la capacidad tumoral de las células de neuroblastoma aún es desconocido.

### **1.7 SHH y Neogenina 1**

Recientemente, Milla y cols. publicaron un trabajo en el que utilizando herramientas de biología molecular aplicadas sobre genotecas de ratón y pez cebra (*Danio rerio*), junto a un exhaustivo análisis predictivo *in silico*, se determinó una serie de genes candidatos como posibles nuevos blancos transcripcionales de la vía de SHH/Gli, entre los cuales figuraba *Neogenina 1* [Milla y cols., 2012].



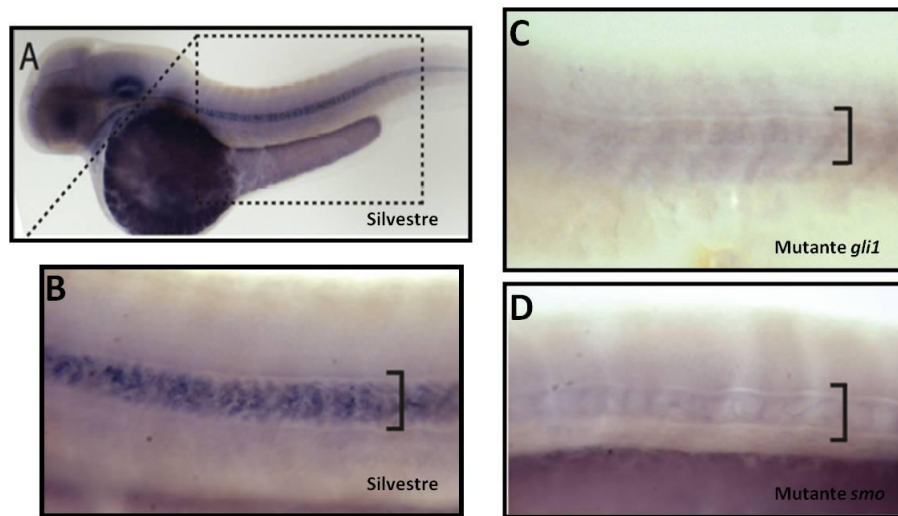
Para validar experimentalmente los resultados anteriores, se realizaron ensayos de pérdida de función farmacológica de la vía de SHH, incubando la línea celular de fibroblastos embrionarios de ratón CH310T1/2 reportera para la acción de SHH, con el antagonista de la vía y se midieron cambios cuantitativos a nivel del ARN mensajero. Particularmente para el gen *neogenina 1*, se verificó una baja en la expresión a partir de las 24 horas de incubación. También se hicieron ensayos de ganancia de función incubando con al agonista de la vía purmorfamina, donde se vio un aumento significativo en la expresión del gen *neogenina 1* a las 24 horas (figura 4).



**Figura 4. Análisis de expresión de *neogenina 1* mediante qPCR.** **A.** Se trataron cultivos celulares de fibroblastos embrionarios de ratón CH310T1/2 con ciclopamina 10  $\mu$ M (barra blanca) durante 6, 12 y 24 horas y en condición control (barras negras). Se muestran los niveles de expresión del gen *neogenina 1* normalizados. A las 24 horas se observa una baja significativa en su expresión. **B.** Ganancia de función de la vía incubando las células con purmorfamina 10  $\mu$ M (barra blanca) y el control del vehículo (barra negra) durante 24 horas, aumentando significativamente la expresión del gen *neogenina 1*. \*  $p < 0,05$ . Tomado de Milla y cols. 2012.

Finalmente, para corroborar que la regulación se replicaba *in vivo*, se hicieron experimentos en embriones de pez cebra, tanto de genotipo silvestre como mutantes para la vía de SHH (figura 5). Al respecto, en embriones silvestres se encontró que el gen *neogenina 1* es fuertemente expresado en la notocorda y SNC, específicamente, en zonas proliferativas como el tectum óptico, el ojo y el diencéfalo. Muy por el contrario, la expresión del gen se

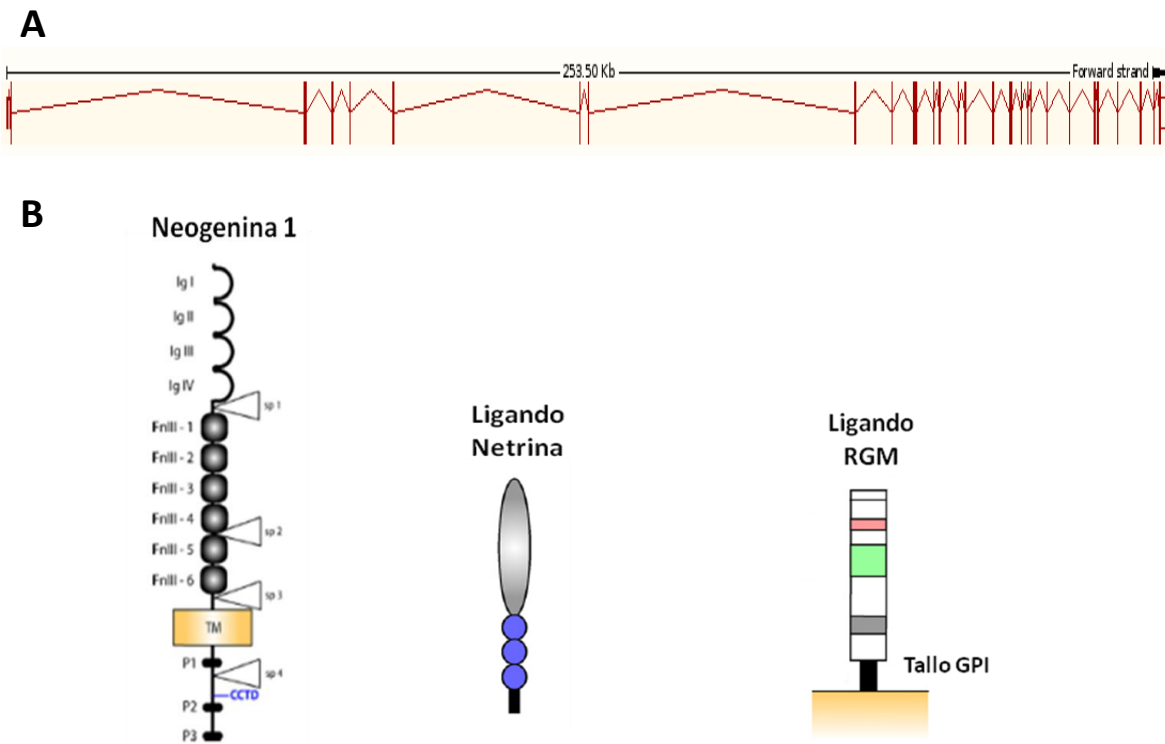
inhibe por completo en embriones mutantes para los componentes de la vía *smo* y *gli1* (figura 5).



**Figura 5. Hibridaciones *in situ* mostrando la expresión del gen *neogenina 1* en embriones de pez cebra silvestres y mutantes para los componentes de la vía SHH/Gli. A.** Expresión del gen *neogenina 1* en la notocorda de embriones de pez cebra silvestre, 48 horas posterior a la fertilización (hpf). **B.** Fotografía aumentada de A. La notocorda se indica en el corchete. **C y D.** Embriones mutantes para *gli1* y *smo*, respectivamente, de 48 hpf. Estos embriones mutantes muestran una ausencia de marca para expresión del gen *neogenina 1* en la notocorda. Tomado de Milla y cols, 2012.

### 1.8 Neogenina 1: Estructura y función

Originalmente, Neogenina 1 fue aislada de tectum de embriones de pollo como un homólogo de la proteína supresora de tumores *Deleted in Colorectal Cáncer* (DCC por sus siglas en inglés), la que como su nombre lo indica, está ausente en cáncer colorectal. La secuencia génica de *Neogenina 1* codifica para varias isoformas, de las cuales la isoforma 1 se considera como la secuencia canónica de Neogenina 1. Esta isoforma es la más larga y consta de 1461 aminoácidos. Su transcrito tiene 27 exones y 26 intrones (figura 6 A). Neogenina 1 pertenece a la superfamilia de receptores transmembrana tipo inmunoglobulinas (Ig). En su porción extracelular, Neogenina 1 presenta cuatro dominios Ig y seis repeticiones fibronectina tipo III, seguidos por un dominio transmembrana, y un tallo citoplasmático, el que posee un sitio de sustrato de corte para caspasa 3 y tres dominios altamente conservados con DCC, P1, P2 y P3 (figura 6 B) [Wilson & Key, 2006].



**Figura 6. Esquema del transcrito y de la proteína Neogenina 1. A.- Esquema del transcrito de la isoforma canónica de Neogenina 1.** Este transcrito codifica para la isoforma más larga de Neogenina 1, con 1461 aminoácidos, tiene 27 exones, señalados en cajas, y 26 intrones. **B.- Esquema de la estructura de la proteína Neogenina 1.** Neogenina 1 consiste en cuatro dominios tipo Ig, seis repeticiones de fibronectina tipo III, un dominio transmembrana y un tallo citoplasmático con tres dominios conservados con DCC, P1, P2 y P3. También, presenta un dominio de sustrato para caspasas CCTD. Se indican en triángulos los sitios de plegamiento alternativo descritos en la secuencia de ratón. Además, se muestran los esquemas de los ligandos de Neogenina 1: Netrina y RGM. Adaptado de Wilson & Key, 2006.

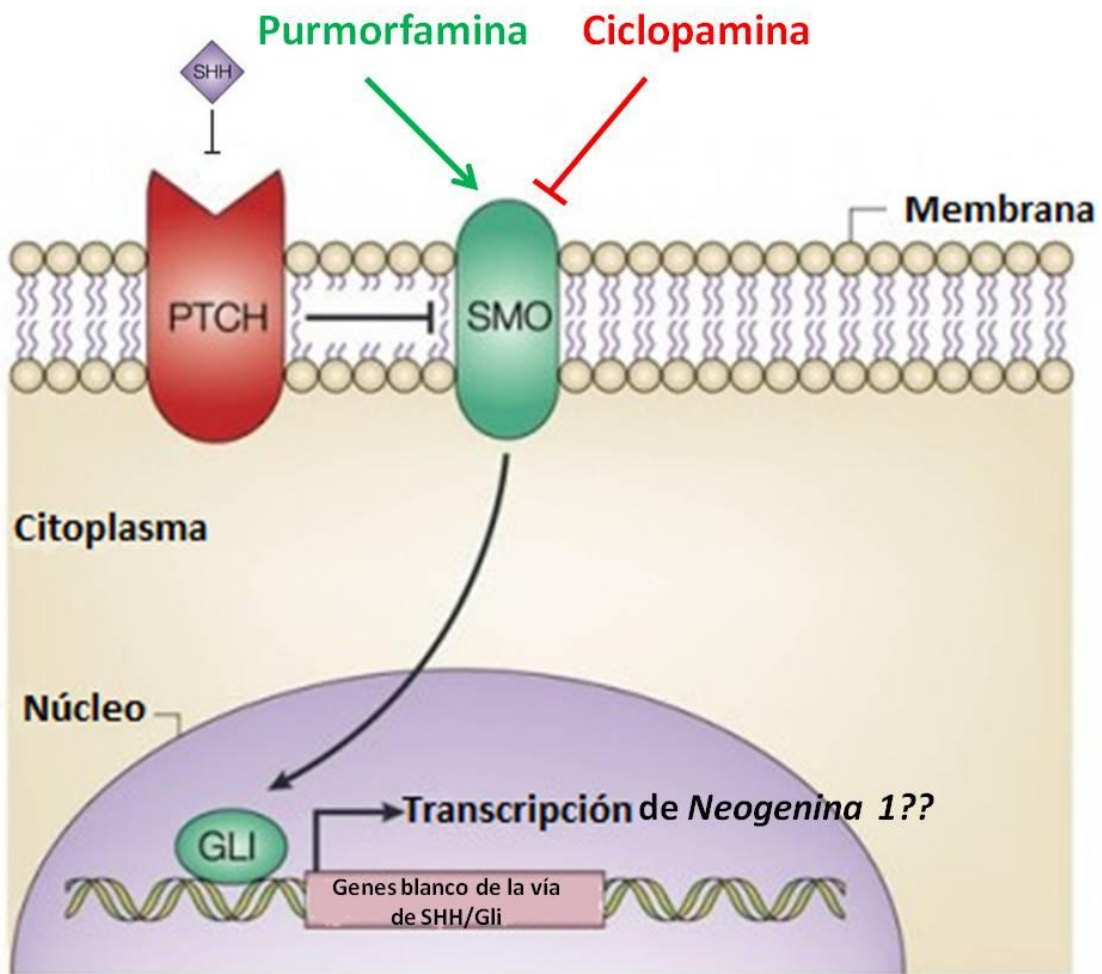
Visto desde la fisiología celular, Neogenina 1 corresponde a un receptor de membrana que puede responder a ligandos diferentes. Se sabe que Neogenina 1, al igual que su homólogo DCC, interacciona con la familia de las proteínas Netrina participando en el proceso de orientación axonal quimioatrayente. Esto ocurre en aquellas neuronas que están prolongando sus axones hacia sus zonas blanco [Wilson & Key, 2006]. Sin embargo, también se ha establecido que Neogenina 1 es un receptor de alta afinidad para la familia de Moléculas de Orientación axonal Repulsiva o RGM, por sus siglas en inglés. RGM fue identificada por primera vez en el año 2002 como una señal repulsiva que contribuye al

mapeo axonal de la retina en el tectum anterior en pollo [Monier y cols., 2002]. Como se ha mencionado anteriormente, Neogenina 1 presenta un alto porcentaje de identidad a la proteína DCC, pero sólo Neogenina 1, y no DCC, se une a RGM. Se sabe también que Neogenina 1 tiene una afinidad 10 veces mayor por RGM que por Netrina. No obstante, la unión de un ligando no afecta la afinidad del otro, por lo que se piensa que ambos ligandos se unen a Neogenina 1 en sitios diferentes [Wilson & Key, 2006].

Varios reportes indican que la expresión de Neogenina 1 es conservada en diferentes estructuras neurales en desarrollo. Los mayores estudios se han llevado a cabo en ratón [Fitzgerald y cols., 2006]. Neogenina 1 es detectada tempranamente, anterior a la formación del tubo neural, en el neuroectodermo. Posterior a la formación del tubo neural, Neogenina 1 se expresa en las poblaciones de los progenitores neurales emergentes, y en la medida en que el desarrollo del SNC va progresando, Neogenina 1 comienza a expresarse en los precursores neurogénicos en activa proliferación, incluyendo a la glía radial, durante la fase de mayor neurogénesis en ratón (entre los 12,5 y 14,5 días de gestación) [Fitzgerald y cols., 2006; Fitzgerald, y cols., 2007]. Además, al momento del nacimiento, la expresión de Neogenina 1 se mantiene sólo en aquellas estructuras cerebrales que sostienen una activa neurogénesis post-natal, como ocurre en el hipocampo y en el cerebelo, atribuyéndole a Neogenina 1 un rol de mantención y proliferación de células troncales y progenitores en el adulto. Como se ha mencionado anteriormente, en todos estos territorios altamente proliferativos hay una expresión sostenida y una actividad importante de la vía SHH/Gli. Se han observado transcritos de *neogenina 1* en tubo neural, ojo y células de la cresta neural en migración, durante el desarrollo embrionario de *Xenopus leavis*. Su expresión también es conservada en pez cebra. Pese a que su expresión temprana no está del todo descrita en pollo, se sabe que durante el desarrollo de RGD, Neogenina 1 comienza a expresarse en el estadio 23 del desarrollo (E3.5) por toda la RGD, con un aumento sostenido hasta el estadio 35 (E8.5), donde alcanza su máximo nivel de expresión [Gessert y cols., 2008; Guan y cols., 2003]. Esto último resulta particularmente relevante, dado que, como ya se ha mencionado, un crecimiento celular descontrolado de las células de la cresta neural ubicadas en la RGD da origen a neuroblastoma.

Neogenina 1 no sólo se expresa en el SNC, sino que también en una variedad de otros tejidos durante el desarrollo embrionario, tales como el músculo cardíaco, el epitelio y el mesénquima pulmonar, intestinal y estomacal. Además, está presente en el epitelio pancreático, mesénquima de la glándula adrenal y riñón, cartílago en diferenciación ósea, en el músculo liso vascular y tejido conectivo de extremidades y de la cara [Fitzgerald y cols., 2006].

En resumen, la proteína Neogenina 1 es ampliamente expresada en territorios sometidos a una vigorosa proliferación durante el desarrollo del embrión vertebrado. En el SNC, Neogenina 1 se localiza en territorios donde se expresan de manera importante los componentes de la señalización de SHH. La expresión génica de *neogenina 1* disminuye en fibroblastos embrionarios de ratón posterior a 24 horas de incubación con el inhibidor de SHH ciclopamina tanto su expresión aumenta a las 24 horas de incubación con el agonista purmorfamina. Además, los ensayos *in vivo* en pez cebra, revelan que los embriones mutantes para *smo* y *gli1* presentan una ausencia de la expresión de *neogenina 1*. Con lo anterior y considerando que la vía de señalización de SHH/Gli se expresa y está activada en neuroblastoma, promoviendo la sobrevida y proliferación de las células tumorales, se propone estudiar el dominio transcripcional que ejercería la vía de señalización de SHH /Gli sobre la expresión génica de *Neogenina 1* en un modelo celular de neuroblastoma humano (figura 7).



**Figura 7: ¿Es *Neogenina 1* un gen blanco transcripcional directo de la vía de señalización de SHH/Gli en un modelo celular humano?** Esquema indicando la pregunta que se plantea resolver en este trabajo de tesis. Purmorphamina y Ciclopamina, se unen directamente a Smo y tienen un efecto estimulante o inhibitorio de la vía, respectivamente. Adaptado de Madorosky & Fulwider, 2011.

## **2.- HIPÓTESIS**

### **2.1 Hipótesis**

Basado en los antecedentes presentados, se propone la siguiente hipótesis:

“Neogenina 1 es un blanco transcripcional directo de la vía de señalización de Sonic Hedgehog / Gli en las células de neuroblastoma humano”

### **2.2 Objetivo General**

Establecer que *Neogenina 1* es un gen blanco directo de la vía de señalización de SHH / Gli en células de neuroblastoma humano.

### **2.3 Objetivos Específicos**

- 1.- Establecer que la línea celular de neuroblastoma humano SH-SY5Y expresa la proteína Neogenina 1.
- 2.- Estudiar los cambios en el patrón de expresión de la proteína Neogenina 1 en condiciones de ganancia y pérdida de función farmacológica de la vía de SHH.
- 3.- Buscar sitios putativos de unión de Gli a la secuencia promotora y en el primer intrón de gen *Neogenina 1* mediante un análisis *in silico*.
- 4.- Estudiar una posible unión directa de los factores transcripcionales Gli a la secuencia promotora y al primer intrón del gen *Neogenina 1* por medio de ensayos de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP).
- 5.- Detectar la funcionalidad de los sitios putativos de unión de Gli por medio de ensayos con el gen reportero luciferasa.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1 MATERIALES

##### 3.1.1 Cultivos Celulares

- Medio Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), n° catálogo 12800-017, Invitrogen (New York, New York, E.E.U.U.).
- Penicilina/Streptomycin 10.000 U/mL / 10.000 ug/mL, Thermo Scientific (Miami, Florida, E.E.U.U.).
- Suero Bovino Fetal (SBF), n° catálogo SH30071.03, Invitrogen (New York, New York, E.E.U.U.).
- Tripsina/EDTA 10X, Invitrogen (New York, New York, E.E.U.U.).

##### 3.1.2 Líneas Celulares

- SH-SY5Y corresponden a células de neuroblastoma humano, provenientes de de una metástasis en médula ósea, ATCC.
- SK-N-SH al igual que la línea SH-SY5Y, corresponden a células de neuroblastoma humano, provenientes de de una metástasis en médula ósea, ATCC.
- DAOY originada a partir de un meduloblastoma desmoplástico cerebelar humano, ATCC.
- U87 proviene de un glioblastoma humano en grado IV, ATCC.
- HEK 293 originadas desde riñón embrionario humano, ATCC.

##### 3.1.3 Fármacos

- Purmorfamina, Calbiochem (New York, New York, E.E.U.U.).
- Ciclopamina, gentilmente donado por Infinity Pharmac (Cambirdge, Massachusetts, E.E.U.U.)

##### 3.1.4 RT-PCR y Síntesis ADN Complementario

- Sistema comercial GoTaq, Promega (San Luis Obispo, California, E.E.U.U.)
- RNA-Solv, Omega Bio-tek (Norcross, Georgia, E.E.U.U.).

##### 3.1.5 Western Blot

- Tampón de lisis celular: SDS 2%, glicerol 10%, Tris-HCl 5 mM pH 6,8
- Inhibidor de Proteasas Halt<sup>TM</sup> Protease & Phosfatase Inhibitor Cocktail, Thermo Scientific (Miami, Florida, E.E.U.U.).
- Tampón de carga 6X: Tris-HCl 1M, pH 6,8, glicerol 3%, SDS 10%, azul de bromofenol  $1,8 \times 10^{-4}$  M,  $\beta$ -mercaptoetanol 0,7 M.
- Tampón de corrida: Tris Base 25 mM, Glicina 0,19 M, SDS 0,1%.
- Tampón de transferencia: Tris Base 48 mM, 39 mM, SDS 0,37%, metanol 20%.
- Solución de bloqueo: leche descremada al 5% disuelta en solución de lavado.
- Solución de lavado: TBS-Tween al 0,1%.
- TBS: Tris-HCl 0,5 M, NaCl 1,5 M, pH 7,4.



- Anticuerpo primario: anti-Neogenina 1, # cat. sc-6536, Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, California, E.E.U.U.).
- Anticuerpo control de carga:  $\beta$ -actina, # cat. A5316, Sigma.
- Anticuerpo secundario: HRP-anti Goat, # cat sc-2020. Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, California, E.E.U.U.).
- Reactivo quimioluminiscente: Pierce ECL Western Blotting, Thermo Scientific (Miami, Florida, E.E.U.U.).

### 3.1.6 InmunoFluorescencia

- Paraformaldehído (PFA) al 4%
- Solución PBS-Tritón X-100 al 0.1% (PBST).
- Anticuerpo primario: anti-Neogenina 1, # cat. sc-6536, Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, California, E.E.U.U.).
- Anticuerpo secundario: IgG Alexa Fluor ® 555 Donkey anti-goat, # cat. A21432, Invitrogen (New York, EEUU).
- Solución de bloqueo: Suero de caballo preparado al 5% en PBST.
- Gel de montaje: Gel/Mount, # cat. M01/V6, Biomed.

### 3.1.7 Plasmidios

- *pGL3 Promoter Vector* y plasmidio *renilla SV-40*, Promega. Gentil donación del Dr. Montecinos, Universidad Andrés Bello, Santiago, Chile.
- pBluescript SK+ (pBSK+)
- Plasmidio *8X-GBS* y *8X-GBSmut*, gentileza del Dr. Sasaki, Osaka University, Osaka, Japón.
- Plasmidio *CMV-Gli 2*, gentileza del Dr. Ruiz i Altaba, University of Geneva Medical School, Geneva, Suiza.

### 3.1.8 Transfecciones

- Sistema comercial Lipofectamine 2000 <sup>TM</sup> Transfection Reagent, Invitrogen (New York, New York, E.E.U.U.).

### 3.1.9 Ensayo de cuantificación de actividad luciferasa

- Sistema comercial Dual-Luciferase® Reporter (DLR <sup>TM</sup>) Assay System, Invitrogen (New York, New York, E.E.U.U.).

### 3.1.10 Inmunoprecipitación de Cromatina

- Se usó el sistema comercial ChIP Kit ab500, Abcam (Cambirdge, Massachusetts, E.E.U.U.).
- .Anticuerpo anti Gli 1, # cat. sc-20687, Santa Cruz (Santa Cruz, California, E.E.U.U.).
- Anticuerpo anti Gli 2, # cat. ab 26056, Abcam (Cambirdge, Massachusetts, E.E.U.U.)
- .Anticuerpo IgG, # cat. sc-2025, Santa Cruz (Santa Cruz, California, E.E.U.U.).

### 3.1.11 Partidores.

Se señalan en la Tabla 1. Todos los partidores fueron diseñados en este trabajo de tesis.

**Tabla 1:** Diseño de partidores usados para RT-PCR, ChIP y mutagénesis sitio dirigida.

<b>Partidores RT-PCR</b>	<b>Secuencia Sentido</b>	<b>Secuencia Antisentido</b>	<b>TM (°C)</b>
<i>GAPDH</i>	5' TGCACCACCAACTGCTTAGC 3'	5' GGCATGGACTGTGGTCATGAG 3'	<b>55</b>
<i>Neogenina 1</i>	5' GCTTCATCAAATTGACGTGGCGGA 3'	5' AGATGTACACGGTCGCTGGCATT 3'	<b>57</b>
<b>Partidores ChIP</b>	<b>Secuencia Sentido</b>	<b>Secuencia Antisentido</b>	<b>TM (°C)</b>
<b>GBS 1</b>	5' GGTCTCCACCTGCTTACCTG 3'	5' CCAACTCCATACCCCAAAGA 3'	<b>55</b>
<b>GBS 2</b>	5' GCCAGGATTTGTGATTACCG 3'	5' GGTGACTAATCCAGGGAACAGA 3'	<b>55</b>
<b>GBS 3</b>	5' AAGGTGATCTCGAAGATTGATGA 3'	5' GGACATCTCCTTGCAAACTT 3'	<b>54</b>
<b>Ptch1</b>	5' GAAGCCGAGGATGCACAC 3'	5' CTGTGAGATGGCTTCGGTTT 3'	<b>55</b>
<b>Partidores Mutaciones Sitio Dirigidas</b>	<b>Secuencia Sentido</b>	<b>Secuencia Antisentido</b>	<b>TM (°C)</b>
<b>GBS 1 mut</b>	5' GATTAGATAGAGAGCTAGCTGCCA GATCACTGGGAATTTAGCAAC 3'	5' GTTGCTAAATCCAGTGATCTGG CAGCTAGCTCTATCTATAC 3	<b>65</b>
<b>GBS 2 mut</b>	5' CTCTCTATTCAGATGGAGAAATTACAT GCCAAATCTCAAATCTTTGTTACCTTTAG 3'	5' CTAAGGTAAACAAAAGATTGGAGAT TTGGCATGTAATTTCTCCATCTGAATAGAGAG3'	<b>65</b>
<b>GBS 3 mut1</b>	5' TTAGGATGGCTCCAGATTTGTTGATTTGG CAGTCTTATATTAGGTCATAATAACT 3'	5' AGTTATTATGACCTAATAAAGACTGCCAA ATCAACAAATCTGGAAGCCATCCTAA 3'	<b>65</b>
<b>GBS 3 mut2</b>	5' CAGAGTTATTTAGGATGGCTCCAGATTTGTT GAAATCCAGTCTTATATTAGGT 3'	5' ACCTAATAAAGACTGGGATTTCAACAAATC TGGAAGCCATCCTAAATAACTCTG 3'	<b>65</b>

## **3.2 MÉTODOS**

### **3.2.1 Cultivos Celulares**

Las líneas celulares de neuroblastoma humano SH-SY5Y y SK-N-SH se cultivaron en medio DMEM al 2,5% de SBF. Las células se mantuvieron en incubador húmedo a 37°C y al 5% de CO<sub>2</sub>. El medio se suplementó con penicilina/streptomina con una concentración final de 50 U/mL /50 µg/mL, respectivamente. Las células se sub-cultivaron al alcanzar una confluencia del 80%. Todos los experimentos se realizaron con células entre los pasajes 18 y 20.

La línea celular DAOY se cultivó en medio MEM suplementado con SBF al 10%, piruvato de sodio 1 mM, L-glutamina 2 mM y penicilina/streptomina con una concentración final de 50 U/mL /50 µg/mL, respectivamente, en incubador húmedo a 37°C al 5% CO<sub>2</sub>.

Las células U87 se cultivaron en medio DMEM suplementado con SBF al 10%, piruvato de sodio 1 mM, L-glutamina 2 mM y penicilina/streptomina con una concentración final de 50 U/mL /50 µg/mL, respectivamente. Se cultivaron en incubador húmedo a 37°C al 5% CO<sub>2</sub>.

La línea celular HEK293 se cultivó en medio DMEM al 5% SBF en atmósfera húmeda a 37°C y al 5% de CO<sub>2</sub>. El medio se suplementó con penicilina/ estreptomina 50 U/mL /50 µg/mL de concentración final.

### **3.2.2 Tratamientos farmacológicos**

Se cultivaron 100.000 células SH-SY5Y en medio DMEM al 2,5% SBF en placas de 6 pocillos en las condiciones anteriormente mencionadas. Una vez alcanzado el 40% de confluencia, las células fueron tratadas durante 48 horas con purmorfamina 10 µM y ciclopamina 5 y 10 µM. Luego de la incubación, las células se procesaron para Western blot.

### **3.2.3 Extracción ARN**

Una vez alcanzado el 80% de confluencia, las células se lavaron tres veces con PBS frío y se les adicionó RNA-Solv en la proporción de 1 mL/ 60 cm<sup>2</sup> de superficie del cultivo. Luego, las células se homogenizaron con jeringa tuberculina y se les adicionó 200 µL de

cloroformo, se mezcló en vórtex durante 15 segundos y se incubó en hielo durante 10 minutos. Después, se centrifugó a 14.000xg durante 15 minutos a 4°C. Se extrajo la fase acuosa y se transfirió a un nuevo tubo con 500 µL de isopropanol frío. Las muestras fueron suavemente invertidas y se observó el ovillo de precipitación de ARN. Las muestras se incubaron durante 10 minutos a temperatura ambiente y se centrifugaron a 12.000g durante 15 minutos a 4°C. El sobrenadante fue descartado y el precipitado se lavó con 500 µL de etanol al 80%, se mezcló en vórtex y se centrifugó a 7500xg durante 5 minutos a 4°C. El etanol se descartó y se dejó secar a temperatura ambiente durante 15 minutos. El precipitado se resuspendió en agua DEPC.

### **3.2.4 Síntesis de ADN complementario**

#### **3.2.4.1 Tratamiento con DNAsa**

A 1 µg ARN se le adicionó 1 µL de DNAsa (1U/µL), 1µL de tampón DNAsa 10X y se llevó a un volumen total de 10 µL con agua DEPC. Se incubó 30 minutos a 37°C. Luego de esto, se agregó 1 µL de la solución *DNAsa Stop Solution* y se trató durante 10 minutos a 65°C.

#### **3.2.4.2 Síntesis de ADN complementario**

A la mezcla anterior se le agregó 0,5 µL de partidores de secuencia aleatoria (3µg/µL de concentración), 4 µL de tampón de reacción 5X, 0,5 µL de RNAsin, 2 µL de dNTPs (10 mM), 1 µL de la enzima *RevertedAID<sup>TM</sup> Transcriptase* (200 U/µL) y se llevó a 20 µL con agua DEPC. Se incubó durante 1 hora a 42°C. La reacción se detuvo incubando 10 minutos a 70°C. El ADN complementario fue almacenado a -20°C.

### **3.2.5 RT-PCR**

Las amplificaciones de ADN complementario se realizaron utilizando el sistema comercial *Go Taq* de Promega, siguiendo las especificaciones del fabricante. La amplificación de *Neogenina 1* y *GAPDH* se realizaron con 35 y 30 ciclos de amplificación, respectivamente. La visualización de las bandas se hizo en un gel de agarosa al 2% de resolución. Los partidores utilizados se indican en la tabla 1.

### 3.2.6 Western Blot

Las células se lisaron con tampón de lisis suplementado con inhibidor de proteasas, se homogeneizaron con jeringa tuberculina y se calentaron durante 5 minutos a 95°C en tampón de carga 6X. Se reservaron alícuotas de las muestras para cuantificar la concentración de las proteínas por sistema comercial *Bio-Rad DC Protein Assay*, siguiendo las indicaciones del fabricante. Se cargaron 20 µg de proteína en un gel al 7,5% acrilamida/bisacrilamida. La electroforesis se realizó en tampón de corrida aplicando voltaje constante de 100 V durante 90 minutos. La electrotransferencia de proteínas se realizó a una membrana de nitrocelulosa en tampón de transferencia durante 2 horas a 400 mA. Para la visualización de las proteínas transferidas se usó el colorante Rojo Ponceau.

Para la inmunodetección de proteínas, la membrana se bloqueó toda la noche con solución de bloqueo a 4°C en agitación. Después, la membrana se incubó con el anticuerpo primario anti Neogenina 1 diluido (1:200) en solución de bloqueo durante 1 hora a temperatura ambiente en agitación moderada. Luego, la membrana se lavó con solución de lavado tres veces 10 minutos con agitación fuerte. Se incubó con el anticuerpo secundario acoplado a HRP durante 1 hora a temperatura ambiente, diluido (1:2000) en solución de bloqueo. Finalmente, la membrana se lavó tres veces durante 10 minutos en solución de lavado y se procedió a revelar con el reactivo quimioluminiscente *Pierce ECL Western Blotting*.

### 3.2.7 Inmunofluorescencia

Se sembraron 10000 células SH-SY5Y en placas de 24 pocillos. A las 24 horas de crecimiento, las células se lavaron con PBS y se fijaron con PFA al 4% a 4°C, haciendo un recambio a los 15 minutos. Luego, las células se lavaron tres veces con PBS frío durante 5 minutos y el mismo procedimiento se realizó con PBST. Se bloqueó con solución de bloqueo durante 1 hora a temperatura ambiente y se dejó incubando con el anticuerpo primario preparado en solución de bloqueo (1:50) toda la noche a 4°C. Se lavó tres veces con PBST durante 5 minutos y se incubó con el anticuerpo secundario 1 hora a temperatura ambiente preparado en solución de bloqueo (1:500). Se lavó tres veces con PBST durante 5 minutos y se incubó con DAPI durante 3 minutos diluido en PBS, se lavó dos veces con PBS para finalmente proceder a montar con reactivo GelMount. Se dejó secar toda la noche en oscuridad.

### **3.2.8 Búsqueda *in silico* de GBS putativos en la secuencia génica de *Neogenina 1***

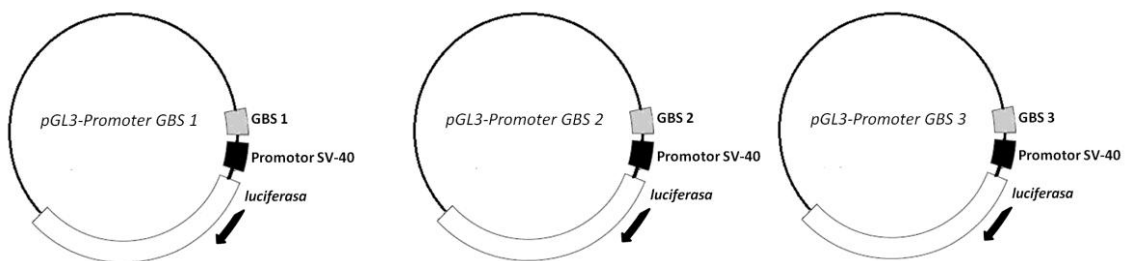
La búsqueda de GBS en el gen de *Neogenina 1* se inició aislando las secuencias correspondientes a los 20 Kb río arriba desde el inicio de la traducción y primer intrón de *Neogenina 1* a partir de la base de datos Ensembl ([www.ensembl.org](http://www.ensembl.org)). Para confirmar la identidad de las secuencias aisladas, se realizó un BLAST de las secuencias en dos base de datos diferentes: National Center for Biotechnology (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) y en el sitio UCSC Genome Bioinformatics (<http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgBlat?command=start>). Luego de corroborar la identidad de las secuencias aisladas, éstas fueron ingresadas al sitio <http://www.cbil.upenn.edu/cgi-bin/tess/tess?RQ=SEA-FR-Query> para hacer uso de la herramienta bioinformática llamada TESS. Este algoritmo TESS se usó para buscar el sitio 5' GAYYRCCCA 3' en las secuencias de *Neogenina 1* aisladas.

### **3.2.9 Inmunoprecipitación de Cromatina (ChIP)**

El ChIP se realizó con el sistema comercial *ChIP Kit ab500*, siguiendo todas las instrucciones del proveedor, a excepción de que se utilizaron 2 millones de células SH-SY5Y en cada inmunoprecipitación. La inmunoprecipitación de cromatina consta de cuatro etapas fundamentales: la fijación de las células, una lisis celular, la inmunoprecipitación de la cromatina y la purificación de ésta. Brevemente, las células se lavaron con PBS y se fijaron con formaldehído, de esta manera se logra estabilizar las interacciones entre ADN y proteínas. Luego, las células se lisaron y se sonicaron. El programa utilizado para sonicar el sobrenadante consistió en 180 segundos de sonicación total con un 20% de amplitud. El tiempo total de sonicación se seccionó en 18 ciclos que consistían en 10 segundos de sonicación seguido por 30 segundos de reposo. Este protocolo permitió obtener cromatina fragmentada entre los tamaños 400 a 200 pb. Luego, se incubó toda la noche con anticuerpos específicos contra los factores transcripcionales Gli 1 y Gli 2 (2 µg de cada uno), después de lo cual se procedió a precipitar el complejo ADN-proteína-Anticuerpo con proteína A. Finalmente, la cromatina se purificó tratando con proteinasa K y centrifugando a 14.000xg. Con esto se obtuvo segmentos de cromatina disponibles para usarla como templado para la reacción de PCR utilizando los partidores ChIP indicados en la tabla 1.

### 3.2.10 Clonamiento de secuencias GBS a un plasmidio de expresión del gen reportero luciferasa

El clonamiento de las secuencias se hizo a partir de ADN genómico de células HEK 293. El ADN fue extraído mediante el sistema comercial *Tissue DNA Kit D3396-01*. Las secuencias GBS fueron aisladas utilizando los partidores para ChIP indicados en la Tabla 1. Una vez aisladas, las secuencias fueron clonadas en el plasmidio pBluescript SK+ (pBSK+) en un sitio EcoRV. Se transformaron bacterias y se seleccionaron colonias blancas, las que fueron confirmadas por una reacción PCR de colonias. Luego de varios PCRs confirmatorios usando los partidos específicos de cada GBS y los partidores T3 y T7 (propios del plasmidio pBSK+), se realizó una digestión con las enzimas Sall1 y Not1. Para confirmar el correcto clonamiento de las secuencias GBS, estos fueron secuenciados. Conforme con la secuenciación, los GBS fueron sub-clonados desde el plasmidio pBSK+ al plasmidios reportero pGL3 Promoter Vector que codifica para el gen reportero luciferasa. Para cortar el plasmidio pBSK+ se usaron las enzimas KpnI y BamHI de manera secuencial y se purificaron las secuencias GBS a partir de un gel de agarosa al 2%. Paralelamente, el plasmidio de expresión pGL3 Promoter Vector se sometió a digestión con las enzimas KpnI y BglIII. Los fragmentos GBS aislados se ligaron independientemente toda la noche al plasmidio de expresión pGL3 Promoter Vector. En seguida, se transformaron bacterias y se seleccionaron colonias con resistencia a ampicilina. Luego, se realizó una PCR de colonias y se secuenciaron los plasmidio pGL3 Promoter Vector con los insertos respectivos. La figura 8 muestra un esquema de los plásmidos de expresión generados con los sitios GBS clonados.



**Figura 8: Esquema de los plásmidos reporteros generados mediante el clonamiento de las secuencias GBS.** Los sitios GBS 1, GBS 2 y GBS 3 se clonaron, de manera independiente, río arriba del gen que codifica para la enzima luciferasa en la construcción pGL3 Promoter.

### 3.2.11 Mutaciones sitio dirigidas

Las mutaciones sitio dirigidas se generaron mediante una reacción de PCR utilizando los partidores señalados en la Tabla 1. La mezcla para la reacción de PCR fue la siguiente: 1 µL de enzima *PfuTurbo*<sup>TM</sup> *DNA polymerase* (2.5 U/ µl), 5 µL de tampón de reacción 10X, 25 ng de ADN templado, 125 ng de partidores, 1 µL de dNTPs 10 mM, 3 µL de DMSO y se llevó a 50 µL de reacción con agua DEPC. El programa de la reacción de PCR se indica en la Tabla 2.

**Tabla 2: Programa de la reacción de PCR para la obtención mutaciones sitio dirigidas.**

Segmento	Ciclos	Temperatura	Tiempo (minutos)
1	1	95°C	1:00
2	18	95°C 60°C 68°C	0:50 0:50 1:00 por kb
3	1	68°C	7:00

Terminada la reacción de PCR, se añadió 1 µL de la enzima de restricción Dpn I (10U/µL) y se incubó durante 1 hora a 37°C. Finalmente, se transformaron 5 µL del producto PCR. Las mutaciones se verificaron mediante secuenciación.

### 3.2.12 Transfección de células HEK293

Las transfecciones celulares se hicieron con el sistema comercial *Lipofectamine 2000*<sup>TM</sup> *Transfection Reagent* con algunas modificaciones. El día anterior a la transfección se sembraron 10.000 células HEK293 (pasaje 12) en placas de 96 pocillos previamente tratadas con polilisina. Para el cultivo, se usó medio DMEM al 5% de SBF suplementado con penicilina/ estreptomycin 50 U/mL /50 µg/mL y se crecieron en incubador toda la noche a 37°C al 5% de CO<sub>2</sub>. Inmediatamente anterior a la transfección, el medio con antibiótico se retiró y las células se lavaron cuidadosamente con PBS estéril y se adicionó 100 µL medio DMEM al 5% SBF, sin antibiótico. Para cada condición, se transfectaron 0,2 µg de ADN plasmidial total. El ADN plasmidial fue diluido en 25 µL de medio Opti-MEM. En paralelo, se diluyeron 0,5 µL de lipofectamina en 25 µL de Opti-MEM. Después de 5



minutos de incubación a temperatura ambiente, se combinaron ambas soluciones y se dejó reposar 20 minutos a temperatura ambiente. Luego, los 50  $\mu\text{L}$  de solución total se adicionaron suavemente sobre las células. Después de 5 horas de incubación a 37°C y 5% de  $\text{CO}_2$ , se retiró el medio de transfección y se reemplazó por 200  $\mu\text{L}$  de medio DMEM al 5% de SBF con penicilina/ estreptomycin 50 U/mL /50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y se incubó durante 48 horas a 37°C.

### 3.2.13 Ensayo Luciferasa

Para cuantificar las actividades luciferasa, se dispuso del sistema comercial *Dual-Luciferase® Reporter (DLR™) Assay System*, con mínimas modificaciones. Este ensayo cuenta con un sistema dual de detección de actividad luciferasa: primero se detecta la actividad enzimática proveniente de luciérnaga, codificada en el plasmidio reportero *pGL3 Promoter Vector*, en donde se clonaron las secuencias GBS humanas. Posteriormente, se detecta la actividad luciferasa proveniente de *Renilla*, codificada en el plasmidio *Renilla SV-40*. Esta actividad es utilizada para normalizar las lecturas provenientes del plasmidio reportero. La lisis celular se hizo agregando 20  $\mu\text{L}$  de la solución *Passive Lysis Buffer* a cada pocillo. La placa se rotó suavemente durante 15 minutos a temperatura ambiente luego de lo cual se guardó a -80°C hasta el momento de las mediciones. Para realizar las cuantificaciones de actividad luciferasa, se tomaron 10  $\mu\text{L}$  del lisado celular y se mezcló con 50  $\mu\text{L}$  del reactivo LAR II, este reactivo contiene el sustrato de la reacción para medir la luminiscencia producida por la enzima luciferasa de luciérnaga. Luego de que la actividad de luciérnaga es leída por el luminómetro, se agregó inmediatamente 50  $\mu\text{L}$  del reactivo *Stop & Glo Reagent* al tubo. De esta forma se detiene la reacción de luciérnaga y se suministra el sustrato para la reacción de la luciferasa de *Renilla*.

Las construcciones que se transfectaron para realizar los ensayos de reportero luciferasa fueron las siguientes:

- El Plasmidio *8X-GBS*, con ocho sitios GBS consenso clonados en serie río arriba del gen reportero luciferasa. El plasmidio *8X-GBSmut*, con los ocho GBS dispuestos de la misma manera pero en su versión mutada. Estos plasmidios se utilizaron como control positivo y negativo del ensayo reportero luciferasa, respectivamente.
- Plasmidio *renilla SV-40*.

- Plasmidio *CMV-Gli2*, codifica para el factor transcripcional Gli 2 en su forma activadora.
- Plasmidios *pGL3-Promoter GBS 1*, *pGL3-Promoter GBS 2* y *pGL3-Promoter GBS 3*. Cada uno cuenta con el correspondiente GBS clonado río arriba del gen reportero luciferasa. Los plasmidios *pGL3-Promoter GBS 1 mut*, *pGL3-Promoter GBS 2 mut* y *pGL3-Promoter GBS 3 mut1* y *pGL3-Promoter GBS 3mut 2*, contienen los respectivos GBS en sus versiones mutadas.

### **3.2.14 Análisis Estadístico**

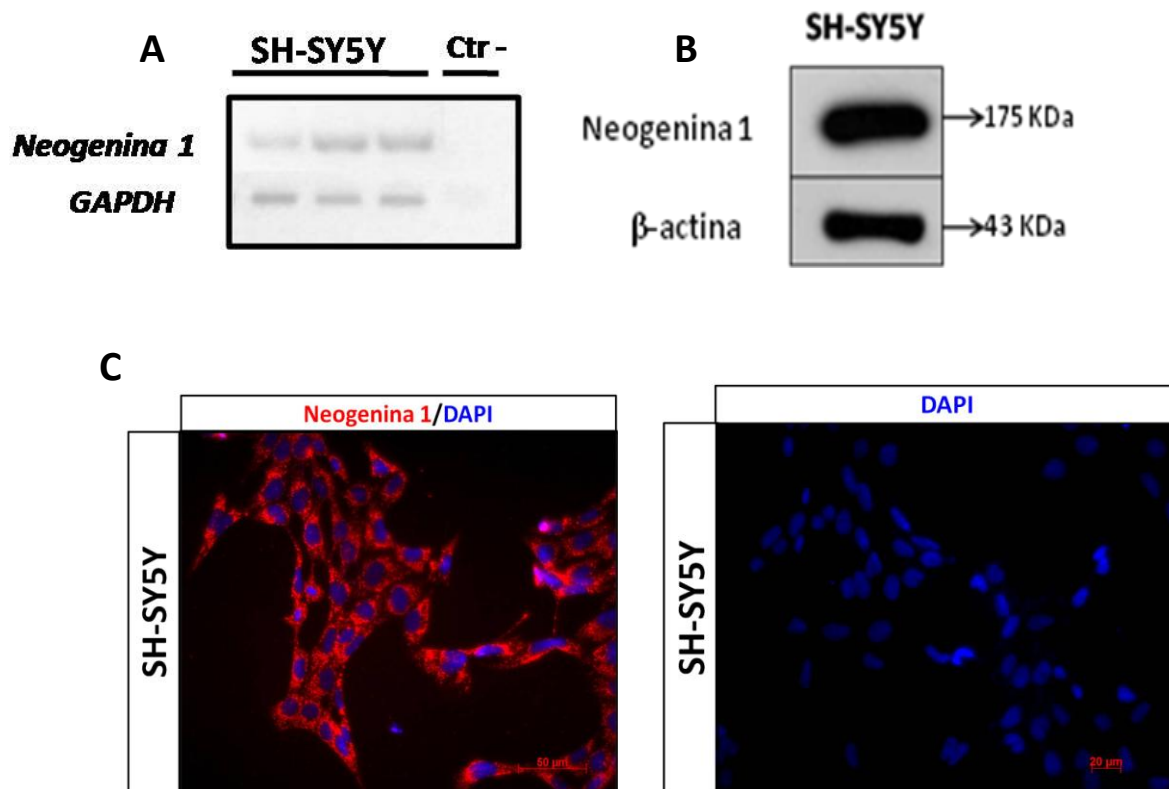
Todos los análisis estadísticos y los gráficos mostrados se hicieron con el programa GraphPad Prism 5. Para estudiar diferencias entre los grupos experimentales, se aplicó la prueba no paramétrica t-Student de dos colas, considerando los resultados significativamente diferentes cuando  $p < 0,05$ . Para todos los casos, se graficó el promedio de los experimentos en triplicado  $\pm$  la desviación estándar.

## **4. RESULTADOS**

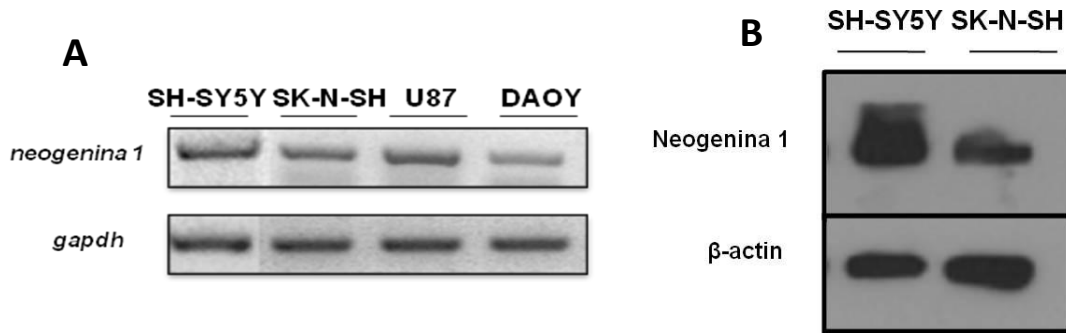
El desarrollo de este trabajo se inició evaluando cambios en la expresión de Neogenina 1 humana en cultivos celulares de la línea de neuroblastoma humano SH-SY5Y, en experimentos de ganancia y pérdida de función farmacológica de la vía de SHH/Gli. Para profundizar en un posible mecanismo regulatorio de la vía de SHH sobre la expresión de Neogenina 1, se buscó sitios de reconocimiento de los factores de transcripción Gli en la secuencia génica de *Neogenina 1*. Habiendo encontrado tres posibles sitios regulatorios, se estudió a continuación la capacidad de reconocimiento y unión de los factores transcripcionales Gli a estos elementos de respuesta. Finalmente, se evaluó la funcionalidad de estos sitios. Para ello, se clonaron los sitios de reconocimiento de Gli encontrados en la secuencia de *Neogenina 1* de manera independiente en un vector de expresión en un sitio río arriba del gen reportero que codifica para la enzima luciferasa y se evaluó la actividad luciferasa.

### **4.1 Detección de la expresión de la proteína Neogenina 1 en la línea celular de neuroblastoma humano SH-SY5Y**

En primer lugar se verificó que el modelo a usar en este estudio, la línea celular de neuroblastoma humano SH-SY5Y, expresa la proteína Neogenina 1. Para ello, se cultivaron células SH-SY5Y durante 48 horas en condiciones basales y se extrajo ARN y proteínas. En la figura 9 se muestra la expresión de Neogenina 1 por medio de RT-PCR y Western blot. Además, se realizó una inmunofluorescencia de los cultivos celulares, observándose una expresión punteada y homogénea de Neogenina 1 en el citoplasma de todas las células. Cabe hacer notar que, tal como lo indica la figura 10, la expresión basal de Neogenina 1 es alta en estas células en comparación con otras líneas tumorales, inclusive comparando con otra línea de neuroblastoma ampliamente usada como es la SK-N-SH.



**Figura 9: Neogenina 1 se expresa en la línea celular de neuroblastoma humano SH-SY5Y.** **A.** Se muestra el nivel transcripcional del gen *Neogenina 1* mediante RT-PCR en triplicado. **B.** Western Blot mostrando expresión de la proteína Neogenina 1 (175 KDa). Se usó como control de carga  $\beta$ -actina (45 KDa). Las flechas indican los pesos moleculares de las proteínas. **C.** Inmunofluorescencia de las células cultivadas en medio DMEM al 2,5% SBF. Panel de la izquierda muestra una distribución punteada y homogénea de la proteína Neogenina 1 (visualizada en rojo) en el citoplasma de las células de neuroblastoma, acompañada de contra-tinción DAPI (en azul) para la identificación de los núcleos celulares. Panel de la derecha se muestra control del anticuerpo secundario.



**Figura 10: Expresión de Neogenina 1 en diferentes líneas celulares.** **A.** RT-PCR mostrando el nivel de mRNA de *Neogenina 1* en las líneas celulares de neuroblastoma humano SH-SY5Y y SK-N-SH, en una línea de glioblastoma (U87) y meduloblastoma (DAOY). Se usó *GAPDH* como control de carga. **B.** Immunoblot de Neogenina 1 revela altos niveles de expresión en la línea celular SH-SY5Y, corroborando los resultados del RT-PCR. Los niveles de Neogenina 1 en las células SH-SY5Y son aproximadamente el doble que en la línea SK-N-SH.

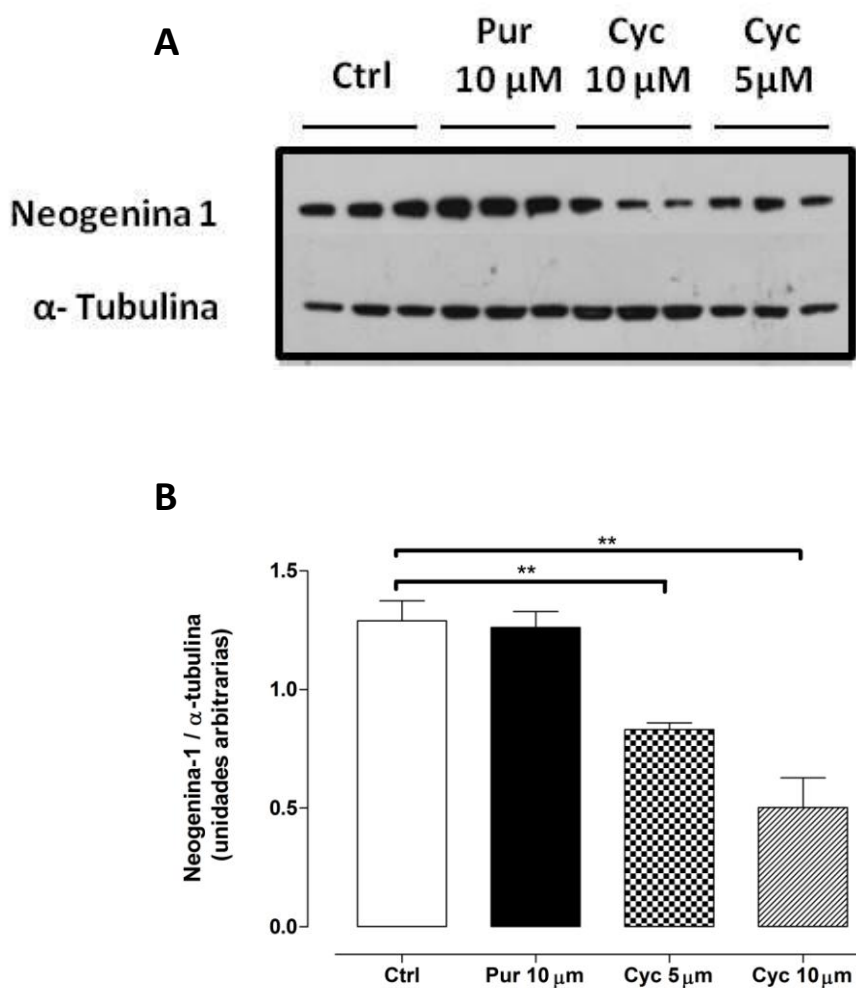
#### 4.2 Detección de cambios en el nivel de Neogenina 1 al producir alteraciones en la vía de señalización de SHH/Gli

##### *Los ensayos de pérdida de función de la vía de SHH/Gli disminuyen el nivel de Neogenina 1*

Con el fin de estudiar los cambios en el patrón de expresión de la proteína Neogenina 1 en condiciones de ausencia y presencia de la vía de SHH/Gli, se hicieron ensayos farmacológicos incubando los cultivos celulares con ciclopamina y purmorfamina, antagonista y agonista de la vía, respectivamente. Los cultivos celulares se trataron con purmorfamina 10  $\mu$ M y con ciclopamina en dos concentraciones: 5 y 10  $\mu$ M, durante 48 horas en medio DMEM suplementado con SBF al 2,5%.

Como se ve en la figura 11, mediante Western blot se observó una disminución estadísticamente significativa (t-student,  $p < 0,05$ ) en la expresión de la proteína Neogenina 1 en presencia del antagonista de la vía de SHH. Estos cultivos revelaron una baja en la expresión de manera dosis dependiente. Sin embargo, no se observó un aumento significativo de la expresión en los tratamientos con purmorfamina. En resumen, la

expresión de la proteína Neogenina 1 observada en la línea celular SH-SY5Y, es dependiente de SHH y sensible a alteraciones en la recepción del ligando SHH a través del co-receptor Smo.



**Figura 11: Disminución en el nivel de la proteína Neogenina 1 en ausencia de la vía SHH/Gli.** **A.** Inmunoblot realizado posterior a 48 hrs de tratamiento según se indica. Pese a que no se aprecia un aumento al tratar con el agonista purmorfamina, las muestras tratadas con ciclopamina revelan una baja en la expresión del receptor de manera dosis dependiente. **B.** Cuantificación del Western blot, indicando diferencias significativas de las muestras tratadas con el inhibidor comparadas con su control.  $n=3$ , t-Student no paramétrico,  $**p<0,05$ . Ctrl; control; Pur, purmorfamina; Cyc, ciclopamina.

### 4.3 Búsqueda de sitios putativos de unión de Gli (GBS) tanto en la secuencia promotora como en el primer intrón del gen *Neogenina 1* humano.

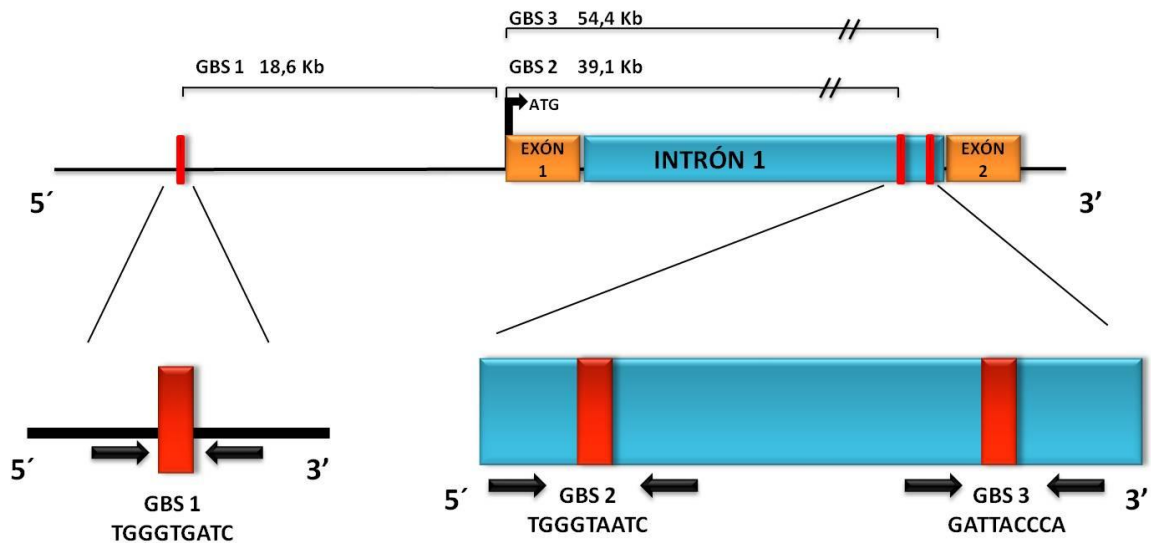
#### *Existen tres sitios putativos de unión de Gli en la secuencia del gen Neogenina 1*

Para realizar la búsqueda *in silico* de sitios putativos de unión de Gli en la secuencia de *Neogenina 1* humana, se comenzó aislando la secuencia del primer intrón y 20 Kb corriente arriba del inicio de la transcripción del gen *Neogenina 1* a partir de la base de datos *Ensembl* ([www.ensembl.org](http://www.ensembl.org)), proyecto que almacena secuencias de genomas de vertebrados y organismos eucarióticos. Una vez obtenidas ambas secuencias, se realizó una búsqueda de alineamientos locales (BLAST por su nombre en inglés) para confirmar la identidad de las secuencias aisladas. Los alineamientos se realizaron en dos bases de datos diferentes: *National Center for Biotechnology* (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) y en *UCSC Genome Bioinformatics* (<http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgBlat?command=start>). Una vez confirmado el correcto aislamiento de las secuencias requeridas, se procedió a utilizar una herramienta bioinformática capaz de predecir sitios de unión de factores de transcripción en secuencias de ADN. Esta herramienta denominada TESS (*Transcription Element Search System*, por sus siglas en inglés), se usó para buscar sitios de unión de los factores de transcripción Gli o GBS en la secuencia del gen *Neogenina 1*. La literatura reporta un GBS consenso 5' GACCACCA 3', originalmente identificados en humanos y que es conservada en ratón. Sin embargo, hoy se aceptan como sitios de respuesta a Gli secuencias diferentes a la de consenso, que pueden tener un, dos o hasta tres cambios de bases, conocidas como secuencias no-consenso. Es por esto que se decidió ampliar la búsqueda de sitios GBS en la secuencia de *Neogenina 1*, incluyendo en ella la búsqueda de sitios no-consenso. Adicionalmente, por observaciones realizadas en búsquedas desarrolladas en el laboratorio, la secuencia consenso presenta un "core" o núcleo de mayor variabilidad que ocurre en las posiciones 3C4C5A. Para incluir este core en el análisis *in silico*, se decidió buscar la secuencia 5' GAYYRCCCA 3' en *Neogenina 1*, donde "Y" puede ser Citosina o Timina, y "R", Adenina o Guanina.

Como se muestra en la figura 12, en la búsqueda no se encontraron sitios consenso, sin embargo si se encontraron tres sitios putativos no consenso de unión de Gli: (i) un sitio, llamado GBS 1, ubicado a 18,6 Kb río arriba desde el inicio de la traducción del gen

*Neogenina 1* (5' TGGGTGATC 3', hebra antisentido), (ii) otro sitio, llamado GBS 2 (5' TGGGTAATC 3', hebra antisentido), a localizado a 39,1 Kb río abajo desde el inicio de la traducción y (iii) un tercer sitio llamado GBS 3 a 54,4 Kb río abajo desde el inicio de la traducción del gen *Neogenina 1* (5' GATTACCCA 3', hebra sentido). Los GBS 2 y GBS 3 se encuentran localizados dentro del primer intrón del gen *Neogenina 1*.

### Ubicación de los GBS en la Secuencia Génica de *Neogenina 1*



**Figura 12: Ubicación de los sitios putativos de unión a Gli en la secuencia del gen *Neogenina 1*.** Esquema representativo de la secuencia de *Neogenina 1* con los sitios putativos de unión de Gli (esquemáticos en cajas rojas) encontrados mediante la búsqueda *in silico*. La búsqueda arrojó 3 sitios posibles de unión de Gli: (i) un sitio llamado **GBS 1** (5'TGGGTAATC3') a 18,6 Kb río arriba desde el inicio de la traducción del gen *Neogenina 1*, (ii) un segundo sitio llamado **GBS 2** (5'TGGGTAATC3') posicionado a 39,1 Kb río abajo desde el inicio de la traducción. y (iii) un tercer sitio llamado **GBS 3** (5' GATTACCCA 3') posicionado a 54,4 Kb desde el inicio de la traducción del gen *Neogenina 1*. Los exones se señalan en naranja y el intrón 1 se señala en celeste, la flecha indica el inicio de la traducción del gen *Neogenina 1*. Las flechas negras esquematizan las posiciones de los partidores usados en la inmunoprecipitación de cromatina y en el clonamiento de las secuencias putativas de unión a Gli.



#### **4.4 Detección de unión de los factores de transcripción Gli en regiones regulatorias putativas en la secuencia promotora y primer intrón del gen *Neogenina 1*.**

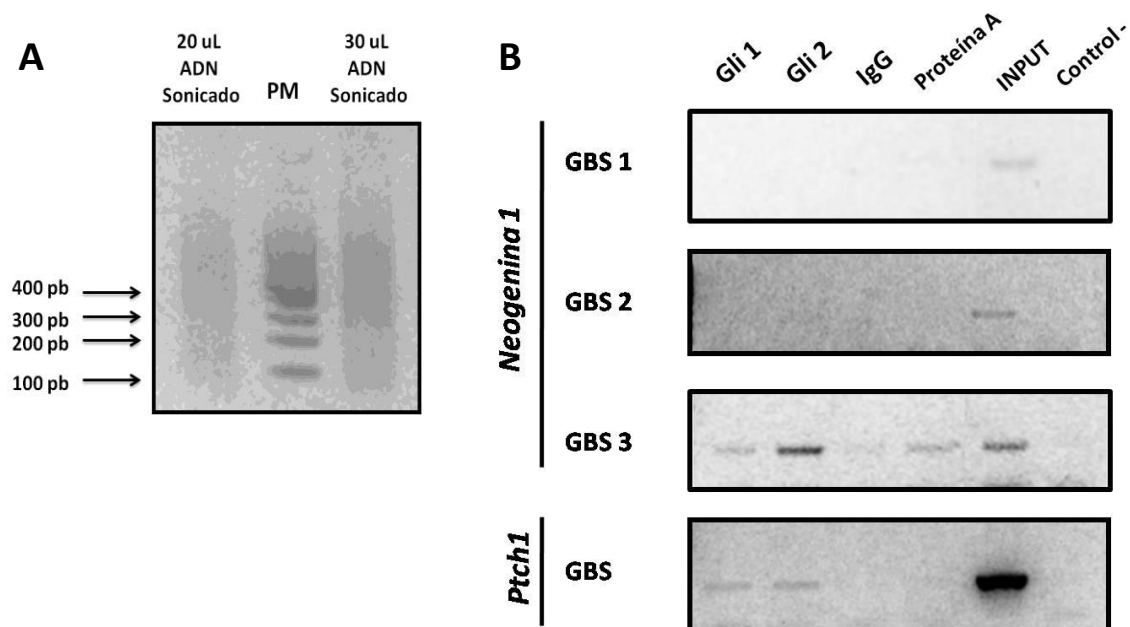
##### ***Gli 2 reconoce y se une directamente al sitio GBS 3 en el primer intrón de Neogenina 1***

Para estudiar una posible unión directa de los factores de transcripción Gli a los sitios GBS 1, GBS 2 y GBS 3, se realizaron ensayos de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP, por sus siglas en inglés) en cultivos celulares de la línea de neuroblastoma humano SH-SY5Y. En la figura 13A se muestra la calidad del ADN sonificado utilizado en el ChIP, donde se observa un enriquecimiento de fragmentos de ADN entre 400 a 200 pb, requisito para una óptima inmunoprecipitación. La figura 13B presenta las bandas de la cromatina inmunoprecipitada amplificadas mediante PCR. Los partidores utilizados para las reacciones de amplificación por PCR se indican en la tabla 1. Para verificar los resultados obtenidos en el ChIP, se incluyó un control de isotipo de los anticuerpos anti Gli 1 y anti Gli 2. Para ello, se usó un anticuerpo IgG sin especificidad alguna. Además se incluyó un control usando únicamente proteína A para precipitar. También se muestra el INPUT de la cromatina y el control negativo de las reacciones de PCR. Como control positivo del ensayo de ChIP, se incluyó la amplificación de un GBS clásicamente descrito en el promotor del gen *Ptch1* [Winklmayr y cols., 2010]. Como ya se ha mencionado anteriormente, *Ptch1* es un gen de respuesta a la vía de señalización de SHH/Gli. Los partidores del GBS de *Ptch1* se señalan en la tabla 1.

De acuerdo a lo mostrado en la figura 13B, no se observó unión directa de los factores transcripcionales Gli 1 ni Gli 2 al sitio GBS 1. Tampoco se obtuvo amplificado en los controles IgG y Proteína A, aunque se obtuvo una débil banda en el INPUT. Para el sitio GBS 2, tampoco se observaron bandas amplificadas para las inmunoprecipitaciones realizadas usando los anticuerpos anti Gli 1 y anti Gli 2, sus controles IgG y proteína A se muestran negativos. En tanto para el sitio GBS 3, se muestra una fuerte banda amplificada en la inmunoprecipitación hecha contra Gli 2, banda que es comparable a la obtenida para su INPUT. Se observa también una banda de baja intensidad para este sitio en la inmunoprecipitación contra Gli 1. No obstante, se descarta una unión directa del factor transcripcional Gli 1 al sitio GBS 3, ya que la banda obtenida es muy similar a la de los controles IgG y proteína A. Finalmente, se muestran las bandas de amplificación por PCR

obtenidas para el GBS en la secuencia del gen *Ptch1*, mostrando un resultado positivo para la inmunoprecipitación contra Gli 1 y Gli 2, con una fuerte banda resultante para su INPUT, validando entonces el resultado de este ChIP.

Podemos afirmar, por tanto, que el sitio GBS 3 presente en el intrón 1 del gen *Neogenina 1*, es reconocido por el factor de transcripción Gli 2 en células humanas. La funcionalidad de los tres sitios encontrados se abordará en la próxima sección.



**Figura 13: El factor de transcripción Gli2 se une a un elemento de respuesta putativo ubicado en el primer intrón del gen *Neogenina 1*.** **A.** Se muestra el tamaño del ADN sonificado que se utilizó en esta inmunoprecipitación de cromatina en un gel al 2% de agarosa. Se puede observar un enriquecimiento de fragmentos de ADN con tamaño entre 400 - 200 pb. Las flechas indican los tamaños de estándar de peso molecular (PM) Winkler® 100 pb. **B.** La inmunoprecipitación de cromatina se realizó a partir de células SH-SY5Y, usando anticuerpos anti Gli 1 y anti Gli 2, seguido por una amplificación de PCR donde se usó partidores específicos diseñados para cada uno de los sitios posibles de unión a Gli. La inmunoprecipitación muestra en un gel de agarosa al 2% de resolución que existe una unión directa del factor Gli 2 al sitio GBS 3. Como control positivo de la inmunoprecipitación, se hizo una reacción de PCR usando partidores específicos de un sitio de unión descritos para Gli presente en el promotor del gen *Ptch1*.

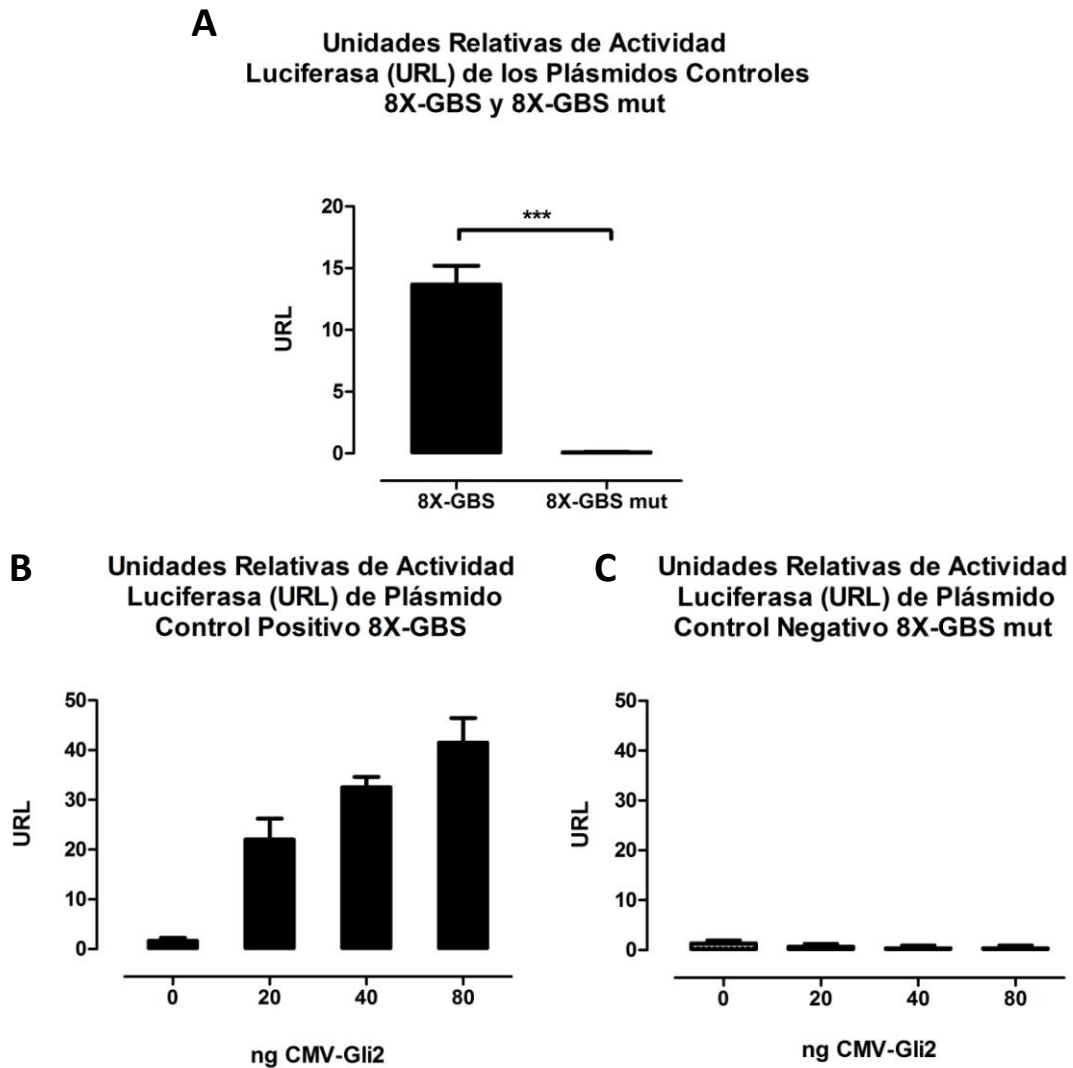
#### **4.5 Estudio de la funcionalidad de los putativos GBS presentes en *Neogenina 1***

##### ***El Sitio GBS 3 es activado por el factor de transcripción Gli 2***

Con el fin de verificar si los sitios putativos GBS encontrados en el gen de *Neogenina 1* son activados por los factores de transcripción Gli, estos sitios se clonaron en un vector de expresión río arriba del gen reportero luciferasa.

Como modelo experimental del ensayo, se diseñaron diferentes transfecciones, con un sistema dual de detección de actividades de distintas luciferasas; tal sistema consta de: (i) un plasmidio experimental en el cual se clonaron los GBS putativos de manera independiente (*pGL3-Promoter GBS 1*, *pGL3-Promoter GBS 2* y *pGL3-Promoter GBS 3* (figura 8) y (ii) un plásmido como control interno de transfección (*renilla SV-40*) que se usó para normalizar las lecturas de luciferasa. Además, como activador de los GBS se usó al plásmido *CMV-Gli2* que codifica para el factor de transcripción Gli 2 en su forma activadora.

Para verificar que el sistema de transfección respondía correctamente, se hizo un primer ensayo midiendo las actividades de luciferasa de los plasmidios controles: como control positivo se utilizó una construcción en la cual se insertaron ocho sitios consenso de reconocimiento para Gli (*8X-GBS*) en serie y como control negativo, se utilizó un plásmido en el que se insertaron 8 sitios en serie de reconocimiento para Gli mutados (*8X-GBSmut*) [Sasaki y cols., 1997]. Como se muestra en la figura 14A, no se registró respuesta para el plásmido *8x-GBSmut*, mientras que para el control positivo se midió una respuesta 14 veces mayor. Con esto se demuestra que el sistema de transfección realizada con Gli 2 activador es funcional y reconoce los GBS consenso.



**Figura 14: Sistema de transfección responde de manera dosis dependiente al factor de transcripción Gli2.** **A.** Se grafican las URL (unidades relativas de actividad luciferasa) obtenidas para el plásmido 8X-GBS (control positivo de la transfección) y el plásmido 8X-GBS mut (control negativo). La actividad luciferasa proveniente del plásmido 8X-GBS fue activada y tuvo una lectura de 14 ULR, mientras que la actividad proveniente del plásmido 8X-GBS mut no fue activada. n=3, t-student, \*\*\* p<0,001. **B** y **C.** Se muestran las ULR de actividad luciferasa con diferentes cantidades de CMV-Gli2. Se transfectaron cantidades crecientes (0,20, 40 y 80 ng) de CMV-Gli2 junto con 20 ng de las construcciones 8X-GBS y 8X-GBSmut, según sea el caso. Se cuantificaron las actividades luciferasa 48 horas posteriores a la transfección. Para el plásmido control positivo, se obtuvo lecturas crecientes de actividad luciferasa conformes a la cantidad del plásmido CMV-Gli2 agregadas. Para el control negativo, no se registró actividad con ninguna de las cantidades de CMV-Gli2 adicionadas.

Con el fin de determinar la cantidad de plasmidio activador (CMV-Gli2) a usar en los experimentos, y para modelar la respuesta del sistema de transfección, se realizó una curva dosis-respuesta de la actividad luciferasa con diferentes cantidades del plasmidio Gli 2 activador. Como se grafica en la figura 14B, se observa una respuesta proporcional a las cantidades de Gli 2 activador usado; con esto se decidió realizar las transfecciones experimentales utilizando 80 ng del plasmidio Gli 2 activador, punto donde se obtiene la mayor respuesta dentro del rango de dosis ensayadas. Para el plásmido control negativo (figura 14C), no se observó respuesta de la actividad luciferasa en ninguna de las cantidades ensayadas del plasmidio activador. Con lo anterior, se confirma que el sistema respondió de un modo dosis-dependiente.

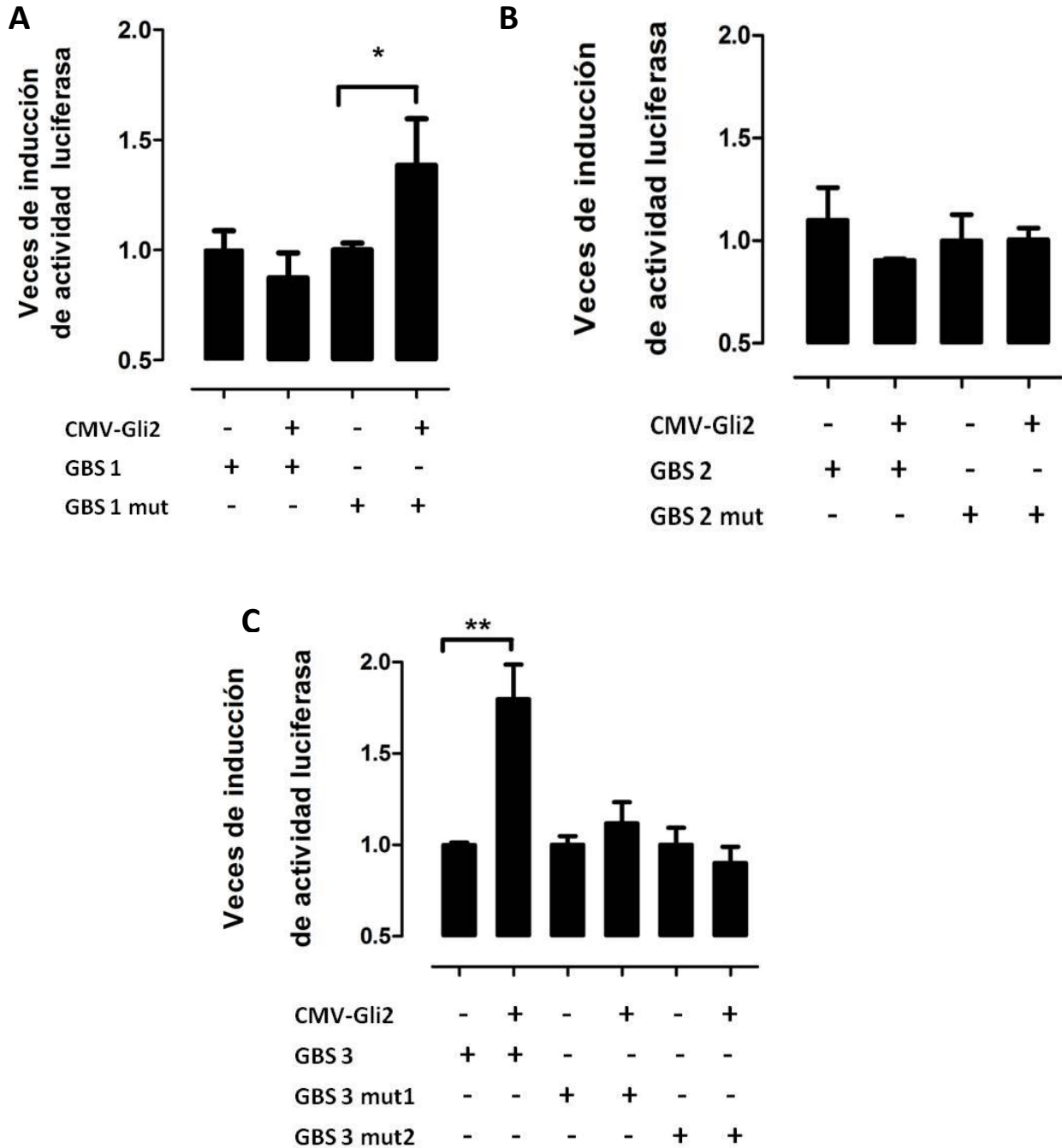
Finalmente, en la figura 15 se grafican las actividades luciferasa normalizadas obtenidas para los sitios GBS 1, GBS 2 y GBS 3, tanto en sus versiones silvestres como mutadas (mostrados en la tabla 3). También se muestran las actividades de luciferasa controles obtenidas en ausencia del activador Gli 2. Para el sitio GBS 1, no se registró inducción de la actividad luciferasa, pero se detectó un aumento de la actividad en su versión mutada, que resultó ser significativa respecto de su control. En cuanto al sitio GBS 2, tampoco se obtuvo una inducción de la actividad luciferasa, observándose incluso una leve baja en su actividad respecto de su control sin el activador. En tanto, para el sitio GBS 3 se obtuvo una inducción de la actividad de luciferasa mayor al 50% respecto de su control sin activador, lo cual se considera una inducción biológicamente funcional. Tal inducción fue totalmente abolida al ensayar ambas versiones mutadas del sitio GBS 3 (GBS 3 mut1 y GBS 3 mut2). Por lo tanto, el aumento en la actividad luciferasa inducida por el factor de transcripción Gli 2 es específico para el sitio GBS 3.

**Tabla 3: Secuencia de los sitios GBS silvestre y mutados que se utilizaron en el ensayo de reportero luciferasa.** Las mutaciones sitio dirigidas utilizadas en el ensayo del gen reportero luciferasa se indican en **negrita** y **subrayado**.

	GBS 1	GBS 2	GBS 3
<b>Silvestre</b>	5' TGGGTGATC 3'	5' TGGGTAATC 3'	5' GATTACCCA 3'
<b>Mutado</b>	5' TG <u>cca</u> GATC 3'	5' TG <u>cca</u> AATC 3'	5' GATT <u>gg</u> CA 3' (1) 5' GA <u>aat</u> CCCA 3' (2)

(1) Sitio GBS mut 1

(2) Sitio GBS mut 2



**Figura 15: El sitio GBS 3 fue activado por el factor de transcripción Gli 2.** En A, B y C se grafica las veces de inducción de la actividad luciferasa normalizada para los sitios GBS 1, 2 y 3, respectivamente, durante 48 horas de transfección. Se muestran la inducción de respuesta para los sitios silvestre y los sitios mutados, en ausencia y presencia del activador Gli 2. Sólo el sitio GBS 3 mostró una inducción considerada biológicamente significativa, es decir, sobre el 50% de inducción respecto de su control en ausencia de Gli 2. n=3, t-Student, \* p<0,05, \*\* p<0,01.

## 5. DISCUSIÓN

La vía señalización de SHH/Gli actúa como un regulador maestro durante la formación y desarrollo de los órganos y tejidos, controlando procesos como proliferación, diferenciación, migración, supervivencia y muerte celular. Los distintos y complejos procesos celulares en los cuales participa la vía de SHH, se relacionan directamente con la variedad de los genes blanco río abajo de la vía, siendo éstos los verdaderos efectores de la respuesta celular a SHH. Se han desarrollado novedosas aproximaciones moleculares para ir a la búsqueda de nuevos genes blanco de la vía de SHH y así descifrar los mecanismos a través de los cuales la vía comanda los diferentes eventos celulares. Esto adquiere mayor relevancia si se considera las distintas patologías en las que está implicada la vía de SHH, que van desde malformaciones como la polidactilia hasta severos defectos en desarrollo, incluso incompatibles con la vida, o cáncer.

Por otra parte, Neogenina 1 es un receptor multifuncional, que ha sido involucrado en orientación axonal, diferenciación, proliferación, apoptosis y más recientemente en cáncer. Es interesante que las funciones de Neogenina 1 se sobreponen considerablemente con aquellas propuestas para la vía de señalización SHH/Gli, lo que permite postular que este receptor puede formar parte de la intrincada red de señalización comandada por SHH.

El presente trabajo tiene por objetivo general demostrar que la vía de SHH ejerce una regulación directa, por medio de los factores de transcripción Gli, sobre la expresión del gen *Neogenina 1* humano utilizando el modelo de células de neuroblastoma humano. Los resultados permiten proponer a *Neogenina 1* como un gen efector de la vía de señalización de SHH/Gli. Con esto se espera contribuir a la comprensión de los mecanismos regulatorios que gobiernan la expresión de un receptor funcionalmente versátil, pero del cual se conoce poco acerca de los mecanismos intracelulares que subyacen sus funciones.



### **5.1 Neogenina 1 es expresada por la línea de neuroblastoma humano SH-SY5Y y alteraciones farmacológicas de la vía de SHH/Gli afectan la expresión de la proteína en esta línea celular.**

La línea celular de neuroblastoma humano SH-SY5Y deriva de una biopsia de una metástasis en médula ósea de un paciente pediátrico con neuroblastoma. Como se ha visto, la expresión de Neogenina 1 se extiende a una variedad de tejidos durante el desarrollo embrionario, entre ellos, las células de la cresta neural y la raíz de los ganglios dorsales, tejidos a partir de los cuales se genera tempranamente el neuroblastoma. Los experimentos de pérdida de función de Neogenina 1 realizados en embriones de *Xenopus Leavis* entregan información acerca de la función que Neogenina 1 podría ejercer en estos tejidos. Los resultados muestran defectos serios en la migración de las células de la cresta neural y aberraciones en la formación del ojo [Gessert y cols., 2008]. Antecedentes previos muestran que la línea SH-SY5Y responde a la vía de SHH. Sin embargo, no existen estudios acerca de la expresión de la proteína Neogenina 1 en esta línea celular. Con este fin, se realizaron extracciones de ARN y proteínas de cultivos celulares cultivados en condiciones basales. Los resultados obtenidos por medio de RT-PCR y por inmunodetección permitieron confirmar que la línea celular SH-SY5Y expresa fuertemente la proteína Neogenina 1. Además, por inmunofluorescencia se visualiza que Neogenina 1 es expresada en todas las células.

Una vez confirmado que las células SH-SY5Y expresan Neogenina 1, se quiso estudiar si su expresión era modificada por la presencia de los agonista y antagonista la vía de SHH. Las cuantificaciones obtenidas del Western blot (figura 13) muestran que para las condiciones con el antagonista ciclopamina 5 y 10  $\mu\text{M}$  hay una disminución significativa de Neogenina 1 y esta inhibición ocurre de manera dependiente de la dosis. Sin embargo, en ningún caso se verificó una abolición completa de su expresión. Probablemente, esto se deba a que Neogenina 1 no es únicamente un blanco transcripcional directo de la vía SHH/Gli. Otros autores han reportado que durante la migración neuronal en el SNC de ratón en desarrollo, Neogenina 1 se comporta como un blanco transcripcional directo de la vía Rb/E2F [Andrusiak y cols., 2010], una vía que también se presenta desregulada en cáncer. Al respecto, se vio que ratones mutantes para la proteína Rb muestran niveles de

expresión aumentados para Neogenina 1 en la zona subventricular, la corteza y el cuerpo estriado. Además, una búsqueda *in silico* realizada por estos autores, arrojó la existencia de diferentes sitios consenso y no-consenso del factor transcripcional E2F, ubicados inmediatamente río arriba del ATG en la secuencia de *Neogenina 1*. Luego, a través de un ensayo de ChIP se verificó una unión directa del factor transcripcional E2F3 a los sitios consenso y por ensayos luciferasa la funcionalidad de éstos. Por lo tanto, la expresión remanente que se observa de Neogenina 1 en los ensayos de pérdida de función farmacológica de la vía SHH/Gli en las células SH-SY5Y podrían estar siendo dirigidos por la vía Rb/E2F. Es futura materia de estudio si acaso existe una interacción entre estas dos vías. Se hace notar que se ha reportado en la literatura a Gli 2 como un activador de la expresión de factores relacionados con el ciclo celular como E2F1, en keratinocitos humanos [Regl y cols., 2004].

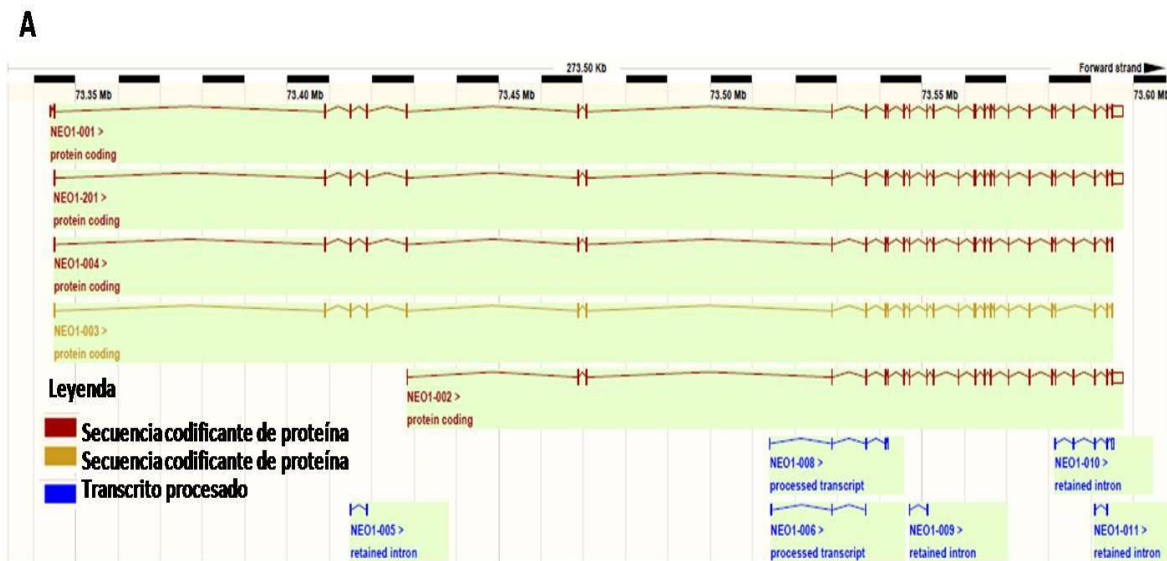
Por otra parte, los tratamientos con el agonista purmorfamina no revelaron un aumento significativo en los niveles de expresión de Neogenina 1 en la línea SH-SY5Y. Como ya se indicó, se sabe por los antecedentes bibliográficos, la vía de SHH está constitutivamente activa tanto en líneas celulares como en muestras tumorales de neuroblastoma. Además, la línea SH-SY5Y presenta *per se* una alta expresión basal de Neogenina 1 (Figura 12). Es posible pensar que al estimular con el agonista de SHH no se detecten diferencias con respecto a las condiciones controles, porque ya habría una saturación en la capacidad de la respuesta metabólica por parte de las células SH-SY5Y. Esta presunción se podría haber corroborado realizando ensayos con purmorfamina en la línea de neuroblastoma humano SK-N-SH, la que presenta menores niveles basales de expresión de Neogenina 1.

## **5.2 Existen tres GBS en las secuencias analizadas del gen *Neogenina 1***

Al verificar que la supresión de la vía de SHH produce una disminución en la expresión de Neogenina 1, es posible considerar que la vía ejerce algún tipo de regulación sobre la expresión de la proteína. Para indagar en esta idea, se buscaron sitios de unión a Gli en la secuencia de *Neogenina 1*. Por antecedentes generados en el laboratorio, se sabía de la existencia de un GBS a los 18.3 Kb río arriba del inicio de la transcripción de *Neogenina 1* en la secuencia de ratón, y considerando la conservación evolutiva existente entre los GBS

en vertebrados, la búsqueda abarcó hasta los 20 Kb río arriba desde el inicio de la traducción en la secuencia de *Neogenina 1* humana.

El gen *Neogenina 1* está localizado en 15q22.3-q23, y su secuencia génica en humanos presenta 11 transcritos diferentes, de los cuales sólo cinco de ellos codifican para proteínas. Los seis transcritos restantes permanecen como transcritos retenidos o procesados (Figura 16).



**Figura 16: Esquema de la secuencia génica de *Neogenina 1* en humanos. A.-** Diferentes transcritos descritos para *Neogenina 1*. Se conocen 11 transcritos. En rojo y amarillo se muestran los cinco de ellos que codifican para proteína, en azul se indican los transcritos que son retenidos. Los exones se señalan en cajas rectangulares.

La búsqueda *in silico* se inició obteniendo las secuencias de los 20 Kb río arriba desde el ATG y el primer intrón de la isoforma 1 de *Neogenina 1* a partir de la base de datos Ensembl. Como resultado, no se encontraron sitios consenso en las secuencias analizadas de *Neogenina 1*, sin embargo, la búsqueda arrojó tres sitios posibles de unión a Gli no-consenso: uno de ellos a 18,6 Kb río arriba del ATG de *Neogenina 1* (i) GBS 1 (5' TGGGTGATC 3'), y dos sitios ubicados dentro del primer intrón (ii) GBS 2 (5' TGGGTAATC 3') y (iii) GBS 3 (5' GATTACCCA 3'). Como se ha mencionado, los factores transcripcionales Gli, mediadores de la señal de SHH, se unen con alta afinidad a la secuencia consenso 5'GACCACCCA 3'. Esta secuencia ha sido descrita para humano y es conservada en ratón. A partir de ésta se han determinado numerosos genes blancos de la

vía de SHH/Gli. Sin embargo, hoy se aceptan variantes de la secuencia consenso (o sitios de unión a Gli no-consenso) como sitios funcionales en respuesta a los factores transcripcionales Gli, tal como se observa en dos de los genes clásicamente descritos como blancos directos de la vía SHH/Gli en humano: los factores transcripcionales *gli1* y *hnf3β* (Factor Nuclear de Hepatocito 3β). Estos presentan sitios no-consenso en sus secuencias promotoras, las que son funcionales y determinantes para la activación transcripcional [Ikram y cols., 2004; Sasaki y cols., 1997]. Más aún, se ha visto que determinadas variaciones puntuales en la secuencia consenso inducen una actividad transcripcional mayor de los factores Gli, sugiriendo con esto que muchos sitios variantes de menor afinidad por Gli son funcionales y pueden sustituir a la secuencia consenso [Winklmayr y cols., 2010].

El sitio GBS 1 encontrado en la secuencia de *Neogenina 1*, ha sido descrito como un sitio que está presente en la región promotora del gen humano IL1R2 (Receptor tipo II de Interleuquina 1) y que es funcional en respuesta a los factores Gli. Este sitio difiere de la secuencia consenso sólo en una base: en la posición 3C variando a 3T [Winklmayr y cols., 2010]. Mientras que los sitios GBS 2 y GBS 3 difieren del sitio consenso en dos posiciones: 3T4T; estos sitios no han sido descritos antes en genes blancos de los factores transcripcionales Gli.

### **5.3 Gli 2 reconoce y se une directamente al GBS 3 dentro del primer intrón de *Neogenina 1*.**

Dada la existencia de tres sitios regulatorios putativos GBS en la secuencia promotora y en el primer intrón de *Neogenina 1*, se quiso estudiar si estos sitios son reconocidos directamente por los factores de transcripción activadores de la vía de SHH/Gli: Gli 1 y Gli 2. Para esto se realizó una inmunoprecipitación de cromatina a partir de un cultivo de células SH-SY5Y en condiciones basales. Para los sitios GBS 1 y GBS 2 no se detectó interacción con los factores de transcripción Gli. Sin embargo, hay que considerar que las bandas de PCR correspondientes a los INPUT de estos dos sitios resultaron muy tenues, por lo que sería adecuado aumentar la sensibilidad de la técnica realizando las amplificaciones de la cromatina inmunoprecipitada de manera cuantitativa, usando PCR en tiempo real.

Sólo de esta manera se podría confirmar que los factores de transcripción Gli no reconocen a los sitios GBS 1 y GBS 2.

Para el sitio GBS 3 se obtuvo una banda correspondiente al INPUT muy comparable a la obtenida para la inmunoprecipitación con Gli 2, por lo es posible afirmar que Gli 2 reconoce y se une directamente al sitio GBS 3. Sin embargo, aunque se detectó una banda de intensidad menor para la inmunoprecipitación con Gli 1, se descarta una interacción de este factor transcripcional con el sitio GBS 3, dado que la intensidad de esta banda es muy comparable a las obtenidas para los controles de isotipo y de proteína A.

Por lo tanto, se verificó que sólo el factor de transcripción Gli 2 reconoce y se une directamente al sitio GBS 3. Esto es relevante al considerar que en estudios realizados en ratones mutantes para Gli 2 y Gli 3, se observó una pérdida en la respuesta a la estimulación con SHH. Esto indica que Gli 2 y Gli 3 median la mayoría, sino todas, las respuestas transcripcionales a la señal de SHH en mamíferos durante la embriogénesis [Hui y cols., 2011]. Por otra parte, se sabe que Gli 1 es dispensable para el desarrollo embrionario en mamíferos y más bien parece formar parte de un circuito de retroalimentación positiva en la vía de señalización de SHH/Gli. Lo anterior contrasta a lo observado en embriones de *Xenopus* y pez cebra, donde Gli 1, más que Gli 2, es el principal activador de la vía [Hui y cols., 2011]. Considerando que Gli 3 funciona predominantemente como un represor transcripcional de los genes blancos de la vía SHH/Gli y relacionando esto con la baja en la expresión de Neogenina 1 observada en los tratamientos realizados incubando las células de neuroblastoma con el inhibidor de la vía, ciclopamina, no se descarta una posible unión y reconocimiento del factor de transcripción Gli 3 en la secuencia de *Neogenina 1*, y que la baja en su expresión se deba no sólo a la falta de activación de Gli 2, sino a un efecto mediado por la unión del factor Gli 3 represor a los GBS existentes en la secuencia de *Neogenina 1*.

#### **5.4 Sólo el sitio GBS 3 fue activado por el factor de transcripción Gli 2.**

En la mayoría de los casos, la afinidad con que un factor transcripcional se une a una secuencia en el ADN, resulta ser un buen predictor de su potencial para la activación (o represión) transcripcional. Sin embargo, también se sabe que secuencias en el ADN que

presentan afinidades de unión bajas, resultan ser sitios que en presencia de concentraciones moderadas de los factores Gli, pueden llegar a ser funcionales por si solos, o bien, pueden potenciar la actividad transcripcional de otro GBS. Un ejemplo de esto ocurre en la secuencia del gen *Ptch1* humano. Este gen presenta promotores alternativos de la transcripción. Dentro de éstos, se han descrito dos GBS descritos ubicados río arriba del exón 1B: uno consenso y otro no-consenso. Al respecto, se ha visto que sólo el sitio consenso es funcional por si solo, sin embargo, el sitio no-consenso es esencial para potenciar su actividad transcripcional [Winklmayr y cols., 2010].

Considerando también que la activación transcripcional *in vivo* involucra la articulación de un proceso altamente complejo, que depende de la presencia de co-factores, de un estado epigenético y una conformación espacial adecuada de la cromatina y de la presencia factores de transcripción adicionales, se hace difícil describir una relación entre una alta afinidad de unión de los factores Gli y la activación transcripcional que tendrían sobre una secuencia determinada. Por lo anterior, se hace necesario realizar los ensayos funcionales correspondientes, y aunque en los ensayos reporteros de luciferasa no se representa perfectamente el contexto de la cromatina, éstos sí son ampliamente usados para distinguir entre una alta afinidad de unión y una activación transcripcional.

De acuerdo a los resultados obtenidos en los ensayos de luciferasa, el sitio GBS 1, descrito anteriormente como un GBS funcional en el promotor del gen *IL1R2*, pese a ser muy buen candidato, no gatilló la actividad transcripcional del gen reportero. En cambio, su versión mutada, mostró una activación transcripcional significativa con respecto al control. En el año 2010 se publicó un trabajo que estudió el efecto sobre la activación transcripcional de mutaciones puntuales en cada una de las posiciones del GBS consenso (5'GACCACCCA3') [Winklmayr y cols., 2010]. Este reporte muestra que un cambio en la posición 5A del GBS consenso por 5T induce un aumento importante en la activación transcripcional del GBS. Como se indica en la tabla 3, corresponde a la misma mutación sitio-dirigida en el sitio GBS 1 mut, lo que podría explicar el aumento significativo en la activación transcripcional de este sitio. De todas maneras, este aumento estadísticamente significativo en la actividad luciferasa, contribuye a reafirmar la validez de los resultados del ensayo de luciferasa obtenidos.

En el sitio GBS 2 no se indujo la activación transcripcional del gen reportero, sin embargo, la presencia del factor Gli 2 sí incrementó de manera significativa la actividad transcripcional del sitio GBS 3, considerándose ésta biológicamente relevante, dada por una activación mayor al 50% respecto de su control en ausencia de Gli 2. Para un estudio más acabado de la funcionalidad y especificidad de reconocimiento de Gli 2 por el GBS 3, se ensayaron dos versiones mutadas del sitio: una de ellas con mutaciones parciales del *core* (GBS 3 mut1) y la otra con mutación total del *core* (GBS 3 mut2). En ambas versiones mutadas se abolió la actividad transcripcional, demostrando una unión y activación específico de Gli 2 activador por el sitio GBS 3. Estos resultados concuerdan y son consistentes con los obtenidos en la inmunoprecipitación de cromatina, donde sólo se detectó unión de Gli 2 al sitio GBS 3.

*Ptch1* es considerado uno de los genes humanos más complejos en cuanto a la diversidad de sitios alternativos de inicio de la transcripción que presenta en su extremo 5'. Se conocen siete transcritos codificantes de *Ptch1*, los que se diferencian únicamente en la secuencia del primer exón [Nagao y cols., 2004]. Además, se sabe que la expresión de *Ptch1* humano es controlada por diferentes promotores alternativos, los cuales determinan la isoforma de *Ptch1* que se expresa [Nagao y cols., 2004]. Es posible considerar que *Neogenina 1* tenga una regulación transcripcional similar a la de *Ptch1*. En este sentido, la expresión de determinadas isoformas de Neogenina 1 podrían estar bajo control del promotor que responde a la vía Rb/E2F; otras isoformas en cambio, podrían estar moduladas por la vía de SHH/Gli, mediante el GBS 3 ubicado dentro del primer intrón.

### **5.5 Neogenina 1 en el contexto de la vía de SHH/Gli**

Es clásicamente conocido que *Ptch1* es uno de los genes blancos en la red de señalización de la vía SHH/Gli, generando con esto un mecanismo de regulación negativa de la vía. Recientemente, se publicó un estudio que postula a Neogenina 1 como un nuevo regulador negativo de la vía de SHH/Gli [Hong y cols., 2012]. El estudio muestra que embriones de ratones en la edad gestacional E18.5 que son mutantes para *neogenina 1* presentan polidactilia y una actividad aumentada de SHH, reflejado por una expresión ectópica de los genes de respuesta *gli1* y *ptch1*. Este fenotipo ocurre con una baja penetrancia y específicamente en la extremidad posterior derecha de los embriones. También se observó

que en ratones heterocigotos para Gli3 (Gli represor) y mutantes para *neogenina 1*, se ve un fenotipo aumentado de polidactilia. Esto sugiere que Neogenina 1 actúa para restringir la señalización de SHH específicamente en la extremidad posterior en desarrollo, y su pérdida resulta en la activación de la vía. Al igual que Ptch1, en el presente trabajo se ha establecido que *Neogenina 1* es un gen blanco de SHH. Por lo tanto, dentro del contexto de la red de señalización de SHH, la expresión de *Neogenina 1* podría ser parte de otro sistema de regulación negativa de la vía, donde la expresión de la proteína es activada por SHH, mediante la acción directa de los factores Gli. A su vez, Neogenina 1 reprime, la actividad de SHH por un mecanismo aún desconocido. Sin embargo, se descarta que este mecanismo ocurra a través de una interacción directa entre Neogenina 1 y SHH, de acuerdo a los ensayos de unión realizados con la actividad reportera de fosfatasa alcalina [Hong y cols., 2012]. Por otra parte, se ha establecido que durante la formación de músculo esquelético en el desarrollo, Neogenina 1 interacciona de manera *cis* con CDO [Kang y cols., 2004], un correceptor a nivel de membrana de la vía de SHH/Gli formando parte de un complejo receptor mayor. Con esto es posible postular que Neogenina 1 ejercería su regulación sobre la vía de SHH a través de la conformación de complejos con otros co-receptores de la vía de SHH a nivel de membrana plasmática, como los son Ptch1 mismo, o CDO, u otros co-receptores de la vía como BOC, y Gas1.

## 5.6 Neogenina 1 y Cáncer

Existen diferentes publicaciones en las que se reportan alteraciones en la expresión de la proteína Neogenina 1 en tumores respecto de su tejido de origen no tumoral. Se sabe que en cáncer esofágico hay un aumento en la expresión de la proteína Neogenina 1 comparado con su tejido epitelial normal [Hu y cols, 2001], mientras que en cáncer de mama [Lee y cols., 2005] y cáncer de colon [Li y cols., 2009] hay una disminución en la expresión de Neogenina 1. Sin embargo, no existen antecedentes que reporten alteraciones de la expresión de la proteína en el contexto de neuroblastoma, por lo que sería muy interesante realizar un estudio al respecto. Recientemente, se publicó un trabajo en el cual se estudia la expresión de Neogenina 1 en glioma [Wu y cols., 2012], una patología donde la vía de SHH/Gli se encuentra anormalmente activada. En este trabajo, se observó una baja progresiva en la expresión de la proteína Neogenina 1 en las etapas avanzadas del tumor,



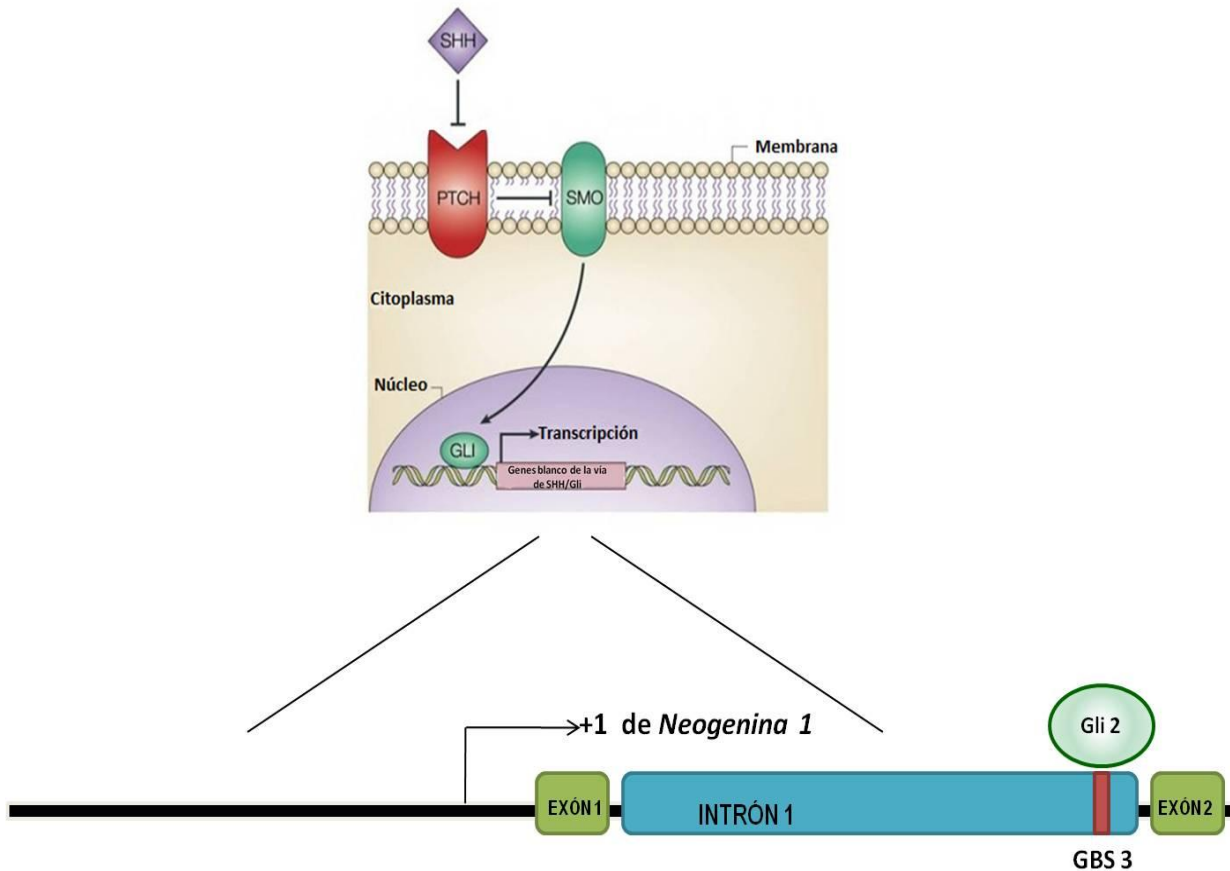
proponiendo entonces que las alteraciones en la expresión de la proteína Neogenina 1 son una herramienta útil como un posible biomarcador de progresión tumoral en glioma.

Probablemente, esta progresiva baja en la expresión de Neogenina 1 relativa al desarrollo de glioma, esté relacionada con su función de factor de dependencia. Se ha visto que en ausencia de su ligando RGM, Neogenina 1 desencadena muerte celular por apoptosis [Matsunaga y cols., 2004]. Por lo tanto, esta baja en la expresión de Neogenina 1 podría deberse a un mecanismo de evasión de muerte celular y mayor sobrevivencia por parte del tumor [Mehlen y cols., 2011], proponiendo a Neogenina 1 no solo como un biomarcador de progresión tumoral, sino que además como un posible blanco terapéutico anticancerígeno para el caso de glioma [Wu y cols., 2012].

Sin embargo, el fenómeno opuesto se ha verificado, en resultados obtenidos por el laboratorio, para el caso de meduloblastoma, el tumor del SNC más común en la población infantil. El 30% de los meduloblastomas se desarrolla por una proliferación desregulada de las células progenitoras mediada por alteraciones en la vía de SHH/Gli, durante el desarrollo del cerebelo. En un modelo murino de meduloblastoma, desarrollado por mutaciones de pérdida de función del receptor Ptch1, se verificó un aumento significativo en la expresión de *neogenina 1* en las células proliferativas granulares que conforman etapas más avanzadas del meduloblastoma, respecto del tejido normal. Además, se ha visto que en modelo celular humano de meduloblastoma, el silenciamiento transiente de *Neogenina 1* produce un arresto del ciclo celular en G2/M, lo que podría significar que Neogenina 1 tiene un importante rol regulando la progresión del ciclo celular en una línea celular de meduloblastoma [Milla y cols., 2013, manuscrito en preparación]. De todas maneras, es claro que existen alteraciones en la expresión de Neogenina 1 en diferentes tipos tumorales y la función que Neogenina 1 podría desempeñar, al parecer, depende del contexto tumoral y actualmente es materia de estudio.

Finalmente, se puede considerar que en este trabajo de memoria se ha demostrado que la línea celular de neuroblastoma humano SH-SY5Y expresa la proteína Neogenina 1, línea celular donde la vía de SHH/Gli está permanentemente activa. Además, la secuencia génica de *Neogenina 1* presenta tres sitios de unión a los factores de transcripción Gli, de los cuales sólo uno, el sitio GBS 3, es reconocido y une directamente al factor transcripcional

Gli 2, principal factor activador en mamíferos, y que además el sitio GBS 3 responde funcionalmente a Gli 2, se propone el siguiente modelo de regulación transcripcional para el gen *Neogenina 1* en un modelo celular humano (figura 17).



**Figura 17: Modelo de la regulación transcripcional ejercida por la vía de señalización de SHH/Gli sobre la expresión del gen *Neogenina 1* en el modelo de neuroblastoma humano SH-SY5Y.** SHH presente en el medio, interacciona con su receptor de membrana Ptc1, inhibiendo la represión que constitutivamente ejerce sobre el co-receptor Smo. De esta manera, Smo promueve la activación de una compleja red de señalización intracelular que conduce a la activación de los factores transcripcionales Gli. Estos factores, en sus formas activadoras, se desplazan hacia el núcleo para activar la transcripción de los genes blanco de la vía, entre los que se encuentra el gen *Neogenina 1*, uniéndose al GBS 3 ubicado dentro del primer intrón y activando la expresión de este gen. El GBS 3 está señalado en caja roja, los exónes 1 y 2 en cajas verdes y el intrón 1 en celeste. La flecha indica el inicio de la transcripción.

## 6.- CONCLUSIONES

- La proteína Neogenina 1 es expresada en la línea celular de neuroblastoma humano SH-SY5Y.
- El nivel de la proteína Neogenina 1 es inhibida en ausencia de la vía de señalización SHH/Gli.
- Existen tres sitios putativos de unión de los factores transcripcionales Gli en la secuencia genómica de *Neogenina 1*: el sitio GBS 1 a 18,6 Kb río arriba desde el inicio de la traducción, y los sitios GBS 2 y GBS 3 ubicados a 39,1 y 54,4 Kb del inicio de la traducción de *Neogenina 1*, respectivamente.
- El factor de transcripción Gli 2 reconoce y se une directamente al sitio GBS 3.
- El sitio GBS 3 es funcional, e induce la transcripción del gen reportero luciferasa activada por el factor de transcripción Gli 2.
- El gen *Neogenina 1* es un blanco transcripcional directo de la vía de señalización SHH/Gli en la línea celular de neuroblastoma humano SH-SY5Y.

## REFERENCIAS

Andrusiak M. G., McClellan K. A., Dugal-Tessier D., Julian L. M., Rodrigues S. P., Park D. S., Kennedy T. E, Slack R. S. 2011. Rb/E2F Regulates Expression of Neogenin during Neuronal Migration. *Molecular and Cellular Biology*. **31**. 238-247.

Caro I., Low J. 2010. The Role of the Hedgehog Signalling Pathway in the Development of Basal Cell Carcinoma and Opportunities for Treatment. *Clinical Cancer Research*. **16**. 3335-3339.

Chen J.K., Taipale J., Cooper M. K., Beachy P.A. 2002. Inhibition of Hedgehog signaling by direct binding of Cyclopamine to Smothened. *Genes & Development*. **16**. 2743-2748.

Clement V., Sánchez P., Tribolet N., Radovanovic I., Ruiz i Altaba A. 2007. Hedgehog-Gli Signaling Regulates Human Glioma Growth, Cancer Stem Cell Self-Renewal and Tumorigenicity. *Current Biology*. **17**. 165-172.

Crowson A. N. 2006. Basal cell carcinoma: biology, morphology and clinical implications. *Modern Pathology*. **19**. 127-147.

Feijóo C. G., Oñate M. G, Milla L. A., Palma V. A. 2011. Sonic hedgehog (Shh)-Gli signaling controls neural progenitor cell division in the developing tectum in zebrafish. *European Journal of Neurosciences*. **33**. 589-598.

Fitzgerald D.P., Cole S.J., Hammond A., Seaman C., Cooper H.M. 2006. Characterization of neogenin-expressing neural progenitor populations and migrating neuroblasts in the embryonic mouse forebrain. *Neuroscience*. **142**. 703-716.

Fitzgerald DP, Seaman C, Cooper HM. 2006. Localization of Neogenin protein during morphogenesis in the mouse embryo. *Developmental Dynamics*. **235**. 1720-1725.

Fitzgerald D.P., Bradford D., Cooper H.M. 2007. Neogenin is expressed on neurogenic and gliogenic progenitors in the embryonic and adult central nervous system. *Gene Expression Patterns*. **7**. 784-792.

Fuccillo M., Joyner A. L., Fishell G. 2006. Morphogen to Mitogen: the multiple roles of hedgehog signalling in vertebrate neural development. *Signalling in Development*. **7**, 772-781.

Gessert S, Maurus D, Kühl M. 2008. Repulsive guidance molecule A (RGM A) and its receptor neogenin during neural and neural crest cell development of *Xenopus laevis*. *Biology of the Cell*. **100**. 659-673.

Goetz S. C., Anderson K. V. 2010. The primary cilium: a signaling centre during vertebrate development. *Nature Review*. **11**. 331- 344.

Guan W., Condic M. L. 2003. Characterization of Netrin-1, Neogenin and cUNC-5H3 expression during chick dorsal root ganglia development. *Gene Expression Patterns*. **3**. 369-373.

Hatten M., Roussel M. 2011. Development and Cancer of the Cerebellum. *Trends in Neurosciences*. **34**. 134-142.

Hong M., Schachter K. A., Jiang G., Krauss R. S. 2012. Neogenin regulates Sonic Hedgehog pathway activity during digit patterning. *Developmental Dynamics*. **241**. 627-637.

Hu Y.C., Lam K.Y., Law S., Wong J., Srivastava G. 2001. Identification of differentially expressed genes in esophageal squamous cell carcinoma (ESCC) by cDNA expression array: overexpression of Fra-1, Neogenin, Id-1, and CDC25B genes in ESCC. *Clinical Cancer Research*. **7**. 2213-2221.

Hui C., Angers S. 2011. Gli proteins in development and disease. *The Annual Review of Cell and Developmental Biology*. **27**. 513-37.

Ikram M. S., Neill G. W., Regl G., Eichberger T., Frischauf A. M., Aberger F., Quinn A., Philpott M. 2004. Gli 2 is expressed in normal human epidermis and BCC and induces Gli 1 expression by binding to its promoter. *The Journal of Investigative Dermatology*. **122**. 1503-1509.

Kang J., Yi M., Zhang W., Feinleib J. L., Cole F., Krauss R. S. 2004. Netrins and neogenin promotes myotube formation. *The Journal of Cell Biology*. **167**. 493-504.

Kamenetsky MF., Zhang X. M., Bottega S., Guicherit O., Wichterle H., Dudek H., Bumcrot D., Wang F.Y., Jones S., Shulok J., Rubin L.L., Porter J.A. 2002. Small-molecule modulators of Hedgehog signaling: identification and characterization of Smoothed agonists and antagonists. *Journal of Biology*. **1**. 1-19.

Kamijo T, Nakagawara A. 2012. Molecular and genetics bases of neuroblastoma. *International Journal of Clinical Oncology*. **17**.190-195.

Kinzler K., Vogelstein B.. 1990. The Gli gene encodes a nuclear protein which binds specific sequences in the human genome. *Molecular and Cellular Biology*. **10**. 634-642.

Lay K, Ma D., Guo-Li M., Song H. 2003. Adult neural stem cells and repair of the adult central nervous system. *Journal of Hematotherapy & Stem Cell Research*. **12**. 671-679.

Lee J. E, Kim H. J., Bae J. Y., Kim S. W, Park J., Shin H. J., Han W.W., Kim S., Kang K., Noh D. 2005. Neogenin expression may be inversely correlated to the tumorigenicity of human breast cancer. *BMC Cancer*. **5**. 1471-2407.

Li V.S., Yuen S.T., Chan T.L., Yan H.H., Law W.L., Yeung B.H., Chan A.S., Tsui W.Y., So S., Chen X., Leung S.Y. 2009. Frequent inactivation of axon guidance molecule RGMA in human colon cancer through genetic and epigenetic mechanisms. *Gastroenterology*. **137**. 176-187.

Li Ch., Chi S., Xie J. 2011. Hedgehog Signalling in Skin Cancers. *Cellular Signalling*. **23**. 1235- 1243.

Nagao K., Toyoda M., Takeuchi-Inoue K., Fujii K., Yamada M., Miyashita T. 2004. Identification and characterization of multiple isoforms of a murine and human tumor suppressor, patched, having distinct first exons. *Genomics*. **85**. 462-471.

Mao L., Xia Y., Zhou Y., Dai R., Yang X., Duan S., Qiao X., Me Y., Hu B., Cui H. 2009. A critical role of Sonic Hedgehog signaling in maintaining the tumorigenicity of neuroblastoma cells. *Cancer Science*. **100**. 1848-4855.

Matsunaga E., Tauszig-Delamasure S., Monnier P.P., Mueller B.K., Strittmatter S.M., Mehlen P., Chédotal A. 2004. RGM and its receptor neogenin regulate neuronal survival. *Nature Cell Biology*. **6**. 749-755.

Mehlen P., Delloye-Bourgeois C., Chédotal A. 2011. Novel roles for Slits and netrins: axon guidance cues as anticancer targets? *Nature Review Cancer*. **11**. 188-197.

Merchant A., Matsui W. 2010. Targeting Hedgehog – A Cancer Stem Cell Pathway. *Clinical Cancer Research*. **16**. 3130-3140.

Milla A. L., Cortés C. R., Hodar C. Q., Oñate M. G, Cambiazo V., Burgess S. M., Palma V. 2012. Yeast-based assay identifies novel Shh/Gli target genes in vertebrate development. *BMC Genomics*. **13**. 1471-2164.

Monnier, P. P., Sierra, A., Macchi, P., Deitinghoff, L., Andersen, J. S., Mann, M. 2002. RGM is a repulsive guidance molecule for retinal axons. *Nature*. **419**. 392-395.

Traiffort E., Angot E., Ruat M. 2010. Sonic Hedgehog Signaling in the mammalian brain. *Journal of Neurochemistry*. **113**. 576 – 590.

Palma V., Ruiz i Altaba A. 2004. Hedgehog-GLI signaling regulates the behavior of cells with stem cell properties in the developing neocortex. *Development*. **131**. 337-345.

Palma V., Lim D. A., Dahmane N., Sánchez P., Brionne T. C., Herzberg C. D., Gitton Y., Carleton A., Alvarez-Buylla A., Ruiz i Altaba A. 2005. Sonic Hedgehog controls stem cell behavior in the postnatal and adult brain. *Development*. **132**. 335 – 244.

Regl G., Kasper M., Schnidar H., Eichberger T., Neill G.W., Philpott M.P., Esterbauer H., Hauser-Kronberger C., Frischauf A.M., Aberger F. 2004. Activation of the BCL2 promoter in response to Hedgehog/GLI signal transduction is predominantly mediated by GLI2. *Cancer Research*. **64**. 7724-7731.

Ruiz i Altaba A., Mas C., Stecca B. 2007. The gli code: an information nexus regulating cell fate, stemness and cancer. *Trends Cell Biology*. **17**. 438-447.

Sasaki H., Hui C., Nakafuku M., Kondoh H. 1997. A binding site for gli proteins is essential for HNF-3 $\beta$  for plate enhancer activity in transgenics and respond to shh in vitro. *Development*. **124**. 1313-1322.

Shahi M. H., Sinha S. Afzal M., Castresana J.S. 2009. Role of Sonic hedgehog signaling pathway in neuroblastoma development. *Biology and Medicine*. **1**. 1-6.

Shahi M. H., Schiapparelli P., Afzal M., Sinha S., Rey J. A., Castresana J. S. 2011. Expression and epigenetic modulation of sonic hedgehog-GLI1 pathway genes in neuroblastoma cell lines and tumors. *Tumor Biology*. **32**. 113-127.



Sinha S., Chen J.K. 2005. Purmorphamine activates the Hedgehog pathway by targeting Smoothened. *Nature Chemical Biology*. **2**. 29-30.

Simpson F., Kerr m. C., Wicking C. 2009. Trafficking, development and hedgehog. *Mechanism of Development*. **126**. 279-288.

Souzaki R., Tajiri T., Souzaki M., Kinoshita Y., Tanaka S., Kohashi K., Oda Y., Katano M., Taguchi T. 2010. Hedgehog signaling pathway in neuroblastoma differentiation. *Journal of Pediatric Surgery*. **45**. 2299-2304.

Stecca B., Ruiz i Altaba A. 2010. Context-Dependent Regulation of the Gli Code in Cancer by Hedgehog and Non-Hedgehog Signals. *Journal of Molecular Cell Biology*. **2**. 84-95.

Varjosalo M., Taipale J. 2008. Hedgehog: Functions and Mechanism. *Genes & Development*. **22**. 2454 – 2472.

Wilson N. H., Key B. 2006. Neogenin: one receptor, many functions. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. **39**. 874-878.

Winklmayr M., Schmid C., Laner-Plamberger S., Kaser A., Aberger F., Eichberger T., Frischauf A. 2010. Non-consensus Gli binding sites in hedgehog target gene regulation. *BMC Molecular Biology*. **11**. 1471-2199.

Wu X., Li Y., Wan X., Kayira T.M., Cao R., Ju X., Zhu X., Zhao G. 2012. Down-regulation of neogenin accelerated glioma progression through promoter methylation and its overexpression in SHG-44 Induced Apoptosis. *Plos One*. **7**. e38074.

Xu L. , Wang X., Wan J., Li T., Gong X., Zhang K., Liang Yi L., Xiang Z., Xu M., Cui H. 2012. Sonic Hedgehog pathway is essential for neuroblastoma cell proliferation and tumor growth. *Molecular and Cellular Biochemistry*. **364**. 235-241.

