

UCH-FC
MAG-BMCN
L 834
C.1

**APOPTOSIS INDUCIDA POR EL RECEPTOR DE
DEPENDENCIA PATCHED1.**



Tesis

**Entregada A La
Universidad De Chile
En Cumplimiento Parcial De Los Requisitos
Para Optar Al Grado De**

**Magister en Ciencias con Mención en Biología Molecular, Celular Y
Neurociencias**

Facultad De Ciencias

Por

Pablo Lois Silva

Enero, 2012

Director de Tesis Dra: Verónica Palma

FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE
INFORME DE APROBACION
TESIS DE MAGISTER

Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Magister presentada por el candidato.

Pablo Lois Silva

Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Magister en Ciencias con mención en Biología Molecular Celular y Neurociencias, en el examen de Defensa Privada de Tesis rendido el día 16 de Enero de 2012.

Director de Tesis:

Dra. Verónica Palma A.



Comisión de Evaluación de la Tesis

Dr. Juan Fernández

Dr. Alejandro Roth



*A Guillermo, María Paula
y Amanda.*

AGRADECIMIENTOS

En estas breves líneas, quiero agradecer a todas las personas que facilitaron directa o indirectamente este trabajo y la realización de la tesis.

A todo el grupo de Biología del Desarrollo y la gente de los laboratorios de los Drs. Miguel Allende y Álvaro Glavic. Al Dr. Brandon Wainwright por la facilitación de las mutaciones de PTCH1. Al Dr. Luis Milla por su invaluable ayuda en el manejo de los programas para el diseño de los esquemas que aparecen en esta tesis y las discusiones de los resultados. A João Botelho por su ayuda en los protocolos experimentales y el trabajo con los pollitos (y su compañía y café también...)

Especiales agradecimientos a todos los compañeros de trabajo de nuestro laboratorio, por la ayuda, discusión y la paciencia en mis largos seminarios. Atesoro gratos recuerdos de los largos cafés conversados con Dr. Luis ("Polo") Milla discutiendo los resultados y resolviendo los inconvenientes de la biología molecular. También las conversaciones sobre ciencia y otros temas con Claudio Cortés y a todos y cada uno de los que se fueron sumando en el tiempo (João, Matías, Gabriela, Catalina, Cynthia...) de quienes siempre obtuve ayuda, apoyo y atención.



En un párrafo aparte y en forma destacada, quiero agradecer por sobre todo a la Dra. Verónica Palma quien me apoyó desde el primer momento y hasta el final en este proyecto y quien siempre tuvo tiempo para analizar los resultados, discutirlos, proponer nuevos enfoques y experimentos, corregir los borradores y un largo etcétera, trascendiendo su papel de directora de tesis. En lo personal, fue muy significativo para mi que ella fuera mi tutora, lo que le otorga un matiz especial a este trabajo.

Para todos los nombrados o los que no incluí en estos párrafos pero que de igual manera soy su deudor, entrego mis agradecimientos de todo corazón. Gracias.





INDICE

1. Índice de contenidos.

Materia	Página
INTRODUCCIÓN	1
Sonic hedgehog en el desarrollo del sistema nervioso.	2
Transducción de la señalización de Shh.	4
SHH, PTCH1 y cáncer.	6
El carcinoma basocelular (BCC).	7
PTCH1 como Receptor de Dependencia.	8
Mutaciones puntuales en PTCH1	11
Hipótesis	14
Objetivos	14
MATERIALES Y MÉTODOS.	15
Bacterias y preparación de plásmidos.	15
Cultivo <i>in vitro</i> y transfección de una línea celular.	16
Cultivo de condrocitos.	19
Electroporación <i>in ovo</i> .	21
Inmunofluorescencia e inmunohistoquímica.	23
RESULTADOS	25
SOBREEXPRESIÓN DE PTCH1 EN UNA LÍNEA CELULAR	25

PTCH1 y sus variantes no inducen proliferación.	31
G509R no induce apoptosis pero si lo hacen las otras variantes.	32
PTCH1 y G509V se comportan como Factor de Dependencia.	34
SOBREEXPRESIÓN DE PTCH1 EN CONDROCITOS.	35
Transfección de condrocitos.	36
Proliferación en cultivos de condrocitos transfectados.	38
PTCH1 y sus variantes inducen apoptosis.	42
Diferenciación en cultivos de condrocitos	43
SOBREEXPRESIÓN DE PTCH1 <i>IN VIVO</i>.	47
La electroporación no afecta la estructura del tubo neural.	49
La proliferación está aumentada en los embriones electroporados con las variantes de PTCH.	51
Las mutaciones de PTCH1 aumentan la apoptosis en el tubo neural.	53
DISCUSIÓN.	58
La sobreexpresión de PTCH1 disminuye la proliferación.	58
La sobreexpresión de PTCH1 induce apoptosis.	60
La sobreexpresión de las mutaciones de PTCH1 no siempre aumentan la proliferación.	60
Las mutaciones de PTCH1 también inducen apoptosis.	62

PTCH1 y sus variantes promueven la diferenciación.	64
D513Y y CTD se comportan de distintas maneras.	66
G509R y G509V: El mismo aminoácido sustituido pero distintos efectos.	69
PTCH1 y G509V como Receptores de Dependencia.	72
Perspectivas.	73
REFERENCIAS.	75
ANEXO	84

2. Índice de figuras y tablas.

Figura 1. Esquema de la espina dorsal y algunas vías de señalización.	3
Figura 2. Esquema simplificado de la vía de señalización de Shh.	5
Figura 3. Modelo simplificado de la acción de PTCH1 como Receptor de Dependencia.	9
Figura 4. Familia de los Receptores de Dependencia.	10
Figura 5. El cuarto dominio transmembrana (TM4) está altamente conservado.	12
Figura 6: Expresión de fosfatasa alcalina en la línea celular transfectada.	27
Figura 7. La línea celular 10T1/0 responde a la modulación de la vía de Shh.	29
Figura 8. Las células 10T1/2 responden de distintas maneras a las mutaciones de PTCH1.	30
Figura 9. Los constructos PTCH1 ensayados no inciden en la proliferación.	31
Figura 10. PTCH1, G509V y CTD inducen temprano la apoptosis.	33
Figura 11. La apoptosis inducida por PTCH1 y G509V puede ser rescatada por Shh.	34
Figura 12: Los condrocitos pueden transfectarse con mayor eficiencia que los fibroblastos.	37
Figura 13: Alta tasa de transfección en condrocitos.	37
Figura 14: Proliferación en cultivos de condrocitos.	39
Figura 15: PTCH1 disminuye la proliferación en condrocitos y aumenta con G509V.	40
Figura 16. Número de micromasas en cultivos transfectados de condrocitos.	41
Figura 17. La apoptosis está aumentada en los cultivos transfectados.	42
Figura 18. Sólo G509V deposita más colágeno a las 48 hrs. cultivo.	44

Figura 19. Los condrocitos transfectados depositan colágeno tipo II.	45
Figura 20. El depósito de colágeno IX se adelanta en los condrocitos transfectados con las variantes de PTCH1.	46
Figura 21. Las mutaciones de PTCH1 depositan más calcio excepto CTD.	47
Tabla 1: Sobrevida de embriones de pollo electroporados con diversos constructos.	48
Figura 22. La expresión de GFP comprueba una adecuada electroporación.	50
Figura 23. La electroporación no parece afectar la arquitectura del tubo neural.	51
Figura 24. La proliferación aumenta en el tubo neural en el lado electroporado con las versiones mutantes de PTCH1.	53
Figura 25. Apoptosis en el tubo neural de embriones electroporados.	55
Figura 26. Apoptosis en el tubo neural de embriones electroporados.	56
Tabla 2. Resumen del efecto de PTCH1 y sus mutaciones sobre los tres sistemas ensayados.	57
Figura 27. Representación gráfica del cuarto dominio transmembrana de PTCH1.	85
Figura 28. El cuarto dominio transmembrana de G509V tiene mayor probabilidad de constituir un dominio transmembrana que PTCH1 silvestre o sus otras mutaciones.	86

Lista de abreviaturas

BCC	Carcinoma Basocelular
cyc	Ciclopamina
DCC	<i>Deleted in Colorectal Carcinoma</i>
FA	Fosfatasa Alcalina
GFP	Proteína Fluorescente Verde
pGL	Plásmido Green Lantern
H3P	Histona 3 fosforilada
Hh	Hedgehog
IF	Inmunofluorescencia
IHQ	Inmunohistoquímica
NBCCS	Síndrome Carcinoma Basocelular Nevoide (Síndrome de Gorlin)
PBS	Solución tampón fosfato
PFA	Paraformaldehído
Ptc1	Patched1
Pur	Purmorfamina
Shh	Sonic Hedgehog
Smo	Smoothened
SNC	Sistema Nervioso Central
10T1/2	Línea celular C3H10T1/2

RESUMEN

La vía de señalización de Sonic Hedgehog (Shh) está relacionada con procesos importantes en el desarrollo embrionario, como formación de patrones, diferenciación, proliferación y muerte celular. Su desregulación está involucrada en malformaciones embrionarias y cáncer en la edad adulta. Mutaciones en su receptor Patched (Ptc) están asociadas con varios tipos de cáncer, en especial con los de la piel, siendo el más común el Carcinoma Basocelular (BCC). Además, se ha demostrado que Ptc1 actuaría como un Receptor de Dependencia que en ausencia de Shh induciría apoptosis. Se han aislado tres mutaciones puntuales de PTCH1 que causan BCC y se ponen a prueba en este trabajo en cultivos de la línea celular C3H10T1/2, en cultivos primarios de condrocitos de embriones de pollo y en el tubo neural de embriones de pollo. Los resultados se comparan con los efectos de la sobreexpresión de PTCH1 y de una mutación con una delección en el carboxilo terminal intracelular. Esta es la primera vez que se reporta el efecto de estas mutaciones en modelos de vertebrados. La sobreexpresión de PTCH1 disminuye la proliferación, afecta la diferenciación y causa apoptosis en su papel como Receptor de Dependencia. Las mutaciones estudiadas tiene efectos variables, siendo G509V la única que se comporta como un dominante negativo y además como Receptor de Dependencia. Estos resultados permiten comprender más profundamente el papel de PTCH1 en el cáncer y generalizar su acción.

ABSTRACT

The Sonic hedgehog pathway (Shh) has been involved in important processes during embryonic development, including patterning, differentiation, proliferation and cell death. Its deregulation is involved in embryonic malformations and postnatal cancer. Its main receptor Patched1 (Ptc1) is implicated in tumorigenesis, particularly the skin cancer and basal cell carcinoma (BCC). Along this line, Ptc1 has been shown to function as Dependence Receptor as it induces apoptosis in the absence of Shh, whereas its pro-apoptotic function is blocked in the presence of Shh. Three PTCH1 substitution mutations have been isolated from cancer patients. Here we tested them for the first time in the setting of vertebrate models: in a mouse cell line, in chicken embryo chondrocyte primary culture and in chicken embryo neural tube. These mutations were compared with PTCH1 overexpression and also to a mutation that deleted the intracellular terminal carboxyl region. Overexpression of PTCH1 diminished proliferation and differentiation but induced apoptosis.

Mutations have variable context dependent effects. Only one of the mutations, G509V, functions as a negative dominant and acts like a Dependence Receptor. Together these results allow a better understanding of the role of PTCH1 in cancer.

INTRODUCCIÓN

El desarrollo embrionario de los vertebrados comprende una serie de procesos coordinados de proliferación, diferenciación y muerte celular. Estos procesos son regulados por un limitado conjunto de vías de señalización, utilizadas reiteradas veces en la inducción, el establecimientos de patrones y el crecimiento y mantención de tejidos. El desarrollo normal depende del adecuado establecimiento e interacción entre estas cascadas de señalización. Durante la vida adulta, estas vías siguen activas manteniendo nichos adecuados para las células troncales y progenitoras asegurando la homeostasis en general (Peacock y Rudin, 2010). Una desregulación de alguna de estas puede producir malformaciones en el embrión o inclusive hacerlo inviable; en el adulto conlleva a la generación de enfermedades tales como el cáncer.

Una de estas vías de señalización es la de Sonic hedgehog (Shh). El gen *hedgehog* fue descrito originalmente en *Drosophila melanogaster* en una búsqueda de genes involucrados en la segmentación corporal y polaridad larval (Nüsslein-Volhard y Wieschaus, 1980). En mamíferos se han descritos tres genes homólogos a *hh*: *sonic hedgehog*, *desert hedgehog* e *indian hedgehog*, de los cuales *shh* cumple ampliamente este papel regulador (Varjosalo y Taipale, 2008).

Sonic hedgehog en el desarrollo del sistema nervioso de vertebrados.

Se ha estudiado con especial atención la participación de Shh en el desarrollo del sistema nervioso central (SNC) (Ruiz i Altaba et al., 2003; Ulloa y Briscoe, 2007; Lek et al., 2010). El desarrollo del SNC comienza durante la gastrulación y progresa desde anterior hacia posterior con la invaginación y cierre dorsal de la placa neural para formar el tubo neural. En la medida que esto ocurre, van estableciéndose patrones a lo largo del eje rostro-caudal y del dorso-ventral en que las células adquieran una identidad regional determinada por su localización dentro del tubo neural. Varias moléculas participan en el establecimiento de patrones, algunas de las cuales se muestran en la figura 1.

Shh es secretado al comienzo del desarrollo por la notocorda sumándose posteriormente la placa del piso del tubo neural (Jessel, 2000). Su primera función –y la más estudiada- es su acción como morfógeno, vale decir como una molécula secretada que actúa a distancia en gradientes de concentración, especificando distintos tipos celulares en el eje dorso-ventral de la futura médula espinal (Dessaud et al., 2008; Ribes y Briscoe, 2009). Un papel similar cumple en el desarrollo del cerebro, siendo requerido para generar las estructuras ventrales del encéfalo (Vaillant y Monard, 2009; Sousa y Fishell, 2010).

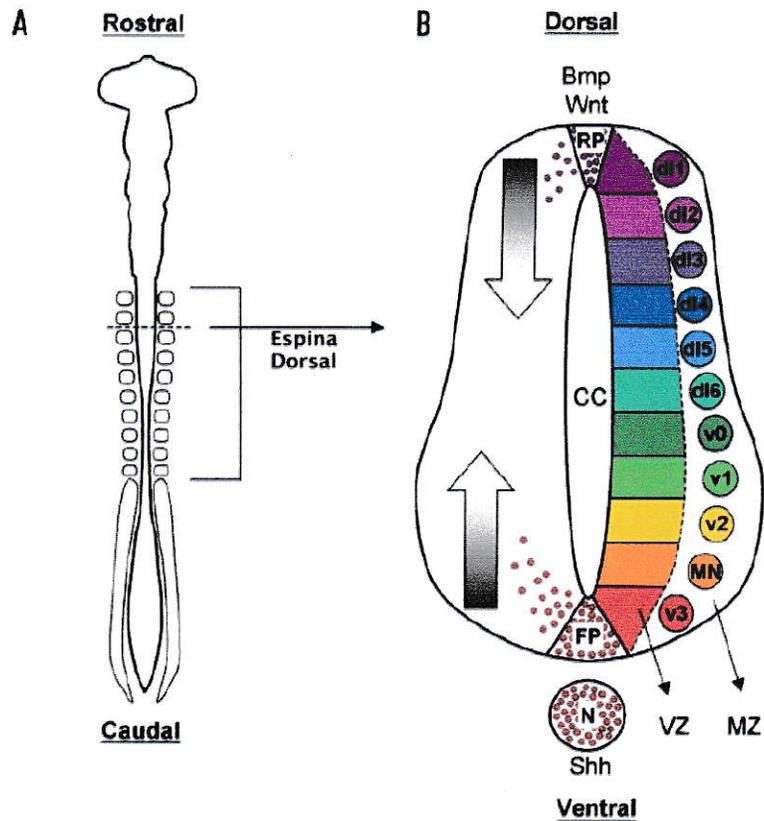


Figura 1. Esquema de la espina dorsal y algunas vías de señalización. Se muestra esquemáticamente una vista dorsal del tubo neural de embrión de pollo temprano (A). Esquema de una sección donde los neuroprogenitores están localizados medialmente adyacentes al canal central (cc) en la región conocida como zona ventricular (VZ). Las neuronas diferenciadas se ubican lateralmente. Los distintos subtipos neuronales son generados desde diferentes dominios de progenitores a lo largo del eje dorso-ventral, según la expresión de diferentes factores de transcripción (B). El patrón espacial de la expresión de factores de transcripción en los progenitores depende de la acción y balance de gradientes de concentración de factores de crecimiento como Bmp, Wnt y Shh. N, notocorda; RP placa del techo; FP placa del piso; MZ zona del manto (tomado de Ulloa y Briscoe, 2007).

La acción de Shh no se agota en su rol instructivo; también se ha podido demostrar una potente acción mitogénica durante la embriogénesis tardía, promoviendo la proliferación de progenitores neurales dorsales en la corteza, hipocampo, tectum, cerebelo y medula espinal, y consecuentemente el

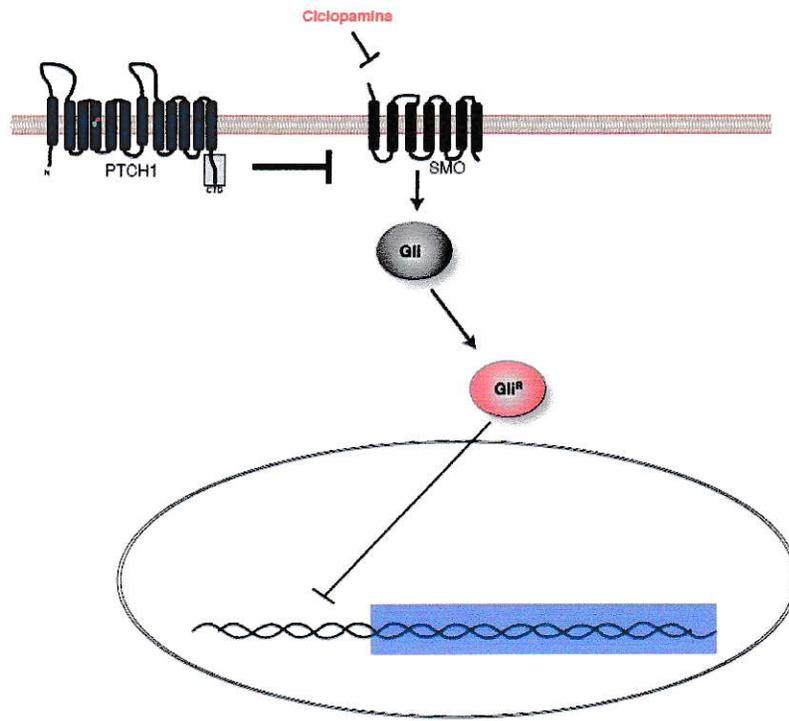
crecimiento de estas estructuras (Dahmane et al., 2001; Palma et al., 2004; Ishibashi et al., 2005; Feijoo et al., 2011). Otro papel importante de Shh es la regulación de la mantención y proliferación de las células madres del SNC y en la neurogénesis en adultos (Palma et al., 2005; Pozniak y Pleasure, 2006; Hatten y Roussel, 2011; Ming y Song, 2011; Ihrie et al., 2011).

Transducción de la señalización de Shh.

Shh es una glicoproteína secretada que actúa a distancia. El ligando Shh se une a un receptor de membrana llamado Patched (Ptc/PTCH), el cual en ausencia de Shh inhibe a la proteína de membrana Smoothened (Smo). En presencia de Shh, la actividad de Ptc se inhibe liberando a Smo de su represión que transduce la señal al citoplasma, activando en consecuencia la vía a través de la acción de los efectores que son las proteínas Gli que actúan como factores de transcripción (Goetz et al., 2009; Tasouri y Tucker, 2011; Louvi y Grove, 2011). Las proteínas Gli actuarán como activadores o represores según se encuentre activa o no la vía de señalización de hedgehog.

La figura 2 muestra un esquema simplificado de la vía de señalización de Shh, donde también se muestra la acción de dos fármacos que permiten activar (el agonista purmorfamina) o reprimir (el antagonista ciclopamina) la vía actuando a nivel del co-receptor Smo. Aunque se han descrito dos variantes de receptores para Ptc en vertebrados (llamados Ptc1 y Ptc2) sólo la pérdida de expresión de Ptc1 produce una inactivación total de la vía (Lee et al., 2006).

A



B

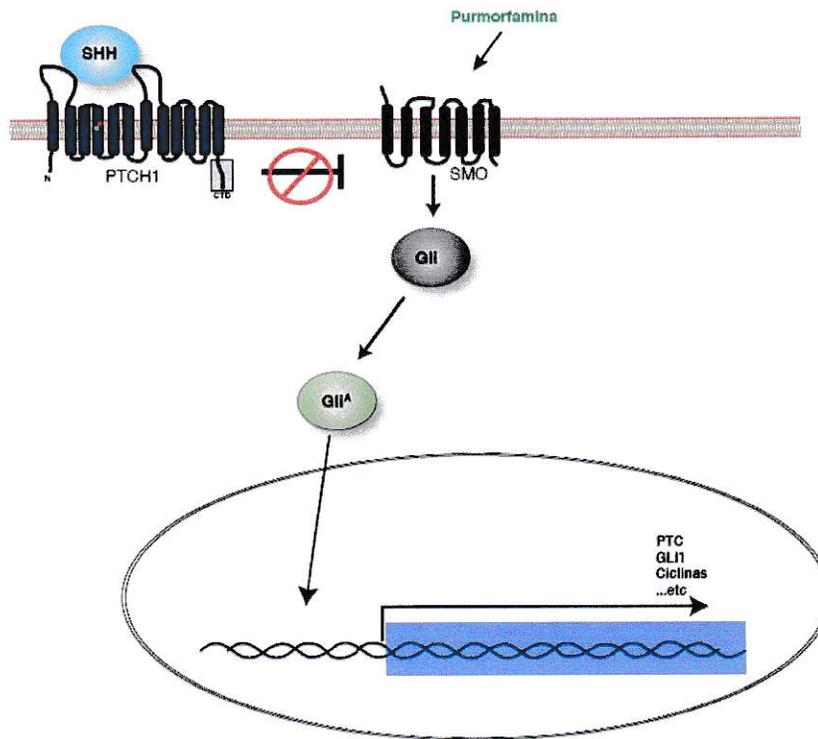


Figura 2. Esquema simplificado de la vía de señalización de Shh. En ausencia de SHH, PTCH1 está continuamente ejerciendo un efecto represor sobre SMO (A). En presencia del ligando, PTCH1 libera de su represión a SMO quien transduce la señal al citoplasma donde los principales mediadores de la activación de la vía son las proteínas Gli. Al ingresar al núcleo, estas activan genes blanco dentro de los cuales está el mismo PTCH1. Un aumento en la presencia del receptor PTCH1 es evidencia de una vía activa (B). Ciclopamina y Purmorfamina tienen un efecto inhibitorio o estimulante de la vía, respectivamente, uniéndose directamente a SMO.

SHH, PTCH1 y cáncer.

El primer indicio de que la vía de señalización de SHH estaba involucrada en la formación de tumores, provino de la observación que PTCH1 estaba mutado en individuos que sufrían el Síndrome de Gorlin (también llamado Síndrome de Carcinoma Baso Celular Nevoide, NBCCS), una predisposición hereditaria a desarrollar carcinomas basocelulares (BCC), meduloblastoma y rabdomiosarcomas (Hahn et al., 1996; Johnson et al., 1996). Posteriormente, numerosos trabajos muestran que un alto número de tumores, que no están relacionados entre sí, dependen de la vía de SHH para crecer (Stecca y Ruiz i Altaba, 2010). Estos incluyen cánceres tan variados como los de colon, páncreas, próstata, vesícula, etc. Entre los tumores dependientes del ligando SHH se encuentran mielomas múltiples, gliomas y tumores de ovario, próstata y células pequeñas del pulmón (revisado en Merchant y Matsui, 2010). Y en los independientes del ligando está el carcinoma basocelular, el más frecuente cáncer de la piel.

Varios estudios han determinado la función de componentes específicos de la vía de señalización mediante el análisis del efecto que tienen sus mutaciones

sobre el programa de desarrollo normal; sin embargo, no se han podido comprender las similitudes precisas entre desarrollo y carcinogénesis (Merchant y Matsui, 2010).

El carcinoma basocelular (BCC).

El carcinoma basocelular (también llamado carcinoma de las células basales) es la neoplasia maligna más frecuente de la piel originada en las células del estrato germinativo de la piel. Se manifiesta preferentemente en las zonas expuestas a la radiación solar (Li et al., 2011).

Aunque se han descrito mutaciones en SMO y excepcionalmente en las proteínas Gli, la mayoría de los BCC se originan por mutaciones en *PTCH1* siendo la delección o inactivación de *PTCH1* la causa de un 60% de ellos (Harris et al., 2010). Sin embargo, también se han podido aislar mutaciones puntuales a las que se le atribuye la causa del BCC (Hime et al., 2004). El BCC se produce por una activación constitutiva de la vía de señalización de SHH y no por la presencia del ligando cuyo niveles de expresión son normales (Li et al., 2011). Esto ha llevado a que actualmente en diversos estudios clínicos se utilicen antagonistas de la vía de SHH con resultados alentadores (Merchant y Matsui, 2010; Blackburn, 2011).

Normalmente, el ligando SHH es producido en la papila dermal, señalizando hacia el folículo piloso y hacia las capas de la epidermis interfolicular (Chiang et al., 1999; Adolphe et al., 2004). Varios modelos murinos han sido utilizados para el estudio del BCC, incluyendo los que la sobreexpresan, *Shh*, *Dhh*, *Gli1* y *Gli2*.

Sin embargo, todos presentan diferencias en cuanto a la latencia y el fenotipo del tumor y no reflejan niveles fisiológicamente relevantes de señalización (Villani et al., 2010). Sólo la pérdida de función de Ptc1 da como resultado el descontrol del ciclo celular y el desarrollo del BCC aunque aún no se ha logrado dilucidar si esto ocurre directamente a través de Gli o si hay otros mediadores responsables (Adolphe et al., 2006; Stecca y Ruiz i Altaba, 2010; Ruiz i Altaba, 2011).

Actualmente, hay controversia en cuanto a cuáles son las células en las que se origina el BCC. Un grupo de investigadores, utilizando ratones condicionales de *ptc1* perinatales, mostró que se trataría de células troncales alojadas en el folículo piloso (Villani et al., 2010); mientras que otro grupo, utilizando ratones condicionales para un Smo constitutivamente activo pero de 28 días de edad, mostró que sería en las células de la epidermis interfolicular (Youssef et al., 2010). Ambos modelos nulos no son biológicamente equivalentes pues es sabido que Ptc1 también cumple otras funciones que no son transducidas a través de la vía canónica de Shh y que se describen a continuación.

PTCH1 como Receptor de Dependencia.

Existe otra función del receptor PTCH1 aparte de unir al ligando Shh y activar esta vía. El grupo del Dr. Mehlen mostró que en ausencia de Shh PTCH1 no se encuentra inactivo sino que induce apoptosis (Thibert et al., 2003). Efectivamente, al igual que DCC (del inglés *Deleted in Colorectal Carcinoma*), crea un estado celular de dependencia de su ligando induciendo apoptosis en

las situaciones en que el ligando no está disponible. La sobreexpresión de Ptc1 en líneas celulares o en el tubo neural del embrión de pollo, induce muerte celular que es impedida tratando a las células con Shh. Esto no sólo ocurre con las versiones completas de Ptc1, si no que es suficiente sobreexpresar la región del carboxilo terminal para inducir apoptosis, demostrando que el dominio proapoptótico se encuentra en esa región. Posteriormente, el mismo grupo demostró que este sitio sensible se encuentra en la región del aminoácido 1392 que está ubicado en el último dominio intracelular del receptor (Mille et al., 2009). En ausencia de Shh, este sitio recluta un complejo de proteínas, que incluye a DRAL y TUCAN, lo que resulta en una activación de la cascada de las Caspasas induciendo por tanto muerte celular por apoptosis (figura 3).

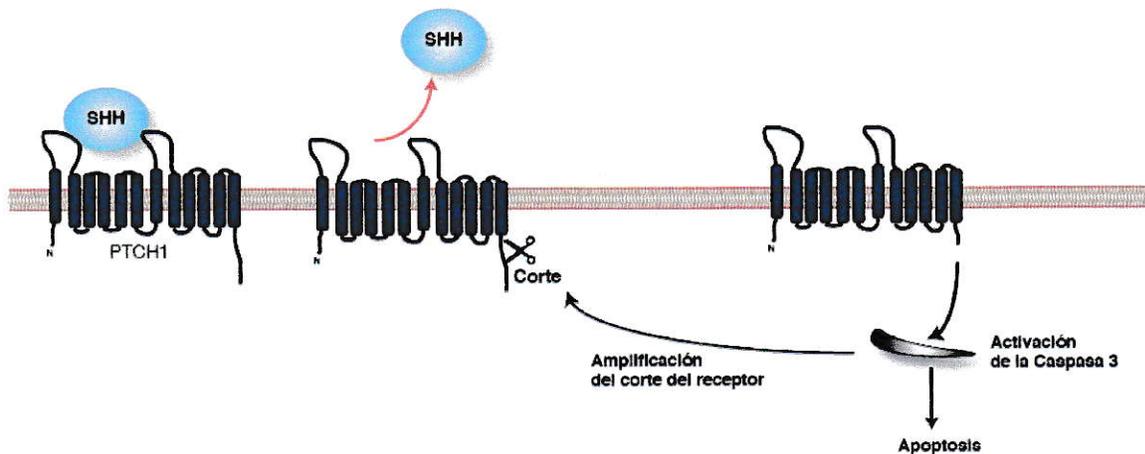


Figura 3. Modelo simplificado de la acción de PTCH1 como Receptor de Dependencia. En ausencia de SHH es clivado por caspasa, permitiendo la exposición de su dominio proapoptótico. El receptor PTCH1 recluta a DRAL que a su vez recluta a TUCAN y caspasa 9 formando un complejo que activa a caspasa 3 llevando a apoptosis a la célula (basado en Goldschneider y Mehlen, 2010).

Esos hechos permiten entender la función supresora de tumores de PTCH1 y que sea adscrito a la familia de *Receptores de Dependencia*, que actualmente consta de una docena de receptores de membrana que se agrupan no por su estructura si no que por su función (figura 4). Con la excepción de integrinas y p75NTR, todos tienen en común el poseer un dominio pro-apoptótico substrato de caspasa, cuya mutación impide la muerte celular programada (Goldschneider y Mehlen, 2010). El sitio es bastante conservado en la evolución para cada uno de los receptores, pero al observar su secuencia aminoacídica se constata que difiere de unos a otros (Ibíd.).

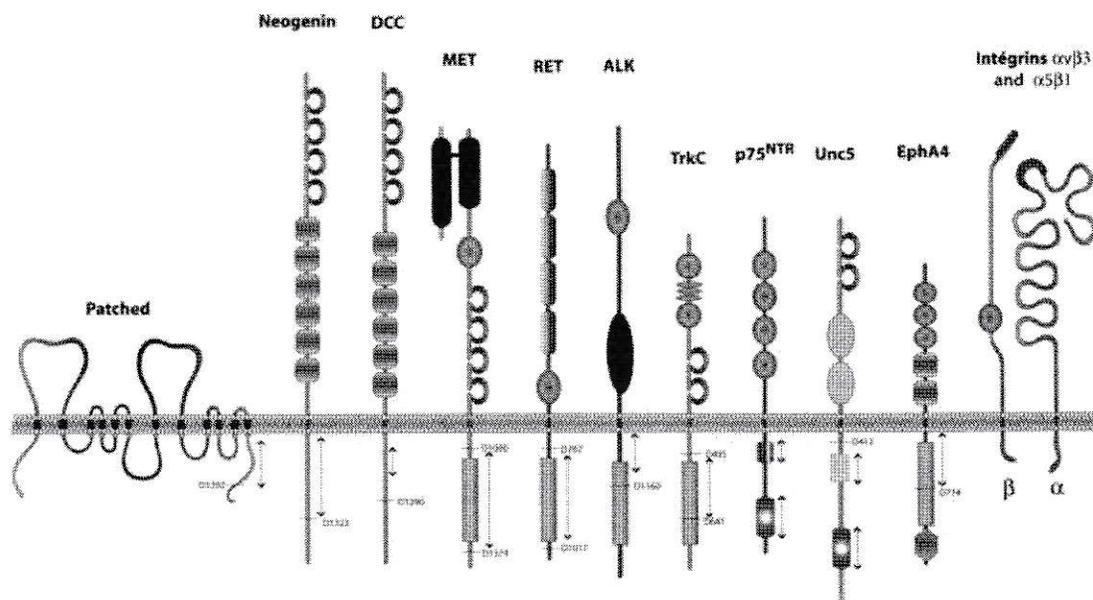


Figura 4. Familia de los Receptores de Dependencia. Esquema que muestra la estructura de los dominios intra y extracelulares de los Receptores de Dependencia descritos hasta la fecha. En esta familia, no están relacionados unos con otros de acuerdo a su estructura si no que por su capacidad de inducir apoptosis en ausencia de su ligando. Nótese que PTCH1 es completamente distinto en su estructura a los otros Receptores de Dependencia. (tomado de Goldschneider y Mehlen, 2010).

Mutaciones puntuales en PTCH1

Hace algunos años, el grupo del Dr. Brandon Wainwright aisló tres mutaciones puntuales de PTCH1 en pacientes que presentaban NBCCS (Hime et al., 2004). Estas resultaron ser mutaciones de sustitución en el cuarto dominio de transmembrana, dentro de una región que se encuentra altamente conservada entre *Drosophila* hasta el ser humano, que se reconoce como región sensible a esteroides y que está involucrada en el tráfico vesicular (figura 5). Mutaciones en los dominios de transmembrana tres y seis de Ptc de *Drosophila* han aparecido como dominantes negativos, sugiriendo que esta cuarta región también podría serlo. Es posible que estas mutaciones produzcan un cambio conformacional en la molécula que le impida ejercer su represión sobre Smo independiente de la presencia o ausencia de Shh.

Las mutaciones aisladas fueron una que afectaba al aminoácido de la posición 513 (llamada D513Y) y otras dos mutaciones que afectaban al aminoácido de la posición 509 (llamadas G509R y G509V). Debido a que están dentro de un dominio de transmembrana altamente conservado (en residuos idénticos entre humanos y *Drosophila*) se sugiere que D513 y G509 se encuentran en un contexto similar. Ellos probaron las tres mutaciones en *Drosophila*, pero inesperadamente sólo la llamada G509V se comportó como dominante negativo (Hime et al., 2004).

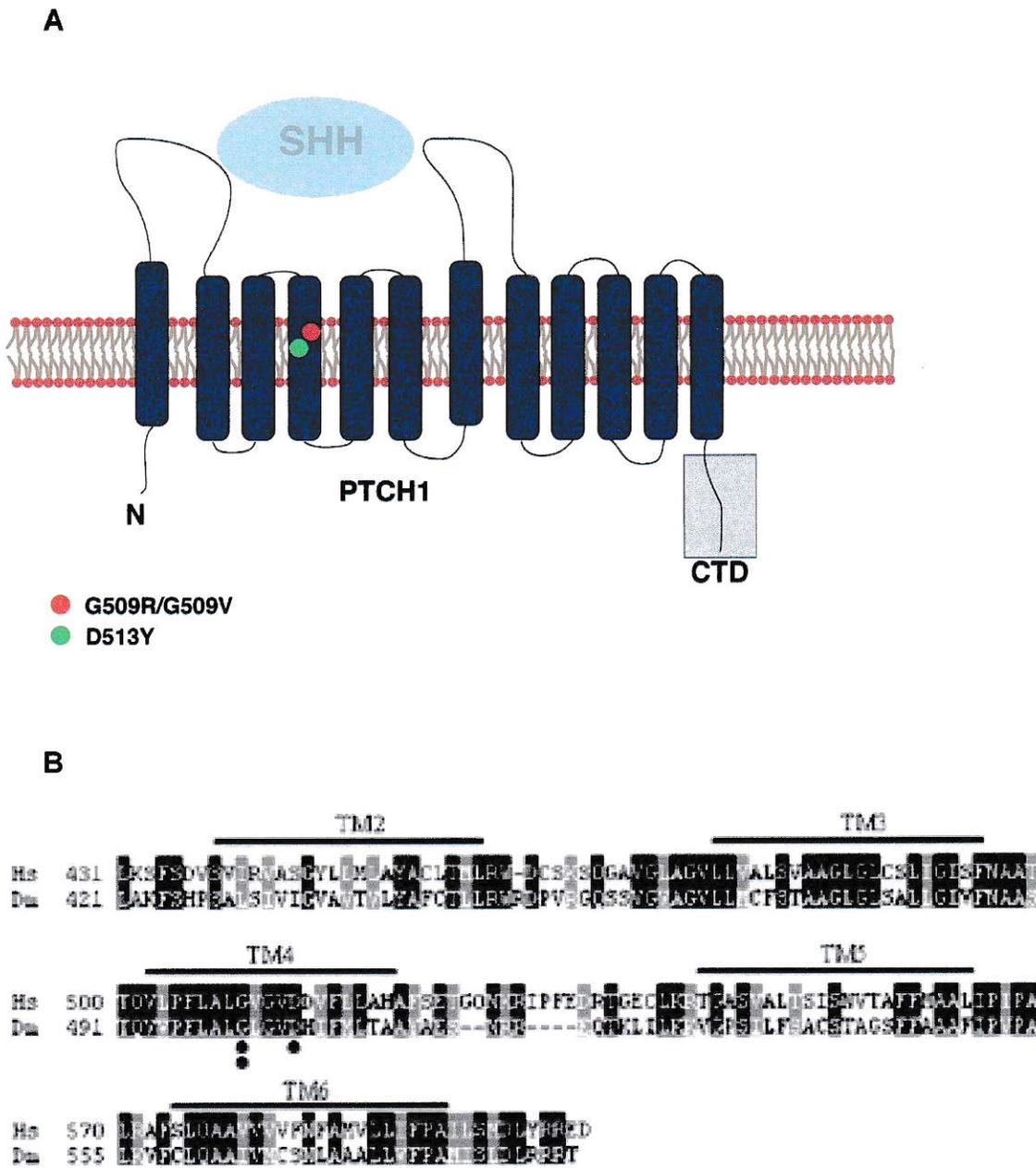


Figura 5. El cuarto dominio transmembrana (TM4) está altamente conservado. La figura muestra un esquema del receptor PTCH1 donde se indica con puntos coloreados el sitio de las mutaciones caracterizadas por el grupo liderado por el Dr. Wainwright; el recuadro gris muestra aproximadamente el sitio de corte de la mutación CTD en el carboxilo terminal (A). La comparación de aminoácidos en la región sensible a esteroides muestra en negro aquellos idénticos y en gris los conservados; las líneas muestran los dominios transmembrana (TM) y los puntos oscuros el sitio de las mutaciones puntuales (tomada de Hime et al, 2004) (B). Hs, *Homo sapiens*; Dm *Drosophila melanogaster*

Desde la publicación de ese artículo, no se ha seguido investigando en torno a estas mutaciones puntuales, pero los resultados obtenidos implican que son necesarios más estudios en vertebrados para lograr una comprensión más profunda de la implicancia de estos alelos de PTCH1 mutados en cáncer.

En este trabajo, se propone ahondar en el estudio de estas mutaciones de PTCH1 utilizando modelos vertebrados (aves y mamíferos). Comparativamente, también se desea estudiar una nueva mutación que corresponde a una delección en los últimos 220 aminoácidos del carboxilo terminal y que, por lo tanto, no contiene el sitio sensible a ser clivado por caspasa. Por último, se pretende relacionar cáncer con la cualidad de PTCH1 como Receptor de Dependencia.



HIPÓTESIS

PTCH1 es un Receptor de Dependencia que induce apoptosis en ausencia de ligando. Mutaciones puntuales de PTCH1 no sólo activarán la vía de SHH sino que también inducirán apoptosis.

OBJETIVOS

1.- Investigar *in vivo* e *in vitro* los efectos producidos por una sobreexpresión de PTCH1 silvestre en ausencia del ligando SHH.

- a) Cuantificar la proliferación.
- b) Cuantificar la muerte celular por apoptosis.
- c) Determinar efectos sobre la diferenciación.

2.- Investigar *in vivo* e *in vitro* los efectos producidos por una sobreexpresión de PTCH1 mutados.

- a) Cuantificar la proliferación.
- b) Cuantificar la muerte celular por apoptosis.
- c) Determinar efectos sobre la diferenciación.

3.- Relacionar la sobreexpresión de los distintos constructos de PTCH1 con la respuesta celular a la vía de SHH.

MATERIALES Y MÉTODOS.

Para este estudio se utilizaron cultivos de la línea celular comercial derivada de mesénquima de embrión de ratón C3H10T1/2, cultivos primarios de condrocitos y embriones de pollo para los experimentos *in vivo*. Todas las técnicas de biología molecular se basaron en técnicas clásicas descritas en manuales (Sambrook, 2001) y en las de manejo de embriones (Tuan y Lo, 2000).

Bacterias y preparación de plásmidos.

Bacterias *E. Coli*, cepa DH5-alfa, fueron crecidas en medio Luria Bertani (LB, Omega Biotek) esterilizado por autoclave. Para la fabricación de placas, se agregó Agar (Winkler) a una concentración de 15 g/l. Para seleccionar bacterias transformadas se utilizó ampicilina (Merck) o kanamicina (Calbiochem) según la naturaleza del plásmido.

Tres mutaciones de PTCH1 aisladas, secuenciadas y clonadas en el laboratorio del Dr. Brandon Wainwright de la Universidad de Queensland, Australia, fueron gentilmente donadas para este trabajo. Corresponden a mutaciones en el cuarto dominio transmembrana, donde en la mutación D513Y ha ocurrido una sustitución del aminoácido Ácido Aspártico de la posición 513 por Tirosina; en G509R se sustituyó la Glicina de la posición 509 por una Arginina y en G509V la sustitución fue por una Valina (Hime, 2004). La mutación CTD corresponde a una deleción de un trozo de la región del carboxilo terminal a partir del

aminoácido 1186, anterior al sitio propuesto para la actividad proapoptótica de PTCH1 silvestre (figura 5). Las cuatro mutaciones provenientes de pacientes con carcinoma basocelular fueron clonadas, secuenciadas e insertadas en el plásmido comercial pcDNA3.1 (Invitrogen, USA).

Cultivos de bacterias transformadas crecidas en medio LB con el antibiótico correspondiente, fueron tratadas con un kit para extracción y purificación de DNA libre de endotoxinas (*Endo-Free Plasmid Mini Kit II*, Omega Bio-Tek) según las especificaciones del fabricante. El DNA obtenido se concentró por precipitación con acetato de sodio (Winkler) hasta llegar a una concentración de 5 µg/µl medidos en un nanofotómetro (Implen).

Cultivo *in vitro* y transfección de una línea celular.

Todos los medios de cultivo empleados fueron de Invitrogen, USA, salvo otra especificación. Las células C3H/10T1/2, clon 8, fueron obtenidas de *American Type Culture Collection* (ATCC, USA). Los cultivos fueron crecidos en medio Eagle modificado de Dulbecco (D-MEM) suplementado con 10% suero fetal bovino inactivado por calor (Hyclone) en placas de 100 mm ø (Corning) sin permitir que llegaran a confluencia para evitar su diferenciación. Al alcanzar aproximadamente un 80% de confluencia, fueron removidas de su placa de cultivo con tripsina-EDTA a 37°C y sembradas sobre cubreobjetos de 12 mm ø en placas de 24 pocillos (Corning) a un número de 10.000 células por pocillo. Al siguiente día fueron transfectadas con Lipofectamina 2000, según las especificaciones del fabricante, con 0,2 µg de DNA por pocillo durante 5 horas

en 100 μ l de Optimem más 200 μ l de D-MEM que contiene 10% suero. Transcurrido este tiempo, se lavaron con D-MEM y se dejaron en medio normal toda la noche. Al siguiente día, se pusieron en D-MEM con 0,5% suero y se observó el éxito de la transfección en un microscopio de epifluorescencia Zeiss, donde la observación de fluorescencia muestra el éxito de la transfección. Sólo se continuó adelante con los cultivos que tuvieron sobre un 75% de células transfectadas (ver más adelante). Los experimentos se hicieron tres veces y cada condición en cuadruplicado.

Como controles experimentales se realizaron cultivos en presencia continua de D-MEM con 10% de suero; cultivos en medio con 0,5% de suero; cultivos en Lipofectamina con Optimem y D-MEM con 10 o 0,5% de suero. Para controlar el porcentaje de transfección, se utilizó pGL (*plasmid Green Lantern*) un plásmido comercial con un gen reportero de la proteína fluorescente verde (GFP). Los plásmidos transfectados fueron el de PTCH1 silvestre, sus mutaciones D513Y, G509R, G509V y CTD. Para comparar los efectos de la transfección de estos plásmidos con inhibidores o activadores de la vía de señalización, se cultivaron células en presencia de Ciclopamina (una gentil donación de Infinity Pharmac.), que es un alcaloide (11-deoxijervina) y potente inhibidor de la vía que ejerce su efecto uniéndose a Smo (Frank-Kamenetsky et al., 2002). Para activar la vía de señalización de Shh, se utilizó Purmorfamina (Calbiochem), un derivado de purina, que se une específicamente a Smo (Sinha y Chen, 2005). También se transfectó un plásmido que contiene la secuencia para una mutación de Smo que permanece constantemente activo (Smo activado, una donación de la Dra.

Carol Wicking de la Universidad de Queensland, Australia) o su control que es Smo silvestre. Finalmente, también se transfectó Gli2, el efector principal de la vía de señalización hedgehog (gentileza del Dr. A. Ruiz i Altaba, de la Universidad de Ginebra, Suiza).

A las 48 horas post-transfección, las células se fijaron en paraformaldehído al 4% en solución salina por 5 minutos en frío. Luego de lavados en buffer fosfato salino (PBS) se ensayó la actividad de fosfatasa alcalina (FA) revelándola durante dos horas en obscuridad con una mezcla de NBT/BCIP (Roche) a una concentración de 3,5 $\mu\text{l/ml}$ y 4,5 $\mu\text{l/ml}$, respectivamente, en buffer AP (Tris pH9,5 100 mM; NaCl 100 mM; MgCl_2 50 mM y Tween-20 0,1%). Al terminar el revelado, las células fueron fijadas en PFA 4% por 10 minutos, lavadas en PBS y contrateñidas por 20 minutos con la tinción *nuclear red*, que tiñe los núcleos de rojo claro para facilitar la contabilidad. Luego de deshidratar en concentraciones crecientes de etanol y clarificar en xilol, se montaron en portaobjetos con Entellán (Merck) para ser observadas en una lupa Leica MZ-125 y fotografiadas con una cámara Leica IC-80. Se contaron 5 campos de cada cubreobjeto con el máximo aumento de la lupa y se fotografiaron los más representativos. Para graficar los resultados y realizar el análisis estadístico, se utilizó el programa *Prism*. Los datos fueron analizados con estadística no paramétrica con un intervalo de confianza del 99%; la probabilidad p de ocurrencia se anotó con un asterisco (*) cuando era de 0,01; con dos asteriscos (**) cuando era de 0,001 y con tres (***) cuando era 0,0001

Para cuantificar la proliferación, se dio un pulso de BrdU (1 ng/ml) de una hora de duración al final de las 48 de cultivo y luego las células fueron fijadas y procesadas para una inmunohistoquímica.

Para la estimulación del cultivo con Shh, se transfectó como se indicó más arriba. Al día siguiente, junto con el cambio de medio, se agregó Shh (proteína recombinante, R&D System, USA) a una concentración de 3,3 µg/µl y se prosiguió el cultivo hasta completar 48 hrs.

Cultivo de condrocitos.

Los condrocitos fueron obtenidos de costillas de embriones de pollo de 14 días (aproximadamente en HH40). Para implementar el protocolo en el laboratorio, se siguió uno descrito en la literatura (Gosset et al, 2008) con pequeñas modificaciones. Las costillas fueron aisladas mecánicamente y lavadas en PBS estéril. A continuación, tratadas con colagenasa tipo II a una concentración de 3 mg/ml en medio de cultivo de condrocitos carente de suero (D-MEM suplementado con ácido ascórbico 0,2 mM, Sigma, β-glicerolfosfato, Merck, 10 mM, y antibiótico penicilina estreptomycin) por 30 minutos a 37°C dentro de una estufa de incubación con una atmósfera de 5% de CO₂. Luego, se disgregaron mecánicamente con una pipeta plástica de 25 ml. y se dejaron otros 30 minutos en colagenasa. Finalmente, se disgregaron nuevamente con una pipeta de 25 ml. y se traspasaron a otra placa petri con 10 ml. de colagenasa 0,5 mg/ml para incubar durante toda la noche. Al día siguiente, se dispersaron los agregados celulares pasando el cultivo por pipetas de 25, 10, 5 y 2 ml; luego se filtraron

con un tamiz para células (Falcon BD, USA) de 40 μm y se centrifugaron por 10 minutos a 400g. El precipitado se resuspendió en medio de condrocitos suplementado con 5% de suero fetal bovino (Hyclone, USA), las células se contaron en un hemocitómetro para ser sembradas en placas de diverso tamaño a una densidad de 8000 células por cm^2 y se cultivaron en una estufa de incubación a 37°C en una atmósfera con 5% de CO_2 en medio de cultivo suplementado con 5% de suero fetal bovino. Este día de siembra del cultivo corresponde al día 0; al día siguiente, el día 1 de cultivo, ya están suficientemente adheridas las células para realizar los experimentos y pueden distinguirse por su morfología, que corresponde a una mezcla de fibroblastos y de condrocitos.

Transfecciones realizadas el día 3, 4 ó 5 de cultivo no mostraron mayores diferencias (datos no mostrados) por lo que se prefirió realizar toda la experimentación transfectando en el día 1. El cultivo primario de condrocitos fue transfectado con lipofectamina 2000 en condiciones similares a las utilizadas para las células C3H/10T/2 en medio que contiene una parte de Optimem y dos partes de medio de cultivo de condrocitos con suero fetal bovino pero sin antibióticos. Cuatro a seis horas después se reemplazó por medio de cultivo de condrocitos normal, el cual es recambiado por medio fresco cada dos días. El éxito de la transfección se comprobó observando la presencia de GFP bajo una lupa de fluorescencia y/o mediante su detección por anticuerpos. Los procedimientos experimentales se llevaron a cabo por dos o siete días. Todos los experimentos se repitieron al menos tres veces y por cuadruplicado.

Para teñir depósitos de colágeno se utilizó la tinción con *Alcian Blue* (Lev y Spicer, 1964) y para depósitos de calcio la de Alizarina roja (Tuan y Lo, 2000). Para cuantificar la tinción de *Alcian Blue*, se incubó por 8 horas en guanidino cloruro 6M y se leyó la densidad óptica a 620 nm en un espectrofotómetro Shimadzu UV-120-11 (Zhou et al, 2010).

Electroporación *in ovo*.

Huevos de gallina, *Gallus gallus*, de la raza Rock iso, se incubaron a 38,5°C con agitación en una incubadora para huevos (GQF Manufacturing Co., USA) durante 36 horas aproximadamente. Al cabo de ese tiempo, se realizó una apertura en la cáscara para tener acceso al embrión. Los estados embrionarios fueron catalogados según la nomenclatura propuesta por Hamburger y Hamilton (Hamburger y Hamilton, 1951), seleccionando los que se encontraban en el correcto estado de desarrollo, esto es entre HH10 a HH12 y electroporándolos de acuerdo a protocolos clásicos. Brevemente, se inyectó un poco de tinta china diluida (Pelikan) por debajo del embrión, se insertó un fino capilar en el tubo neural y se inyectó unos 0,1 a 0,2 µl de DNA experimental a una concentración de 3 a 4 µg/µl, diluido en buffer de electroporación (Tris, 10 mM; EDTA, 1 mM y Fast Green 0,025 % Sigma) conjuntamente con pGL, un plásmido que porta como gen reportero GFP para poder visualizar el éxito de la electroporación. Se dispusieron los electrodos en forma de L paralelos al tubo neural y se aplicaron 6 pulsos de 25V por 50 milisegundos con un segundo de intervalo. Se usó un electroporador (BTX, modelo EC-20). Luego de la electroporación, se pusieron unas gotitas de Ringer (NaCl 7,2 g/l ; CaCl₂ 0,23 g/l; KCl 0,37 g/l y pH 7,2) sobre

el embrión, sin antibióticos. Se cubrió la apertura de la cáscara con cinta transparente y se devolvieron a la incubadora a 38,5°C. La sobrevida se observa 24 y 48 horas después (tabla 1). El éxito de la electroporación se observó por la emisión de fluorescencia en el tubo neural como producto de la expresión del plásmido reportero, 24 o 48 horas después de la intervención (figura 17).

El PTCH1 silvestre y sus mutaciones D513Y, G509R , G509V y CTD fueron coelectroporados junto con pGL debido a que estaban insertos en un plásmido que no contiene un gen reportero. Se utilizó también un constructo de Shh de pollo (cShh) que está insertado en un plásmido comercial IRES-EGFP que lleva en su secuencia el gen para GFP (una donación del Dr. Claudio Stern del University College London, Inglaterra). Como controles experimentales se utilizó el plásmido pGL, la coelectroporación de pGL junto pcDNA3.1 vacío, o el plásmido IRES-EGFP vacío, sin cShh.

Se efectuaron al menos cuatro rondas de electroporación correspondientes a distintas posturas de huevos. A las 48 horas postelectroporación, los embriones fueron fijados en PFA 4% (Merck) por 4 horas a 4°C, lavados varias veces en PBS y deshidratados en sacarosa (Merck) al 30%. Luego, fueron incluidos en OCT y se hicieron cortes seriados de 12 a 18 µm en un criostato.

Inmunofluorescencia e inmunohistoquímica.

Para inmunofluorescencia (IF) los cortes o los cubreobjetos con células adheridas fueron lavados en PBT (PBS más 0,1% Tritón X-100, Winkler), bloqueados con suero de cabra 5% en PBS e incubados toda la noche en el anticuerpo primario a 4°C. Los anticuerpos utilizados fueron anti histona 3 fosforilada 1:300 (hecho en ratón, Milipore); anti caspasa-3 1:700 (conejo, Cell signaling). Al día siguiente, se lava en PBS y se incuba en anticuerpo secundario por una hora a temperatura ambiente y oscuridad. Como anticuerpo secundario se utilizaron Alexa-488 y Alexa-555 (Invitrogen) o Dy-Light Red (Jackson). Luego de lavar con PBT se tiñen con DAPI 1:10000 (Sigma) o TOPRO-3 (Invitrogen). Las muestras se montaron con Fluor-Save (Calbiochem) y se observaron en un microscopio de epifluorescencia Zeiss, o en un microscopio de fluorescencia Olympus, modelo BX-52 o en un microscopio Confocal Zeiss, Laser Meta 50. Las fotografías fueron obtenidas con cámara Zeiss y las imágenes fueron tratadas sólo para modificar su brillo o contraste.

La muerte celular por apoptosis en los embriones de pollo electroporados se midió utilizando un kit comercial según las instrucciones del fabricante (*In situ cell death detection kit*, Roche).

Para inmunohistoquímica (IHQ) se utilizó un kit ABC (Vector) según las indicaciones del fabricante y se reveló con Impact-DAB (Vector). Los anticuerpos utilizados fueron anti GFP (Invitrogen) 1:200 (cuando era proveniente de ratón) o 1:500 (cuando era proveniente de conejo); anti caspasa-3 1:700 (conejo, Cell

Signaling); anti BrdU 1:300 (ratón, Dako, USA); anti colágeno II 1:10 y anti colágeno IX 1:15 (ambos de Hybridoma Bank, Iowa, USA y hechos en ratón). Para facilitar el recuento celular, las células se tiñeron con hematoxilina (núcleo) y Eosina amarilla (citoplasma). Una vez revelada la IHQ, las muestras se deshidrataron en concentraciones crecientes de alcohol, se transparentaron en xilol y se montaron con Entellán (Merck). Las observaciones se hicieron en un microscopio Olympus, modelo BX51 y fotografiados con una cámara Motic, modelo Moticom 2500. El procesamiento de las imágenes fue similar a las de IF.

Para contar células marcadas positivamente, se tomaron cinco campos de observación bajo el microscopio.

Para graficar los resultados y realizar el análisis estadístico se utilizó un programa estadístico en línea (Kirkman, 1996) o el programa *prism*, según se indicó más arriba.

RESULTADOS

Para estudiar la participación de PTCH1 en los procesos de proliferación, diferenciación y muerte celular, se sobreexpresó la proteína *in vitro* en cultivos de una línea celular, en cultivos primarios de condrocitos, que responden a la señalización de Hh, e *in vivo* en el tubo neural del embrión de pollo. Cada uno de los modelos experimentales estudiados presentan ventajas específicas que nos permiten lograr un conocimiento más amplio y general de la participación de PTCH1 en tales procesos. Se utilizaron constructos plasmidiales que portan una versión de PTCH1 silvestre y otros que portan una versión de PTCH1 mutado en el dominio de transmembrana 4 o con una delección en la región del carboxilo terminal intracelular.

SOBREEXPRESIÓN DE PTCH1 EN UNA LÍNEA CELULAR.

La línea celular C3H/10T1/2 (de ahora en adelante abreviada como 10T1/2), es una línea celular multipotente proveniente de mesénquima de embrión de ratón que ha sido utilizada ampliamente para el estudio de la vía de señalización de Shh pues responde a su acción diferenciándose a un linaje osteogénico. Un alto porcentaje de las células 10T1/2 estimuladas con Shh responden incrementando la actividad de fosfatasa alcalina (FA), indicador de diferenciación ósea, la que puede medirse fácilmente por métodos colorimétricos (Ruiz i Altaba, 1999; Ingram et al, 2002).

Las células 10T1/2 fueron transfectadas mediante el método de lipofección utilizando liposomas, cuando se encontraban en un cultivo de una confluencia cercana al 80%. Habitualmente, estas células crecen en un medio que contiene 10% de suero que podría enmascarar el efecto de la sobreexpresión de PTCH1 silvestre o mutado, por lo que el cultivo experimental se realizó en presencia de sólo un 0,5% de suero, lo mínimo necesario para su crecimiento (véase Materiales y Métodos).

La figura 5 muestra un experimento representativo de transfección de la línea celular. Aproximadamente un 15% de las células controles expresan fosfatasa alcalina (figura 5A), porcentaje que se ve reducido a la mitad en presencia de sólo 0,5% de suero (figura 5B). La situación control de transfección con un plásmido que sólo expresa GFP como gen reportero, no muestra diferencias respecto a los controles anteriores (figura 5C), como tampoco hay diferencias en las células crecidas sólo con Lipofectamina tanto en 10% como en 0,5% de suero (figura 6). Tal como era esperable, el cultivo de células en presencia de la ciclopamina (de aquí en adelante Cyc, abreviado de su nombre en inglés), que es un inhibidor farmacológico de la vía de señalización de Shh, muestra una disminución de la actividad de FA y las pocas células que la expresan tienen una marca tenue (figura 5D); mientras que el cultivo en presencia de la purmorfamina (de aquí en adelante Pur), un activador de la vía, muestra un aumento al doble.

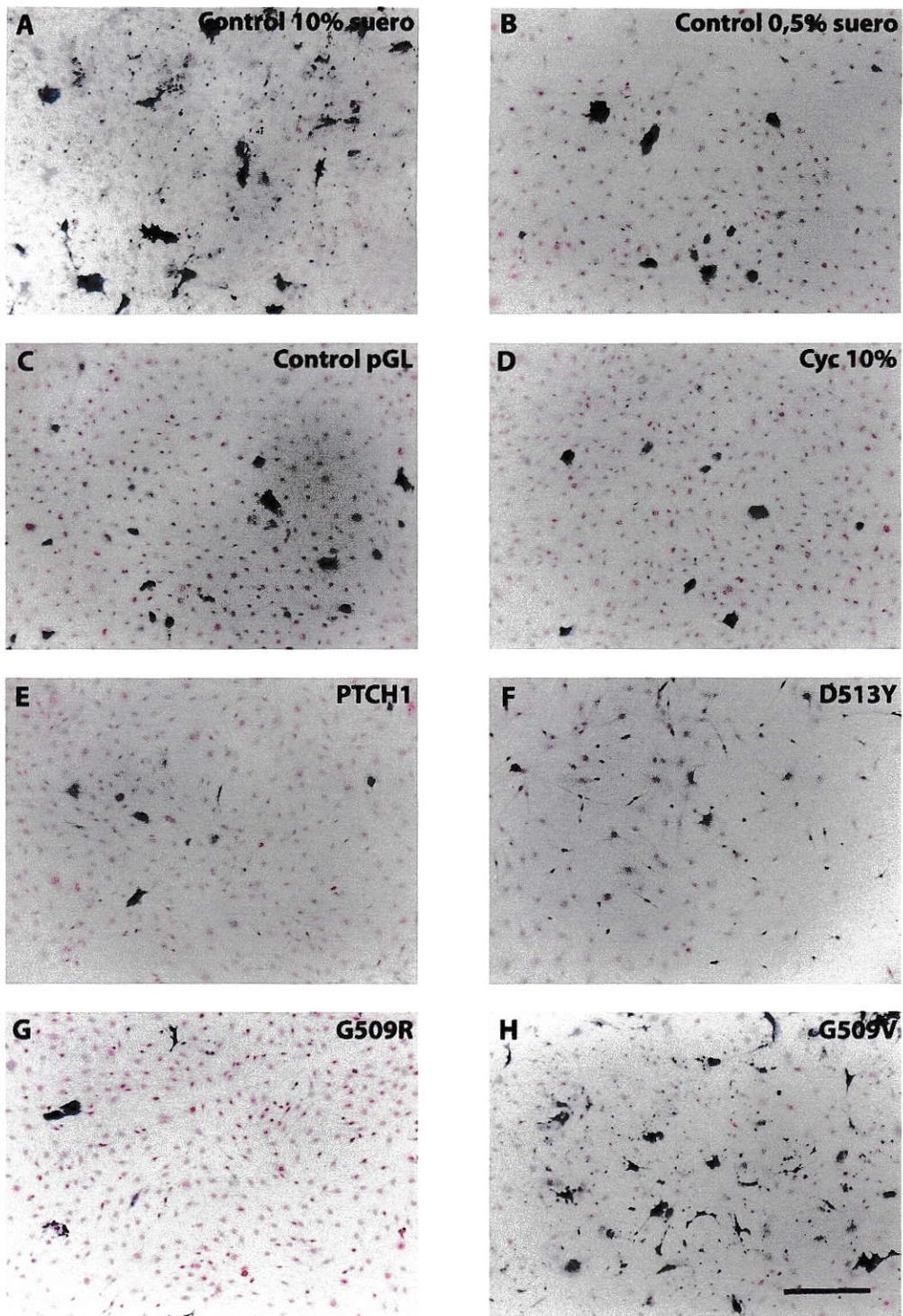


Figura 6: Expresión de fosfatasa alcalina en la línea celular transfectada. Células C3H/10T/1/2 fueron transfectadas con versiones de PTCH1 mutadas y cultivadas por 48 horas antes de revelar la FA. Las células FA positivas aparecen en morado. Como controles se cultivaron células en presencia de 10% de suero (A), 0,5% de suero (B) o pGL en 0,5% de suero (C). La Cyc en

presencia de 10% de suero reduce la marca de FA (D). PTCH1 también reduce la marca respecto a los controles (E), en cambio D513Y (F) y G509V (H) la aumentan. Con G509R (G) no se ve un aumento. La barra representa 400 μ m.

La transfección con PTCH1 silvestre, muestra a las 48 horas de cultivo una disminución de la expresión de FA (figura 5E). Esto concuerda con resultados previos (Ruiz i Altaba, 1999 e Ingram et al, 2002), ya que al aumentar la presencia de *PTCH1* (que es un gen blanco de SHH), se estaría secuestrando Shh presente en el medio y aumentando la posibilidad de represión sobre Smo y, por lo tanto, una inhibición de toda la vía, produciéndose una retroalimentación negativa. En cambio, al transfectar con las versiones mutadas de PTCH1 se observa un incremento de la actividad de FA. Esto ocurre para la versión D513Y (figura 5F) y CTD que tienen un aumento similar al que ocurre cuando se estimula la vía con la purmorfamina. El aumento es mayor aún con G509V (figura 5H), donde más del 50% de las células expresan FA y que justamente corresponde a la variante de PTCH1 que se había comportado como un dominante negativo en *Drosophila* (Hime et al., 2004). Curiosamente, la versión G509R no muestra un aumento significativo de la actividad de FA comparada con los controles (figura 5G).

Las figuras 6 y 7 resumen en un gráfico la cuantificación de estos experimentos y puede apreciarse que tanto D513Y, CTD y G509V muestran una activación de la vía de señalización de Shh, pero no así G509R. El aumento notable producido por G509V es incluso mayor que el producido cuando se transfectan estas células con otros constructos que activan la vía. Es el caso de la sobreexpresión

de dos controles positivos utilizados, una variante permanentemente activada de Smo, como así mismo la de un constructo Gli2 activador el cual es el principal efector de la vía hedgehog.

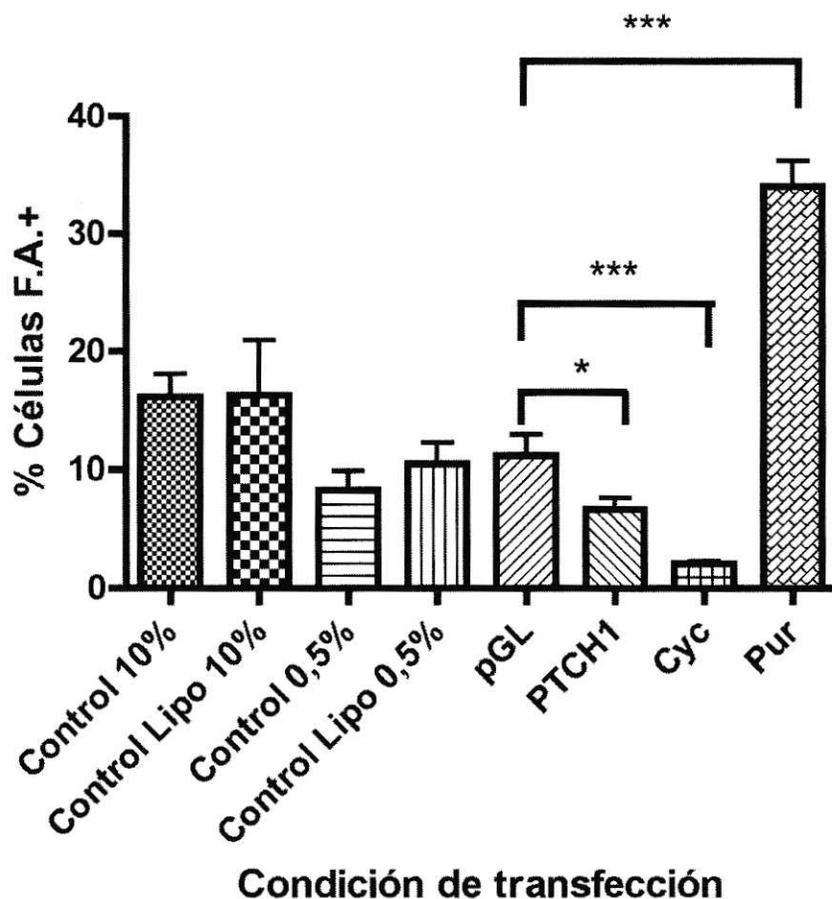


Figura 7. La línea celular 10T1/0 responde a la modulación de la vía de Shh. Gráfico del porcentaje de células FA positivas en las diversas condiciones de transfección. No se observan diferencias entre los controles cultivados con Optimem y Lipofectamina (“Control Lipo”) respecto a controles sin ellos, ya sea en 10% o 0,5% de suero. Las transfecciones con pGL, con PTCH1 y el cultivo con Pur se hicieron en presencia de 0,5% de suero. El cultivo en presencia de Cyc se realizó en 10% de suero (* $p < 0.01$; *** $p < 0.0001$; véase Materiales y Métodos).

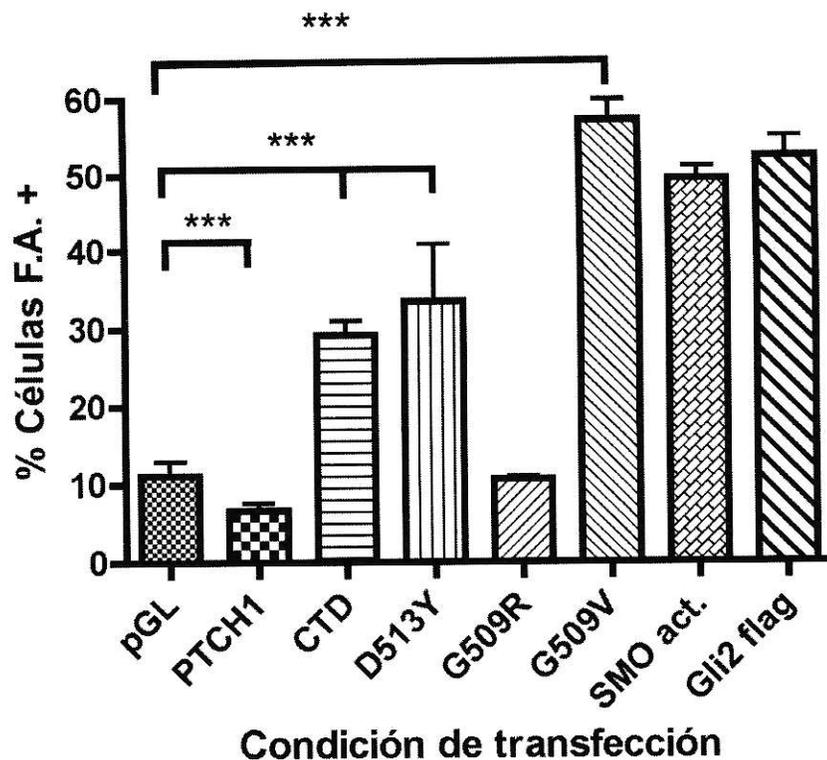


Figura 8. Las células 10T1/2 responden de distintas maneras a las mutaciones de PTCH1. Todas las mutaciones, salvo G509R, aumentan la expresión de FA y se comportan como dominante negativo luego de dos días post-transfección. Todos los cultivos fueron realizados en 0,5% de suero (***) $p < 0.0001$).

Estos resultados sugieren que las variantes de PTCH1 ensayadas, con excepción de G509R, se comportan como si estuvieran frente a la presencia continua de Shh, lo que es esperable en una mutación que produce cáncer por un desbalance en la vía de señalización de Shh.

PTCH1 y sus variantes no inducen proliferación.

Al ensayar la incorporación de BrdU en las células 10T1/2, un análogo de la timidina que se incorpora durante la fase S del ciclo celular, para revelar si las diferentes mutaciones también tenían un efecto sobre la proliferación, se encontró que ninguno de ellas la aumenta (figura 8). Este resultado es esperable pues esta línea celular responde a la señalización de Shh diferenciándose y no proliferando. Incluso, en los cultivos transfectados con PTCH1 silvestre hay una disminución de la proliferación debido a que la presencia de Shh es necesaria para la homeostasis celular.

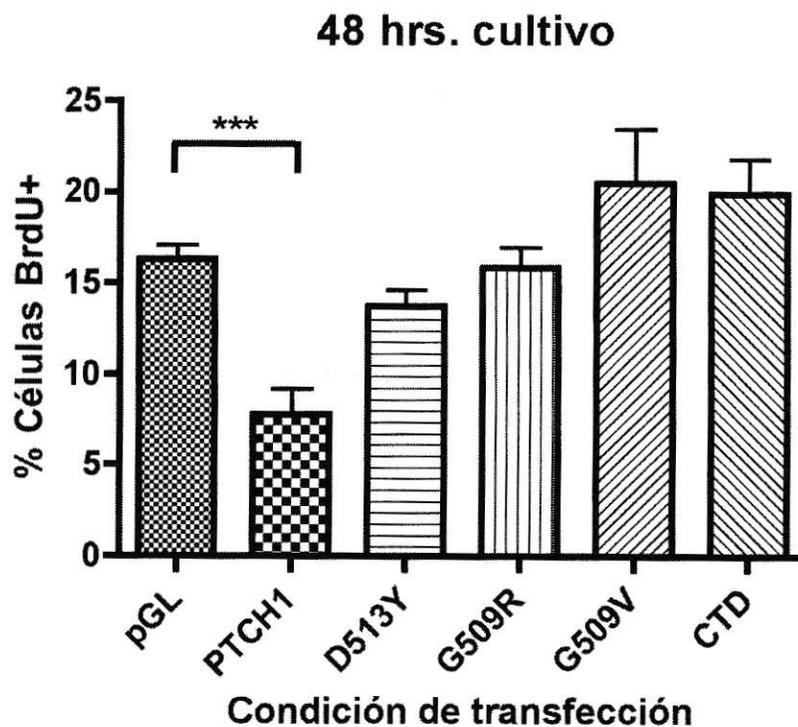


Figura 8. Los constructos PTCH1 ensayados no inciden en la proliferación. Ensayo de incorporación de BrdU en pulsos de 1 hora al final de un cultivo de

dos días post-transfección. Ninguna de las mutaciones aumenta la proliferación y PTCH1 silvestre incluso la disminuye *** $p < 0.0001$).

G509R no induce apoptosis pero si lo hacen las otras variantes.

A pesar de que los cultivos se sembraron con el mismo número de células, al cabo de 48 hrs. de cultivo luego de la transfección, no se observa la misma cantidad de células en todos ellos. Como las variantes de PTCH1 no inducen un aumento de la proliferación, se investigó el efecto sobre la muerte celular, encontrándose que tanto PTCH1 como sus mutaciones inducen apoptosis a las 48 horas de cultivo, con la excepción de G509R (figura 9). Para observar si la inducción de apoptosis era temprana, es decir, poco tiempo después que el constructo comienza a expresarse, se analizó el cultivo a las 24 horas post-transfección encontrando que G509V y CTD inducen apoptosis extensamente. También lo hace PTCH1 moderadamente, revelando así su cualidad de receptor de dependencia.

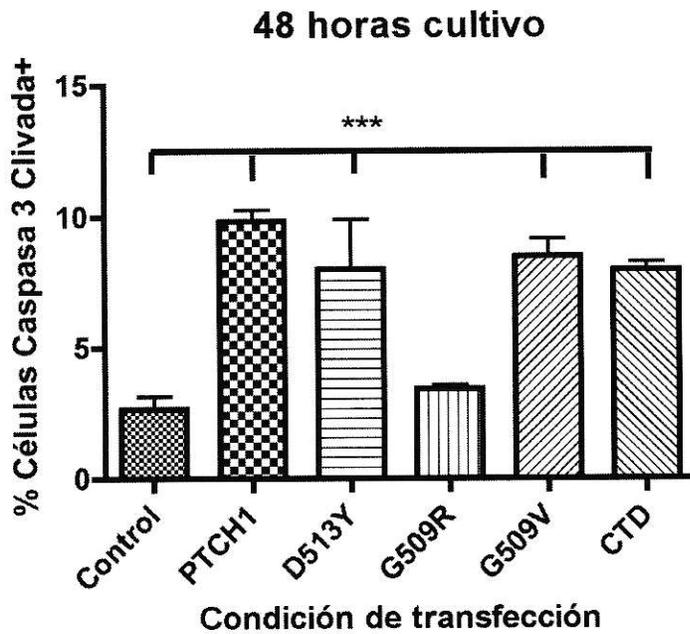
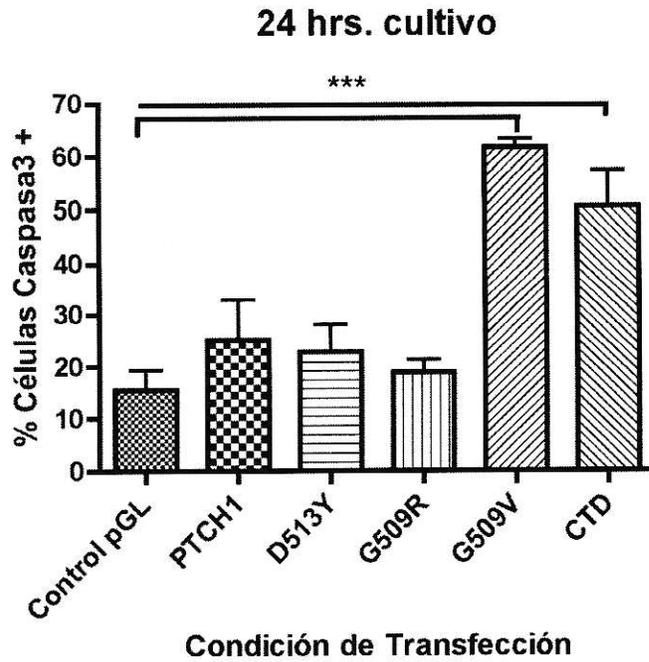


Figura 10. PTCH1, G509V y CTD inducen temprano la apoptosis. Tanto PTCH1 como G509V y CTD inducen muy pronto apoptosis, no así D513Y que lo hace más tarde, entre las 24 y 48 hrs. de cultivo, ni G509R que no induce más apoptosis que el control en los tiempos analizados (***) $p < 0.0001$).

PTCH1 y G509V se comportan como Receptor de Dependencia.

A continuación, ensayamos si las variantes de PTCH1 también se comportan como receptor de dependencia. Para esto, se cultivan las células transfectadas en un medio que contiene Shh (figura 10).

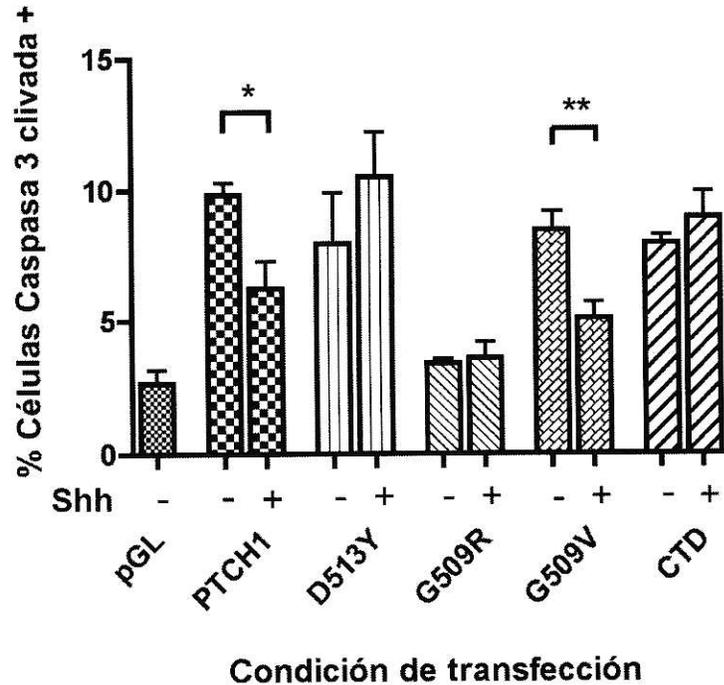


Figura 11. La apoptosis inducida por PTCH1 y G509V puede ser rescatada por Shh. Los cultivos transfectados con las variantes de PTCH1 fueron suplementados con Shh recombinante exógeno y analizados a las 48 hrs. post-transfección. Tanto en los cultivos transfectados con PTCH1 como con G509V disminuye la apoptosis en presencia de Shh (* $p < 0.01$; ** $p < 0.001$).

En la literatura está descrito que Shh puede rescatar la apoptosis inducida por PTCH1 y fue precisamente una de las demostraciones de su cualidad de factor de dependencia (Thibert, 2003). Al ensayar en nuestros cultivos la adición de Shh observamos que G509V también se comporta como Receptor de

Dependencia, pero no así D513Y ni CTD donde persiste apoptosis en el cultivo. G509R pareciera no tener efecto alguno sobre la línea celular, por lo que tampoco varía la muerte celular en presencia de Shh. Este resultado refuerza el papel de G509V como dominante negativo.

Finalmente, al adecuar las condiciones de transfección a la línea celular reportera de Shh, se han podido ensayar las variantes de PTCH1 por primera vez en un modelo de vertebrado *in vitro* y los resultados nos muestran que éstas son biológicamente funcionales. Para lograr una comprensión más amplia acerca del papel de PTCH1 y el de sus mutaciones, se probaron a continuación todas ellas en un cultivo primario de condrocitos de pollo.

SOBREENPRESIÓN DE PTCH1 EN CONDROCITOS.

Los condrocitos aislados de costillas de embrión de pollo derivan de células troncales mesenquimales originadas en el esclerótomo de los somitos. El cultivo primario de condrocitos aparece como otro modelo interesante en el cual ensayar estas mutaciones de PTCH1 ya que durante su proceso de diferenciación ósea expresan el receptor Ptc1 y responden a la vía de señalización de Hh (Enomoto-Iwamoto et al., 2000).

Transfección de condrocitos.

Los condrocitos pueden sembrarse y cultivarse en monocapas (Quarto et al., 1997; Gosset et al., 2008) los cuales también pueden transfectarse (Guo et al., 2007; Shi et al., 2010). Se optimizó el método de cultivo y transfección de este cultivo, ensayando primeramente un plásmido que contiene sólo GFP como gen reportero. La figura 11 muestra un cultivo representativo con marca positiva para GFP. Al analizarlo con alto aumento, puede verse una intensa marca en los condrocitos y prácticamente ninguna en los fibroblastos que acompañan el cultivo, que se reconocen por su apariencia morfológica. Esto también se observa en los experimentos de sobreexpresión de PTCH1 y sus variantes (véase más adelante). Esto último facilita la interpretación de los resultados, pues casi todo el efecto que observemos se debe al comportamiento de los condrocitos y no al de los fibroblastos transfectados. Para calcular la eficiencia de la transfección, se contó el número de células GFP positivas en una IHC sobre el total en cada conglomerado de condrocitos por campo de observación (figura 12), logrando aproximadamente un 81% de células transfectadas, un porcentaje mayor que el reportado en la literatura (Madry y Trippel, 2000; Shi et al., 2010). Si bien es cierto este resultado puede considerarse sobrevalorado ya que los condrocitos pueden aún sufrir divisiones celulares en los cultivos, y por lo tanto aumentar el número de células GFP positivas sólo por amplificación clonal, ellos también estarán expresando nuestros constructos por lo que para efecto del análisis de los resultados no debería afectar.

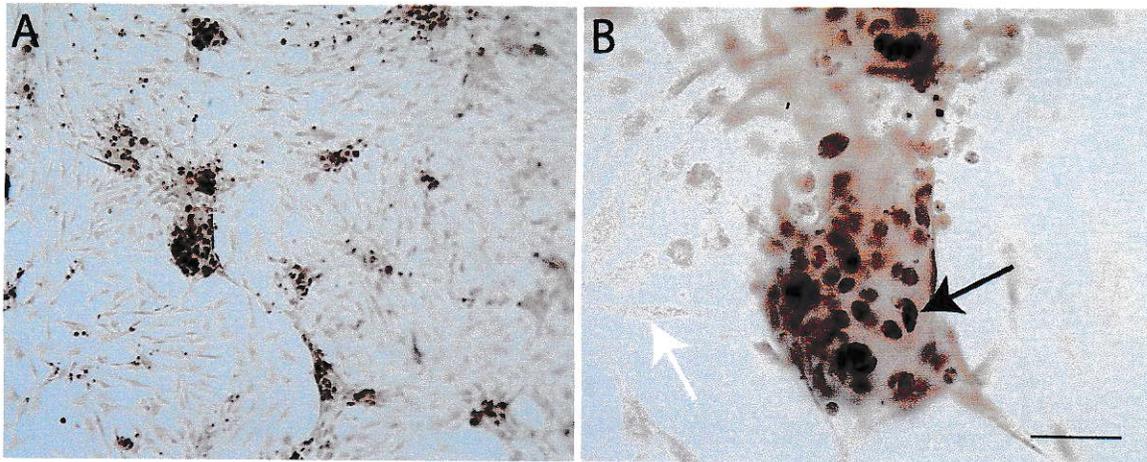


Figura 12: Los condrocitos pueden transfectarse con mayor eficiencia que los fibroblastos. Cultivo de condrocitos transfectados el día 1 y analizados 48 hrs. después mediante una IHC contra GFP. Con bajo aumento pueden observarse colonias de condrocitos cuya marca muestra la expresión de GFP (A). A mayor aumento, pueden observarse condrocitos marcados (flecha negra) junto a fibroblastos circundantes no marcados (flecha blanca), lo que sugiere que en estos cultivos se transfectan preferentemente los condrocitos. La barra representa 25 μm en (A) y 100 μm en (B).

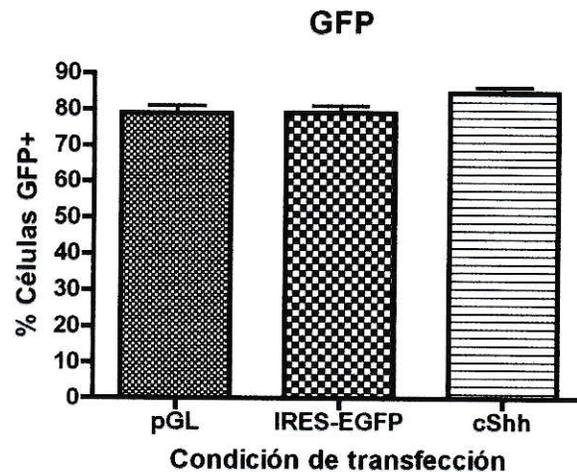


Figura 13: Alta tasa de transfección en condrocitos. El gráfico muestra el porcentaje de células transfectadas reveladas en una IHC contra GFP 48 horas después. Los valores son prácticamente similares para transfecciones con tres plásmidos comerciales distintos, dos de ellos que sólo expresan GFP y un tercer plásmido que además porta el gen para Shh de pollo acoplado a GFP. El promedio de transfección entre las tres condiciones es de 80,94% sobre células totales contabilizadas.

Proliferación en cultivos de condrocitos transfectados.

Para estudiar la proliferación en condrocitos transfectados, se utilizó BrdU, un análogo de la timidina que se intercala en el DNA. Se sembraron 8000 células por cm² y se dio un pulso de BrdU de una hora al final de dos días de cultivo post-transfección, seguido de revelado con un anticuerpo anti BrdU. La figura 13 muestra fotografías representativas de cultivos de condrocitos de 48 hrs. PTCH1 disminuye la proliferación en los condrocitos cultivados (figura 13), mientras que G509V sólo la incrementa moderadamente; tanto D513Y como G509R no tienen un efecto en la proliferación y CTD la disminuye en un porcentaje que no es estadísticamente significativo (26,5% de células BrdU positivas para el control transfectado con pGL) . La transfección con cShh no produce efecto sobre la tasa de proliferación. Este resultado se condice con el antecedente que señala que si bien Shh es necesario para mantener la proliferación de condrocitos pre-hipertróficos y guiar su diferenciación, sólo tendría un efecto en los primeros estados de la condrogénesis, durante la proliferación y condensación mesenquimática (Park et al., 2010; Bruce et al., 2010).

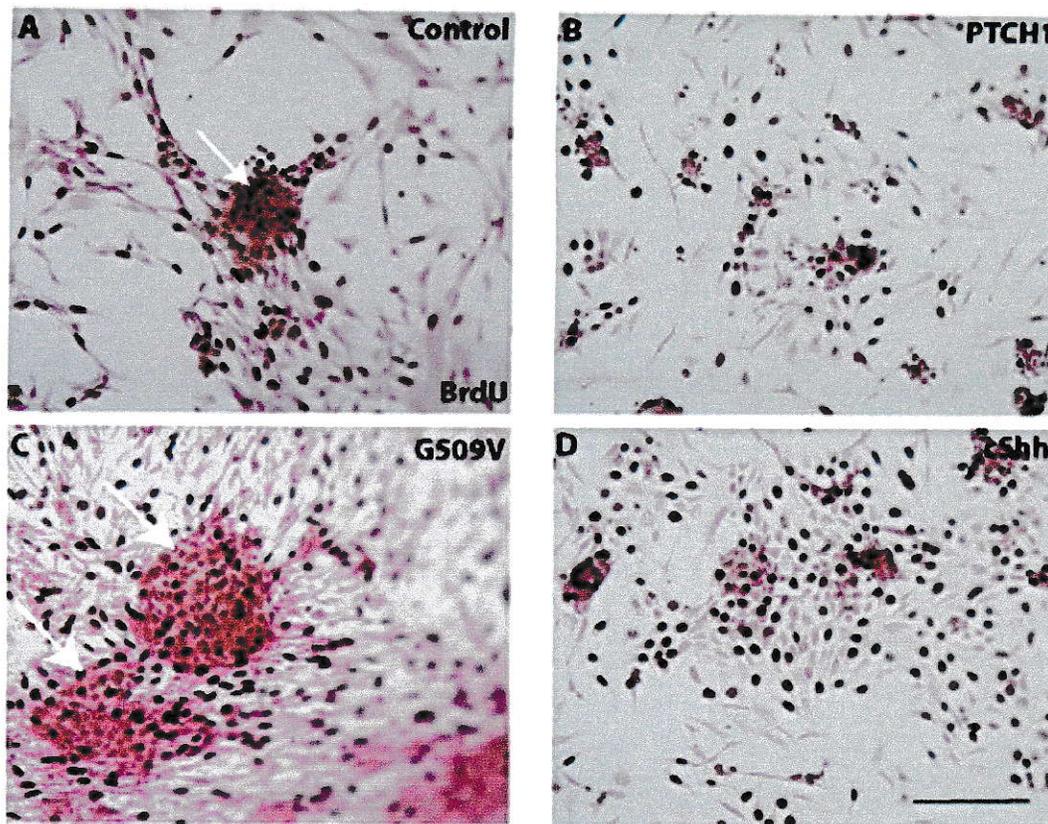


Figura 14: Proliferación en cultivos de condrocitos. Se ilustra un experimento representativo de un cultivo de 2 días de condrocitos transfectados según se indica, a los cuales se les dio un pulso de BrdU de una hora de duración y que fue revelado mediante una IHC. Los nódulos de condrocitos pueden distinguirse morfológicamente de los fibroblastos que tapizan el cultivo y sólo se contaron células marcadas en esos nódulos variando el plano focal en un microscopio de luz (flecha blanca). La situación control es un cultivo transfectado con pGL (A). En los transfectados con PTCH1 pueden observarse menos nódulos (B). En cambio en el caso de G509V, los nódulos pueden verse muy bien formados y de mayor tamaño (flechas) (C). Para cShh se ven abundantes nódulos pero de tamaño menor (D). La barra representa 100 μm .

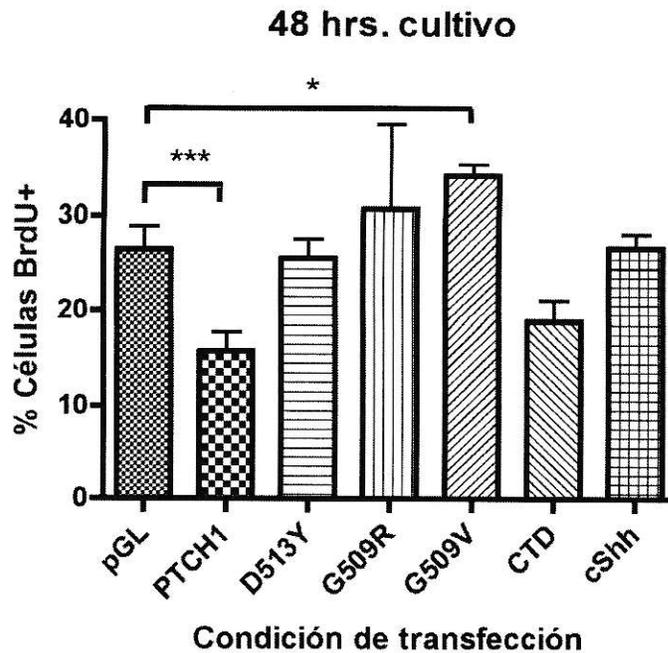


Figura 15: PTCH1 disminuye la proliferación de condrocitos y G509V la aumenta. El gráfico muestra el porcentaje de condrocitos marcados en una IHC contra BrdU, luego de un pulso de una hora al final de dos días de cultivo post transfección. Mientras PTCH1 disminuye significativamente la proliferación comparado con su control pGL, G509V la aumenta moderadamente. La transfección con el constructor CTD no tiene un efecto estadísticamente significativo (* $p < 0.01$; *** $p < 0.0001$).

Los condrocitos en cultivos de monocapa se agregan rápidamente y se dividen formando micromasas o nódulos que pueden contener hasta aproximadamente 130 células a los tres días de cultivo. Esta organización puede dificultar la contabilidad de células marcadas para BrdU u otro marcador de proliferación, por lo que se decidió contar el número de micromasas por campo de observación aleatorio a bajo aumento en un microscopio de luz (figura 15). PTCH1 disminuye el número de micromasas respecto al control, e incluso el cultivo tiene una apariencia más desorganizada (figura 13B). G509V aumenta moderadamente el número de micromasas, en tanto, D513Y como G509R no

tienen un efecto en su número y CTD la disminuye en un porcentaje que no es estadísticamente significativo (figura 15). Mediante ambos métodos para cuantificar la proliferación, encontramos que PTCH1 la disminuye y que G509V la aumenta. CTD también disminuye la proliferación, pero sólo es estadísticamente significativa cuando se cuenta el número de micromasas.

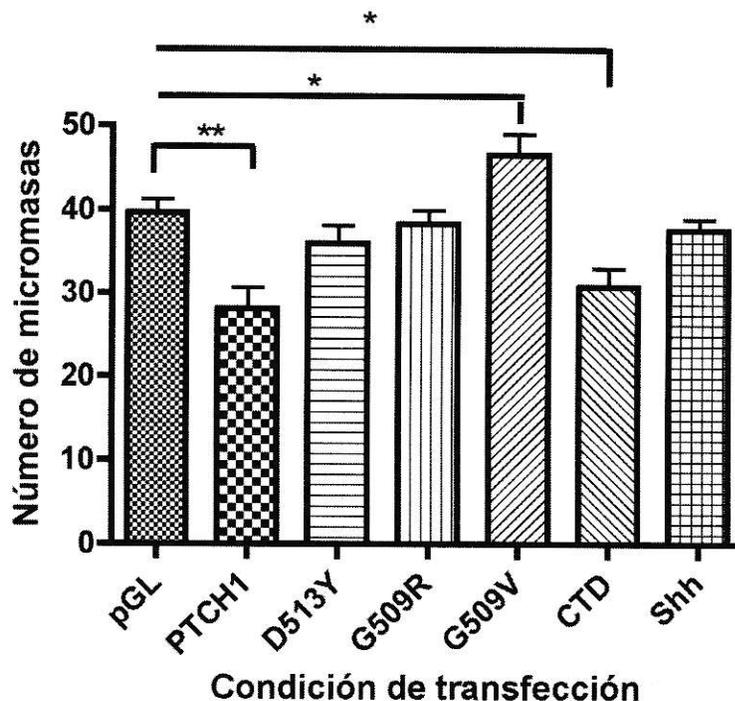


Figura 16. Número de micromasas en cultivos transfectados de condrocitos. PTCH1 disminuye el número de micromasas por campo de observación, como medida indirecta de la proliferación, mientras que CTD lo hace moderadamente. G509V tiene una incidencia estadísticamente significativa en el aumento de su número, en cambio Shh no tiene efecto alguno (* $p < 0.01$; *** $p < 0.0001$).

PTCH1 y sus variantes inducen apoptosis.

Para observar el efecto sobre la muerte celular por apoptosis de las distintas variantes de PTCH1, se estudió la expresión de caspasa-3 clivada mediante IHQ. La figura 16 grafica el aumento de la apoptosis con todos los constructos ensayados, en especial con PTCH1 y CTD.

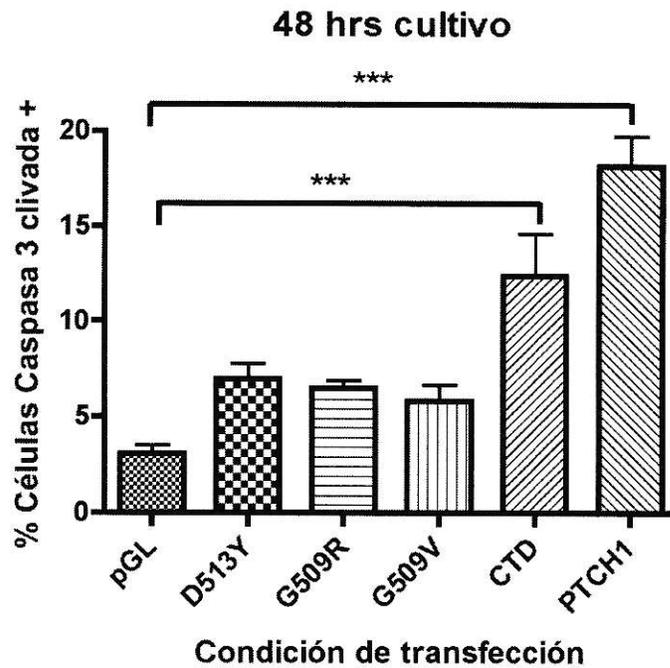


Figura 17. La apoptosis está aumentada en todos los cultivos transfectados. Tanto CTD como PTCH1 inducen una alta tasa de muerte celular por apoptosis a las 48 hrs. de transfectados. Las otras variantes de PTCH1 aumentan al doble aproximadamente la apoptosis en los cultivos (*** $p < 0.0001$).

Si bien es cierto que PTCH1 actuaría como un factor de dependencia, y podemos explicar por este hecho la elevada tasa de muerte en las micromasas transfectadas, también ocurre apoptosis en los otros cultivos transfectados, aunque en mucho menor escala. Esto es cierto incluso para G509V, que ha sido

considerado como un dominante negativo de la vía de señalización de Shh en *Drosophila* (Hime et al., 2004).

Diferenciación en cultivos de condrocitos

Debido a los resultados anteriores y dado que Hh guía la diferenciación de los condrocitos (Park et al., 2010; Bruce et al., 2010), se ensayó a continuación el papel de las mutaciones de PTCH1 sobre la diferenciación.

La figura 17 muestra el depósito de glicosaminoglicanos, mediante la tinción de *Alcian blue*, en condrocitos transfectados y mantenidos 2 días en cultivo posterior a la transfección. Al cuantificar el depósito de colágeno por absorbancia, puede constatarse que sólo G509V promueve el depósito de colágeno y por ende la condrogénesis, un resultado esperable para la vía de Hh activa. Sin embargo, tanto PTCH1 como G509R y CTD disminuyen los depósitos de colágeno.

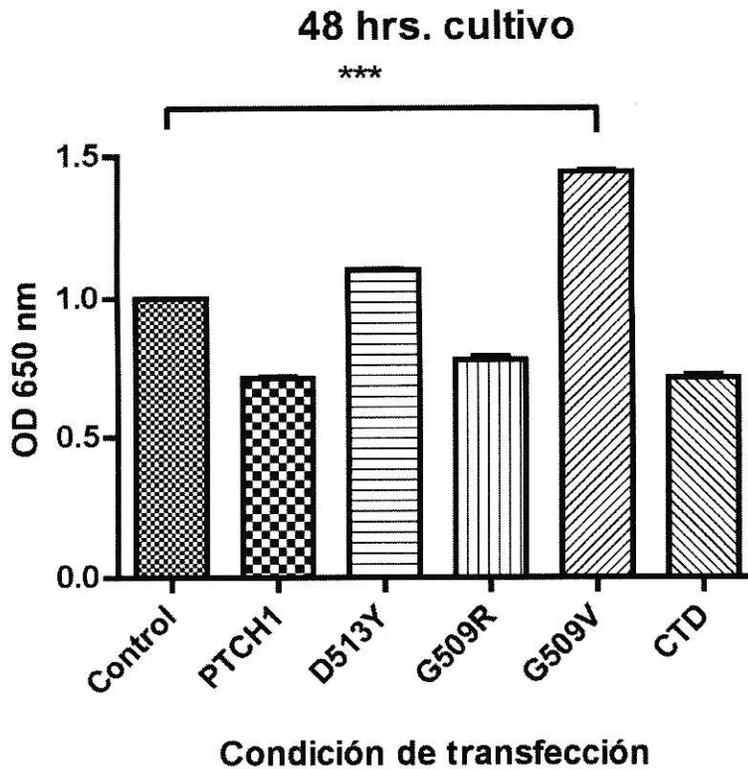


Figura 18. Sólo G509V deposita más colágeno a las 48 hrs. cultivo. Se grafica el valor de la densidad óptica (OD) del depósito de colágeno en una tinción de *Alcian Blue* sobre el control para cada condición. La barra representa 100 μm (* $p < 0.0001$).

Para poder visualizar el progreso de la diferenciación de los condrocitos en el tiempo, se observó el depósito de dos tipos de colágeno distintos. Al comienzo del cultivo, los condrocitos sintetizan y secretan como principal componente de la matriz extracelular cartilaginosa, colágeno tipo II; luego durante la maduración sintetizan y secretan colágeno tipo IX. No se aprecia en los cultivos transfectados con las versiones PTCH1 silvestre o mutado alguna diferencia en la expresión de colágeno II a los 2 días de cultivo al comparar con su control

(Figura 18). Sin embargo, el mismo cultivo secreta mucho más colágeno IX con las variantes de PTCH1 al comparar con la versión silvestre y el control pGL, sugiriendo una diferenciación prematura de estas células (Figura 19).

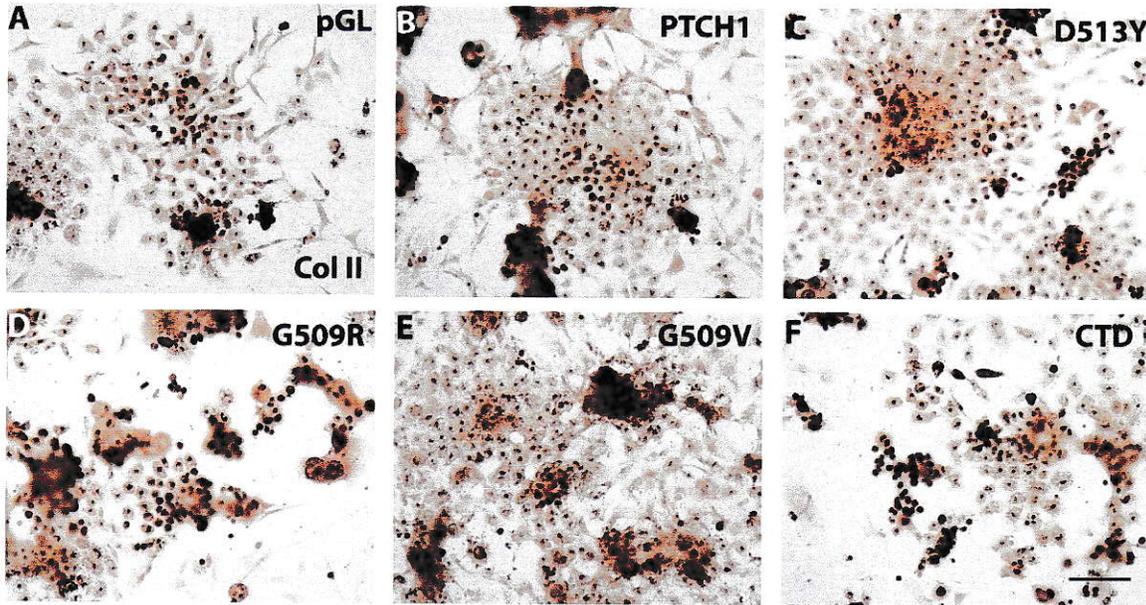


Figura 19. Los condrocitos transfectados depositan colágeno tipo II. Cultivos mantenidos 48 hrs. post-transfección depositan normalmente colágeno II revelado en una IHC. Control pGL (A), PTCH1 (B), D513Y (C), G509R (D), G509V (E), CTD (F). La barra representa 100 μ m.

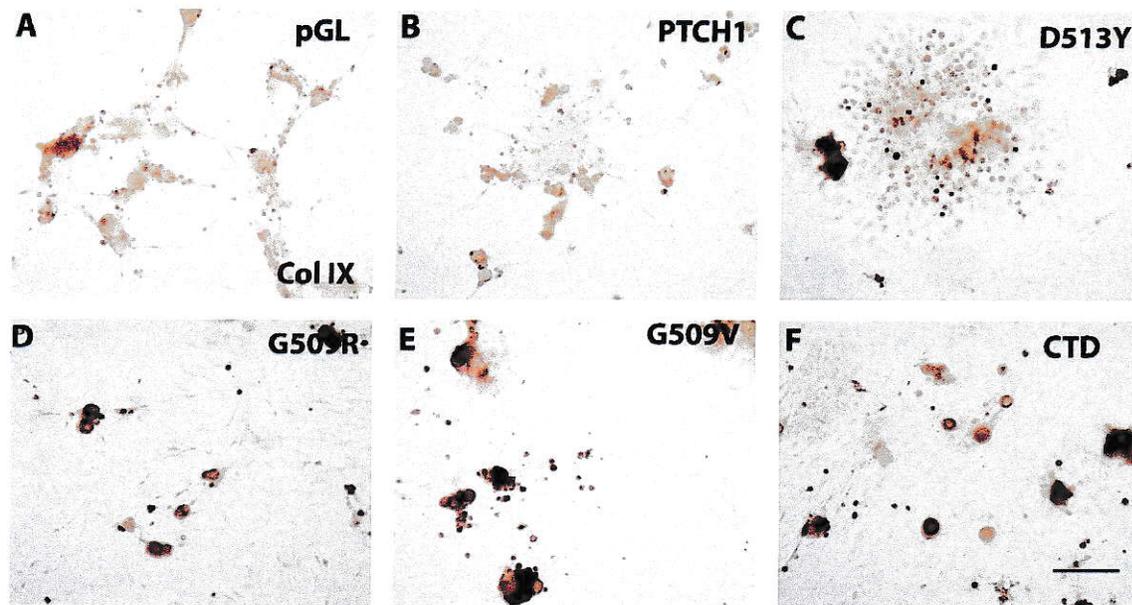


Figura 20. El depósito de colágeno IX se adelanta en los condrocitos transfectados con las variantes de PTCH1. Cultivos de condrocitos mantenidos 48 horas post-transfección con las mutaciones de PTCH1 ya depositan colágeno tipo IX, revelado a través de una IHC, en cambio ni los controles ni los transfectados con PTCH1 silvestre lo hacen. Control pGL (A), PTCH1 (B), D513Y (C), G509R (D), G509V (E), CTD (F). La barra representa 100 μ m.

Por esta razón, se decidió analizar el depósito de calcio en la matriz extracelular a los 7 días de cultivo post-transfección (figura 20). PTCH1 presenta más depósitos de calcio, revelado mediante la tinción con Rojo Alizarina, que el control lo que sugiere una aceleración en la diferenciación osteogénica. Así mismo, D513Y, G509R y G509V también promueven esta diferenciación osteogénica, lo que concuerda con el resultado anterior en que la secreción de colágeno tipo IX se adelantaba en el tiempo a los controles, sugiriendo que tanto PTCH1 como sus variantes fuerzan el sistema hacia la diferenciación osteogénica al desequilibrar un fino balance (véase Discusión para un análisis

más detallado de estos resultados). Sin embargo, la mutación CTD no produce un aumento del depósito de calcio pese a que se trata de una mutación del tipo dominante negativo y que es capaz de unir a Shh pero no de inhibir la vía (Johnson et al, 2000; Zheng et al., 2010).

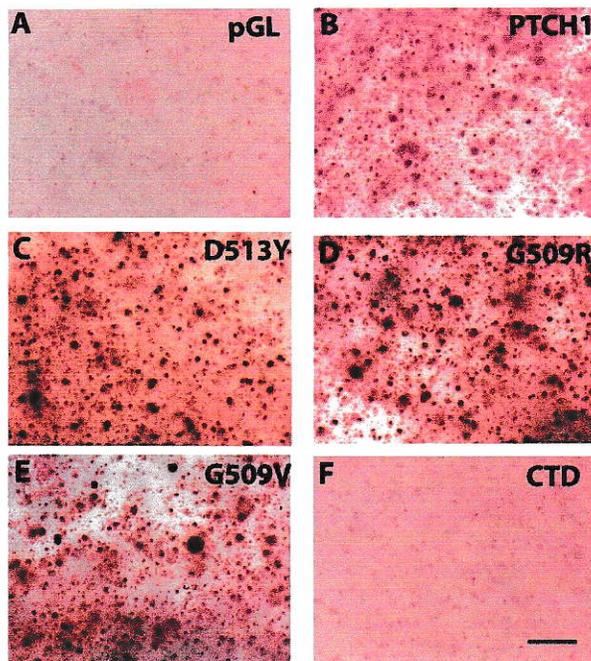


Figura 21. Las mutaciones de PTCH1 depositan más calcio excepto CTD. Tinción de Rojo Alizarina en condrocitos cultivados 7 días post-transfección. La barra representa 100 μ m.

SOBREEXPRESIÓN DE PTCH1 *IN VIVO*.

La electroporación *in ovo* de embriones de pollo ha llegado a ser una técnica valiosa para el análisis de la sobreexpresión de proteínas, especialmente aquellas involucradas en la regulación del desarrollo del tubo neural (Itasaki et al., 1999; Nakamura et al., 2004).

El tubo neural del embrión de pollo es un modelo experimental muy bien caracterizado en cuanto a la diferenciación y la proliferación celular en el SNC (Politis et al., 2008; García-López et al., 2009), en donde ha sido ampliamente descrita la acción de Shh como morfógeno, como así mismo su papel mitogénico (Ribes y Briscoe, 2009). Por estas razones, se escogió ensayar los constructos mediante electroporación en el tubo neural. El estadio escogido fue entre HH10 y HH12, cuando la especificación de territorios en el tubo neural ya se ha establecido y se analizan los resultados 48 horas post-electroporación, cuando la apoptosis en el tubo neural ha terminado (Hirata y Hall., 2000).

Plásmido	24 horas	48 horas
pGL o IRES-GFP	08/08	07/08
c-Shh	07/07	07/07
PTCH1	25/25	24/25
D513Y	23/25	18/25
G509R	25/25	24/25
G509V	27/27	24/27
CTD	21/22	20/22

Tabla 1: Sobrevida de embriones de pollo electroporados con diversos constructos. Se muestra el número de embriones vivos a las 24 y a las 48

horas después de la electroporación sobre el número total de embriones tratados.

La tabla 1 muestra la sobrevivencia de los embriones electroporados con los diversos constructos a las 24 horas y a las 48 horas posteriores a la electroporación. Es interesante notar que para D513Y la sobrevivencia de 48 horas post-electroporación es más baja que para cualquier otro constructo, con casi un 25% de los embriones electroporados muertos. Para eliminar la posibilidad de que algún error en la síntesis y aislamiento de estos constructos fueran la causa de la muerte, se realizaron electroporaciones con tres partidas distintas de DNA y en todas ellas se encontró la misma viabilidad. La tabla 1 muestra la suma total de las electroporaciones que en el caso de D513Y se realizaron con tres lotes distintos y en los demás con dos.

La electroporación no afecta la estructura del tubo neural.

La técnica de la electroporación ya está validada como herramienta experimental (para una revisión, véase De Vry et al., 2010), siendo uno de sus grandes cualidades el hecho que la situación control es el mismo tubo neural del mismo ejemplar electroporado, por lo que se minimizan las variaciones.

La presencia de fluorescencia verde, producto de la expresión de GFP, demuestra que la electroporación, en cuanto a metodología, es exitosa en nuestras manos (figura 21).

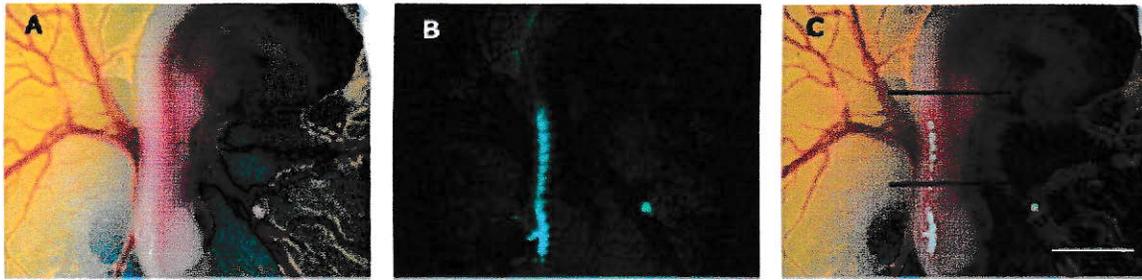


Figura 22. La expresión de GFP comprueba una adecuada electroporación. Embrión de pollo HH19 electroporado en HH11. Imagen de embrión bajo la lupa (A). La marca fluorescente debido a GFP que muestra una electroporación exitosa en el tubo neural (B). Composición de ambas imágenes (C). Las líneas negras muestran la zona de estudio del tubo neural electroporado. La barra representa 2,5 mm.

Es importante hacer notar que la electroporación no afecta la arquitectura del tubo neural (figura 22) ni la sobrevivencia de los embriones como se muestra en cortes de criostato obtenidos a partir de embriones en aproximadamente HH21.

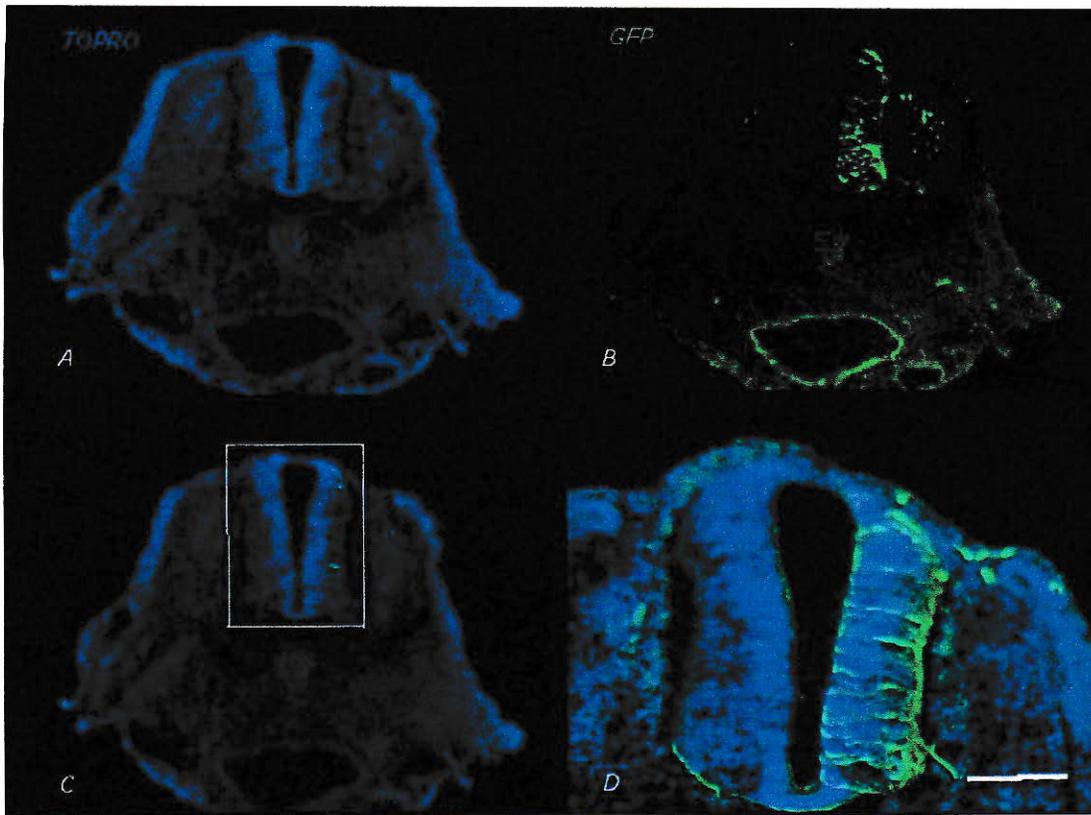


Figura 23. La electroporación no parece afectar la arquitectura del tubo neural. Cortes representativos de embriones electroporados con un plásmido que sólo expresa GFP muestran un tubo neural de apariencia normal. Tinción TOPRO-3 revela los núcleos de las células (A) e IF contra GFP, que muestra el lado electroporado (B) vistas a bajo aumento. Composición de ambas (C). El recuadro indicado en C se muestra con mayor aumento (D). La barra representa 200 μ m en A-C y 80 μ m en D.

La proliferación está aumentada en los embriones electroporados con las variantes de PTCH1.

Las cuatro mutaciones de PTCH1 analizadas, provienen de pacientes que padecían de cáncer a la piel, donde la proliferación está aumentada. Sin embargo, debido a la alta tasa de proliferación que se presenta en el tubo neural durante la etapa de desarrollo ensayada, era posible no encontrar diferencias

significativas ya que un alto porcentaje de células son positivas para la marca de PCNA (antígeno nuclear para células en proliferación, una ciclina producida durante las fases G1 y S del ciclo celular) (Dubreuil et al., 2000). También se descartó el uso de BrdU ya que en experimentos controles prácticamente todas las células se marcaban positivamente con pulsos de una hora o más (datos no mostrados). Pulsos breves (Cayuso et al., 2006) pueden causar diferencias importantes entre las muestras analizadas dado el tiempo que puede demorarse en manipularlas antes de fijar.

La fosforilación en el residuo serina 10 de histona H3 es crucial para la condensación de la cromatina y la progresión del ciclo celular durante la mitosis en células eucariontes. Durante la mitosis la fosforilación de esta histona se extiende a través del genoma durante la transición de la fase G2-M (Nowak y Corces, 2004). De este modo, se podría determinar la proliferación a nivel de las células del tubo neural que se encuentran en este paso específico del ciclo celular.

La figura 23 muestra el número de células en mitosis en la zona ventricular del tubo neural. Tal como se esperaba, todas las variantes de PTCH1 aumentan la proliferación a las 48 hrs. postelectroporación. Este resultado contrasta con lo reportado que ocurre al transfectar con la versión silvestre de PTCH1 (dato no mostrado), el que tiene un efecto represor sobre la vía de señalización de Shh y por ende, una disminución en la tasa proliferativa (Milenkovic et al., 1999).

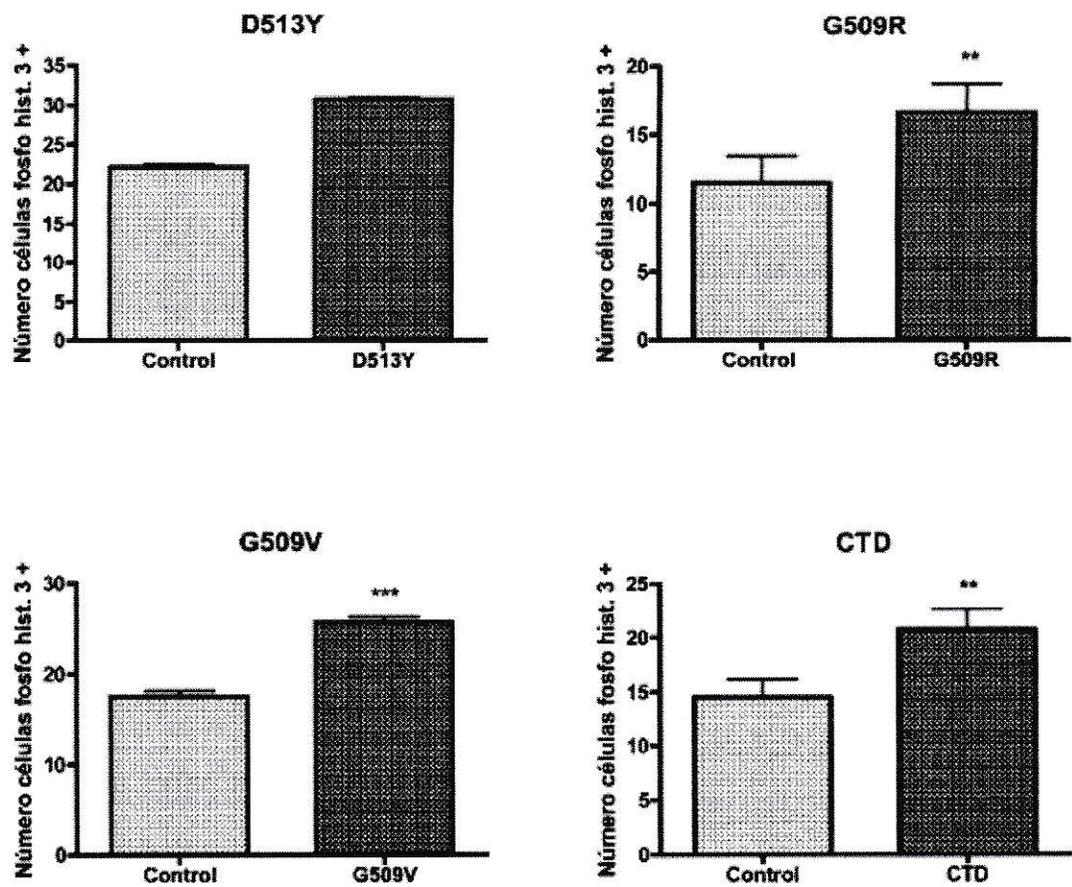


Figura 24. La proliferación aumenta en el tubo neural en el lado electroporado con las versiones mutantes de PTCH1. Los gráficos muestran el número de células marcadas positivas contra fosfo histona 3. En todos los casos hubo un aumento estadísticamente significativo de las células en mitosis en el lado electroporado comparado con el lado control del tubo neural (** $p < 0.001$; *** $p < 0.0001$).

Las mutaciones de PTCH1 aumentan la apoptosis en el tubo neural.

Durante el análisis de los embriones electroporados, se encontró que todos tenían una pérdida considerable de tejido en el lado electroporado, lo que dificultó la interpretación de los resultados. Por esta razón y sumado al hecho que PTCH1 actúa como un factor de dependencia, se cuantificó la presencia de

células apoptóticas mediante un ensayo de TUNEL. La figura 24 resume los resultados obtenidos. En las variantes electroporadas de PTCH1, G509R, G509V, CTD y el silvestre, se observa un aumento en las células apoptóticas (figura 24), en cambio, los embriones electroporados con c-Shh no muestran mayor muerte. Es interesante notar que la variante D513Y no muestra diferencias significativas con el control, presumiblemente debido a que a las 48 horas post-electroporación un cuarto de los embriones han muerto y estamos analizando solamente los embriones sobrevivientes (tabla 1). Los gráficos corresponden a un experimento representativo, pero como el número de células TUNEL positivas es muy bajo, se graficó el total experimental normalizando los resultados adjudicando un valor de 1 al número de células positivas en el lado control del tubo neural (figura 25). Esto nos permite visualizar un aumento de casi 5 veces en la apoptosis en el tubo neural al electroporar PTCH1 silvestre, y que salvo D513Y, las otras variantes de PTCH1 también aumentan el número de células apoptóticas.

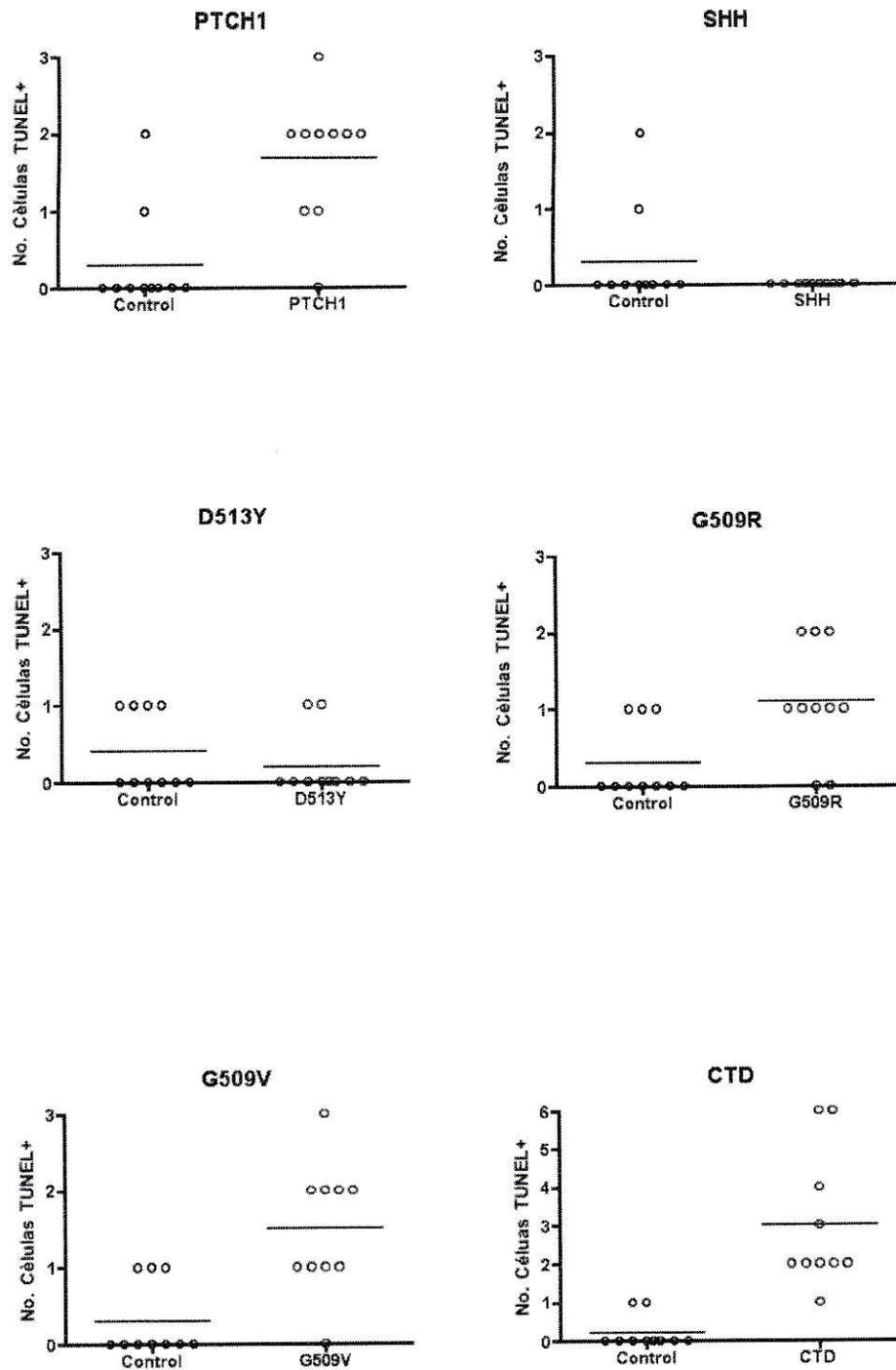


Figura 25. Apoptosis en el tubo neural de embriones electroporados. Cada gráfico muestra un experimento representativo donde se cuenta el número de células TUNEL positivas en cada uno de 10 cortes seriados de un embrión electroporado. En todos los casos se observa un número mayor de células

TUNEL positivas, según se indica, en el lado electroporado respecto al lado control, salvo para los embriones electroporados con D513Y donde no hay diferencias ni tampoco en los embriones electroporados con cShh donde sencillamente no se observan células apoptóticas.

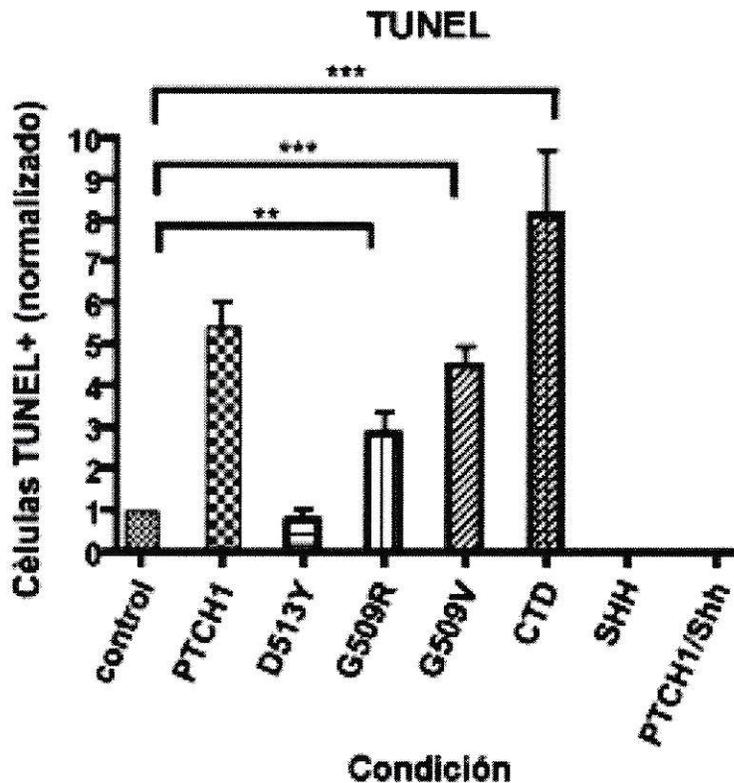


Figura 26. Apoptosis en el tubo neural de embriones electroporados. El gráfico muestra el número de veces que aumenta la apoptosis en el lado electroporado del tubo neural de pollo respecto a su lado control. D513Y no aumenta la apoptosis, en cambio PTCH1 silvestre y sus demás variantes sí lo hacen. cShh no induce la apoptosis y también es capaz de rescatar el fenotipo cuando es co-electroporado con PTCH1, mostrándolo como factor de dependencia de Shh. El gráfico resume al menos tres experimentos distintos con un mínimo de tres embriones por condición (** $p < 0.001$; *** $p < 0.0001$).

A modo de resumen de los resultados presentados se muestra la tabla 2 que indica el efecto de la sobreexpresión de PTCH1 y de sus variantes en los tres modelos experimentales ensayados. Se desglosa además dependiendo del proceso celular analizado.

	PTCH1	D513Y	G509R	G509V	CTD
10T1/2					
Proliferación	+	-	-	-	-
Apoptosis	+	+	-	++	++
Diferenciación	+	+	-	++	+
Condrocitos					
Proliferación	+	-	-	+	-
Apoptosis	++	+	+	+	++
Diferenciación	++	++	++	++	+
Tubo Neural					
Proliferación	+	+	+	+	+
Apoptosis	++	-	+	+	++

Tabla 2. Resumen del efecto de PTCH1 y sus mutaciones sobre los tres sistemas ensayados. Para resumir su efecto, se anotó un signo (-) cuando no se observó algún resultado. El signo (+) denota un efecto moderado ya sea aumento o disminución. El signo (++) denota un marcado efecto.

DISCUSIÓN.

En el presente trabajo hemos ensayado *in vitro* e *in vivo* cuatro mutaciones distintas del receptor PTCH1 provenientes de pacientes con cáncer de piel. En tres de ellas se trata de mutaciones puntuales de sustitución, aisladas a partir de muestras de pacientes con Síndrome de Gorlin y una cuarta correspondiente a una delección de un segmento del carboxilo terminal intracelular aislada de un paciente con BCC. En esta tesis, las cuatro mutaciones del receptor fueron ensayadas por primera vez en vertebrados y comparadas con la sobreexpresión de PTCH1 en cuanto a su función en la señalización de Shh.

La sobreexpresión de PTCH1 disminuye la proliferación.

Cada uno de los modelos escogidos responde de una manera particular a la acción de Shh. Tanto la línea celular murina 10T1/2 como los cultivos primarios de condrocitos de pollo lo hacen diferenciándose a linaje osteogénico y las células del tubo neural proliferando y diferenciándose hacia un linaje neurogénico.

Un primer resultado de este trabajo es que encontramos en los tres sistemas ensayados que la sobreexpresión de PTCH1 disminuye la proliferación. Tanto la línea celular 10T1/2 como los condrocitos son de origen mesenquimático y expresan el receptor Ptc1 y los demás componentes de la vía de señalización de Shh (Ingram et al, 2002; Iwamoto et al, 1999; Park et al, 2010). Dado que el cultivo primario de condrocitos de pollo fue crecido en un medio osteogénico, permite comparar la respuesta con la de las células 10T1/2 murinas que

normalmente se diferencian hacia un linaje osteogénico en presencia de Shh. En ambos casos encontramos que la sobreexpresión de PTCH1 disminuye la proliferación celular basal del cultivo.

El modelo de estudio del tubo neural del embrión de pollo, un derivado ectodérmico –al igual que la piel- nos permite ensayar *in vivo* en células originarias de la misma capa germinal estas mutaciones humanas. Se ha demostrado que Ptc1 determina el tamaño del cuerpo en general y del tubo neural en particular (Milenkovic et al, 1999; Thibert et al, 2003). En el caso de la piel, se ha demostrado en ratones que Ptc1 juega un papel central en limitar el tamaño del compartimento de células troncales/progenitoras y permitir la diferenciación en el linaje del folículo piloso, actuando como un regulador negativo (Villani et al, 2010).

Varios de los genes blancos de la vía de señalización de Shh parecen ser contexto y tejido dependientes. Sin embargo, los genes que controlan y promueven el ciclo celular se activan con Shh (Duman-Scheel et al, 2002) y la pérdida de función de Ptc1 en la piel deviene en BCC promoviendo la progresión del ciclo celular (Adolphe et al, 2006). Además, PTCH1 no sólo estaría actuando en el modo de la vía canónica de señalización de HH (Jenkins, 2009), sino que también de un modo no canónico uniéndose directamente con la Ciclina B1 previniendo su translocación al núcleo e inhibiendo la progresión del ciclo celular (Barnes et al, 2001). Es importante señalar que los experimentos fueron realizados sin agregar Shh exógeno por lo que se presume que el Shh endógeno presente en el cultivo o en el tubo neural en desarrollo, solo se une a

una fracción de PTCH1 presente en la membrana. PTCH1 está producido en exceso, lo que resulta entonces en un exceso de PTCH1 en la membrana y en una disminución de la proliferación.

La sobreexpresión de PTCH1 induce apoptosis.

En todos los modelos ensayados aquí, PTCH1 induce apoptosis. Esto está en línea con los resultados descritos en la literatura y que han llevado a calificar a PTCH1 como un receptor de Dependencia (Thibert et al., 2003; Goldschneider y Mehlen, 2010). En estos trabajos, todos del mismo grupo, se mostró esta cualidad en dos líneas celulares, HEK 293T y 13.S.24 (neuroblastos inmortalizados) y en el tubo neural del embrión de pollo (Thibert et al., 2003). Nosotros hemos comprobado que PTCH1 actúa como inductor de apoptosis en el tubo neural del embrión de pollo, pero además hemos obtenido resultados similares en el linaje mesodérmico, en una línea celular reportera de Hh y en cultivos primarios de condrocitos. Por tanto, no solo logramos validar los resultados anteriores sino también proponer generalizar el papel de PTCH1 como Receptor de Dependencia en vertebrados.

La sobreexpresión de las mutaciones de PTCH1 no siempre aumentan la proliferación.

Las variantes de PTCH1 se comportaron de distintas maneras en los modelos ensayados, lo que dificulta la interpretación y generalización de los resultados (tabla 2). En la línea celular 10T1/2 ninguna de las variantes indujo proliferación, pese a que fueron aisladas de pacientes que padecían cáncer. La explicación

más simple es que estas células responden a la señalización de Hh diferenciándose y no proliferando. Se trata de una línea celular que no es tumorigénica y que al tener un carácter multipotente, puede dar origen a diversos derivados mesodérmicos de acuerdo a las condiciones de cultivo y transformación (Pinney y Emmerson, 1989). No se trata propiamente de células troncales, que sí pueden responder proliferando y/o diferenciándose, tal como ocurre en el BCC.

En el caso del cultivo de condrocitos de pollos, sí vemos un aumento estadísticamente significativo de la proliferación, pero sólo con la variante G509V. Esta mutación ha sido previamente reportada como dominante negativo en *Drosophila*, lo que refuerza el papel conservado de la mutación G509V en vertebrados.

En el tubo neural del embrión de pollo, todas las mutaciones de PTCH1 ensayadas aumentan la proliferación siendo G509V nuevamente la que presenta el resultado más notable. En el tubo neural embrionario, se encuentran células troncales y progenitores aún en división por lo que estas mutaciones se comportan como era esperado.

El hecho que se comporten de distintas manera en los tres modelos ensayados en cuanto a la proliferación, nos lleva a proponer que la acción de Hh es contexto dependiente y que estas mutaciones no le confieren cualidades distintas a las células que no poseían antes, sino que pueden exacerbar las que ya tienen, sea proliferando o diferenciándose. En el caso del BCC, éste se

originaria de células con características de células troncales (véase más adelante) que responden a la vía de SHH proliferando (Harris et al., 2010; Li et al., 2011).

Las mutaciones de PTCH1 también inducen apoptosis.

Al sobreexpresar las mutaciones de PTCH1 hay inducción de la apoptosis en los tres sistemas ensayados. Si bien es cierto hay variaciones de uno a otro en cuanto a la intensidad o a cuales de ellas son las que tienen un mayor efecto, vemos que incluso a las 24 horas de cultivo ya hay actividad de Caspasa 3 clivada (figura 9, tabla 2).

¿Cómo compatibilizar el hecho que se trata de mutaciones de PTCH1 que producen cáncer y por ende un aumento de la proliferación y sobrevida? En el contexto celular hay una interacción entre las distintas vías de señalización que se compensan unas a otras. En experimentos de activación de la vía de Shh en células mesodérmicas murinas (comparables a los experimentos de este trabajo en 10T1/2 y en condrocitos) se ha encontrado una regulación positiva de genes ubicados río abajo de Shh vinculados a la vía Notch, a la de Wnt y a la de BMP; y una regulación negativa de algunos genes vinculados a la inhibición de la vía de BMP (*Bambi*) y *Wnt5b* (revisado en Harris et al, 2010). Este hecho muestra que podría haber una compensación por parte de otras vías.

También está el hecho que existen otros genes supresores de tumores, por ejemplo *p53*, que controla el daño en el DNA mediante detención del ciclo celular, reparación del DNA y apoptosis. Mutaciones en *p53* acompañan muchos

cáncer humanos (Vogelstein y Kinzler, 1992; Pfeifer y Bersaratinia, 2010; Zwaan y Haass, 2010). Es así que en más de la mitad de los BCC no se encuentran mutaciones de *p53* en la línea germinal de los pacientes pero sí en sus tumores (Zwaan y Haass, 2010). Si se induce experimentalmente un BCC en ratones, éste se amplifica rápidamente si se realiza posteriormente una pérdida de función de *p53* (Epstein, 2008). *p53* actúa entre otras formas, induciendo apoptosis (Suzuki y Matsubara, 2011) y se ha reportado recientemente que la apoptosis también puede inducir tumorigénesis en ciertas circunstancias, como lo es la irradiación (Labi et al, 2010; Michalak et al, 2010).

Finalmente, también se ha reportado recientemente una cooperación entre *p53* y *Gli2* que regula la apoptosis en condrocitos durante la progresión de un tumor maligno de cartílago (Ho et al, 2009), donde *p53* actuaría como un regulador positivo y *Gli2* como uno negativo de la apoptosis. También se ha propuesto una estrecha relación entre *p53* y *Gli1* en la cual *p53* inhibe la actividad de *Gli1*, mediante un circuito de retroalimentación negativa, interfiriendo con su localización normal en el núcleo y dirigiéndolo a degradación proteosomal (Stecca y Ruiz i Altaba, 2009). Por último, la actividad de *Gli1* es estimulada por la pérdida de función de *p53*; en tal caso, al cruzar un umbral en el nivel de actividad de *Gli1*, se gatilla la invasión, crecimiento y metástasis (Ruiz i Altaba, 2011).

Es importante notar que el cáncer tiene causas multifactoriales y hasta la fecha se ha podido demostrar una estrecha correlación entre *PTCH1* y cáncer a la piel, pero no una relación causal. En el caso de las mutaciones estudiadas aquí, no

contamos con la información médica acerca de si los pacientes de los cuales fueron obtenidas portaban además una mutación en p53 u otros genes, ya sea en la línea germinal o en las células cancerosas.

Por lo tanto, al sobreexpresar nuestras mutaciones en células normales, como ocurre en nuestros cultivos e *in vivo*, podría operar en ellas todos los mecanismos de compensación que incluyen la apoptosis.

PTCH1 y sus variantes promueven la diferenciación.

Tanto en la línea celular 10T1/2 como en los cultivos primarios de condrocitos, PTCH1 y sus variantes promueven la diferenciación celular hacia sus respectivos linajes.

En la línea celular esto ocurre con todas las variantes de PTCH1, salvo con G509R. Se destaca la mutación llamada G509V, dado que lo hace alcanzando valores similares a los de la sobreexpresión de Gli2, activador principal de la vía de Shh.

El cultivo primario de condrocitos está compuesto de células en proliferación y otras en proceso de diferenciación. Al comienzo de la condrogénesis, secretan colágeno tipo II; más avanzado el proceso, secretan colágeno tipo IX y luego el de tipo X (Stott y Chuong, 1997). Ya se ve un efecto con G509V en el depósito de colágeno tipo II a los dos días post-transfección y un aumento notable respecto al control en el depósito de colágeno tipo IX, más tardío. Aunque con todas las variantes el depósito de colágeno tipo II es similar, hay un aumento estadísticamente significativo respecto al control en el caso de G509V (Figura

17). El depósito de calcio pareciera ser también mayor aunque se hace necesaria una cuantificación.

La conclusión de estos experimentos es que las células están respondiendo a la regulación positiva de la vía de la manera en que habitualmente lo harían, diferenciándose. Como la vía de Hh está sobreactivada, estos procesos de diferenciación se aceleran.

Observaciones realizadas en el desarrollo de extremidades en ratones condicionales para *Ptc1*, tanto *in vivo* como en cultivos de micromasas, muestran que la pérdida temprana de función de *Ptc1* produce muerte celular y un decremento en la tinción con *Alcian Blue* de nódulos de cartílago (Bruce et al, 2010) y la sobreexpresión de Shh promueve la hipertrofia de condrocitos (Stott y Chuong, 1997). En ratones adultos, la pérdida total de función de *Ptc1* en los animales condicionales produce una mayor formación de hueso, pero éste es más poroso debido a su excesiva reabsorción. En cambio, la haploinsuficiencia de *Ptc1* produce un incremento de la masa ósea debido a una ampliación de la diferenciación osteoblástica (Ohba et al , 2008; Mak et al, 2008). Shh tendría un efecto más temprano durante la osificación e lhh actuaría a continuación, sin embargo, ambos utilizan el mismo receptor, Ptc1 (Enomoto-Iwamoto et al, 2000). La contribución de la vía de Shh a la condrogénesis pareciera ser el establecimiento de un fino balance entre señales donde Ptc1 cumpliría un papel fundamental en mantener un control estricto de los niveles de señalización (Bruce et al, 2010).

En nuestro caso, estamos sobreexpresando las mutaciones sobre un fondo que contiene aún el Ptc1 normal. Al activar la vía en los experimentos de sobreexpresión, se estará transcribiendo más *Ptc1* -debido a que es un gen blanco de la vía de señalización de Shh- por lo que tendremos como trasfondo una competencia entre el Ptc1 silvestre y el PTCH1 sobreexpresado o alguna de sus mutaciones, por lo que nuestros modelos todavía pueden compensar la mutación mediante la actividad normal de su propio Ptc1.

Lamentablemente, el embrión de pollo no resultó apto para el estudio de la expresión génica durante la sobreexpresión de las mutaciones de PTCH1 en el tubo neural en desarrollo. Esto habría sido ideal pues tendríamos a PTCH1 y sus mutaciones actuando en el contexto de todas las señalizaciones *in vivo*.

D513Y y CTD se comportan de distintas maneras.

D513Y fue descrita por primera vez en 1997 como una mutación esporádica en un rastreo masivo de mutaciones de PTCH1 en 71 pacientes que presentaban NBCCs (Wicking et al, 1997). En el contexto en que fue hallada esta mutación, más del 86% de las descritas correspondían a proteínas truncadas y ésta aparecía como una rara mutación puntual. Sin embargo, al ensayarla en *Drososphila* no fue capaz de conferir una actividad como un dominante negativo sobre Ptc1 y sólo era capaz de producir un fenotipo intermedio en el cual no había activación ectópica de la vía y escaso efecto en la expresión de genes blancos tales como *dpp* o el mismo *Ptc1* (Hime et al., 2004). Algo parecido encontramos en los resultados expuestos acá. D513Y no ha sido descrita en

otros rastreos masivos efectuados hasta la fecha, por lo que podría tratarse de una mutación excepcional y de baja penetrancia.

D513Y y CTD tienen el comportamiento más disímil en los tres sistemas ensayados. D513Y induce apoptosis en la línea celular a las 48 hrs. de cultivo en un porcentaje similar a PTCH1, pero ésta no puede ser rescatada por la adición de Shh exógeno. En los cultivos primarios de condrocitos la apoptosis está aumentada al doble que en los controles, y en los embriones de pollo electroporados hay una baja sobrevivencia, aunque los sobrevivientes no muestran mayores diferencias con los controles respecto de la muerte celular. Pareciera que de las mutaciones probadas, D513Y fuera la que menos efecto produjera o que los sistemas pudieran compensar mejor (Tabla 2).

En relación a los resultados obtenidos con CTD, es importante hacer notar que la inducción de transcripción de PTCH1 endógeno es crítica para secuestrar a Shh y limitar su rango de señalización mediante una retroalimentación negativa. Se ha demostrado que CTD es una proteína que aún es capaz de unir a Shh, pero no de inhibir la vía (Johnson et al, 2000; Zheng et al., 2010). Otras deleciones que truncan toda la región intracelular del carboxilo terminal, como es la llamada 1130X, actúan como dominante negativo estabilizando a Smo y activando la vía (Johnson et al, 2000; Hime et al, 2004). Otras investigaciones han demostrado que a pesar de que el tallo intracelular del carboxilo terminal regula tanto la localización como el recambio de Ptc1 en *Drosophila* y en ratón, la deleción de CTD es enteramente funcional (Lu et al, 2006,). CTD es una mutación donde se han perdido los últimos 220 aminoácidos del carboxilo

terminal y no posee el dominio proapoptótico. Sin embargo, en nuestros experimentos la inducción de apoptosis por CTD fue alta en las células 10T1/2, en los cultivos primarios de condrocitos y notablemente alta en el tubo neural de los embriones electroporados de pollo. Esta apoptosis inducida por CTD no podía ser rescatada por Shh exógeno, por lo que esta inducción debe ser necesariamente distinta a la propuesta para el PTCH1 silvestre. Alternativamente, dado que CTD aún mantiene una cola intracelular del carboxilo terminal de aproximadamente 120 aminoácidos, esta región podría tener alguna función fisiológica aún no descrita o podría exponer grupos que sean sensibles a clivaje por caspasa. Recientes trabajos muestran que PTCH1, sobreexpresado en células HeLa es susceptible de clivaje proteolítico en la región del carboxilo terminal, lo que resulta en la producción de un fragmento soluble que se acumula en el núcleo. Mientras tanto, toda la región del amino terminal se mantiene en la membrana de vesículas (Kagawa et al, 2011). Aunque los autores muestran que el fragmento del carboxilo terminal escindido se trasloca al núcleo y suprime parcialmente la actividad transcripcional de Gli1, aún no está claro su papel fisiológico. Como CTD es funcional, podemos suponer que aún cuando sufra el procesamiento proteolítico de su carboxilo terminal, generará un fragmento de menor tamaño (unos 120 aminoácidos) que no sería capaz de reprimir la vía, lo que explicaría una vía continuamente encendida y por lo tanto cáncer; y que incluso este fragmento sea suficiente además para desencadenar una respuesta celular de apoptosis. Por añadidura, podemos comprender mejor la acción de la mutación X1130, en la cual

sencillamente no existe el último dominio intracelular del carboxilo terminal y por lo tanto ningún fragmento se trasloca al núcleo ni tampoco entrega ninguna señal proapoptotica que explicaría su papel de dominante negativo en extremo, que las células no mueran y que provoque cáncer.

G509R y G509V: El mismo aminoácido sustituido pero distintos efectos.

Ambas mutaciones de sustitución han cambiado la Glicina de la posición 509, dentro del cuarto dominio transmembrana, por una Arginina (G509R) o por una Valina (G509V). Arginina es un aminoácido polar que podría desestabilizar una estructura que se encuentra inserta en la membrana plasmática; en cambio Valina es apolar, mucho más parecido a la Glicina original en sus características, lo que podría dar una simple explicación de la diferencia en la acción de ambas mutaciones. Fueron descritas por primera vez en un rastreo masivo en distintas poblaciones (Chidambaram et al, 1996). G509V se encontró en el primer afectado de la familia y en un hermano, ambos con BCC; en cambio G509R fue hallado en un afectado y en otro miembro de la familia no afectado, lo que nos da luces acerca del grado de dominancia de la mutación. G509V ha sido descrito posteriormente en otras búsquedas masivas en individuos con NBCCs en poblaciones japonesas e italianas (Fujii et al, 2003; Pastorino et al, 2005), por lo que no se trata de una mutación rara. Curiosamente, en los pacientes estudiados, ninguno presentaba la mutación en células germinales sino que sólo en las cancerosas.



En estudios de sobreexpresión en *Drosophila*, la localización intracelular de ambas mutaciones era igual que en el silvestre y parecían no alterar su distribución, por lo que se puede concluir que la cualidad de dominante negativo de G509V no es debida a una localización o tráfico aberrantes (Hime et al, 2004).

Hasta la fecha no está dilucidado el mecanismo molecular que subyace a la inhibición que ejerce Ptc1 sobre Smo. Ptc1 actúa como un represor constitutivo de Smo con una estequiometría que no es 1:1 sino que 1:250 implicando un mecanismo catalítico de la inhibición más complejo, el cual se ha propuesto que se ejercería a través de lípidos derivados de lipoproteínas que desestabilizan a Smo (Taipale et al., 2002; Khaluillina et al., 2009). En ausencia de Hh, Ptc1 y Smo son internalizados desde la membrana y procesados juntos en endosomas; la adición de Hh al medio, produce la segregación de Ptc1 de Smo y consecuentemente la localización de un Smo activado en la membrana, con lo que se da inicio a la cascada de señalización (Piddini y Vicent, 2003; Teglund y Toftgard, 2010; Schulte, 2010).

En los estudios de estas mutaciones efectuados en *Drosophila* (Hime et al, 2004), se encontró que la localización intracelular de todas ellas era similar al Ptc silvestre, pero que sólo G509V era capaz de promover la estabilización de Smo en todos los compartimentos donde fue sobreexpresada.

G509V entonces se comportaría como si fuera un Ptc silvestre unido a Shh, capaz de migrar de la membrana hacia el citoplasma y liberar la represión a

Smo. Esto podría demostrarse uniendo a G509V algún etiquetado molecular (por ejemplo *His tag* o *Flag tag*) de tal modo que podamos determinar su localización celular; al mismo tiempo, puede determinarse la localización de Smo en el cilio.

En base a los resultados mostrados en esta tesis, G509R parece no tener ningún efecto sobre la línea celular. En efecto, no favorece la diferenciación de ella, pero tampoco induce proliferación ni muerte celular. En el cultivo primario de condrocitos, tiene un modesto incremento en la apoptosis y no difiere de los demás en cuanto a la diferenciación de condrocitos. En el tubo neural del embrión de pollo, favorece la proliferación tanto como las otras y no se destaca por la inducción de apoptosis.

En cambio, G509V tiene un efecto constante y destacable en los tres sistemas ensayados. En todos ellos estimula la proliferación, también la apoptosis y la diferenciación en las 10T1/2 y en los condrocitos. En un dominante negativo, el producto del gen defectuoso interfiere con la actividad del producto del alelo normal; en el caso de la vía de Shh, ésta se encuentra constantemente apagada en ausencia de Shh mediante la represión que ejerce Ptc1 sobre Smo. En el caso de nuestras mutaciones, ellas no son capaces de reprimir a Smo, por lo que su consecuencia es activar la vía de señalización. De esta forma, la acción de un dominante negativo en esta vía es mediante su activación y no su inhibición. Si añadimos lo que se ha comentado anteriormente de la acción de G509V en *Drososphila*, vemos que de todas las mutaciones estudiadas aquí es la única que se comporta cabalmente como un dominante negativo de la vía de señalización de Shh.

PTCH1 y G509V como Receptores de Dependencia.

Curiosamente, G509V se comporta en los ensayos con las células 10T1/2 como un receptor de dependencia. El Shh exógeno agregado a los cultivos rescata la apoptosis inducida por PTCH1, tal como era esperable que lo hiciera, pero también lo hace con la inducida por G509V.

Está demostrado que PTCH1 actúa como Receptor de Dependencia (Thibert et al, 2003) y en este trabajo hemos ampliado el rango de modelos en los que esto ocurre. Sin embargo, no en todos los sistemas ocurre de esta forma. Es así que en la retina del pez zebra, no es Ptc1 el que induce apoptosis en ausencia de Shh, sino que p53 es el que lo hace (Prykhozhiy, 2010). Sin embargo, por la estrecha relación entre Gli1/Gli2 y p53, ésta línea de experimentación merece ser más estudiada.

La concentración de Shh en el medio de cultivo en los experimentos de rescate (3,3 $\mu\text{g/ml}$), es suficientemente alta como para disponer de todo el Shh necesario para el PTCH1 sobreexpresado o el de sus mutaciones (Thibert, 2003). En esta situación experimental también se rescata la apoptosis inducida por G509V, pero no la de las otras mutaciones. El resultado esperado era que Shh no tuviera algún efecto ya que estamos en presencia de mutaciones que simulan una vía activa y variante de PTCH1 que no son funcionales en la inhibición de SMO. Esto abre una puerta hacia otras investigaciones al respecto que permitan en primer lugar dilucidar si efectivamente estamos en presencia de dos mecanismos de acción distintos, que serían el de la vía canónica que se

manifiesta en proliferación y/o diferenciación y el de una vía no canónica que se manifestaría en muerte celular vs. sobrevivida y en segundo lugar que permitan conciliar la observación de G509V con su responsabilidad en cáncer.

Perspectivas.

Esta tesis ha permitido comprobar el papel de PTCH1 como Receptor de Dependencia y generalizar su acción al estudiarlo en diversos modelos. Aunque se ha ido asimilando con cautela este cambio de paradigma, este nuevo papel de PTCH1 nos permite profundizar la comprensión de la participación de SHH en el desarrollo embrionario y en el cáncer.

A PTCH1 se le han atribuido varias funciones que amplían su función como receptor del ligando SHH que inhibe la acción de SMO. Estas nuevas funciones de Receptor de Dependencia, de regulador del ciclo celular y de inhibir a SMO deben ser investigadas en más detalle dentro del contexto de otras vías de señalización. Los cultivos primarios de condrocitos de embrión de pollo aparecen como un muy buen modelo para investigar estas funciones en relación principalmente a la vía de BMP y con esta tesis hemos podido implementar satisfactoriamente su cultivo. Una interesante perspectiva se abre para el cultivo de los condrocitos en tres dimensiones en geles de colágeno tipo 1, donde las primeras aproximaciones han sido exitosas.

También hemos podido generalizar el papel de la mutación G509V como un dominante negativo, no sólo en *Drosophila* sino que también en vertebrados. Quedan aún abiertas preguntas acerca del papel de G509V en cáncer y dilucidar su cualidad de Receptor de Dependencia.

REFERENCIAS.

- Adolphe, C., Hetherington, R., Ellis, T., and Wainwright, B. (2006). Patched1 functions as a gatekeeper by promoting cell cycle progression. *Cancer Res.*, 66, 2081-2088.
- Adolphe, C., Narang, M., Ellis, T., Wicking, C., Kaur, P., and Wainwright, B. (2004). An in vivo comparative study of sonic, desert and Indian hedgehog reveals that hedgehog pathway activity regulates epidermal stem cell homeostasis. *Development* 131, 5009-5019.
- Alinger, B., Kiesslich, T., Datz, C., Aberger, F., Strasser, F., Berr, F., Dietze, O., Kaserer, K., and Hauser-Kronberger, C. (2009). Hedgehog signaling is involved in differentiation of normal colonic tissue rather than in tumor proliferation. *Virchows Arch.*, 454, 369-379.
- Barnes, E. A., Kong, M., Ollendorff, V., and Donoghue, D. J. (2001). Patched1 interacts with cyclin B1 to regulate cell cycle progression. *EMBO J.*, 20, 2214-2223.
- Besaratinia, A. and Pfeifer, G. P. (2010). Applications of the human p53 knock-in (Hupki) mouse model for human carcinogen testing. *FASEB J.*, 24, 2612-2619.
- Blackburn, E. H. (2011). Cancer interception. *Cancer Prev Res (Phila)*, 4, 787-792.
- Bruce, S. J., Butterfield, N. C., Metzis, V., Town, L., McGlenn, E., and Wicking, C. (2010). Inactivation of Patched1 in the mouse limb has novel inhibitory effects on the chondrogenic program. *J. Biol. Chem.*, 285, 27967-27981.
- Cayuso, J., Ulloa, F., Cox, B., Briscoe, J., and Martí, E. (2006). The Sonic hedgehog pathway independently controls the patterning, proliferation and survival of neuroepithelial cells by regulating Gli activity. *Development* 133, 517-528.
- Chiang, C., Swan, R. Z., Grachtchouk, M., Bolinger, M., Litingtung, Y., Robertson, E. K., Cooper, M. K., Gaffield, W., Westphal, H., Beachy, P. A., et al. (1999). Essential role for Sonic hedgehog during hair follicle morphogenesis. *Dev. Biol.*, 205, 1-9.
- Dahmane, N., Sánchez, P., Gitton, Y., Palma, V., Sun, T., Beyna, M., Weiner, H., and Ruiz i Altaba, A. (2001). The Sonic Hedgehog-Gli pathway regulates dorsal brain growth and tumorigenesis. *Development*, 128, 5201-5212.
- Dessaud, E., McMahon, A. P., and Briscoe, J. (2008). Pattern formation in the vertebrate neural tube: a sonic hedgehog morphogen-regulated transcriptional network. *Development* 135, 2489-2503.

- Donovan, J. (2009). Review of the hair follicle origin hypothesis for basal cell carcinoma. *Dermatol. Surg.* 35, 1311-1323.
- Dubreuil, V., Hirsch, M. R., Pattyn, A., Brunet, J. F., and Goidis, C. (2000). The Phox2b transcription factor coordinately regulates neuronal cell cycle exit and identity. *Development* 127, 5191-5201.
- Duman-Scheel, M., Weng, L., Xin, S., and Du, W. (2002). Hedgehog regulates cell growth and proliferation by inducing Cyclin D and Cyclin E. *Nature* 417, 299-304.
- De Vry, J., Martínez-Martínez, P., Losen, M., Temel, Y., Steckler, T., Steinbusch, H. W. M., De Baets, M. H., and Prickaerts, J. (2010). In vivo electroporation of the central nervous system: a non-viral approach for targeted gene delivery. *Prog. Neurobiol.*, 92, 227-244.
- de Zwaan, S. E. and Haass, N. K. (2010). Genetics of basal cell carcinoma. *Australas. J. Dermatol.*, 51, 81-92; quiz 93-94.
- Enomoto-Iwamoto, M., Nakamura, T., Aikawa, T., Higuchi, Y., Yuasa, T., Yamaguchi, A., Nohno, T., Noji, S., Matsuya, T., Kurisu, K., et al. (2000). Hedgehog proteins stimulate chondrogenic cell differentiation and cartilage formation. *J. Bone Miner. Res.*, 15, 1659-1668.
- Epstein, E. H. (2008). Basal cell carcinomas: attack of the hedgehog. *Nat. Rev. Cancer*, 8 743-754.
- Feijóo, C. G., Oñate, M. G., Milla, L. A., and Palma, V. A. (2011). Sonic hedgehog (Shh)-Gli signaling controls neural progenitor cell division in the developing tectum in zebrafish. *Eur. J. Neurosci.*, 33, 589-598.
- Frank-Kamenetsky, M., Zhang, X. M., Bottega, S., Guicherit, O., Wichterle, H., Dudek, H., Bumcrot, D., Wang, F. Y., Jones, S., Shulok, J., et al. (2002). Small-molecule modulators of Hedgehog signaling: identification and characterization of Smoothed agonists and antagonists. *J. Biol.*, 1, 10.
- Fujii, K., Kohno, Y., Sugita, K., Nakamura, M., Moroi, Y., Urabe, K., Furue, M., Yamada, M., and Miyashita, T. (2003). Mutations in the human homologue of *Drosophila* patched in Japanese nevoid basal cell carcinoma syndrome patients. *Hum. Mutat.*, 21, 451-452.
- Garcia-Lopez, R., Pombero, A., and Martinez, S. (2009). Fate map of the chick embryo neural tube. *Dev. Growth Differ.* 51, 145-165.
- Goetz, S. C., Ocbina, P. J. R., and Anderson, K. V. (2009). The primary cilium as a Hedgehog signal transduction machine. *Methods Cell Biol.*, 94, 199-222.
- Goldschneider, D. and Mehlen, P. (2010). Dependence receptors: a new paradigm in cell signaling and cancer therapy. *Oncogene* 29, 1865-1882.

- Goodrich, L. V., Milenković, L., Higgins, K. M., and Scott, M. P. (1997). Altered neural cell fates and medulloblastoma in mouse patched mutants. *Science* 277, 1109-1113.
- Gosset, M., Berenbaum, F., Thirion, S., and Jacques, C. (2008). Primary culture and phenotyping of murine chondrocytes. *Nat Protoc*, 3, 1253-1260.
- Guo, C.-A., Liu, X.-G., Huo, J.-Z., Jiang, C., Wen, X.-J., and Chen, Z.-R. (2007). Novel gene-modified-tissue engineering of cartilage using stable transforming growth factor-beta1-transfected mesenchymal stem cells grown on chitosan scaffolds. *J. Biosci. Bioeng.*, 103, 547-556.
- Harris, P. J., Takebe, N., and Ivy, S. P. (2010). Molecular conversations and the development of the hair follicle and basal cell carcinoma. *Cancer Prev Res (Phila)*, 3, 1217-1221.
- Hatten, M. E. and Roussel, M. F. (2011). Development and cancer of the cerebellum. *Trends Neurosci.*, 34, 134-142.
- Hime, G. R., Lada, H., Fietz, M. J., Gillies, S., Passmore, A., Wicking, C., and Wainwright, B. J. (2004). Functional analysis in *Drosophila* indicates that the NBCCS/PTCH1 mutation G509V results in activation of smoothened through a dominant-negative mechanism. *Dev. Dyn.*, 229, 780-790.
- Hirata, M. and Hall, B. K. (2000). Temporospacial patterns of apoptosis in chick embryos during the morphogenetic period of development. *Int. J. Dev. Biol.*, 44, 757-768.
- Ho, L., Stojanovski, A., Whetstone, H., Wei, Q. X., Mau, E., Wunder, J. S., and Alman, B. (2009). Gli2 and p53 cooperate to regulate IGFBP-3-mediated chondrocyte apoptosis in the progression from benign to malignant cartilage tumors. *Cancer Cell*, 16, 126-136.
- Ihrie, R. A., Shah, J. K., Harwell, C. C., Levine, J. H., Guinto, C. D., Lezameta, M., Kriegstein, A. R., and Alvarez-Buylla, A. (2011). Persistent sonic hedgehog signaling in adult brain determines neural stem cell positional identity. *Neuron* 71, 250-262.
- Ingram, W. J., Wicking, C. A., Grimmond, S. M., Forrest, A. R., and Wainwright, B. J. (2002). Novel genes regulated by Sonic Hedgehog in pluripotent mesenchymal cells. *Oncogene* 21, 8196-8205.
- Ishibashi, M., Saitsu, H., Komada, M., and Shiota, K. (2005). Signaling cascade coordinating growth of dorsal and ventral tissues of the vertebrate brain, with special reference to the involvement of Sonic Hedgehog signaling. *Anat Sci Int*, 80, 30-36.

- Itasaki, N., Bel-Vialar, S., and Krumlauf, R. (1999). "Shocking" developments in chick embryology: electroporation and in ovo gene expression. *Nat. Cell Biol.*, 1, E203-207.
- Iwamoto, M., Enomoto-Iwamoto, M., and Kurisu, K. (1999). Actions of hedgehog proteins on skeletal cells. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.*, 10, 477-486.
- Izzi, L., Lévesque, M., Morin, S., Laniel, D., Wilkes, B. C., Mille, F., Krauss, R. S., McMahon, A. P., Allen, B. L., and Charron, F. (2011). Boc and Gas1 each form distinct Shh receptor complexes with Ptch1 and are required for Shh-mediated cell proliferation. *Dev. Cell*, 20, 788-801.
- Jenkins, D. (2009). Hedgehog signalling: emerging evidence for non-canonical pathways. *Cell Signal*. 21, 1023-1034.
- Jessell, T M (2000). Neuronal specification in the spinal cord: inductive signals and transcriptional codes. *Nat. Rev. Genet.*, 1, 20-29.
- Johnson, R. L., Milenkovic, L., and Scott, M. P. (2000). In vivo functions of the patched protein: requirement of the C terminus for target gene inactivation but not Hedgehog sequestration. *Mol. Cell*, 6, 467-478.
- Johnson, R. L., Rothman, A. L., Xie, J, Goodrich, L. V., Bare, J. W., Bonifas, J. M., Quinn, A. G., Myers, R. M., Cox, D. R., Epstein, E. H., Jr, et al. (1996). Human homolog of patched, a candidate gene for the basal cell nevus syndrome. *Science* 272, 1668-1671.
- Kagawa, H., Shino, Y., Kobayashi, D., Demizu, S., Shimada, M., Ariga, H., and Kawahara, H. (2011). A novel signaling pathway mediated by the nuclear targeting of C-terminal fragments of mammalian Patched 1. *PLoS ONE*, 6, e18638.
- Katoh, Y. and Katoh, M. (2009). Hedgehog target genes: mechanisms of carcinogenesis induced by aberrant hedgehog signaling activation. *Curr. Mol. Med.*, 9, 873-886.
- Khaliullina, H., Panáková, D., Eugster, C., Riedel, F., Carvalho, M., and Eaton, S. (2009). Patched regulates Smoothed trafficking using lipoprotein-derived lipids. *Development* 136, 4111-4121.
- Labi, V., Erlacher, M., Krumschnabel, G., Manzl, C., Tzankov, A., Pinon, J., Egle, A., and Villunger, A. (2010). Apoptosis of leukocytes triggered by acute DNA damage promotes lymphoma formation. *Genes Dev.*, 24, 1602-1607.
- Lee, Y., Miller, H.L., Russel, H.R., Boyd, K., Curran, T., and McKinnon, P.J. (2006). Patched2 modulates tumorigenesis in patched1 heterozygous mice. *Cancer Res.* 15, 6964-6971.
- Lek, M., Dias, J. M., Marklund, U., Uhde, C. W., Kurdija, S., Lei, Q., Sussel, L., Rubenstein, J. L., Matise, M. P., Arnold, H.-H., et al. (2010). A

- homeodomain feedback circuit underlies step-function interpretation of a Shh morphogen gradient during ventral neural patterning. *Development* 137, 4051-4060.
- Lev, R. and Spicer, S. S. (1964). Specific staining of sulphate groups with Alcian Blue at low pH. *J. Histochem. Cytochem.*, 12, 309.
- Li, C., Chi, S., and Xie, Jingwu (2011). Hedgehog signaling in skin cancers. *Cell. Signal.*, 23, 1235-1243.
- Lindström, E., Shimokawa, T., Toftgård, R., and Zaphiropoulos, P. G. (2006). PTCH mutations: distribution and analyses. *Hum. Mutat.*, 27, 215-219.
- Louvi, A. and Grove, E. A. (2011). Cilia in the CNS: the quiet organelle claims center stage. *Neuron* 69, 1046-1060.
- Lu, X., Liu, S., and Kornberg, T. B. (2006). The C-terminal tail of the Hedgehog receptor Patched regulates both localization and turnover. *Genes Dev.*, 20, 2539-2551.
- Lo Muzio, L. (2008). Nevoid basal cell carcinoma syndrome (Gorlin syndrome). *Orphanet J Rare Dis*, 3, 32.
- Madry, H. and Trippel, S. B. (2000). Efficient lipid-mediated gene transfer to articular chondrocytes. *Gene Ther.* 7, 286-291.
- Mak, K. K., Bi, Y., Wan, C., Chuang, P.-T., Clemens, T., Young, M., and Yang, Y. (2008). Hedgehog signaling in mature osteoblasts regulates bone formation and resorption by controlling PTHrP and RANKL expression. *Dev. Cell*, 14, 674-688.
- Marigo, V. and Tabin, C. J. (1996). Regulation of patched by sonic hedgehog in the developing neural tube. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 93, 9346-9351.
- Merchant, A. A. and Matsui, W. (2010). Targeting Hedgehog--a cancer stem cell pathway. *Clin. Cancer Res.*, 16, 3130-3140.
- Michalak, E. M., Vandenberg, C. J., Delbridge, A. R. D., Wu, L., Scott, C. L., Adams, J. M., and Strasser, A. (2010). Apoptosis-promoted tumorigenesis: γ -irradiation-induced thymic lymphomagenesis requires Puma-driven leukocyte death. *Genes & Development*, 24, 1608 -1613.
- Milenkovic, L., Goodrich, L. V., Higgins, K. M., and Scott, M. P. (1999). Mouse patched1 controls body size determination and limb patterning. *Development* 126, 4431-4440.
- Mille, F., Thibert, C., Fombonne, J., Rama, N., Guix, C., Hayashi, H., Corset, V., Reed, J. C., and Mehlen, P. (2009). The Patched dependence receptor triggers apoptosis through a DRAL-caspase-9 complex. *Nat. Cell Biol.*, 11, 739-746.

- Ming, G.-L. and Song, H. (2011). Adult neurogenesis in the mammalian brain: significant answers and significant questions. *Neuron* 70, 687-702.
- Nakamura, H., Katahira, T., Sato, T., Watanabe, Y., and Funahashi, J.-I. (2004). Gain- and loss-of-function in chick embryos by electroporation. *Mech. Dev.*, 121, 1137-1143.
- Nowak, S. J. and Corces, V. G. (2004). Phosphorylation of histone H3: a balancing act between chromosome condensation and transcriptional activation. *Trends Genet.*, 20, 214-220.
- Nüsslein-Volhard, C. and Wieschaus, E. (1980). Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila*. *Nature* 287, 795-801.
- Ohba, S., Kawaguchi, H., Kugimiya, F., Ogasawara, T., Kawamura, N., Saito, T., Ikeda, T., Fujii, K., Miyajima, T., Kuramochi, A., et al. (2008). Patched1 haploinsufficiency increases adult bone mass and modulates Gli3 repressor activity. *Dev. Cell*, 14, 689-699.
- Palma, V., Lim, D. A., Dahmane, N., Sánchez, P., Brionne, T. C., Herzberg, C. D., Gitton, Y., Carleton, A., Alvarez-Buylla, A., and Ruiz i Altaba, A. (2005). Sonic hedgehog controls stem cell behavior in the postnatal and adult brain. *Development* 132, 335-344.
- Park, J., Zhang, J. J. R., Moro, A., Kushida, M., Wegner, M., and Kim, P. C. W. (2010). Regulation of Sox9 by Sonic Hedgehog (Shh) is essential for patterning and formation of tracheal cartilage. *Dev. Dyn.*, 239, 514-526.
- Pastorino, L., Cusano, R., Nasti, S., Faravelli, F., Forzano, F., Baldo, C., Barile, M., Gliori, S., Muggianu, M., Ghigliotti, G., et al. (2005). Molecular characterization of Italian nevoid basal cell carcinoma syndrome patients. *Hum. Mutat.*, 25, 322-323.
- Peacock, C. D. and Rudin, C. M. (2010). Skin deep and deeper: multiple pathways in basal cell carcinogenesis. *Cancer Prev Res (Phila)*, 3, 1213-1216.
- Pfeifer, G. P. and Besaratinia, A. (2009). Mutational spectra of human cancer. *Hum Genet*, 125, 493-506.
- Piddini, E. and Vincent, J.-P. (2003). Modulation of developmental signals by endocytosis: different means and many ends. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 15, 474-481.
- Politis, P. K., Thomaidou, D., and Matsas, R. (2008). Coordination of cell cycle exit and differentiation of neuronal progenitors. *Cell Cycle* 7, 691-697.
- Pozniak, C. D. and Pleasure, S. J. (2006). Genetic control of hippocampal neurogenesis. *Genome Biol.*, 7, 207.

- Prykhozhij, S. V. (2010). In the absence of Sonic hedgehog, p53 induces apoptosis and inhibits retinal cell proliferation, cell-cycle exit and differentiation in zebrafish. *PLoS ONE*, 5, e13549.
- Quarto, R., Campanile, G., Cancedda, R., and Dozin, B. (1997). Modulation of commitment, proliferation, and differentiation of chondrogenic cells in defined culture medium. *Endocrinology*, 138, 4966-4976.
- Ribes, V. and Briscoe, J. (2009). Establishing and interpreting graded Sonic Hedgehog signaling during vertebrate neural tube patterning: the role of negative feedback. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 1, a002014.
- Ruiz i Altaba, A. (2011). Hedgehog signaling and the gli code in stem cells, cancer, and metastases. *Sci Signal* 4, pt9.
- Ruiz i Altaba, A (1999). Gli proteins encode context-dependent positive and negative functions: implications for development and disease. *Development* 126, 3205-3216.
- Ruiz i Altaba, Ariel, Nguyễn, V., and Palma, V. (2003). The emergent design of the neural tube: prepattern, SHH morphogen and GLI code. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 13, 513-521.
- Sambrook, J. and Russell, D. W. (2001). Molecular cloning: a laboratory manual CSHL Press.
- Schulte, G. (2010). International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXX. The class Frizzled receptors. *Pharmacol. Rev.*, 62, 632-667.
- Shi, Shuiliang, Mercer, S., and Trippel, S. B. (2010). Effect of transfection strategy on growth factor overexpression by articular chondrocytes. *J. Orthop. Res.*, 28, 103-109.
- Sinha, S. and Chen, J. K. (2006). Purmorphamine activates the Hedgehog pathway by targeting Smoothed. *Nat. Chem. Biol.*, 2, 29-30.
- Song, Z., Yue, W., Wei, B., Wang, N., Li, T., Guan, L., Shi, Shuangshuang, Zeng, Q., Pei, X., and Chen, L. (2011). Sonic Hedgehog Pathway Is Essential for Maintenance of Cancer Stem-Like Cells in Human Gastric Cancer. *PLoS One*, 6.
- Sousa, V. H. and Fishell, G. (2010). Sonic hedgehog functions through dynamic changes in temporal competence in the developing forebrain. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 20, 391-399.
- Stecca, B. and Ruiz i Altaba, Ariel (2009). A GLI1-p53 inhibitory loop controls neural stem cell and tumour cell numbers. *EMBO J.*, 28, 663-676.

- Stecca, B. and Ruiz i Altaba, Ariel (2010). Context-dependent Regulation of the GLI Code in Cancer by HEDGEHOG and Non-HEDGEHOG Signals. *Journal of Molecular Cell Biology*, 2, 84 -95.
- Stott, N. S. and Chuong, C. M. (1997). Dual action of sonic hedgehog on chondrocyte hypertrophy: retrovirus mediated ectopic sonic hedgehog expression in limb bud micromass culture induces novel cartilage nodules that are positive for alkaline phosphatase and type X collagen. *J. Cell Sci.*, 110 (Pt 21), 2691-2701.
- Suzuki, K. and Matsubara, H. (2011). Recent advances in p53 research and cancer treatment. *J. Biomed. Biotechnol.*, 2011, 978312.
- Sánchez-Camacho, C. and Bovolenta, P. (2008). Autonomous and non-autonomous Shh signalling mediate the in vivo growth and guidance of mouse retinal ganglion cell axons. *Development* 135, 3531-3541.
- Taipale, J, Cooper, M. K., Maiti, T., and Beachy, P. A. (2002). Patched acts catalytically to suppress the activity of Smoothed. *Nature* 418, 892-897.
- Tasouri, E. and Tucker, K. L. (2011). Primary cilia and organogenesis: is Hedgehog the only sculptor? *Cell Tissue Res.*, 345, 21-40.
- Teglund, S. and Toftgård, R. (2010). Hedgehog beyond medulloblastoma and basal cell carcinoma. *Biochim. Biophys. Acta*, 1805, 181-208.
- Thibert, C., Teillet, M.-A., Lapointe, F., Mazelin, L., Le Douarin, N. M., and Mehlen, P. (2003). Inhibition of neuroepithelial patched-induced apoptosis by sonic hedgehog. *Science* 301, 843-846.
- Tuan, R. S. and Lo, C. W. (2000). Developmental biology protocols. Overview I. *Methods Mol. Biol.*, 135, 3-5.
- Ulloa, F. and Briscoe, J. (2007). Morphogens and the control of cell proliferation and patterning in the spinal cord. *Cell Cycle*, 6, 2640-2649.
- Vaillant, C. and Monard, D. (2009). SHH pathway and cerebellar development. *Cerebellum*, 8, 291-301.
- Varjosalo, M. and Taipale, Jussi (2008). Hedgehog: functions and mechanisms. *Genes Dev.*, 22, 2454-2472.
- Villani, R. M., Adolphe, C., Palmer, J., Waters, M. J., and Wainwright, B. J. (2010). Patched1 inhibits epidermal progenitor cell expansion and basal cell carcinoma formation by limiting Igfbp2 activity. *Cancer Prev Res (Phila)*, 3, 1222-1234.
- Vogelstein, B. and Kinzler, K. W. (1992). p53 function and dysfunction. *Cell* 70, 523-526.

- Wicking, C., Shanley, S., Smyth, I., Gillies, S., Negus, K., Graham, S., Suthers, G., Haites, N., Edwards, M., Wainwright, B., et al. (1997). Most germ-line mutations in the nevoid basal cell carcinoma syndrome lead to a premature termination of the PATCHED protein, and no genotype-phenotype correlations are evident. *Am. J. Hum. Genet.*, 60, 21-26.
- Wolter, M., Reifemberger, J., Sommer, C., Ruzicka, T., and Reifemberger, G. (1997). Mutations in the human homologue of the *Drosophila* segment polarity gene *patched* (PTCH) in sporadic basal cell carcinomas of the skin and primitive neuroectodermal tumors of the central nervous system. *Cancer Res.*, 57, 2581-2585.
- Youssef, K. K., Van Keymeulen, A., Lapouge, G., Beck, B., Michaux, C., Achouri, Y., Sotiropoulou, P. A., and Blanpain, C. (2010). Identification of the cell lineage at the origin of basal cell carcinoma. *Nat. Cell Biol.*, 12, 299-305.
- Zhou, Z., Xie, J., Lee, D., Liu, Y., Jung, J., Zhou, L., Xiong, S., Mei, L., and Xiong, W.-C. (2010). Neogenin regulation of BMP-induced canonical Smad signaling and endochondral bone formation. *Dev. Cell*, 19, 90-102.

ANEXO

Las mutaciones puntuales D513Y, G509R y G509V podrían introducir un cambio conformacional en la proteína PTCH1 que explicaría su acción fisiológica descrita aquí. La figura 26 muestra una representación del cuarto dominio transmembrana desde el aminoácido de la posición 502 hasta el 520. Las mutaciones del aminoácido 509 se encontrarían en la segunda vuelta de la hélice, flanqueado por los de las posiciones 502 y 516, en un ambiente hidrofóbico. En el caso de G509R, la glicina fue reemplazada por arginina, que es un aminoácido polar que podría desestabilizar esta hélice. En cambio, en el caso de G509V, la pequeña glicina ha sido reemplazada por valina, un aminoácido neutro parecido pero más hidrófobo que ésta. La ramificación y su característica hidrofóbica podrían otorgarle al dominio transmembrana un grado de estabilidad mayor que el de la proteína silvestre y por lo tanto una insensibilidad a la modulación por Shh. D513Y se encontraría en un sector medio más alejado de otros aminoácidos.

Al analizar la probabilidad que esas secuencias puedan constituir un dominio transmembrana, se observa que la probabilidad en el caso de G509V es mayor aún que en para el silvestre en el cuarto dominio transmembrana (figura 27), lo que robustece la idea de que ese dominio es más estable aún que en el silvestre y que podría pensarse que, debido a su estabilidad, Shh no puede ejercer un efecto pues tampoco induciría algún cambio en la estructura de PTCH1. Es interesante notar que estas mutaciones no afectarían la probabilidad de

constituir dominios transmembrana para el resto de las secuencias y que la mutación CTD no afecta el resto de la estructura de PTCH1.

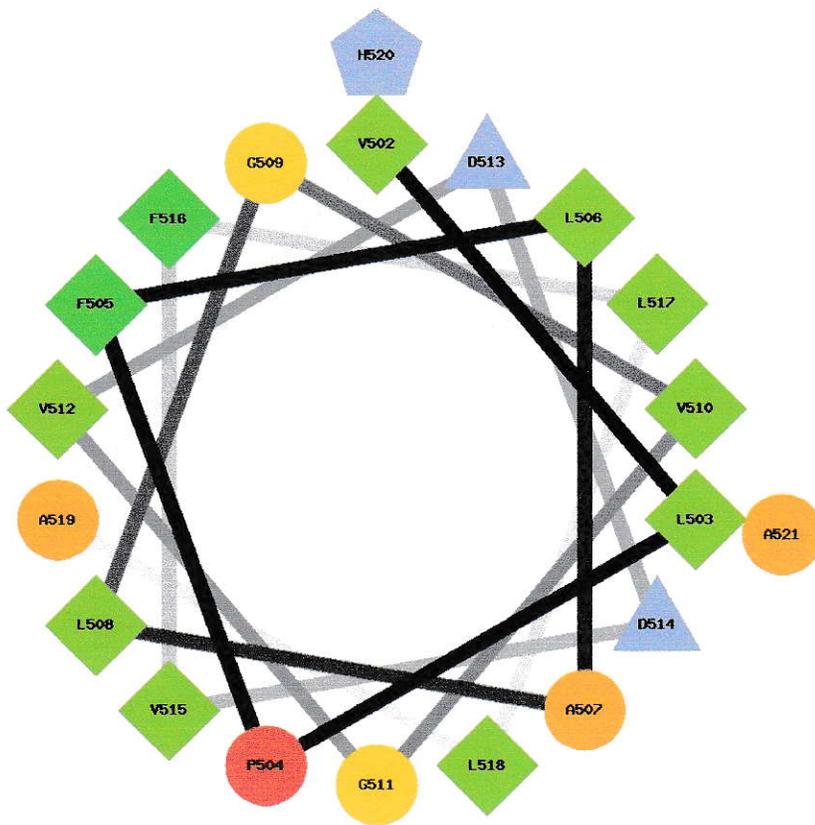


Figura 27. Representación gráfica del cuarto dominio transmembrana de PTCH1. La figura muestra una representación de una vista superior del cuarto dominio transmembrana, comenzando desde el aminoácido de la posición 502 hasta el de la 520. Puede observarse al aminoácido 509 entre los de la 502 y 516. En cambio, el 513 se encuentra más abajo. La figura fue obtenida a partir de un programa del *wheel* (<http://trimer.tamu.edu/cgi-bin/wheel/wheel.pl>) del laboratorio *The Hu Laboratory* (<http://trimer.tamu.edu/>)

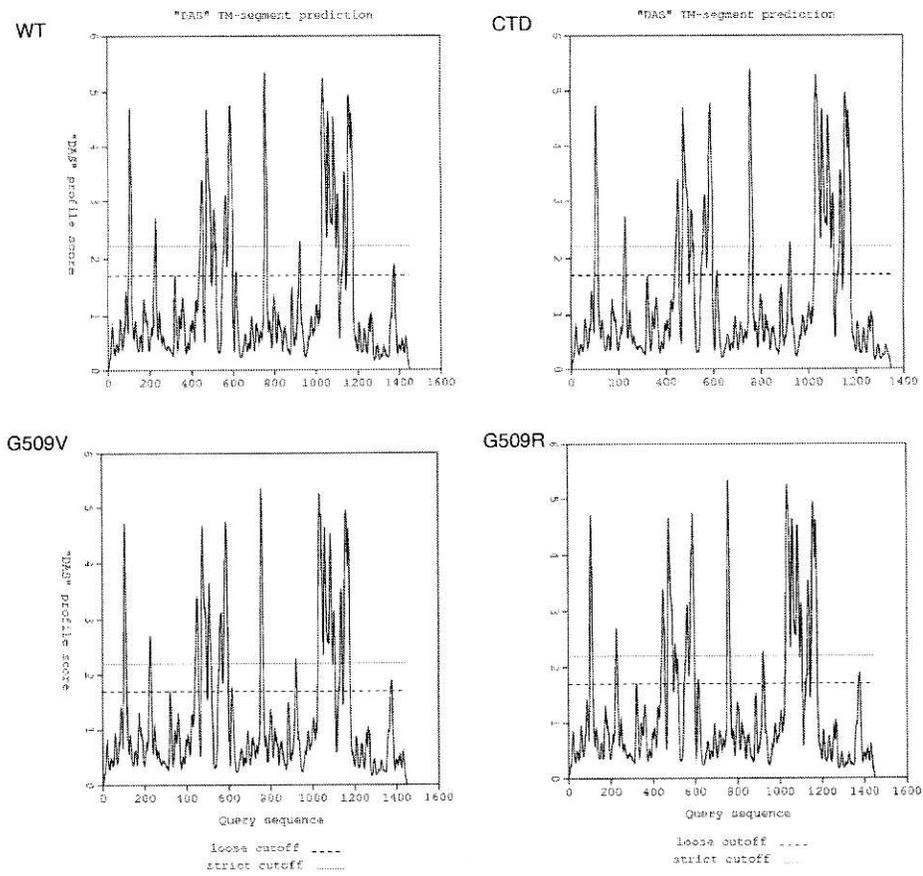


Figura 28. El cuarto dominio transmembrana de G509V tiene mayor probabilidad de constituir un dominio transmembrana que PTCH1 silvestre o sus otras mutaciones. Un programa computacional puede predecir si una secuencia aminoacídica puede constituir un dominio transmembrana y se grafica tal que cada espiga significa una alta probabilidad para esa región, entre mayor sea la probabilidad, más alta será la espiga. En el caso del PTCH1 silvestre (WT), el programa asigna los dominios tal como se conocen en la actualidad. Para G509V el programa asigna una probabilidad mayor aún que para el silvestre para el cuarto dominio transmembrana. Ninguna de las mutaciones afectan los demás dominios transmembrana. Los gráficos fueron obtenidos con un programa informático del Instituto Suizo de Bioinformáticas (<http://www.ch.embnet.org/index.html>) que predice las regiones transmembranas y su orientación. Para escoger el programa adecuado, se compararon varios programas disponibles en línea de institutos o universidades, comparando sus resultados en cuanto a la predicción de dominios para el PTCH1 silvestre (datos no mostrados), encontrando que el escogido era el que hacía la mejor predicción.