

UCH - FC  
MAG - BMCM  
2787  
CA

**Un nuevo gen blanco de la vía de señalización Shh/Gli  
en vertebrados: *c-myc***

**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**

**Claudio Rodrigo David Cortés Rodríguez**



**Marzo, 2011**

**Directora de Tesis Dra:**  
**Verónica Palma Alvarado**

**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.

**CLAUDIO RODRIGO DAVID CORTES RODRIGUEZ**

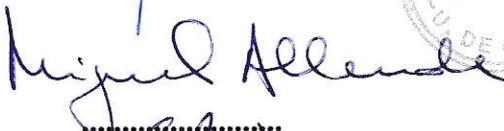
Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Ciencias con mención en Biología Molecular Celular y Neurociencias, en el examen de Defensa Privada de Tesis rendido el día Jueves 20 de Enero de 2011.

Director de Tesis:  
**Dra. Verónica Palma A.**

Comisión de Evaluación de la Tesis

**Dr. Miguel Allende C.**

**Dr. Alvaro Glavic M.**

  
.....  
  
.....  
  
.....



A Fuenteovejuna, Rubí, Víctor y Coti.

A Lautaro y Eliana.





Y comienza la rueda de agradecimientos: primero darle las gracias a Vero, Polo y Pablo, por recibirme por allá por el 2006.

Gracias a los que están y pasaron por el lab, generando la burbuja sincicial del Desarrollo: ambas Constanzas (Martínez y Vásquez), Consu, Elvis (capitán), Diego Rey, Chico Botelho, Undo, Leo, Mary, Vivi G., Gabi, Zanjalvaro, Choscar, Tami, José, Solange, María, Marjorie, Simón, Mario, Pame, Javi, Carmen, Florok, Juanito, Cata. A Muelanga y el avistador Fuentes también, haciendo patria desde las sempiternas barracas. Gracias particulares para Alvaro, Miguel y en especial el Dr. Juan Fernández.

Gracias también a Toya, Jocy, Checho, Chicha, Pachi, Natty, Gemelo, Carolita, Cami, Jime, Vasco, Tami, Patifierra, Caren, Chilo, Pao y tantos otros que no caben en este espacio.

Dentro de los agradecimientos importantes que nunca leerán los destinatarios: Jim Olson, Berry (Bah), Joyoti and Cris. Thanks for turning something great into something awesome!. Many thanks also go to Ida Chow, Eric Wieschaus, Billie Swalla, Kathy Krull, Ankur & Ashley for that contagious interest/love affair for embryos.

Y siempre agradecido a la familia, a quienes va dedicado este trabajo.

**Claudio Cortés Rodríguez**  
**Santiago, Chile**  
**Marzo, 2011**

## Índice



	Página
<b><u>Introducción</u></b>	<b>1</b>
<b>Sonic hedgehog y sus funciones en el desarrollo</b>	<b>2</b>
<b>Shh/Gli en el desarrollo del SNC</b>	<b>6</b>
<b>Shh en desarrollo del cerebelo</b>	<b>7</b>
<b>C-myc y el ciclo celular</b>	<b>9</b>
<b>Antecedentes previos</b>	<b>16</b>
<b><u>Hipótesis</u></b>	<b>20</b>
<b>Objetivo general</b>	<b>20</b>
<b>Objetivos específicos</b>	<b>20-21</b>
<b><u>Materiales y métodos</u></b>	<b>22</b>
<b>Material biológico</b>	<b>22</b>
<b>Síntesis de sondas ARN-digoxigenina</b>	<b>23</b>
<b>Hibridación <i>in-situ</i> en embriones completos de pez cebra</b>	<b>24</b>
<b>Bioinformática</b>	<b>26</b>
<b>Ligaciones</b>	<b>27</b>
<b>Preparación de explantes de tejido cerebral murino</b>	<b>28</b>
<b>Inmunoprecipitación de cromatina a partir de explantes de tejido cerebral embrionario murino</b>	<b>29</b>
<b>Cultivo y subcultivo de células C3H10T1/2</b>	<b>31</b>
<b>Transfección de células C3H10T1/2</b>	<b>32</b>
<b>Cultivo de precursores granulares cerebelares</b>	<b>32</b>
<b>Inmunofluorescencia en precursores granulares cerebelares</b>	<b>33</b>
<b><u>Resultados</u></b>	<b>36</b>
<b>Expresión de c-myc durante el desarrollo del SNC de embriones de pez cebra</b>	<b>37</b>
<b>Análisis regiones regulatorias de c-myc en genomas de pez cebra y ratón</b>	<b>40</b>
<b>Inmunoprecipitación de cromatina para proteínas Gli en corteza embrionaria de ratón</b>	<b>43</b>
<b>Pérdida de función farmacológica de la vía Shh/Gli reduce la expresión de c-myc en explantes de corteza embrionaria</b>	<b>46</b>
<b>Pérdida y ganancia de función farmacológicas de la vía Shh/Gli afectan la expresión de c-myc en una línea celular que responde a Sonic hedgehog</b>	<b>48</b>
<b>Pérdida de función de proteínas Gli mediante uso de shRNA reduce la expresión de c-myc <i>in-vitro</i></b>	<b>50</b>
<b>Regiones de unión a Gli no generan una respuesta</b>	<b>51</b>

<b>transcripcional in-vitro, en línea celular C3H10T1/2</b>		
<b>El número de células c-myc positivas no se ve afectado en modelos de meduloblastoma, ganancia de función de la vía Shh/Gli</b>		<b>55</b>
<b><u>Discusión</u></b>		<b>57</b>
<b><u>Conclusiones</u></b>		<b>67</b>
<b><u>Bibliografía</u></b>		<b>68</b>





## Indice de tablas y figuras

	Página
<b>Figura 1: Relaciones filogenéticas de miembros de la familia de proteínas Hh en diferentes especies de animales.</b>	3
<b>Figura 2. Esquema de la vía de señalización de Shh/Gli en vertebrados, en su forma canónica de regulación de expresión génica.</b>	5
<b>Figura 3. Conservación evolutiva del gen <i>c-myc</i> en vertebrados.</b>	11
<b>Figura 4. Agrupación de conjuntos funcionales de genes blancos del factor de transcripción <i>c-myc</i>.</b>	12
<b>Figura 5. C-myc está involucrado en la progresión del ciclo celular, en particular de la transición G1/S.</b>	13
<b>Tabla 1. Listado de tipos de cáncer relacionados a alteraciones en proteínas Myc en humanos.</b>	14
<b>Figura 6. C-myc varía tanto en su expresión como en niveles de la proteína en diferentes contextos <i>in-vitro</i> de señalización aberrante de la vía de Shh/Gli.</b>	17
<b>Figura 7. Diseño experimental de microarreglos de ARN usando embriones completos de pez cebra.</b>	18
<b>Tabla 2. Partidores utilizados para reacciones de RT-PCR y amplificación de regiones del promotor de <i>c-myc</i> de ratón (ChIP y constructos reporteros).</b>	35
<b>Figura 8. Expresión de <i>c-myc</i> en el SNC embrionario de pez cebra.</b>	37
<b>Figura 9. La expresión de <i>c-myc</i> se ve reducida en pérdida de función genética de la vía de Shh/Gli.</b>	39
<b>Figura 10. Análisis de region 5' río arriba del gen <i>c-myc</i> en pez cebra.</b>	41
<b>Figura 11. Presencia de sitios de unión a gli (GliBS) en la región regulatoria de <i>c-myc</i> en el genoma de ratón.</b>	42
<b>Figura 12. Inmunoprecipitación de cromatina para proteínas Gli en regiones regulatorias en el promotor de <i>c-myc</i>, región - 4.8kb.</b>	45
<b>Figura 13. Inmunoprecipitación de cromatina para proteínas Gli en regiones regulatorias en el promotor de <i>c-myc</i>, región - 7.0kb.</b>	45
<b>Figura 14. Inmunoprecipitación de cromatina para proteínas Gli en regiones regulatorias en el promotor de <i>c-myc</i>, región - 5.9kb.</b>	46
<b>Figura 15. Tratamientos con ciclopamina reducen los niveles de</b>	47

expresión de c-myc en explantes de corteza de embriones de estadio E18.5.		
Figura 16. Pérdida y ganancia de función farmacológica de la vía Shh/Gli afectan la expresión de c-myc.		49
Figura 17. Pérdida de función de proteínas Gli reduce expresión de c-myc en células CH310T1/2.		50
Figura 18. Estrategia de clonamiento de plásmido reportero, involucrando región 5.1-3.4kb (denominada como “distal”).		52
Figura 19. Estrategia de clonamiento para sitio 5.9kb río arriba del sitio de inicio de la transcripción de c-myc.		53
Figura 20. Ensayos de luciferasa para regiones regulatorias “distal” (-5.1-3.4kb) y 5.9kb del promotor de c-myc de ratón.		54
Figura 21. Número de células c-myc positivas se mantiene constante en modelos de ganancia de la vía Shh/Gli en el cerebelo postnatal.		56



## Resumen

El mitógeno Sonic hedgehog (Shh) participa en el desarrollo del Sistema Nervioso Central (SNC), jugando un rol clave en la proliferación de progenitores neurales, entre otros. C-myc es un potente proto-oncogen y regulador del crecimiento durante el desarrollo. Recientemente, identificamos a c-myc como un blanco putativo de la vía de señalización Shh/Gli, mediante ensayos de microarreglos de ARN.

El objetivo de este trabajo es determinar si la vía de señalización Shh/Gli regula la expresión de c-myc a través de actividad transcripcional Gli en el promotor de c-myc. Análisis bioinformáticos predicen la existencia de secuencias de unión a Gli en los promotores de c-myc tanto en pez cebra como en ratón. Embriones de peces mutantes para componentes de la vía de señalización Shh/Gli muestran expresión de c-myc reducida en el SNC, especialmente en el tectum óptico y el ojo en desarrollo. Mediante ensayos de Inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) fue posible observar unión de proteínas Gli1 y Gli3 a una región 5,9kb río arriba del sitio de inicio de la transcripción en neocorteza embrionaria de ratón de 18,5 días de edad. Experimentos de ganancia y pérdida de función farmacológicas muestran variaciones en los niveles de expresión de c-myc, tanto en explantes de neocorteza como en una línea celular. Esta región de 5,9kb, sin embargo, no es suficiente para promover expresión de un constructo reportero luciferasa.

## Abstract

The mitogen Sonic hedgehog (Shh) participates in the development of the Central Nervous System (CNS), playing a central role in neural progenitor proliferation. C-myc is one of the most potent proto-oncogenes and growth regulators during development. We recently identified *c-myc* through microarray screenings as a novel target gene of the Shh pathway.

The aim of this work is to determine whether the Shh signaling pathway directly regulates *c-myc* expression through Gli transcription factor activity in the *c-myc* promoter. Bioinformatic analysis predicts Gli-binding sequences in the *c-myc* promoter in both zebrafish and mouse. Zebrafish mutant embryos for Shh/Gli pathway components show reduced *c-myc* expression in the CNS, specifically the tectum and the eye. Through chromatin immunoprecipitation (ChIP) experiments conducted in mouse embryonic day 18.5 neocortex, we show *in-vivo* binding of Gli1 and Gli3 proteins to a region 5.9kb upstream of the transcription start site of *c-myc*. Shh/Gli pharmacological loss- and gain-of-function affects *c-myc* expression in explants from the same tissue, and also in Shh-responsive fibroblasts. This 5.9kb region, however, is not sufficient to promote expression of a luciferase reporter construct. Further wide-spectrum analyses (like ChIP-Seq) might shed light over non-canonical active sites.

## Introducción

El desarrollo embrionario es un proceso que contempla la secuencia coordinada de una serie de eventos tanto genéticos como epigenéticos, que tienen como consecuencia la conformación de un organismo.

La actividad génica es consecuencia de una integración de señales a nivel celular, señales tanto intrínsecas como extrínsecas. La variedad de señales y su participación dentro del cuadro completo de las respuestas celulares continúan siendo analizadas de manera exhaustiva para poder lograr un mayor entendimiento de los procesos de crecimiento y proliferación de las células eucariontes. Dentro de estas señales podemos destacar algunas, como son las proteínas secretadas y las interacciones célula-célula. La integración de estos eventos de señalización molecular tiene como resultado un estado celular, consecuente con las condiciones ambientales e intrínsecas de la célula. Existen vías de señalización, conservadas en las células eucariontes, que cumplen roles similares durante el desarrollo embrionario y el crecimiento. Una de estas es la vía de señalización de Sonic hedgehog (Shh)/Gli.

## Sonic hedgehog y sus funciones en el desarrollo

El gen *hedgehog* (Hh) fue inicialmente identificado en *Drosophila melanogaster*, en el contexto de una búsqueda de mutaciones con fenotipos en el patrón corporal y polaridad de segmentos embrionarios (Nüsslein-Volhard and Wieschaus, 1980). Posteriormente fue relacionado también con el establecimiento de patrones en los discos imaginales. Se encontró que la proteína Hedgehog codificada por dicho gen participaba como ligando del receptor de una cascada de señalización, que involucra una serie de proteínas de membrana y citoplasmáticas y tiene efectos tanto positivos como negativos sobre la actividad génica de ciertos genes (Ingham et al., 1991).

Estudios posteriores demostraron la existencia de 3 genes homólogos en ratón (*M. musculus*), denominados Sonic hedgehog, Indian hedgehog (Ihh) y Desert hedgehog (Dhh). Estos se han relacionado con diversos procesos en el desarrollo. Por ejemplo, Ihh es clave en el desarrollo óseo (Hammond and Schulte-Merker, 2009; Joeng and Long, 2009), Dhh en el desarrollo de gónadas masculinas y mielinización de axones periféricos (Muir, 2009), y Shh se ha vinculado al desarrollo de estructuras del sistema nervioso central (SNC), mantención de células troncales neurales adultas, desarrollo hepático y formación de extremidades, entre otros (Palma et al., 2005; Donovan and Dyer, 2005). En tanto, en pez cebra, existen al menos 5 homólogos de Hh (Fig.1) (Ingham and McMahon, 2001). Cabe destacar que la participación de los

ligandos Hedgehog en estos procesos está altamente conservada en diversos modelos vertebrados (Ingham and McMahon, 2001; Huangfu and Anderson, 2006).

Los procesos celulares en los que participa Shh descritos hasta el momento incluyen proliferación, diferenciación, muerte celular, generación de patrones (*patterning*) y guía axonal, entre otros (Martí and Bovolenta, 2002; Jia and Jiang, 2006).

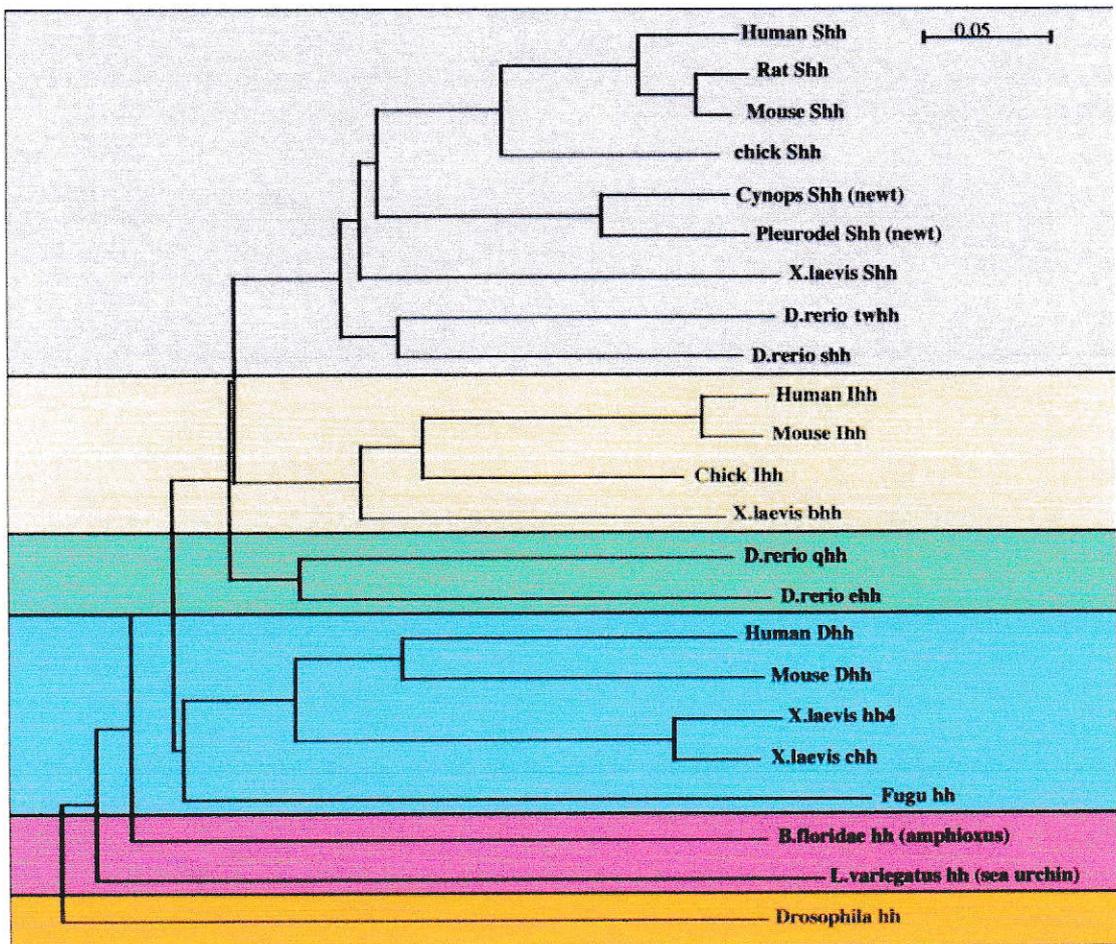


Figura 1. Relaciones filogenéticas de miembros de la familia de proteínas Hh en diferentes especies de animales. Los colores indican similitud en secuencia/conservación de los genes. Adaptado de (Ingham and McMahon, 2001).

Esto ha podido ser confirmado por estudios *in-vitro* e *in-vivo*, los que han permitido entender mejor cómo funciona esta vía de señalización. En la célula existen receptores de membrana, como las proteínas Patched1 (Ptc1) y Patched2 (Ptc2) que son capaz de unir a la proteína Shh, y otra proteína denominada Smoothened (Smo) que es requerida para la mediación de la respuesta, a través de un complejo proteico citoplasmático que incluye al menos a las proteínas Suppresor of fused (SuFu) y a los factores de transcripción Gli (Fig.2) (Varjosalo et al., 2006). En *Drosophila* este complejo también integra a la quinesina Costal2 (Cos2) y a la quinasa Fused (Fu), siendo el complejo activo imprescindible tanto para el clivaje de la proteína Ci como para su translocación al núcleo (Lum et al., 2003).

Las proteínas Gli son factores de transcripción del tipo "dedos-de-zinc", de alrededor de 140 kiloDalton (kD) y 1000 aminoácidos. Son 3 los homólogos en el clado de los vertebrados (Gli1, Gli2 y Gli3) de una única proteína presente en *Drosophila*, la proteína Cubitus interruptus (Ci). Estas proteínas Gli poseen una función activadora o represora de la transcripción, según el estado de clivaje en que se encuentren. En vertebrados, las formas completas (*full-length*) son activadoras en tanto formas con clivaje del extremo carboxilo terminal (*short-length*) ejercen actividad transcripcional represora sobre genes blanco (Ruiz i Altaba et al., 2007). Se han además descrito sitios de reconocimiento para fosforilación por al menos 3 quinasas independientes, GSK3- $\beta$ , PKA y CKI, siendo esta triple fosforilación necesaria para reclutar a la ubiquitina-ligasa

Slimb y la posterior proteólisis mediada por proteosoma que genera estas formas clivadas de las proteínas Gli o Ci (Jia and Jiang, 2006). También poseen dominios conservados de reconocimiento para HIB (Hh-induced MATH and BTB domain-containing protein), que catalizan ubiquitinación tanto de proteínas Gli como de Ci (Jiang, 2006).

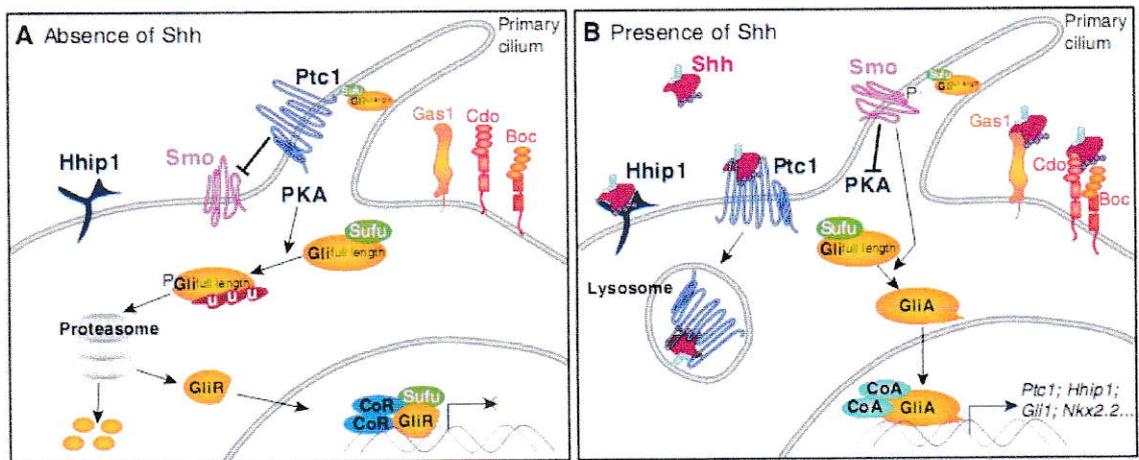


Figura 2. Esquema de la vía de señalización de Shh/Gli en vertebrados, en su forma canónica de regulación de expresión génica. A) En ausencia de ligando, Ptc1 bloquea el ingreso de Smo al cilio primario, bloqueando efectivamente la actividad de la vía de señalización. Esta disminución de la actividad se observa por el aumento de formas represoras Gli en el citoplasma y consecuentemente el núcleo. B) El caso contrario, al existir unión de ligando Shh a Ptc1, permite la liberación de la represión que ejerce Ptc1 sobre Smo, lo que tiene como consecuencia el procesamiento a formas activadoras de las proteínas Gli y la subsecuente activación en la expresión de genes blanco, como *Ptc1* o *Nkx2.2*. Otros componentes de membrana como Hhip, Gas1, Cdo y Boc ejercen regulación adicional sobre la activación de la vía. Adaptado de (Ribes and Briscoe, 2009)

El modelo actual de la vía Hh en vertebrados incorpora ciertas particularidades como la ubicación preferente de algunos componentes de la vía en el cilio primario (Corbit et al., 2005; Michaud and Yoder, 2006; Goetz and Anderson, 2010). El cilio primario es un compartimento subcelular que ha cobrado gran relevancia en los últimos 10 años, considerándose en la actualidad un centro de señalización para la vía Hh (Goetz and Anderson,

2010). La interacción de proteínas participantes de la vía de Hh (como Shh) con otros componentes de membrana como proteoglicanos o heparansulfatos (Ma et al., 2008), permiten fortalecer mecanismos de *feedback* negativo y *feedforward* positivo descritos (para *Gli1* y *Ptc1*, en particular) (Ruiz i Altaba et al., 2007).

### **Shh/Gli en el desarrollo del SNC**

La participación de la vía canónica Shh/Gli en el desarrollo embrionario del SNC se relacionó primero con el *patterning* en el embrión temprano y establecimiento del eje ventral del tubo neural. Sin embargo, posteriormente se validó un papel de Shh/Gli como señal mitogénica en el SNC dorsal durante la embriogénesis tardía, como factor de sobrevivencia e incluso como participante en guía axonal (Jia and Jiang, 2006). Su rol en el crecimiento de algunos órganos y de las estructuras dorsales del SNC ha sido descrito en extenso en la literatura (Ruiz I Altaba et al., 2001; Palma et al., 2005; Sansom and Livesey, 2009), siendo la actividad de la vía imprescindible para la mantención de progenitores y células con propiedades troncales no sólo en el cerebro sino también en otros tejidos como la piel, el pulmón y el páncreas (Barakat et al., 2010). Esta función en el desarrollo y crecimiento también tiene una faceta de gran relevancia clínica: el cáncer. Esto porque existen diversos tipos de cáncer asociados a diferentes estructuras, como lo son el carcinoma basocelular (piel),

el cáncer hepático (hígado) y gliomas (SNC), por mencionar algunos, cuyo origen se atribuye a alteraciones genéticas en la actividad de esta vía de señalización (Kato and Kato, 2009).

### **Shh en desarrollo de cerebelo**

El cerebelo de ratón es un ejemplo de crecimiento mediado por la vía Shh/Gli, ya que durante el desarrollo del cerebelo embrionario se establece una población que responde a la vía de señalización de Shh/Gli (entre otras señales), los precursores granulares cerebelares, que mantienen un estado proliferativo activo en una estructura laminar pial denominada capa granular externa (EGL, por sus siglas en inglés para External Granular Layer). Hacia las 2 semanas después del nacimiento, esta capa comienza a disminuir su número de células y finalmente, hacia las 3 semanas después del parto, cesan de proliferar (Behesti and Marino, 2009). Las células generadas por estos progenitores migran hacia las regiones más internas del cerebelo estableciendo la Capa granular interna (IGL, siglas en inglés Internal Granular Layer), donde finalizan su diferenciación y terminan de establecer la estructura laminada característica del cerebelo (Carletti and Rossi, 2008).

Alteraciones en la vía de señalización de Shh/Gli o en la capacidad de responder adecuadamente a señales mediadas por la misma que tengan un efecto positivo sobre la actividad transcripcional de la vía, tienen como

consecuencia una excesiva proliferación de estos progenitores, con un subsecuente crecimiento anómalo del cerebelo y aumento en incidencia de meduloblastoma (cáncer cerebelar) (Yang et al., 2008). Las células troncales de la zona sub-ventricular (SVZ, por sus siglas en inglés) también tienen esta capacidad de generar tumores en condiciones de alteración de la vía Shh/Gli.

Por otro lado, se ha descrito un número de efectores génicos río abajo de los factores Gli cuya activación o inhibición involucra la unión de factores de transcripción Gli a determinadas regiones del genoma (Müller and Basler, 2000), en secuencias consenso de unión a Gli (GBS) (Sasaki et al., 1997). Estas secuencias consideran 9 pares de bases consecutivos (GAACACCCA, en ratón), que permiten la unión de las diferentes proteínas Gli en vertebrados.

Pese a existir un gran número de genes cuya expresión se ve alterada en concordancia con alteraciones de la vía de señalización Shh/Gli, sólo una veintena de ellos han sido validados a nivel genómico-funcional, como lo son los genes de *CiclinaD1*, *N-myc*, *Ptc1*, *Hhip* y *Gli1*, por ejemplo. Junto con éstos, existen muchos candidatos producto de búsquedas tejido específicas en cerebelo (Yoon et al., 2009; Lee et al., 2010).

*N-myc* es un blanco de la vía Shh/Gli en el desarrollo del SNC, con roles en la respuesta proliferativa de precursores. Su actividad es imprescindible para el normal desarrollo de estructuras como el cerebelo o la corteza (Knoepfler et al., 2002), pero también para la progresión del crecimiento anómalo en condiciones de alteración génica (Kenney et al., 2006). Existen, sin

embargo, otras proteínas de la misma familia involucradas en el desarrollo, proliferación y crecimiento celular, como son C-myc y L-myc.

### **C-myc y el ciclo celular**

Descrita en primera instancia en *D. melanogaster*, la pérdida de función tras el fenotipo mutante *diminutive* fue localizada posteriormente en el gen *Drosophila myc (dmyc)* (Schreiber-Agus, 1997). Estudios de mosaico lo han relacionado con la proliferación, el crecimiento y tamaño celulares (Schuhmacher et al., 1999; Johnston et al., 1999). En el clado de los vertebrados, se han descrito al menos 3 homólogos del gen *myc* de *Drosophila*: mielocitomatosis celular (*c-myc*), *n-myc* (derivado de neuroblastoma) y *l-myc* (Zimmerman et al., 1986).

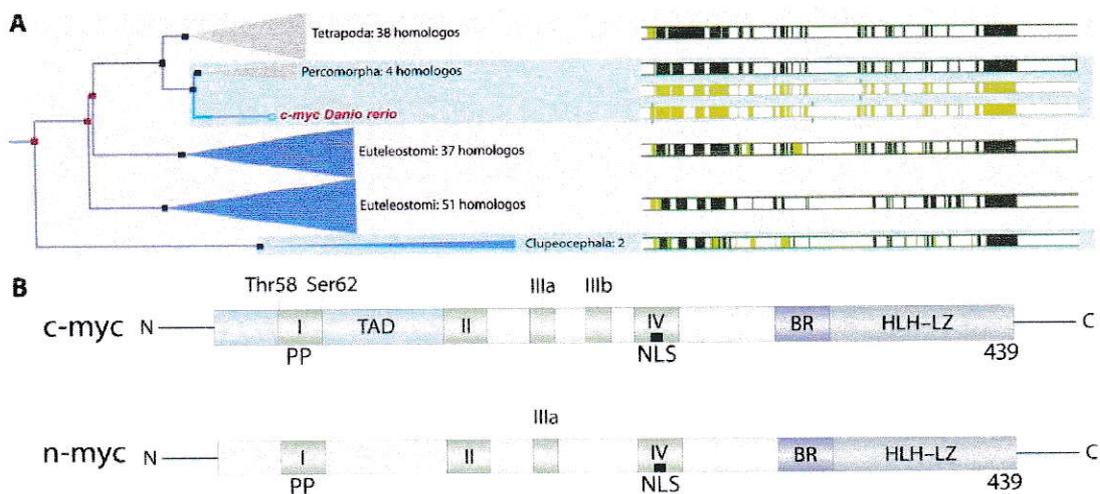
La proteína codificada por este gen consiste en un dominio de transactivación (TAD) en el extremo amino terminal, requerido para el ensamblaje del complejo de activación transcripcional, un dominio cierre de leucina hélice-vuelta-hélice básico (HLH-LZ) imprescindible para la unión a ADN e interacción con otras proteínas, y 4 secuencias denominadas "cajas Myc" (MB, del inglés Myc Boxes), relacionadas con funciones como degradación de la proteína (MBI), apoptosis (MBII) y otros.

Por otro lado, la regulación de la expresión de este gen fue inicialmente descrita en el contexto de diversos tipos de cáncer, y luego individualizada en

sitios de unión funcionales a Tcf-4 en el promotor (He et al., 1998). Además de esto, desregulaciones en variadas vías de señalización (PDGF, HGF, EGF y otros) tienen como consecuencia un aumento en la expresión o estabilización de la proteína (Meyer and Penn, 2008a).

Los genes de la familia *Myc* se encuentran activados en un gran número de tipos de cáncer en humanos, alteraciones que pueden deberse a mutaciones puntuales, amplificación génica, sobreexpresión o aumentos en la estabilidad de la proteína. En la Tabla 1 se listan los tipos de cáncer relacionados con alteraciones en genes *Myc* (Vita and Henriksson, 2006).

Inicialmente aislados a partir de tejidos completamente diferentes, se ha podido establecer que no sólo existe una similitud estructural muy importante entre ellos (Fig.3) sino también una redundancia funcional (DePinho et al. 1987). Esto fue comprobado mediante la inserción de *c-myc* en el locus de *n-myc*, lo que tuvo como consecuencia una importante reducción en el fenotipo del *knock-out* de *n-myc* (Malynn et al., 2000).



**Figura 3. Conservación evolutiva del gen *c-myc* en vertebrados. (A) Árbol filogenético de conservación de la región codificante del gen *c-myc*, cajas en verde denotan identidad de regiones (Ensembl.org, 2010). (B) Alineamiento de la proteína *c-myc* con la proteína *n-myc*, en sus formas presentes en ratón y humano. Se aprecia una gran similitud entre ambos, con sólo algunos dominios diferentes. TAD: dominio de transactivación, NLS: señal de localización nuclear, BR: región básica, HLH-LZ: cierre de leucina hélice-asa-hélice.**

C-myc actúa en el ciclo celular y, en particular, se ha relacionado directamente con la transición G1/S, la fase G2 y con salida del ciclo celular conducente a apoptosis (Fig. 5) (Nilsson and Cleveland, 2003). Adicionalmente, se han descrito relaciones con otras proteínas del ciclo como lo son p53, p27 y E2F (Leone et al., 2001). Estudios a gran escala han permitido encontrar un gran número de genes (más de 1000) cuya expresión responde a un aumento en la proteína c-myc (Fig. 4). Esto configura una compleja red de señales, algunas directas y algunas secundarias.

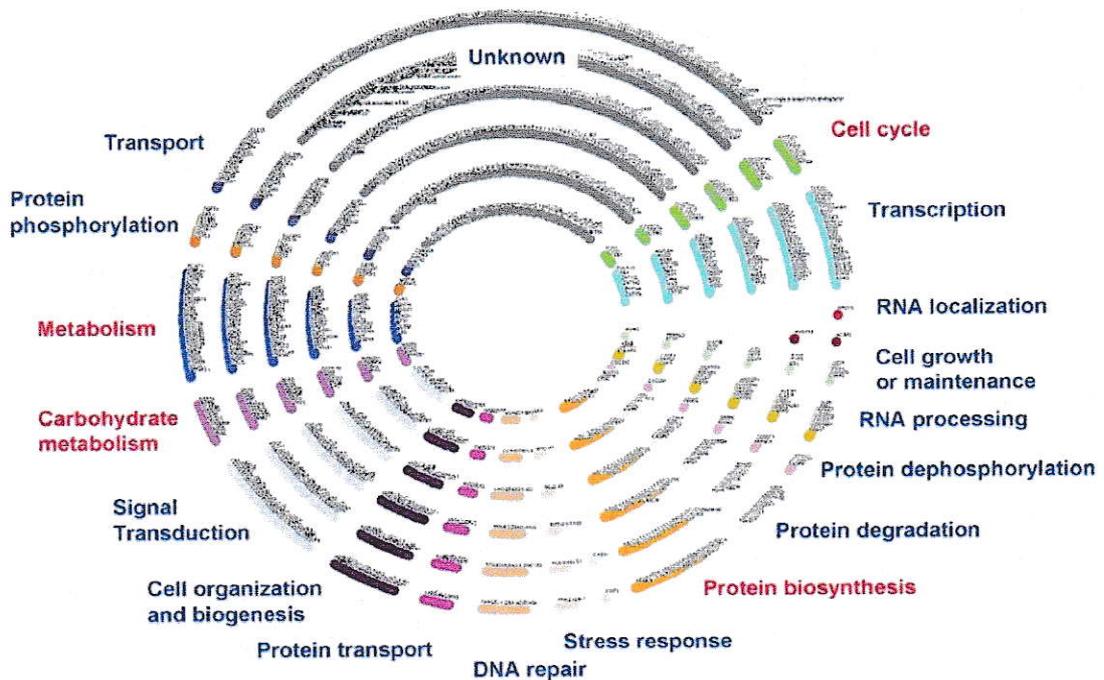


Figura 4. Agrupación de conjuntos funcionales de genes blancos del factor de transcripción *c-myc*. Se estiman en más de 1500 en la actualidad (2010). Nombres en rojo indican sobrerrepresentación estadísticamente significativa del grupo funcional. Tomado de (Dang et al., 2006).

Adicionalmente, se han descrito algunas proteínas capaces de interactuar con *c-myc* permitiendo la activación o represión de genes, las denominadas proteínas Mad y Max. Actualmente se habla de la red Myc/Mad/Max (Grandori et al., 2000), que involucra la dimerización de *c-myc* con Max (regulador positivo) y de Mad con Max (regulador negativo). Se han descrito también efectos de *c-myc* independientes de Mad y Max, relacionados a la transcripción de diferentes grupos de genes (Gallant and Steiger, 2009).

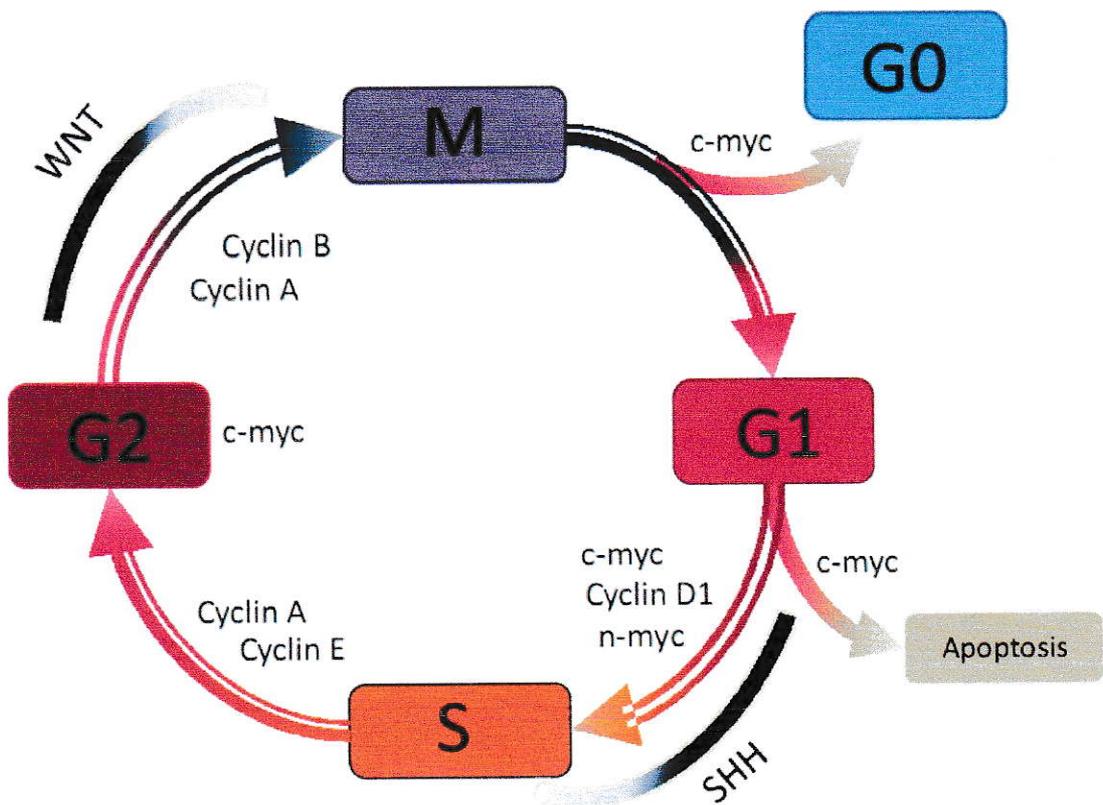


Figura 5. C-myc está involucrado en la progresión del ciclo celular, en particular de la transición G1/S. También se han descrito fenotipos asociados a otras alteraciones dentro del ciclo, como la entrada en apoptosis o el avance de la fase G2. La vía Shh/Gli regula principalmente componentes que regulan la transición G1/S.

El estudio del fenotipo mutante de este gen en ratón arrojó como resultado una temprana letalidad embrionaria, dificultad que se solucionó mediante el uso de ratones *knock-out* condicionales. La pérdida de función de *c-myc* en todas las células progenitoras del SNC, tiene como fenotipo una reducción en la masa del cerebro de un 18%. (Hatton et al., 2006).

**Table 1**  
Summary of *Myc* deregulation in human tumors

Tumor type	Frequency of <i>Myc</i> alterations
<b>Hematological malignancies</b>	
B-acute lymphocytic leukemia	c-Myc rearrangement/amplification (47–52%)
Burkitt's lymphoma	c-Myc translocation (100%) c-Myc overexpression (91%)
Diffuse large cell lymphoma	c-Myc rearrangement/translocation (6–16%) c-Myc overexpression (10%)
Multiple myeloma	c-Myc translocation (15%)
Primary plasma cell leukemia	c-Myc rearrangement (13%)
<b>Solid tumors</b>	
Atypical carcinoid lung cancer	c-Myc amplification (17%)
Bladder cancer	c-Myc amplification (33%)
Breast cancer	c-Myc amplification (9–48%) c-Myc overexpression (45%) MYCN overexpression (25%) CRD-BP amplification (18%) <sup>a</sup>
Cervix cancer	c-Myc amplification (29%)
Colon cancer	c-Myc amplification (17%) c-Myc overexpression (67%)
Gastric cancer	c-Myc amplification (15–30%) c-Myc overexpression (47%)
Glioblastoma	MYCN amplification (<5%) c-Myc/MYCN/L-Myc overexpression (57–78%)
Hepatocellular carcinoma	c-Myc amplification (33%)
Large cell neuroendocrine carcinoma	c-Myc amplification (23%)
Medulloblastoma	c-Myc/MYCN amplification (5–15%) c-Myc overexpression (31%) MYCN overexpression (58%)
Melanoma, nodular	c-Myc amplification (61%)
Melanoma, superficial spreading	c-Myc amplification (28%)
Neuroblastoma	MYCN amplification (25–30%)
Esophageal squamous cell carcinoma	c-Myc amplification (10–30%)
Osteosarcoma	c-Myc amplification (7–78%)
Ovarian cancer	c-Myc amplification (40%) c-Myc overexpression (44%) L-Myc amplification (15%) L-Myc overexpression (40%)
Prostate cancer	c-Myc amplification (30–50%) c-Myc overexpression (70%)
Renal clear cell carcinoma	c-Myc amplification (8%)
Retinoblastoma	MYCN amplification (10–20%)
Rhabdomyosarcoma	MYCN amplification (43–67%)
Small cell lung carcinoma	c-Myc amplification (20%) L-Myc amplification (13%) MYCN amplification (10%)

**Tabla 1. Listado de tipos de cáncer relacionados a alteraciones en proteínas *Myc* en humanos. Se destacan los tipos con alteraciones mayores en c-myc (amplificación o sobreexpresión mayor al 60%), como melanoma, linfoma de Burkitt y glioblastoma. Adaptado de (Vita and Henriksson, 2006).**

Resumiendo, en contextos de desarrollo normal y señalización aberrante de la vía de señalización Shh/Gli se ha descrito una estrecha relación entre la vía

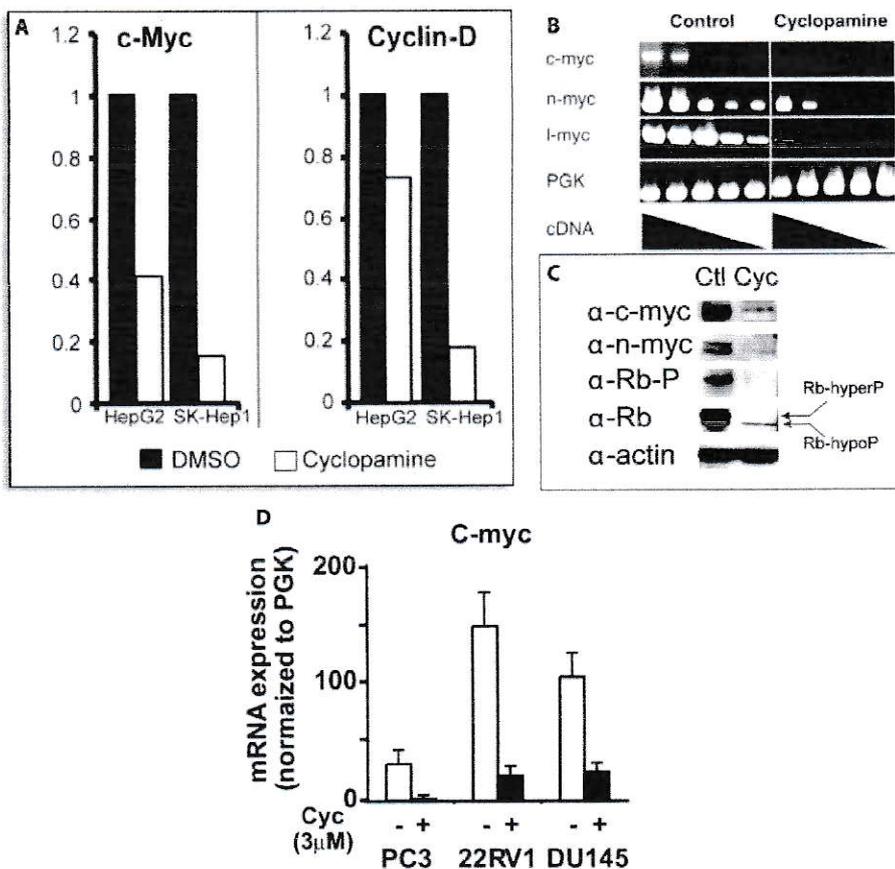
canónica y n-myc como efector transcripcional modulador de la respuesta proliferativa a activación de la vía, siendo este indispensable en el caso del cerebelo, por ejemplo. Existe, sin embargo, evidencia que indica que puede existir una relación funcional entre la vía Shh/Gli y otro componente de la familia Myc, *c-myc*.

## Antecedentes previos

Los primeros antecedentes publicados corresponden al estudio de 2 líneas celulares de carcinoma hepatocelular, donde tratamientos de 5 días con el inhibidor farmacológico de Hh ciclopamina (10uM) reducen en más del 60% los niveles de ARNm de *c-myc* (Patil et al., 2006) (Fig.6A).

El segundo antecedente proviene de una línea celular de cáncer cerebelar nula para p53 y heterocigota para Ptc1 (genera sobreactivación de la vía), donde se reporta una disminución en los niveles de transcrito y proteína C-myc luego de un tratamiento de 72 horas con ciclopamina (5uM) (Berman et al., 2002) (Fig.6B y C).

En otro modelo de cáncer, en este caso de un grupo (4) de líneas celulares de cáncer de próstata que presentan ganancia de actividad de la vía de Shh/Gli, se observan disminuciones en los niveles de transcrito de *c-myc* luego de inducir represión de la vía mediante un tratamiento de 48 horas con ciclopamina (3uM) (6D).

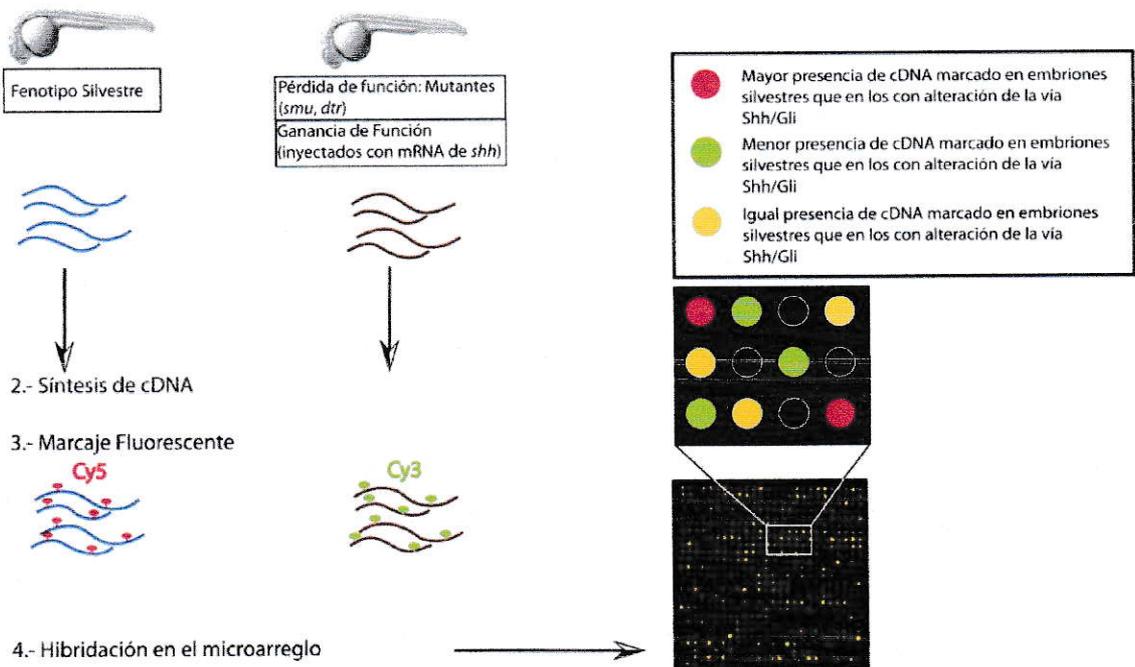


**Figura 6.** C-myc varía tanto en su expresión como en niveles de la proteína en diferentes contextos *in-vitro* de señalización aberrante de la vía de Shh/Gli. **A)** Niveles de expresión de c-myc y ciclinaD1 en líneas celulares de hepatocarcinoma celular humano, luego de un tratamiento con ciclopamina (cyclopamine) de 18-24hrs. Puede observarse una disminución superior al 50% en ambos casos. **B)** RT-PCR semicuantitativo muestra disminución en los niveles de mRNA de c-myc luego de tratamiento de 72 horas, en una línea celular derivada de meduloblastoma de un ratón *ptc1<sup>+/-</sup>*, *p53<sup>-/-</sup>*. **C)** Western-blot realizado con extractos de las células descritas en B. La cantidad de proteína de c-myc se ve reducida. **D)** Niveles de expresión de c-myc se ven significativamente disminuidos en líneas celulares de cáncer de próstata, en condiciones de pérdida farmacológica generada mediante incubaciones con el inhibidor ciclopamina.

Por último, en nuestro laboratorio en el contexto de una búsqueda de genes blanco de la vía de señalización de Shh/Gli en el desarrollo temprano de pez cebra (24-48hpf), se realizaron ensayos de microarreglos de embriones con pérdida de función farmacológica y genética de la vía de señalización. En

ellos fue posible identificar genes cuya expresión se ve alterada en condiciones de pérdida de función de la vía de Shh/Gli. Análisis estadísticos permitieron identificar un grupo de genes cuya expresión se reducía significativamente, entre los cuales se encontró el ortólogo de *c-myc* en pez cebra (*myca*) (Bergeron et al., 2008).

1.- Extracción de RNA



**Figura 7.** Diseño experimental de microarreglos de ARN usando embriones completos de pez cebra. Se utilizaron embriones en los estadios 24 y 48hpf, considerando la pérdida genética y farmacológica, y la ganancia de función, generada mediante la inyección de ARNm de *shh*.

Resumiendo, todos los estudios que han aproximado la vía de Shh/Gli y *c-myc* de manera indirecta han sido realizados en contextos de enfermedad o desarrollo alterado, siendo hasta el momento una incógnita la existencia o

inexistencia de regulación de la expresión de *c-myc* por la vía de Shh/Gli en el desarrollo. Tampoco se ha propuesto un mecanismo para explicar estas variaciones reportadas en la literatura, sin embargo los tiempos involucrados en estos experimentos hacen pensar que estas variaciones en expresión de *c-myc* pueden ser efectos colaterales de alteraciones de la vía Hh, no cambios mediados por unión directa de factores de transcripción Gli al promotor de *c-myc*.

## Hipótesis

"*C-myc* es un gen blanco de la vía canónica Shh/Gli en vertebrados, regulado transcripcionalmente de manera positiva por unión directa de factores de transcripción Gli a secuencias del promotor de *c-myc*."

## Objetivo General

Determinar si existe regulación de la expresión de *c-myc* por la vía canónica de señalización de Shh/Gli en el desarrollo del SNC de vertebrados.

## Objetivos específicos

### Objetivo específico 1

Determinar si alteraciones de la vía de señalización Shh/Gli afectan la expresión de *c-myc* en el SNC.

### Objetivo específico 2

Evaluar si existe unión de factores de transcripción Gli a regiones regulatorias del promotor de *c-myc*.

### Objetivo Específico 3

Determinar si estas regiones regulatorias son funcionales y capaces de regular la transcripción.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### **Material Biológico**

Los embriones de pez cebra, mutantes y silvestres, se mantuvieron a 28°C de acuerdo a protocolos establecidos (Westerfield, 2000). Las líneas mutantes que se utilizaron fueron "Slow-muscle omitted" (*smu*), con pérdida de función de *smoothened*, "you-too" (*yot*) con una forma dominante negativa de *gli2* y "detour" (*dtr*), con pérdida de función de *gli1* (Brand et al. 1996). Los mutantes se mantuvieron como heterocigotos y se realizaron cruzas para ser identificados por criterio morfológico (el eje del cuerpo curvo y somitos anormales). La edad de los embriones fue establecida mediante criterios morfológicos (pigmentación, ángulo de la cabeza respecto al resto del cuerpo, etc.).

Los embriones de ratón (*Mus musculus*) provenientes de las cepas C57 BL/6 y Balb C fueron utilizados en diferentes etapas de desarrollo embrionario, además de distintos días perinatales. Hembras en edad fértil se cruzaron con machos de fertilidad comprobada en condiciones controladas. A la mañana siguiente, se verificó la cópula mediante la presencia del tapón vaginal, definiéndolo como el día del desarrollo embrionario E= 0.5.

Se cumple con los protocolos de manipulación animal especificados por el comité de bioética de la Facultad de Ciencia publicados en el libro "Aspectos Bioéticos de la Experimentación Animal" (<http://www.conicyt.cl/documentos/bioetica19nov.pdf>).

### ***Síntesis de sondas RNA-digoxigenina***

Se digirieron 10 µg del clon del gen *c-myc* de pez cebra en pBluescript SK (-) con la enzima EcoRI, para el caso de la sonda antisentido, durante 3 horas a 37°C. Luego de la digestión, se agregó 1 vol de fenol:cloroformo, se mezcló y centrifugó. La fase acuosa fue precipitada con la adición de 1/10 vol de acetato de sodio 3M, pH 5,2 y 2,5 vol etanol. Luego de incubar toda la noche a -80°C, se centrifugó a 12000 rpm durante 20 min a 4°C y el sedimento, luego de ser secado al aire, se resuspendió en agua libre de RNAsas. Las sondas de cRNA fueron transcritas in vitro en presencia de digoxigenina-11-UTP. Se agregó al DNA plasmidial digerido (mínimo 1 µg) 1.2 µl de 10 mM ATP, 10 mM CTP, 10 mM GTP, 0.8 µl 10 mM UTP y 0.5 µl de 10 mM digoxigenina-11-UTP, 4 µl tampón de transcripción 5X (REF), 1 µl inhibidor de Rnasa (Rnasin) y 90 U de T7 RNA polimerasa. La polimerización se llevó a cabo durante 4 h a 37°C, luego de lo cual se adicionó 1 µl DNasa I libre de RNasa y se incubó por 30 min más. La cantidad de RNA sintetizado fue estimada por electroforesis en gel de agarosa al 1%, lográndose un rendimiento típico de 10 µg de RNA por cada 1 µg de DNA plasmidial inicial.

También se cuantificó la cantidad de RNA obtenida mediante espectrofotometría en un espectrofotómetro. El RNA sintetizado fue precipitado agregando 60  $\mu$ l de agua DEPC, 10  $\mu$ l LiCl 4 M y 250  $\mu$ l etanol absoluto. Después de incubar a  $-80^{\circ}\text{C}$  toda la noche, el RNA precipitado se centrifugó a 12000 rpm a  $4^{\circ}\text{C}$  en una centrífuga de mesón. El sedimento fue lavado con etanol al 80%, luego de lo cual se re-centrifugó y el sedimento fue finalmente resuspendido en tampón de hibridación (descrito más abajo).

Este proceso fue repetido para otras sondas utilizadas.

### ***Hibridación in-situ en embriones completos de pez cebra***

El corion fue retirado de embriones de diferentes estadíos de desarrollo, que luego fueron fijados en paraformaldehído (PFA) al 4% durante 2 horas a temperatura ambiente. Luego de 3 lavados con PBS, fueron deshidratados en metanol por 10 min a temperatura ambiente y los embriones fueron almacenados en metanol a  $-20^{\circ}\text{C}$ . En el momento de su uso, los embriones fueron rehidratados secuencialmente en: 75% metanol/25% PBS, 50% metanol/50% PBS, 25% metanol/75% PBS y PBST (PBS + 0,1% Tween 20), durante 10 min cada uno. Luego fueron tratados con proteinasa K, a una concentración de 10  $\mu\text{g/ml}$  durante 15 min por cada 24 h de desarrollo de los embriones. Se lavaron 3 veces por 5 minutos con PBST, para luego ser refijados en PFA durante 20 minutos a temperatura ambiente. Se realizaron posteriormente 5 lavados de 5 min cada uno con PBST, a temperatura

ambiente y se procedió a la prehibridación. Para ello, los embriones fueron lavados una vez con solución de hibridación (50% formamida, 5X SSC, 50 µg/ml heparina, 500 µg/ml tRNA de levadura *Thorula*, 0,1% Tween-20 y 84 mM ácido cítrico pH 6,0), la que fue reemplazada por solución fresca. Se prehibridó a 55°-65°C durante 4h, luego de lo cual la solución fue reemplazada por una que contenía la sonda marcada con Digoxigenina, previamente denaturada a 70°C por 5 min. La hibridación se realizó durante la noche a 60°C. Alternativamente, los embriones fueron guardados en tampón de hibridación a -20°C. Los embriones fueron posteriormente sometidos a una serie de lavados, a 55°-65°C, durante 10 min cada uno, en: 75% formamida/2X SSC, 50% formamida/2X SSC, 25% formamida/2X SSC y 2X SSC, para finalizar con 2 lavados en 0,2X SSC a 65°C por 30 min cada uno. Se procedió enseguida al bloqueo incubando los embriones a temperatura ambiente durante 5 min en tampón MAB (100 mM ácido maleico, 150 mM NaCl y 0,1% Tween-20) y por 1 h en MAB/BMB (MAB + 2% Boehringer-Mannheim Blocking Reagent + suero de oveja al 5%), para terminar con una incubación de 16-20 h (toda la noche) con el anticuerpo anti-Dig preabsorbido (1:2000) a temperatura ambiente. Se practicaron luego 5 lavados, de 20 min cada uno, con MAB y, posteriormente, 3 lavados de 5 min con tampón AP (100 mM Tris-HCl pH 9,5, 50 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 mM NaCl, 0,2% Tween-20 y 0,2% Triton X-100). Para el revelado, se incubó los embriones en el sustrato comercial para fosfatasa alcalina, BM purple (Boehringer-Mannheim) por el tiempo necesario para visualizar un precipitado

claramente distinguible de la señal inespecífica, a temperatura ambiente, luego de lo cual los embriones fueron lavados 2 veces por 5 min en PBST y re-fijados. En su defecto también se utilizó una mezcla de NBT/BCIP (Roche) en tampón AP para la reacción de fosfatasa alcalina.

### ***Bioinformática***

La primera parte del análisis consistió en analizar las secuencias río arriba de los promotores de *c-myc* en el caso del ratón y *myca* para pez cebra. Para esto, se obtuvieron las secuencias de ADN genómico 10kb río arriba del sitio de inicio de la transcripción a partir de la página web de Ensembl (<http://www.ensembl.org>), las que a fueron curadas manualmente en busca de secuencias de unión a Gli consenso. Luego se realizó una segunda curación en busca de secuencias similares al sitio de unión, que considerasen 2 o más mutaciones en algún nucleótido de la secuencia consenso. Adicionalmente, se utilizó el *software* Geneious (Biomatters, v4.8.5) para buscar secuencias que cumplieran con estos criterios.

Una vez identificadas las secuencias de interés, se diseñaron partidores para amplificar regiones que contuvieran estos sitios. Para esto se usó la herramienta en línea Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/input.htm>), con opciones por defecto. Para confirmar la identidad de las secuencias se realizaron simulaciones de las reacciones de PCR en el *software* SerialCloner ([http://serialbasics.free.fr/Serial\\_Cloner.html](http://serialbasics.free.fr/Serial_Cloner.html)), usando como templado la secuencia

de ADN genómico de 10kb río arriba del sitio de inicio de la transcripción del gen de ratón.

Para los alineamientos de genomas de múltiples especies, se usó la herramienta BLAT en la página web de Genome Browser de la Universidad de California Santa Cruz ([genome.ucsc.edu/](http://genome.ucsc.edu/)). La opción "múltiples vertebrados" y las comparaciones uno a uno fueron usadas.

### **Ligaciones**

Primero se diseñaron partidores para amplificar regiones específicas que contengan sitios de unión a gli (GliBS), detallándose 2 regiones (Tabla 2). Las reacciones se realizaron con GoTaq DNA polimerasa, siguiendo instrucciones del fabricante (Promega) en 25  $\mu$ l. Los fragmentos amplificados por PCR, para regiones del promotor de c-myc, fueron ligados mediante clonamiento T-A en el vector pBluescript SK(-). Cada mezcla de ligación contenía 67 mM Tris-HCl pH 7,8, 6,7 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM ditioneitol (DTT), 66  $\mu$ M ATP, 5 ng del fragmento de PCR correspondiente, 40 ng del fragmento proveniente de la digestión del vector pBluescript SK(-) y 5 U de T4 DNA ligasa, en un volumen total de 10  $\mu$ l. La ligación se llevó a cabo durante 16-20 h a 4°C. El producto de ligación fue transformado en bacterias *E. coli* quimiocompetentes DH5 $\alpha$ , y luego colonias picadas según presencia de inserto evaluada por selección azul/blanca en placas IPTG/X-Gal. Las colonias seleccionadas (un mínimo de 10 por ligación) fueron amplificadas y procesadas

por miniprep de DNA y sobre el DNA obtenido se realizaron digestiones tanto para linearizar como para liberar fragmentos clonados. Los fragmentos que contienen un GliBS poseen tamaños entre 195 y 201 pares de bases. El fragmento de -5.1-3.4kb contempla 1788 pb.

Adicional a esto, se realizaron reacciones de PCR con partidores internos del amplicón y externos (dentro del vector, bordeando el sitio de inserción) para confirmar la orientación del fragmento ligado.

### ***Preparación de explantes de tejido cerebral murino.***

Se prepararon explantes de tejido neural, obtenidos de la región parietal de la neocorteza de ratones en diferentes etapas del desarrollo embrionario (E15.5 y E18.5) de acuerdo a protocolo detallado en Dahmane et al., 2001.

Luego de remover las meninges, los explantes cerebrales se colocaron con la zona ventricular hacia abajo sobre filtros flotantes (Falcon cell culture inserts), en medio libre de suero (CMSF) Dulbecco's modified Eagle's medium-F-12, DMEM-F12 (Invitrogen), conteniendo Mito C (BD Biosciences), N2, B27, 200 mM L-glutamina y antibióticos (Invitrogen). Posteriormente se adicionó al medio de cultivo diferentes factores de crecimiento, como Shh (3ug/ml) o el inhibidor ciclopamina (10uM) de acuerdo al protocolo experimental (ver sección resultados) y los explantes se incubaron durante dos días a 37° C y 5% de CO<sub>2</sub>.

### ***Inmunoprecipitación de cromatina a partir de explantes de tejido cerebral murino.***

Se realizan 2 lavados con PBS a los explantes sembrados en placas de 24 pocillos o frescos. Luego se realiza un entrecruzamiento químico, por 10 minutos a 37°C. Para esto, se utiliza una solución de Formaldehído al 1% en PBS que contiene los inhibidores de proteasas Aprotinina, Pepstatina y PMSF, a 10 ug/mL, 5 ug/mL y 1 mM, respectivamente). Para detener el entrecruzamiento se añade glicina hasta una concentración final de 0,125M. Luego de dos lavados con PBS frío en hielo, las células se obtienen levantando la monocapa utilizando un raspador, y se resuspenden en 5 mL de PBS suplementado con inhibidores de proteasas, para luego ser centrifugadas a 1800 rpm a 4°C, durante 5 minutos. El precipitado de células es resuspendido en 3 mL de solución de lisis, que contiene Hepes pH 7,8 a 50 mM, MgCl<sub>2</sub> a 3mM, KCl a 20 mM y NP-40 al 0,1%; e incubado en hielo por 10 minutos. La resuspensión se somete a un homogenizador de vidrio (Kontes) por 20 repeticiones, utilizando el émbolo A, para luego centrifugar nuevamente en las mismas condiciones anteriores. El precipitado se resuspende en 900 uL de solución de sonicación, que es Hepes pH 7,8 a 50 mM, NaCl a 140 mM, EDTA a 1 mM, Tritón X-100 al 0,1%, deoxicolato de sodio al 0,1% y SDS al 0,1%; y suplementada con inhibidores de proteasas. El homogenizado resultante se sonica 15 veces durante 10 segundos, con una incubación en hielo de 30 segundos en la posición 3 (20%) utilizando un sonicador Misonix XL2020. El

extracto sonificado se centrifuga por 15 minutos a 14000 rpm, para luego obtener el sobrenadante. Treinta unidades arbitrarias de ADN y proteínas (1 unidad arbitraria = absorbancia de 0,02 a una longitud de onda de 260 nm) se utilizan para cada inmunoprecipitación, las que se llevan a 400 uL con solución de sonicación. Un 30% de muestra se reserva para utilizarlo como "INPUT" en comparaciones posteriores. La muestra se pre-aclara, utilizando 20 uL de esferas de agarosa mas proteína A o G (Santa Cruz Biotechnologies), durante 30 minutos con rotación constante a 4°C, para luego obtener el sobrenadante, después de una centrifugación de 20 segundos a 14000 rpm. Se agregan 2 ug de anticuerpo y se incuba a 4°C con rotación por toda la noche, para luego agregar 50 uL de esferas de agarosa mas proteína A o G e incubar en las mismas condiciones durante 45 minutos. Después de una centrifugación de 20 segundos a máxima velocidad, se recuperan las esferas, eliminando el sobrenadante. Este precipitado se lava sucesivas veces, mezclando por 5 minutos en rotación a 4°C, y centrifugaciones de 4000 rpm durante 10 minutos entre cada lavado. Se lava 2 veces con solución de sonicación, una vez con solución de cloruro de litio, que consiste en Tris pH 8 a 20 mM, LiCl a 250 mM, EDTA a 1 mM, Triton X-100 al 0,5% y deoxicolato de sodio al 0,5%; seguido por una solución de lavado IP, que es Tris pH 8 a 100 mM, LiCl a 500 mM, NP40 al 1% y deoxicolato de sodio al 1%. El ADN y proteínas se tratan con solución de elución, que consta de Tris pH8 a 50 mM, EDTA a 1 mM y SDS al 1%; a 65°C, durante 15 minutos, para luego centrifugar a 14000 rpm por 20

minutos y obtener el sobrenadante. A esta solución y paralelamente al "INPUT" se les agrega NaCl a 5M, hasta llegar a una concentración de 200 mM final y se incuban a 65°C por toda la noche para revertir el entrecruzamiento. Se agregan 10 ug de RNAsa (Fermentas) y 25 ug de proteinasa K, y se incuba 2 horas a 42°C. El ADN se recupera realizando una extracción orgánica mediante fenol y cloroformo, para luego precipitar utilizando etanol absoluto. El ADN precipitado se resuspende en 50 uL de agua, y se utilizan 5 uL (o diluciones equivalentes) para cada reacción de PCR.

### ***Cultivo de células C3H10T1/2***

Las células, obtenidas de American Type Culture Collection (ATCC) fueron cultivadas en medio DMEM-F12, suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS). Los cultivos se mantuvieron a 37°C en un incubador humidificado a y 5% de CO<sub>2</sub>. Se usaron células en pasajes 3 a 11.

### ***Subcultivo de células C3H10T1/2***

Para la mantención de las células, éstas fueron subcultivadas a 70-80% confluencia (2-3 días). Para estos efectos, el medio de cultivo fue aspirado de las placas, las que fueron luego lavadas dos veces con PBS estéril. Después de remover el PBS, se agregó sobre las células una solución de 0,25% tripsina y 10 mM EDTA en PBS, en una relación de 0,5 ml por cada 25 cm<sup>2</sup> de superficie de cultivo. Las placas se incubaron de esta manera por 5 min a 37°C

o hasta que prácticamente todas las células se encontraran en suspensión, luego de lo cual la tripsina fue inactivada con la adición de 1 ml de FBS por cada 0,5 ml de solución de tripsina. Las células fueron resuspendidas en forma homogénea mediante sucesivas aspiraciones y expulsiones de la suspensión. Estas fueron divididas y sembradas en placas según lo requiriera el experimento, sobre lo cual se agregó el volumen restante de medio fresco y se colocaron las placas de regreso en la incubadora a 37°C.

### ***Transfección de células C3H10T1/2***

La transfección para células C3H10T1/2 se realizó, en cultivos de un 60% de confluencia, a los que se les agregó una mezcla de el ADN a internalizar y Lipofectamina 2000 en Optimem (Invitrogen). Las cantidades de DNA y agentes de transfección varían según la superficie en la que se encuentren las células a transfectar. El escalamiento según el material de cultivo a utilizar se detalla en las instrucciones del fabricante. La incubación con los liposomas se mantuvo por 4-5 horas, para luego cambiar por DMEM con 10% de FBS, por 48 horas.

### ***Cultivo de precursores granulares cerebelares***

Se usaron ratones C57BL/6, la madre se sacrificó por dislocación cervical, luego de lo cual se practicó una incisión en el abdomen y se procedió a retirar los cuernos uterinos con los embriones.

Los cerebros de los embriones fueron diseccionados en medio HBSS suplementado con glucosa, el cerebelo fue extirpado y las meninges retiradas usando un par de pinzas Dumont N°5. Los cerebelos se colocaron en un mismo tubo y fueron tratados con 1ml de tripsina-EDTA al 0.05% por 12 minutos en baño a 37°C, agitando cada 2 minutos. Luego se agregó 1 ml de SBF, se retiró el medio y se agregó 1 ml de HBSS+glucosa, procediendo a disociar el tejido mediante reiteradas aspiraciones con una micropipeta. Se centrifugó por 5 mins a 1000g y el pellet fue resuspendido en 2ml de DMEM-F-12 suplementado con B27 (Gibco), 10% FBS, KCl 25mM y penicilina-estreptomicina. Estos 2 ml se agregaron a una placa de 35 mm, recubierta previamente con poli-o-lisina, y se incubaron 20 min en la incubadora a 37°C con 5% CO<sub>2</sub>. Pasados los 20 min, se le dan algunos golpes suaves a la placa para terminar de desprender las células débilmente adheridas, las que corresponden a los progenitores granulares del cerebelo.

Se plaquearon  $1,5 \times 10^5$  células/cm<sup>2</sup> en placas Labtek de 8 pocillos o  $6 \times 10^5$  células en Labtek de 2 pocillos, recubiertos previamente con poli-DL-ornitina durante al menos 4 h, seguido de al menos 1 h de incubación con laminina.

### ***Inmunofluorescencia en precursores granulares cerebelares***

Las células fueron fijadas con paraformaldehído 4% en PBS (fresco), durante 20 minutos (2 incubaciones de 10 min). Posteriormente se realizaron

tres lavados de 10 minutos con PBS y se permeabilizó con PBS-Tritón 0,1 % por 5 min. El bloqueo se realizó con PBS-Suero de cabra al 10%, por 1 hora. Luego, las células se incubaron con los respectivos anticuerpos primarios durante toda la noche, a 4°C en cámara húmeda. Al día siguiente se realizaron tres lavados de 10 min. con PBS-Tritón 0,1 % para luego incubar durante 1 hora con los anticuerpos secundarios correspondientes acoplados a fluoróforos en el caso de la inmunofluorescencia. Finalmente los núcleos celulares fueron teñidos con DAPI 1:10.000, durante 5 minutos y visualizados utilizando un microscopio confocal (LSM 510, Zeiss) y/o de epifluorescencia (Axiovert 200, Zeiss).

Se consideraron 5 planos por cada experimento, contabilizando las células Gli1+ y las células C-myc+. Los conteos obtenidos fueron analizados para determinar relevancia estadística mediante una prueba t- de Student.

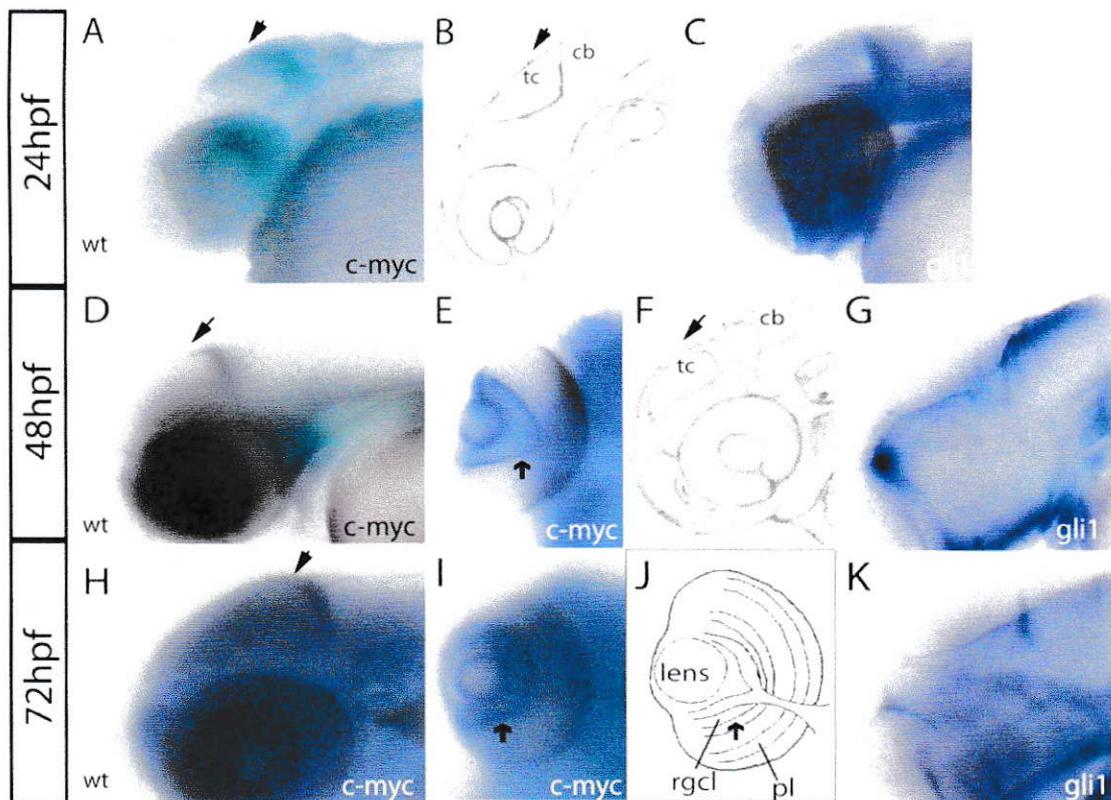
Partidor	Secuencia
Gli1-F	GCTGCCTATAGCCAGTGTC
Gli1-R	GAAGCAGGTGCAAAGCCAG
Cmyc-F	GCCCCTAGTGCTGCATGAGA
Cmyc-R	CCACAGACACCACATCAATTTCTT
Gapdh-F	ACCACAGTCCATGCCATCAC
Gapdh-R	TCCACCACCCTGTTGCTGTA
Hprt-F	CCTGCTGGATTACATTAAAGCACTG
Hprt-R	GTCAAGGGCATATCCAACAACAAAC
4.8kb.cmycM-F	TCAGGACAGTCAGGGAAACC
4.8kb.cmycM-R	GAACGGTCATCCTTGAGACG
5.9kb.cmycM-F	GATGTGCCTGGACTTTACCG
5.9kb.cmycM-R	GTGATCCCTTCCCATACTGC
7.0kb.cmycM-F	TGCACACACAGGAGGAACAT
7.0kb.cmycM-F	GGGACATTGACCAACAGGAG
distal.cmycM.F	ACTAGTGGGGGGCTCTTTGAAGCATGCA
distal.cmycM.R	CCCGGGGCGGAATAGCCTGTGGTT

**Tabla 3.** Partidores utilizados para reacciones de RT-PCR y amplificación de regiones del promotor de c-myc de ratón (ChIP y constructos reporteros).

## RESULTADOS

### ***Expresión de c-myc durante el desarrollo del SNC de embriones de pez cebra.***

Tomando en consideración los resultados obtenidos en los ensayos de microarreglos, se caracterizó en detalle el patrón de expresión de *c-myc* en el desarrollo normal del embrión de pez cebra. Los estadios considerados para esta descripción fueron 24, 48 y 72 horas post-fertilización (hpf), debido a la activa neurogénesis que tiene lugar en el cerebro dorsal del pez cebra en estos estadios. Esta neurogénesis es dependiente de la vía de señalización Shh/Gli en los estadios 30-48hpf, por lo que el estadio elegido para el análisis detallado fue 48hpf.



**Figura 8.** Expresión de *c-myc* en el SNC embrionario de pez cebra. A) Expresión en estadio 24 hpf. El tectum óptico se encuentra indicado con una flecha. D) Expresión en el estadio 48 hpf. E) Detalle de la expresión en el ojo, capa granular indicada con una flecha. H) Expresión en el estadio 72 hpf. I) Detalle de expresión en el ojo, capa granular indicada con una flecha. C, G, K) Expresión de *gli1* en los estadios arriba descritos. B, F, J) Esquemas de vistas laterales de pez cebra (Adaptado de Westerfield, 2001)

La expresión de *c-myc* ya es detectable por hibridación *in-situ* a las 24 hpf, donde se puede observar mRNA en territorios del tectum (Fig. 8A, cerebro medio dorsal) y del itsmo (límite entre el cerebro medio y posterior). También se observa señal en la retina del ojo y en territorios más anteriores del cerebro. También es posible detectar el mensajero del gen en el páncreas y los somitos

más caudales, tal como se encuentra descrito en la literatura (Weiner et al., 2007).

En el estadio 48 hpf continúa detectándose *c-myc* en estos territorios, con un patrón más discreto pero dentro de las mismas regiones del SNC. Una vista lateral (Fig. 8D) muestra presencia del mensajero en la zona más caudal del tectum. El páncreas continúa mostrando fuerte expresión mientras la marca en los somitos se encuentra ausente y se detecta señal en las aletas pectorales. En el estadio 72 hpf, la expresión en el tectum posterior continúa presente (Fig. 8H, flecha negra), detallándose también el transcrito presente en el ojo (Fig. 8I). Estos dominios en el SNC coinciden con territorios de expresión de *gli1*, el principal componente activador de la vía de señalización de Shh/Gli (Fig. 8C, G, K) que ha sido reportado como principal mediador de la función activadora de la vía de señalización de Shh/Gli.

Para comprobar si acaso existe una regulación de *c-myc* por la vía de Shh/Gli, el siguiente paso fue evaluar el fenotipo de la pérdida de función de la vía mediante el uso de líneas mutantes para *smoothened (smo)*, *gli1 (dtr)* y un dominante negativo para la proteína *gli2 (yot)*. En el caso del mutante *smo* la vía presenta una pérdida de función a nivel de componente de membrana, lo que conlleva una pérdida de la función de los factores de transcripción gli, tanto represores como activadores. El caso del mutante *dtr* y el dominante negativo *yot* son pérdidas de función de sólo uno de los factores de transcripción.

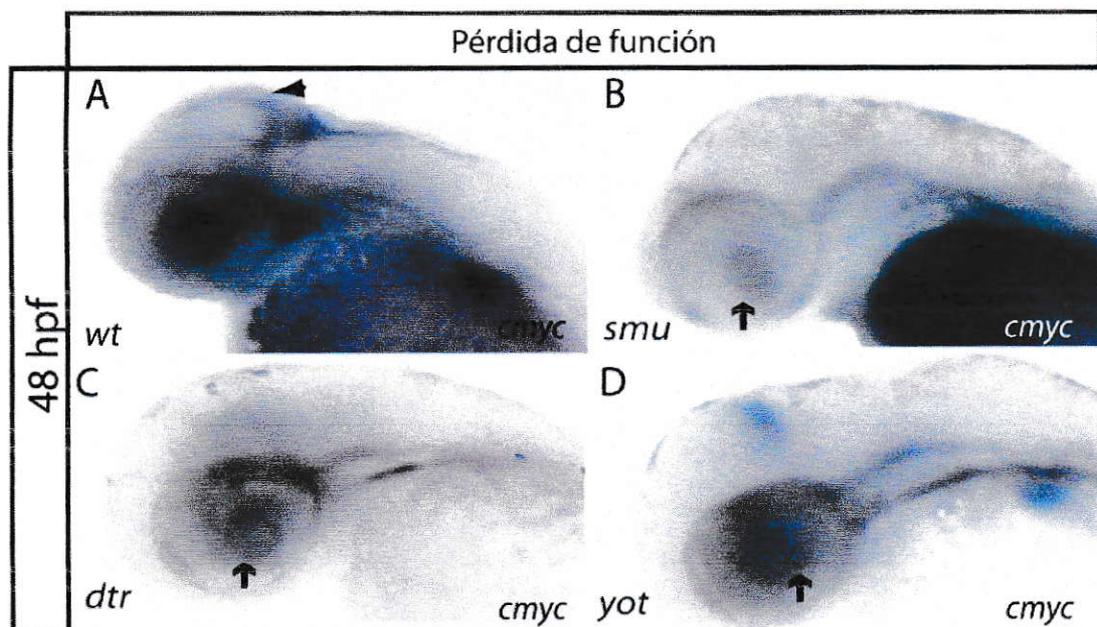


Figura 9. La expresión de *c-myc* se ve reducida en pérdida de función genética de la vía de Shh/Gli. A) Expresión de *c-myc* en condiciones control. B) Ausencia de expresión de *c-myc* en territorios del SNC dorsal y el ojo (flecha negra), en el mutante *smoothened*. C) Ausencia de transcrito de *c-myc* en el mutante *detour* (*dtr*) en los mismos territorios del SNC vistos para el mutante *smoothened*. D) El mutante *you-too* (*yot*) presenta una reducción en la expresión de *c-myc* en territorios del SNC.

En el estadio 48hpf, la ISH del mutante *smu* permite observar la completa ausencia del producto génico de *c-myc* en las zonas observadas en el control excepto en la retina, donde se ve expresión remanente (Fig. 9 A y B, flecha). Un efecto parcial puede observarse para los otros 2 mutantes de la vía analizados, haciendo notar el fenotipo menos severo del pez *yot* comparado con el pez *dtr* (Fig. 9 C y D) evaluado por expresión. Esto podría deberse al carácter de dominante negativo de la línea *yot*, lo que podría determinar una menor efectividad de la pérdida de función en comparación con una pérdida genética total como en el caso del mutante *dtr*.

Estos experimentos de pérdida genética revelan una relación entre la expresión de *c-myc* en 48hpf y la actividad de la vía Shh/Gli en embriones de pez cebra. Recientemente nuestro laboratorio a reportado que los niveles de proliferación en el tectum de pez cebra disminuyen en estos mutantes de la vía (evaluado por marcaje con histona 3 fosforilada, H3-P, marcador del ciclo celular), luego la expresión reducida no es consecuencia de una ausencia de células proliferativas ni de inexistencia del tejido analizado (Feijóo et al., 2011).

### ***Análisis regiones regulatorias de c-myc en genomas de pez cebra y ratón***

Buscando el sustrato estructural de esta regulación que ejerce Shh sobre *c-myc*, realizamos un análisis informático del promotor de *c-myc*, en los genomas de pez cebra y de ratón. El análisis se centró en 2 aristas principales: la presencia de sitios de unión consenso a Gli (GBS) en regiones proximales (inferior a 10kb río arriba) al sitio de inicio de la transcripción y la conservación de dichos sitios en un contexto inter-especies.

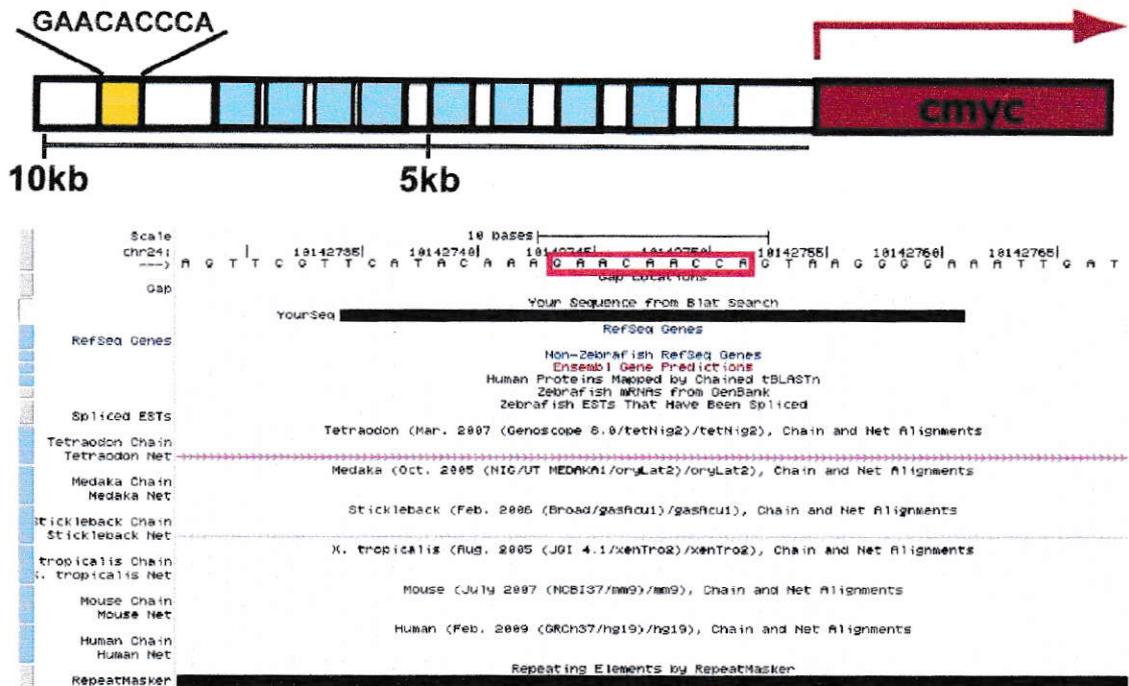


Figura 10. Análisis de region 5' río arriba del gen *c-myc* en pez cebra. Cajas celestes denotan secuencias similares a sitios de unión a Gli. Caja amarilla representa sitio de unión consenso (GAACACCCA).

La búsqueda arrojó la presencia de un único sitio de unión a Gli en esa región, que contiene un cambio puntual respecto al sitio consenso humano, lo que ya se encontraba previamente reportado para el sitio de unión a Gli en ratón (GAACAACCA, base diferente subrayada). Además se encontraron variedad de secuencias similares a sitios de unión a Gli (13 en total), con 2 o más mutaciones dentro de la secuencia con respecto al gliBS consenso. Al comparar con genomas de otros vertebrados ya secuenciados, mediante la herramienta de la Universidad de California Santa Cruz (UCSC Genome Browser), no se observa ninguna conservación dentro de la región del potencial



considerados (Fig.11C). Un tercer sitio consenso se encontró a -7,0kb, más este no presenta conservación más allá de la comparación con el genoma de rata (FIG11D).

Ninguna de las 2 comparaciones arrojó conservación de regiones de más de 50 pares de bases adyacentes, Esto permite plantear la existencia de una presión evolutiva selectiva sobre esas secuencias de unión, ya que se han mantenido prácticamente sin cambios pero rodeados por secuencias de baja conservación. Esta presión podría ser funcional, por lo que evaluar la unión y/o actividad de proteínas Gli en estos sitios se vuelve relevante.

Considerando la relación de *c-myc* con el ciclo celular y la existencia de una gran conservación evolutiva de los sitios de unión en el genoma de ratón, el siguiente paso fue evaluar la expresión de *c-myc* y la unión de proteínas Gli a secuencias regulatorias del mismo, en un contexto proliferativo del cerebro embrionario de ratón.

### ***Inmunoprecipitación de cromatina para proteínas Gli en corteza embrionaria de ratón***

Para poder evaluar si efectivamente existe unión de proteínas Gli a estos sitios, se realizó una inmunoprecipitación de cromatina contra las proteínas Gli1 y Gli3. El razonamiento detrás de esta elección es evaluar la unión de un factor Gli principalmente activador y otro mayoritariamente

repressor a dichas secuencias. Ésta se realizó en explantes de neocorteza embrionaria E18.5, en activo crecimiento dependiente de la vía de Shh/Gli (Palma & Ruiz i Altaba 2004).

Se analizaron diversos sitios de unión: de ahora en adelante se utilizará la nomenclatura de sitios según su posición relativa a los sitios de inicio de la transcripción en el genoma de ratón. Se diseñaron partidores específicos para cada uno de los abajo mencionados (Tabla 2), considerando una secuencia amplificada de tamaño no mayor a 300pb. Cada una de estas secuencias contiene sólo una secuencia putativa de unión a Gli.

Una vez realizada la inmunoprecipitación y habiendo obtenido el ADN genómico donde se encontraban proteínas Gli unidas, se procedió a ensayar si alguna de las regiones amplificadas por los partidores se encontraba enriquecida. Para los sitios 7.0kb y 4.8kb no se presentó enriquecimiento en las muestras analizadas, comparadas con el control de inmunoprecipitación inespecífica (IgG) (Fig. 12 y 13).

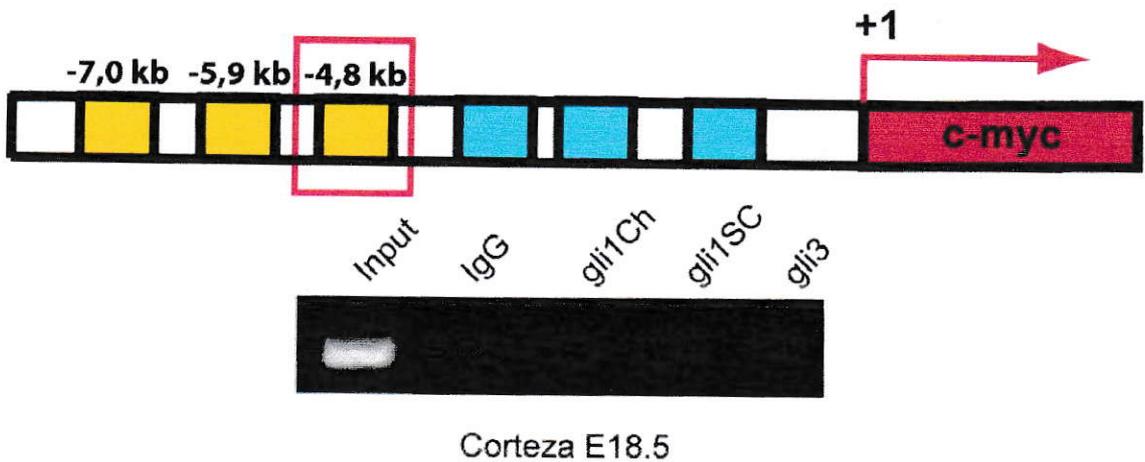


Figura 12. Inmunoprecipitación de cromatina para proteínas Gli en regiones regulatorias en el promotor de c-myc, región -4.8kb. Gli1Ch (Chemicon) y Gli1SC (Santa Cruz).

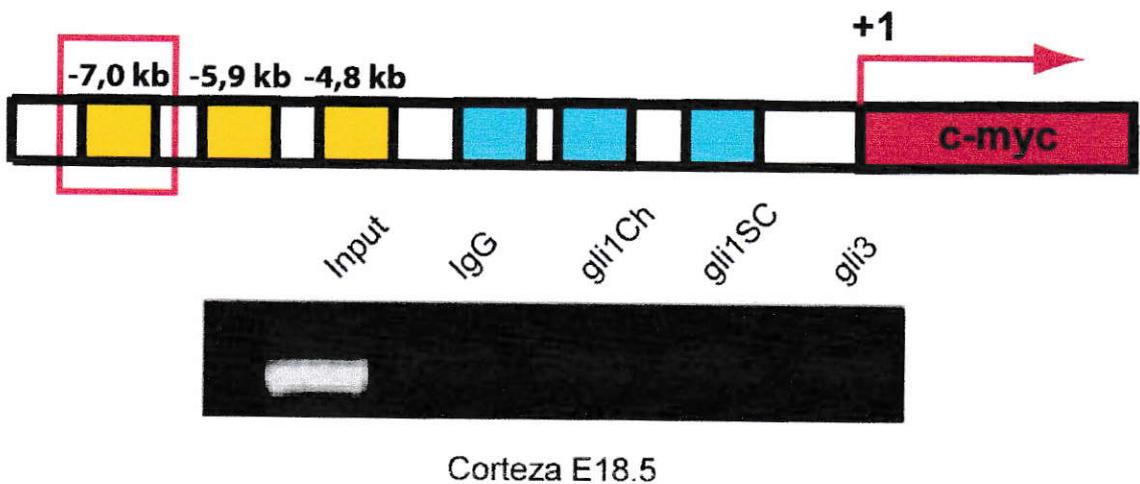
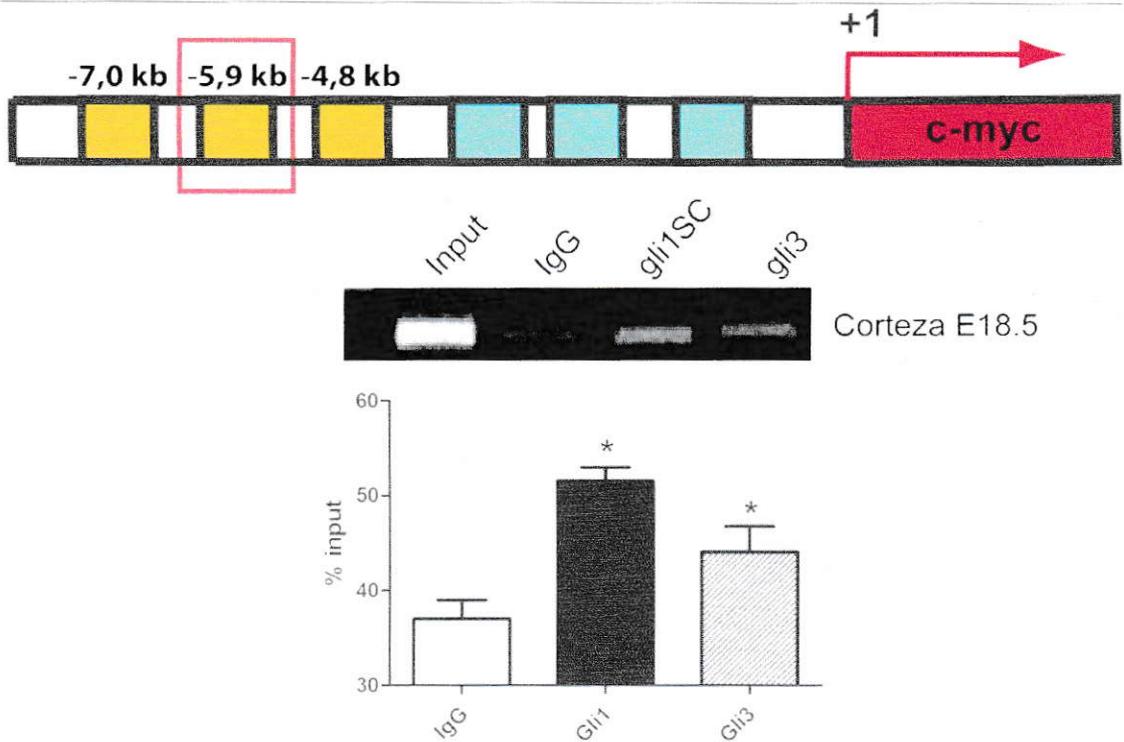


Figura 13. Inmunoprecipitación de cromatina para proteínas Gli en regiones regulatorias en el promotor de c-myc, región -7.0kb. Gli1Ch (Chemicon) y Gli1SC (Santa Cruz).

Para el sitio 5.9kb, sin embargo, sí se observa un enriquecimiento en la secuencia superior a un 10% respecto al control, lo que indica una asociación de proteínas Gli (gli1 y gli3, específicamente) a dicha secuencia en las condiciones ensayadas (n=3). Esta diferencia es significativa para todos los casos analizados y se grafica en la Fig. 14.

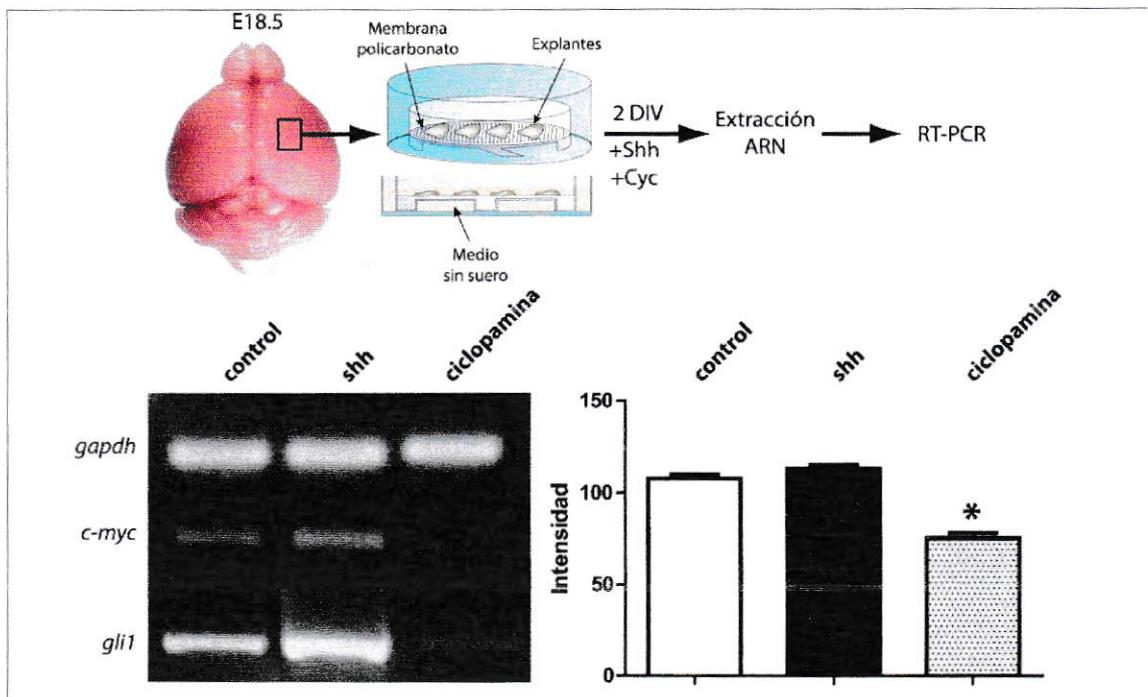


**Figura 14. Inmunoprecipitación de cromatina contra proteínas Gli, amplificando regiones regulatorias en el promotor de c-myc, a una distancia de 5.9kb río arriba. Existe enriquecimiento de esta secuencia regulatoria para Gli1 y, en menor medida, para Gli3 (n=3, p<0.05)**

***Pérdida de función farmacológica de la vía Shh/Gli reduce la expresión de c-myc en explantes de corteza embrionaria.***

Para poder evaluar la posible respuesta a estímulos de la vía de la expresión del gen en los contextos arriba descritos, se procedió a realizar experimentos en explantes de tejidos de corteza embrionaria en el estadio E18.5. Una vez disectados los explantes, estos fueron sometidos a tratamientos con proteína Shh recombinante (3ug/ml) o con el inhibidor farmacológico ciclopamina (10uM) durante 48 hrs.

Los explantes tratados muestran una variación en los niveles de mRNA de *c-myc* en tratamientos con ciclopamina. Cabe destacar que el caso contrario, de ganancia de función mediante adición de proteína Shh recombinante, no tiene el efecto opuesto de incrementar la expresión de *c-myc* (Fig.15).



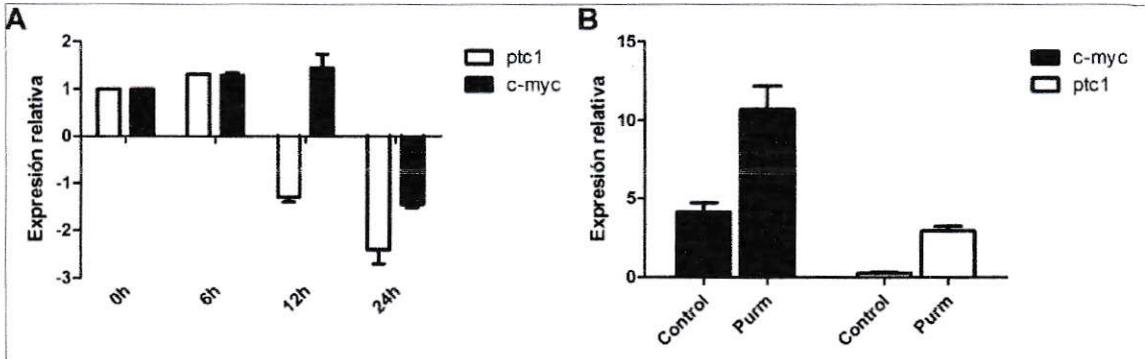
**Figura 15.** Tratamientos con ciclopamina reducen los niveles de expresión de *c-myc* en explantes de corteza de embriones de estadio E18.5. Tejidos tratados fueron incubados durante 2 días en presencia del inhibidor o de la proteína recombinante.

## ***Pérdida y ganancia de función farmacológicas de la vía Shh/Gli afectan la expresión de c-myc en una línea celular que responde a Sonic hedgehog***

Para caracterizar en mayor detalle el efecto observado con la pérdida de función en los explantes de cerebro embrionario, se ensayaron tratamientos farmacológicos en una línea celular con capacidad de respuesta a la vía de Shh/Gli. Estos fibroblastos expresan los componentes de la vía y son un modelo *in-vitro* ampliamente utilizado para estudiar la vía de señalización Shh/Gli (Kinto et al., 1997; Murone et al., 1999). Se ensayaron distintos tiempos de incubación con ciclopamina, para evaluar el curso temporal de la alteración en la expresión de *c-myc*. Una vez transcurrido el tiempo indicado, se extrajo el RNA total de las células y se realizaron ensayos de RT-PCR en tiempo real (qPCR). Los análisis se realizaron a las 6, 12 y 24 horas de tratamiento.

Se observó que los niveles de mRNA de *c-myc* se mantienen inalterados durante las primeras 12 horas de tratamiento, más se reducen a menos de la mitad luego de 24 horas de tratamiento (Fig. 16A). El comportamiento del control positivo experimental (*ptc1*, gen blanco de la vía de señalización) se correlaciona muy bien con este tiempo, ya que sólo después de 12 horas de incubación se observa una disminución en los niveles de transcrito del gen *ptc1* (Fig. 16A). Esta cinética de cambios en la expresión ya ha sido reportada en nuestro laboratorio, donde *ptc1* varía a las 12 horas y luego se observa una variación en otros genes blancos (validados por aproximaciones

independientes) a las 24 o 48 horas (Manuscrito en preparación, Milla *et al*). La diferencia podría estar dada por el contexto genómico de los promotores de los genes.

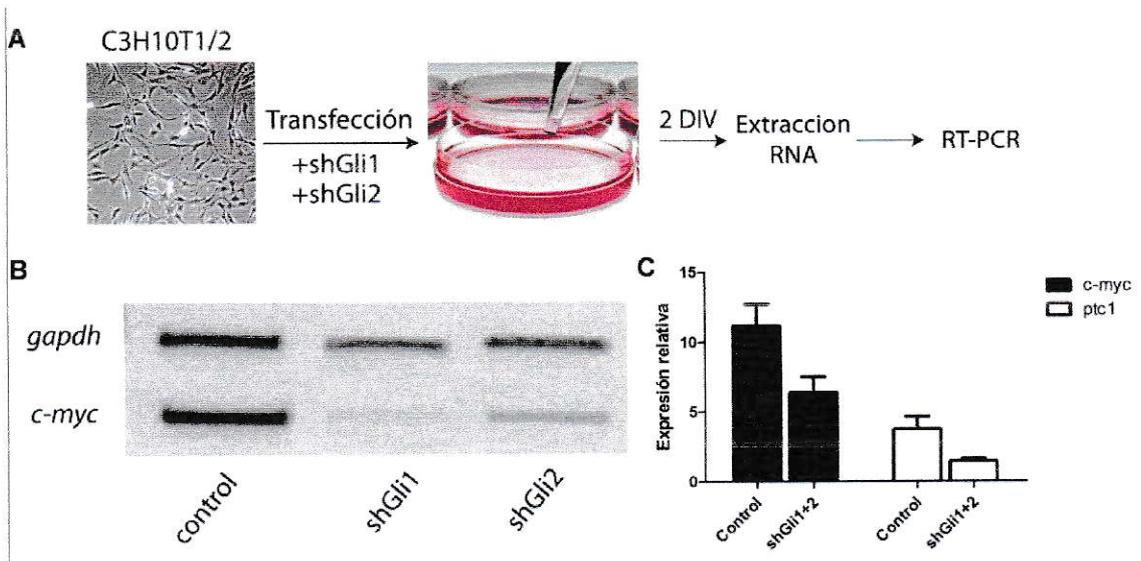


**Figura 16. Pérdida y ganancia de función farmacológica de la vía Shh/Gli afectan la expresión de c-myc.** A) Tratamientos con ciclopamina a 0, 6, 12 y 24 horas disminuyen la expresión de c-myc en la línea celular C3H10T1/2. B) Ganancia de función de la vía Shh/Gli aumenta los niveles de transcrito de c-myc, a las 48 horas posteriores al inicio del tratamiento.

Generando ahora una ganancia de función mediante el tratamiento con purmorfamina (un agonista de Smoothened), las células se incubaron durante 48 horas con el fármaco y luego se extrajo el RNA total. Análisis de qPCR revelaron un aumento del mRNA de *c-myc* al doble (Fig.16B). La expresión de *c-myc* en este tipo celular al parecer es sensible a activación por la vía de Shh, contrario al caso de las células en la corteza embrionaria E18.5. Esto podría deberse a que la regulación positiva por la vía de señalización ya se encuentra en su nivel máximo en las células de la corteza, por lo cual un tratamiento con ligando activador no genera un aumento en los niveles de transcrito.

**Pérdida de función de proteínas Gli mediante uso de shRNA reduce la expresión de c-myc in-vitro.**

Como paso siguiente, aprovechando la disponibilidad de constructos de expresión de small-hairpin RNAs (shRNA), se transfectaron células C3H10T1/2 con 2 constructos que permiten la expresión de shRNA contra los productos génicos de gli1 y gli2, individualmente. Luego de 48 horas post-transfección, se procedió a extraer el RNA completo de los cultivos y se realizaron los análisis.



**Figura 17. Pérdida de función de proteínas Gli reduce expresión de c-myc en células CH310T1/2.** A) Diagrama de flujo experimental. B) mRNA de c-myc se ve reducido, evaluado por RT-PCR. C) Se detectan menores niveles de mRNA por qPCR siguiendo el mismo protocolo experimental.

En la Fig. 17 se muestran los productos de reacciones de PCR resueltos en un gel de agarosa al 2%. Puede observarse una disminución en los niveles de transcrito de *c-myc*, de mayor magnitud en el caso de *gli1* y menor en el

caso del shRNA de *gli2* (Fig.17B). Es necesario considerar que la efectividad del shRNA contra Gli1 es mayor que la efectividad del shRNA contra Gli2.

Para confirmar este resultado semi-cuantitativo se realizaron experimentos de qPCR sobre muestras generadas mediante transfección ahora de ambos constructos de expresión de shRNAs, en los que se observa una reducción de un 50% en la cantidad de transcrito de *c-myc* (Fig. 17C).

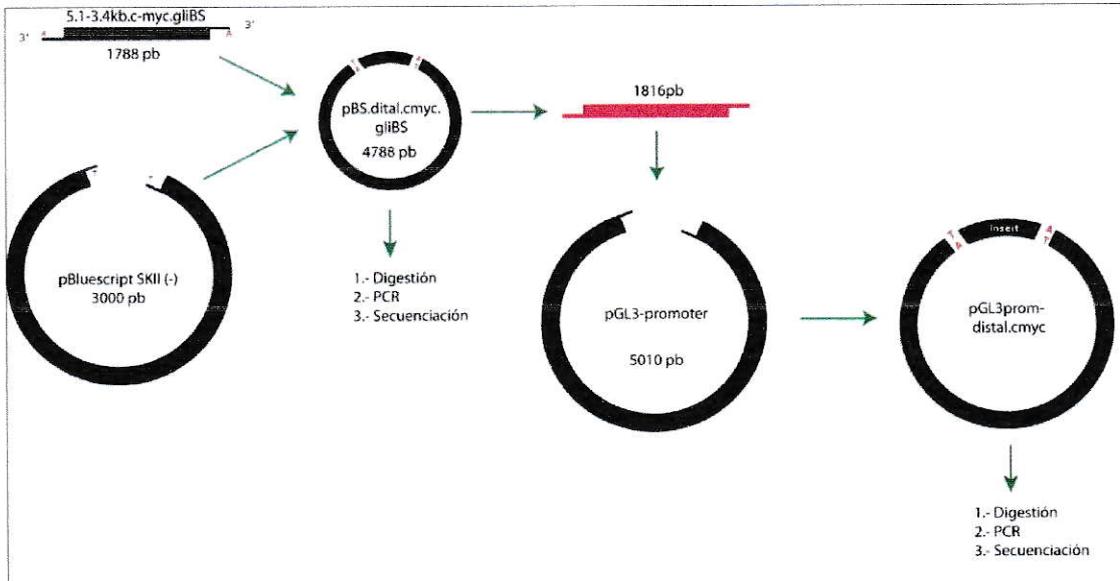
En conjunto, estos experimentos hablan no sólo de una regulación de la expresión de *c-myc* por la vía de Shh, sino también de un efecto específico mediado por proteínas Gli y adicionalmente un requerimiento de proteínas Gli para mantener la expresión de *c-myc*.

***Regiones de unión a Gli validadas en corteza embrionaria de ratón no generan una respuesta transcripcional in-vitro, en la línea celular C3H10T1/2.***

Existiendo unión de proteínas Gli al menos a una secuencia del promotor (5.9kb río arriba, Fig.14) y, considerando el efecto de la pérdida de función específica de las proteínas Gli sobre la expresión de *c-myc*, falta aún por abordar la suposición de que dicha secuencia es capaz de mediar la expresión de genes, *c-myc* en este caso.

En primera instancia se clonó una región que abarca desde aproximadamente -3.4 kb hasta -5.1kb del promotor de *c-myc*. Esta fue

utilizada para generar un constructo reportero luciferasa que permite evaluar su capacidad de modificar transcripción en un modelo *in-vitro* de respuesta a la vía de Shh/Gli.

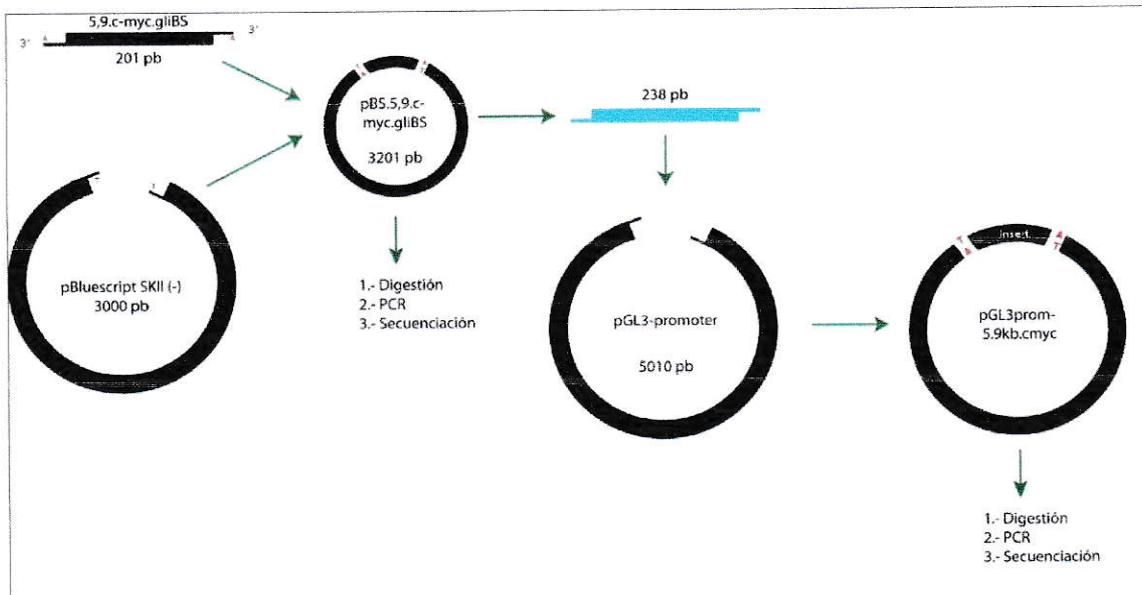


**Figura 18. Estrategia de clonamiento de plásmido reportero, involucrando región 5.1-3.4kb (denominada como “distal”).** Fragmentos amplificados por PCR fueron seleccionados por criterio de tamaño y ligados con el vector pBluescript SKII. El éxito de la misma se confirmó por patrón de digestión, amplificación con partidores internos del inserto y secuenciación. El producto digerido fue ligado a su vez con el vector de expresión reportero, río arriba de un promotor mínimo SV40 mediante expresión de luciferasa.

Como control positivo se utilizó el constructo GBS-Luc (gliBS), que contiene 8 copias de un sitio funcional de unión consenso a factores Gli río arriba de un promotor mínimo acoplado a luciferasa, que responde fuertemente a activación por factores Gli (Sasaki et al., 1997). Como control negativo se transfectó una forma mutada del constructo reportero gliBS-Luc (gliBSmut) que sólo presenta actividad del promotor mínimo sin regulación mediada por

proteínas Gli ya que los sitios de unión han sido inactivados mediante sustitución de bases.

Comparando los niveles de luminosidad cuantificados, no se observan variaciones en los niveles de luminosidad al transfectar el plásmido reportero en conjunto con vectores de expresión para las proteínas Gli1 y Gli2 (Fig. 20).



**Figura 19. Estrategia de clonamiento para sitio 5.9kb río arriba del sitio de inicio de la transcripción de c-myc.** La estrategia fue la misma que la usada para el constructo anterior, excepto por la amplificación de una región más pequeña, de 201 pares de bases.

Adicionalmente, el sitio de unión -5.9kb del promotor de c-myc también fue clonado en un vector reportero luciferasa (Fig.19), pero en este caso tampoco se vieron diferencias al co-transfectar con vectores de expresión de gli1 y gli2 (Fig.20).

Estos experimentos se realizaron en condiciones de bajo suero, para permitir evaluar la ganancia de actividad de la vía Shh/Gli. Esta salvedad se considera debido a que el medio enriquecido en suero en que crecen estas

células (10% suero) activa en gran medida la vía de Shh/Gli, lo que genera un aumento del ruido en las mediciones de actividad luciferasa en los cultivos.

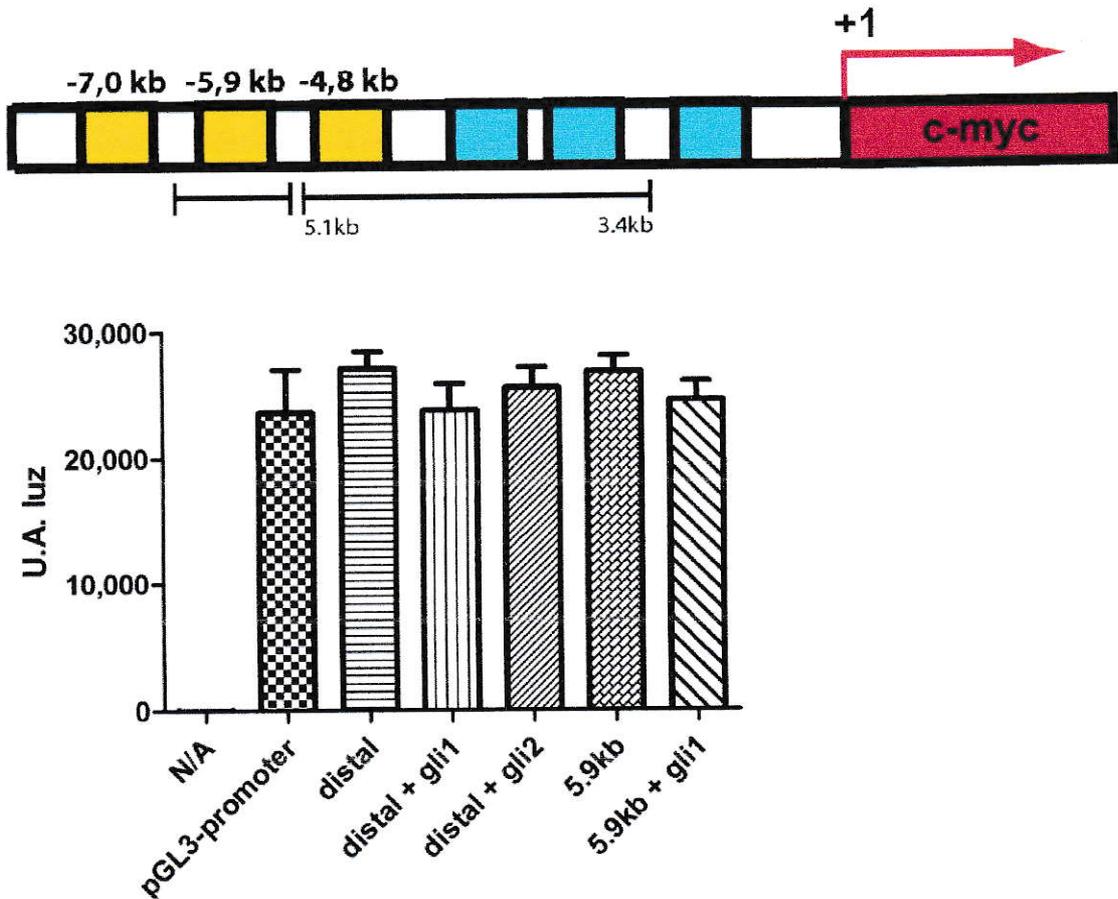


Figura 20. Ensayos de luciferasa para regiones regulatorias “distal” (-5.1-3.4kb) y 5.9kb del promotor de c-myc de ratón. Las células transfectadas fueron mantenidas por 48 hrs post-transfección y luego lisadas para medir actividad luciferasa.

Estos resultados establecen que pese a existir unión de proteínas Gli *in-vivo* en la corteza embrionaria, estos sitios no son capaces por sí solos de inducir expresión del reportero. Algunas posibles explicaciones para esto serían que los sitios requirieran de sinergia con otras secuencias para poder tener efecto sobre la transcripción o que simplemente esta unión no fuese

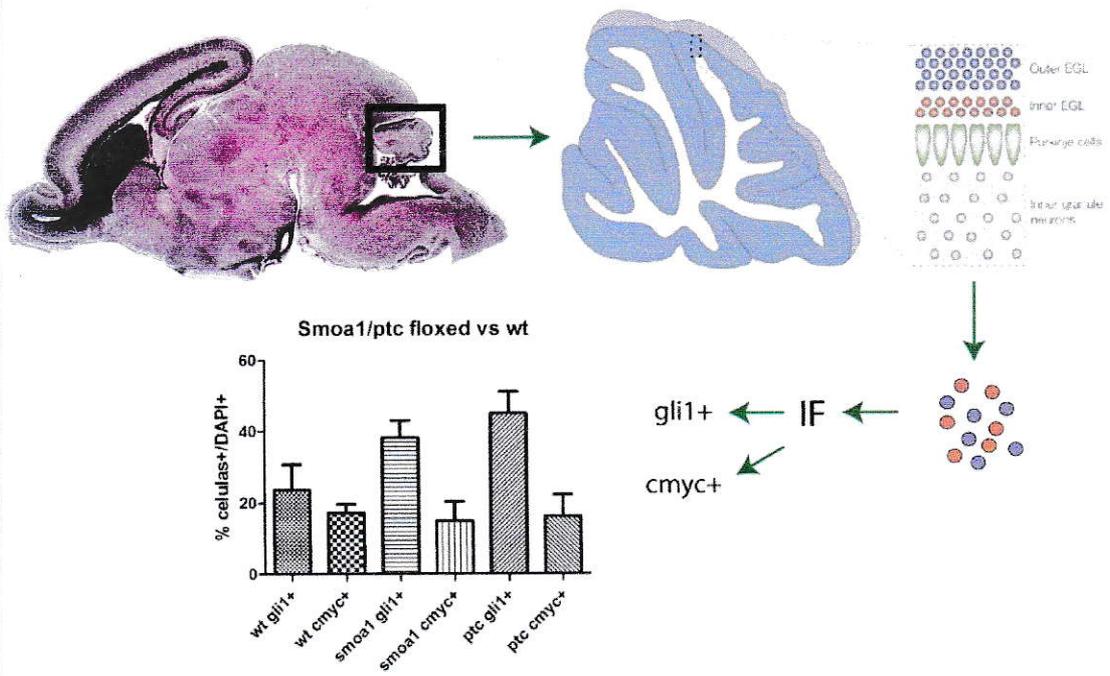
funcionalmente activa. La existencia de un sitio de regulación negativa dentro de las secuencias clonadas es una posibilidad también.

***El número de células c-myc positivas no se ve afectado en modelos de meduloblastoma, ganancia de función de la vía de Shh/Gli***

Se buscó mirar la relación entre Shh y c-myc en el contexto de la enfermedad. Para esto el modelo escogido fue el meduloblastoma, un agresivo tipo de cáncer infantil del SNC que afecta el cerebelo y cuyo origen (en un alto porcentaje de los casos) involucra ganancia de función de la vía Shh/Gli.

Existiendo una fuerte expresión de c-myc en los precursores granulares cerebelares en estadios postnatales tempranos (Ruppert et al., 1986), se tomaron ratones postnatales de 7 días de edad (P7) y se realizó un cultivo primario de estas células (en activa proliferación en respuesta a Shh, ver Introducción). En la figura 21 se diagrama el protocolo seguido tanto para cerebros con tumores como para cerebros controles de la misma camada.

No se observaron diferencias significativas en el número de células c-myc positivas (Fig.21), evaluado por inmunofluorescencia. Sí se observó un aumento del número de células gli1 positivas, concordante con la ganancia de función en tejidos del cerebelo postnatal.



**Figura 21. Número de células c-myc positivas se mantiene constante en modelos de ganancia de la vía Shh/Gli en el cerebelo postnatal.** A) Esquema del protocolo experimental. B) El número de células c-myc positivas no se ve alterado en precursores granulares del cerebelo en estadio P7.

## DISCUSIÓN

El objetivo del presente trabajo, la validación de genes blanco de la vía de señalización Shh/Gli, ha cobrado particular relevancia en los últimos años, debido a la variedad de procesos (y defectos asociados) que ésta regula durante el desarrollo embrionario y adulto. El hecho de que algunos de estos genes puedan ser considerados pivotaes para el normal desarrollo embrionario y su relación con la vía Shh/Gli genera un interés adicional.

La comprensión actual de la vía presenta el dogma de que las proteínas Gli deben unirse a sitios relativamente conservados dentro del genoma para poder ejercer algún efecto sobre la transcripción de genes blanco, y que el balance entre proteínas Gli activadoras o represoras determina el uso de estos sitios en la regulación génica (positiva o negativa, respectivamente).

Sin embargo, en el último par de años han estado surgiendo evidencias en la literatura respecto a que dentro del sitio de consenso originalmente descrito (GAACCACCCA, (Sasaki et al. 1997)) existiría un núcleo de unión a proteínas Gli capaz de retener la capacidad de unión aún en presencia de mutaciones en bases de la secuencia consenso. Más aún, mutaciones puntuales dentro del sitio de unión tienen como efecto una reducción en la afinidad y en la capacidad de activación/represión pero esto no vuelve el sitio

no funcional para ejercer un efecto sobre la transcripción (Winklmayr et al., 2010), al menos en ensayos *in-vitro*.

El modelo de pez cebra, dentro de sus ventajas, contempla la posibilidad de visualizar en detalle la organogénesis y crecimiento de estructuras del sistema nervioso central. Pese a no permitir mayores generalizaciones en muchos casos debido a su distancia de divergencia génica con otros modelos vertebrados, en otros aparece como un buen modelo para evaluar fenotipos letales tempranos o de alta dificultad técnica en otros modelos, como lo son la pérdida o ganancia de función en el desarrollo del SNC. La posibilidad de que los embriones mutantes de pérdida de función de la vía Shh/Gli sobrevivan hasta estadíos tardíos del desarrollo embrionario permite analizar el desarrollo de estructuras dorsales del SNC.

En la situación silvestre, es posible detectar el mRNA de *c-myc* en regiones bastante discretas dentro del SNC, en particular del ojo, del tectum posterior y del cerebro anterior.

Considerando que dichos territorios son mitóticamente muy activos en la ventana temporal 24-72hpf, el encontrar altos niveles de expresión de un importante regulador del ciclo celular como lo es *c-myc* no presenta mayor sorpresa. En particular destacamos las zonas proliferativas del tectum y el ojo, donde se encuentran concentradas las células positivas para marcadores de proliferación (como H3-P o BrdU). En el caso del tectum óptico, las células en división en la ventana temporal 24-60 hpf requieren activación de la vía de

Shh/Gli para mantenerse mitóticamente activas, viéndose severamente disminuidas en condiciones de pérdida de función tanto genética como farmacológica de la vía (Feijóo et al., 2011).

Al observar al mutante *smu* en estadio 24 hpf no se observan mayores diferencias en los niveles o dominios de expresión, situación que se ve revertida en el estadio 48 hpf, donde la expresión en el SNC de *c-myc* está ausente por completo.

El hecho de que este efecto sea observable de manera completa en casi todas las regiones (excepto el ojo, donde es parcial) plantea la interrogante de qué otras señales podrían estar regulando la expresión de dicho gen en ese lugar en ese momento (de manera contexto dependiente), lo que es apoyado por la ausencia de un fenotipo claro de la pérdida de función de la vía Shh/Gli en el estadio 24 hpf. Esta idea se ve reforzada por la relación existente entre Wnt1 y los procesos de neurogénesis en el cerebro medio posterior de pez cebra (Amoyel et al., 2005), y el rol que se le atribuye a Wnt1 en la proliferación del cerebro medio-posterior de ratón (Panhuysen et al., 2004). Además de esto, ensayos de secuencias regulatorias y de sobreactivación muestran que el promotor de *c-myc* en ratón posee elementos de unión funcionales tanto de  $\beta$ -catenina como de APC (He et al. 1998), relación que, de estar conservada en pez cebra, podría dar luces sobre una señal alternativa a la vía Shh/Gli.

Datos obtenidos en el laboratorio muestran que en el caso de las 3 líneas mutantes usadas, la proliferación se ve severamente disminuida en la ventana temporal 24-60hpf en el tectum, sin que esto tenga mayores efectos sobre el establecimiento de las estructuras (evaluado por expresión de marcadores de territorio SNC, Feijó et al. 2011). Sin embargo, pese a verse reducida en estos mutantes aún existe proliferación en esos territorios, lo que apoya la interpretación de la disminución en el número de células c-myc positivas como consecuencia de la inactivación de la vía de señalización Shh/Gli y no necesariamente debido a que las células no estén proliferando en ese estadio. Ya se han establecido los efectos de ganancia y pérdida de función de c-myc sobre progenitores neurales, donde la ganancia promueve proliferación y la pérdida de función de c-myc la disminuye, evaluado mediante el uso de un constructo que expresa una forma dominante negativa (Fulfs et al., 2002; Kim et al., 2009).

Los fenotipos de los mutantes *dtr* y *yot* agregan una faceta de interpretación adicional, ya que ambos tienen fenotipos bastante evidentes en expresión de *c-myc* (aunque no tan marcados como el caso del mutante *smu*), siendo el fenotipo *dtr* más marcado que el *yot*. Ya se ha planteado la posibilidad de que en el pez cebra la activación génica mediada por factores de transcripción Gli en su forma activadora depende en gran medida de Gli1 (Karlstrom et al., 2003), contrario a lo observado en el modelo de ratón donde

Gli2 parece ser el factor Gli de función preponderantemente activadora (Ding et al., 1998).

El hecho de que los mutantes *dtr* y *yot* (a nivel de efectores transcripcionales), tengan un fenotipo similar al de la pérdida de función a nivel de membrana, nos permite plantear la especificidad del fenotipo a la vía de Shh/Gli. Dicha especificidad se ve apoyada adicionalmente por resultados obtenidos previamente en el laboratorio, donde una ganancia de función mediante la electroporación de ARNm de *Gli1* es suficiente para inducir expresión de *c-myc*, en células del tectum y ojo en la transición entre los estadios 24-48 hpf, en un trasfondo mutante *smu* (datos no publicados, Gustavo Cerda et al.).

Considerando todo lo anterior, podemos plantear que el efecto de la vía de señalización sobre la expresión de *c-myc* en el modelo del SNC del embrión de pez cebra es dependiente de la vía de señalización Shh/Gli, y en particular de la función activadora de las proteínas Gli (Gli1, en este caso). No podemos excluir, sin embargo, que parte de este efecto se relacione con Gli3 y una menor unión al promotor en condiciones de activación de la vía.

Además de lo anterior, al revisar las regiones río arriba (10kb) y dentro del primer intrón de *c-myc* encontramos secuencias muy similares a GliBS repetidas, lo que da un sustento mecanístico a esta relación que plantea el trabajo.

En la literatura se encuentra descrito, de manera extensa, que la conservación funcional génica tiene una componente estructural a nivel de secuencias enhancer, por lo que el estudio de la presencia (y funcionalidad) de GliBS en regiones proximales al promotor de *c-myc* arroja una mayor información respecto al tema de la conservación de la regulación.

El hecho de que secuencias GliBS en el promotor de *c-myc* en el genoma de ratón unan proteínas Gli, zanja una de las condiciones necesarias para plantear una regulación por parte de la vía de señalización, en el SNC embrionario. Ensayos preliminares muestran que en el caso de la línea celular CH310T1/2 no existe unión diferencial de proteínas Gli a ninguno de los sitios ensayados, lo que fortalecería la interpretación de la regulación contexto dependiente de *c-myc* mediada por la vía de Shh/Gli. Dicha regulación no resultaría de la mera unión de proteínas Gli a un único sitio de unión, sino que podría involucrar otros sitios o el reclutamiento de cofactores para poder tener lugar. Las diferencias observadas en la ganancia de función entre la línea celular C3H10T1/2 y las células de corteza embrionaria permite plantear la posibilidad de diferentes contextos. Pese a ello, el que sí exista una reducción importante en los niveles de expresión al tratar con shRNAs para las proteínas Gli1 y Gli2, lleva a pensar en la funcionalidad de otros sitios diferentes en esta situación, cuya actividad se vería reducida al reducir los niveles de proteína Gli disponibles en la célula. Una explicación alternativa involucra otras señales putativas que podrían estar regulando la expresión de *c-myc* en este tipo

celular, inmortalizado y no necesariamente representativo de la situación *in-vivo* ya observada en la corteza embrionaria de ratón.

El hecho es que *c-myc* se comporta como un gen blanco de la vía, donde se observa una reducción en su expresión en la pérdida de función y un aumento de transcrito en condiciones de ganancia de función en el tipo celular C3H10T1/2. Además, la disminución de mRNA de *c-myc* observada en las transfecciones con los constructos de shRNAs involucra específicamente a las proteínas Gli en su regulación. El hecho de que la pérdida de función (farmacológica) en explantes también reproduzca la expresión reducida de *c-myc*, da pie para plantear la existencia de este mecanismo regulatorio en un contexto menos artefactual que una línea celular inmortalizada.

Un sitio de unión a Gli no necesariamente es suficiente para generar una respuesta transcripcional en los constructos reporteros como ocurrió en este caso con el sitio 5.9kb, lo que ya ha sido reportado en la literatura (Lee et al., 2010). La necesidad de secuencias adicionales, variabilidad contexto-dependiente, ausencia de cofactores o requerimientos posicionales aparecen como algunas posibles explicaciones para este resultado.

Por otro lado, para considerar la funcionalidad de regiones amplias que pudieran contener sitios para otros factores de transcripción o cofactores necesarios para la actividad de los factores Gli, se realizaron los ensayos de luciferasa con la región de 1.7 kb, que contiene sitios de unión consenso y no consenso. No se observó una variación en los niveles de expresión del

constructo reportero acoplado a luciferasa, lo que indica que esta región tampoco es suficiente por sí sola para regular la expresión de *c-myc*, aún con una disponibilidad de proteínas Gli mucho mayor a la fisiológica (inducida por cotransfección con vectores de expresión).

Esto, sin embargo, no se contradice con los resultados obtenidos mediante la inmunoprecipitación de cromatina, ya que la literatura muestra variados ejemplos de genes que presentan una sinergia entre sitios de unión para distintos factores de transcripción en sus regiones regulatorias (Carey, 1998). Un análisis genómico más detallado y que abarque mayor número de factores de transcripción podría arrojar luces sobre esta especulación.

Aún más, recientemente ha sido comprobado que el sitio de unión consenso a Gli descrito inicialmente, GAACACCCA (Sasaki et al. 1997), es capaz de unir proteínas Gli aún en presencia de distintas mutaciones puntuales dentro de su secuencia, lo que tiene efectos tanto sobre la afinidad como la actividad del sitio (Winklmayr et al., 2010).

El hecho de que existan sitios de unión para otros factores de transcripción, dentro de las secuencias analizadas río arriba del gen *c-myc* tanto en el genoma de pez cebra como el de ratón, no hace sino poner en evidencia la firme regulación a la que está sujeta la expresión de este gen, de la cual hay múltiples ejemplos en la literatura (Meyer and Penn, 2008b).

Se hacen necesarios experimentos de inmunoprecipitación de cromatina, en conjunto con la secuenciación de los fragmentos obtenidos

(ChIP-Seq), para identificar sitios difíciles de establecer en búsquedas informáticas. Esto entregaría bastante información adicional por sobre la aproximación puntual que se consideró en este trabajo.

El meduloblastoma como modelo de crecimiento anómalo gatillado por una ganancia de función de la vía Shh/Gli en un tipo celular específico (precursores granulares), fue elegido para ensayar la regulación de *c-myc* debido a que las células que responden a Shh en el cerebelo son las mismas que expresan fuertemente *c-myc* mientras se encuentran mitóticamente activas (Ruppert et al., 1986). Estas mismas células, sin embargo, expresan también otro miembro de la familia *myc*: *n-myc*, que ha sido validado como gen blanco de la vía por diversas aproximaciones independientes, incluidos experimentos de epistasis y regiones regulatorias (Carroll et al., 2003; Hallikas et al., 2006). Es más, *n-myc* es requerido para la proliferación y crecimiento anómalos en el cerebelo una vez activada la vía Shh/Gli. Para el caso de *c-myc*, sin embargo, el número de células no se ve afectado aún cuando el número de células con la vía de Shh/Gli constitutivamente activa (evaluado mediante marcaje contra Gli1) sí se ve aumentado significativamente.

Una explicación posible permite argumentar que siendo esta regulación contexto dependiente, el contexto del desarrollo del cerebelo simplemente no involucra regulación de *c-myc* por la vía de Shh. Otra explicación alternativa considera la alta redundancia funcional que existe entre *c-* y *n-myc*, donde

posiblemente *n-myc* fue evolutivamente reclutado como efector de la vía en esos procesos de crecimiento.

Pese a lo anterior, está reportado que *c-myc* coopera con la vía Shh a nivel fenotípico, aumentando la tumorigenicidad (Rao et al, 2003), pero esto es atribuible a efectos de *c-myc* independientes de la vía de señalización de Shh/Gli, más relacionados con un rol en la conformación o estado de la cromatina sobre progenitores neurales (Wey and Knoepfler, 2010).

## CONCLUSIONES

Podemos concluir que tanto en el modelo de pez cebra como en el modelo de ratón, alteraciones en la vía de señalización de Shh/Gli tienen como consecuencia alteraciones en la expresión de *c-myc*. Disminuciones en la actividad de la vía Shh/Gli, genética en el caso del pez cebra y farmacológica en el caso de la corteza de ratón, generan a su vez disminuciones en los niveles de ARNm de *c-myc*. Ganancia de función de la vía en células murinas tiene el efecto contrario, aumentando los niveles de transcrito de *c-myc*.

Cabe considerar que los datos de pérdida de función de proteínas Gli, genética en pez cebra e *in-vitro* mediante el uso de shRNA en ratón, validan un mecanismo de regulación de la expresión de *c-myc* a través de los factores Gli. Existe además unión de factores Gli a al menos un sitio de unión presente en las regiones regulatorias del promotor de *c-myc* (-5,9kb), en la neocorteza embrionaria tardía (E18.5). Este sitio por sí solo, sin embargo, no sería suficiente para mediar la transcripción de un constructo reportero en una línea celular, por lo cual no podemos descartar una contribución indirecta a la regulación de *c-myc* por la vía de señalización Shh/Gli.

## BIBLIOGRAFÍA

- Amoyel M, Cheng Y-C, Jiang Y-J, Wilkinson DG (2005) Wnt1 regulates neurogenesis and mediates lateral inhibition of boundary cell specification in the zebrafish hindbrain. *Development (Cambridge, England)* 132:775-85
- Barakat MT, Humke EW, Scott MP (2010) Learning from Jekyll to control Hyde: Hedgehog signaling in development and cancer. *Trends in Molecular Medicine*
- Behesti H, Marino S (2009) Cerebellar granule cells: insights into proliferation, differentiation, and role in medulloblastoma pathogenesis. *The international journal of biochemistry & cell biology* 41:435-45
- Bergeron SA, Milla LA, Villegas R, Shen M-C, Burgess SM, Allende ML, Karlstrom RO, Palma V (2008) Expression profiling identifies novel Hh/Gli-regulated genes in developing zebrafish embryos. *Genomics* 91:165-77
- Berman DM, Karhadkar SS, Hallahan AR, Pritchard JI, Eberhart CG, Watkins DN, Chen JK, Cooper MK, Taipale J, Olson JM, Beachy PA (2002) Medulloblastoma growth inhibition by hedgehog pathway blockade. *Science (New York, N.Y.)* 297:1559-61
- Carey M (1998) The enhanceosome and transcriptional synergy. *Cell* 92:5-8
- Carletti B, Rossi F (2008) Neurogenesis in the cerebellum. *The Neuroscientist : a review journal bringing neurobiology, neurology and psychiatry* 14:91-100
- Carroll AL, Gillingham CL, Kaiser C, Grasdeder LL, Scott MP, Wickramasinghe R, Wechsler-Reya RJ, Lin SM, Oliver TG (2003) Transcriptional profiling of the Sonic hedgehog response: a critical role for N-myc in proliferation of neuronal precursors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100:7331-6
- Corbit KC, Aanstad P, Singla V, Norman AR, Stainier DYR, Reiter JF (2005) Vertebrate Smoothed functions at the primary cilium. *Nature* 437:1018-21
- Dang CV, O'Donnell KA, Zeller KI, Nguyen T, Osthus RC, Li F (2006) The c-Myc target gene network. *Seminars in cancer biology* 16:253-64

- DePinho R, Mitsock L, Hatton K, Ferrier P, Zimmerman K, Legouy E, Tesfaye A, Collum R, Yancopoulos G, Nisen P (1987) Myc family of cellular oncogenes. *Journal of cellular biochemistry* 33:257-66
- Ding Q, Motoyama J, Gasca S, Mo R, Sasaki H, Rossant J, Hui CC (1998) Diminished Sonic hedgehog signaling and lack of floor plate differentiation in Gli2 mutant mice. *Development (Cambridge, England)* 125:2533-43
- Donovan SL, Dyer MA (2005) Regulation of proliferation during central nervous system development. *Seminars in cell & developmental biology* 16:407-21
- Feijóo CG, Oñate MG, Milla LA, Palma VA (2011) Sonic hedgehog (Shh)-Gli signaling controls neural progenitor cell division in the developing tectum in zebrafish. *The European journal of neuroscience* 33:589-98
- Fults D, Pedone C, Dai C, Holland EC (2002) MYC expression promotes the proliferation of neural progenitor cells in culture and in vivo. *Neoplasia (New York, N. Y.)* 4:32-9
- Gallant P, Steiger D (2009) Myc's secret life without Max. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)* 8:3848-53
- Goetz SC, Anderson KV (2010) The primary cilium: a signalling centre during vertebrate development. *Nature reviews. Genetics* 11:331-44
- Grandori C, Cowley SM, James LP, Eisenman RN (2000) The Myc/Max/Mad network and the transcriptional control of cell behavior. *Annual review of cell and developmental biology* 16:653-99
- Hallikas O, Palin K, Sinjushina N, Rautiainen R, Partanen J, Ukkonen E, Taipale J (2006) Genome-wide prediction of mammalian enhancers based on analysis of transcription-factor binding affinity. *Cell* 124:47-59
- Hammond CL, Schulte-Merker S (2009) Two populations of endochondral osteoblasts with differential sensitivity to Hedgehog signalling. *Development (Cambridge, England)* 136:3991-4000
- Hatton BA, Knoepfler PS, Kenney AM, Rowitch DH, Alborán IM de, Olson JM, Eisenman RN (2006) N-myc is an essential downstream effector of Shh signaling during both normal and neoplastic cerebellar growth. *Cancer research* 66:8655-61
- He TC, Sparks AB, Rago C, Hermeking H, Zawel L, Costa LT da, Morin PJ, Vogelstein B, Kinzler KW (1998) Identification of c-MYC as a target of the APC pathway. *Science (New York, N. Y.)* 281:1509-12

Knoepfler PS, Cheng PF, Eisenman RN (2002) N-myc is essential during neurogenesis for the rapid expansion of progenitor cell populations and the inhibition of neuronal differentiation. *Genes & development* 16:2699-712

Lee EY, Ji H, Ouyang Z, Zhou B, Ma W, Vokes SA, McMahon AP, Wong WH, Scott MP (2010) Hedgehog pathway-regulated gene networks in cerebellum development and tumorigenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107:9736-41

Leone G, Sears R, Huang E, Rempel R, Nuckolls F, Park CH, Giangrande P, Wu L, Saavedra HI, Field SJ, Thompson MA, Yang H, Fujiwara Y, Greenberg ME, Orkin S, Smith C, Nevins JR (2001) Myc requires distinct E2F activities to induce S phase and apoptosis. *Molecular cell* 8:105-13

Lum L, Zhang C, Oh S, Mann RK, Kessler DP von, Taipale J, Weis-Garcia F, Gong R, Wang B, Beachy PA (2003) Hedgehog signal transduction via Smoothed association with a cytoplasmic complex scaffolded by the atypical kinesin, Costal-2. *Molecular cell* 12:1261-74

Ma G, Xiao Y, He L (2008) Recent progress in the study of Hedgehog signaling. *Journal of Genetics and Genomics* 35:129-137

Malynn BA, Alboran IM de, O'Hagan RC, Bronson R, Davidson L, DePinho RA, Alt FW (2000) N-myc can functionally replace c-myc in murine development, cellular growth, and differentiation. *Genes & development* 14:1390-9

Marti E, Bovolenta P (2002) Sonic hedgehog in CNS development: one signal, multiple outputs. *Trends in neurosciences* 25:89-96

Meyer N, Penn LZ (2008)(a) Reflecting on 25 years with MYC. *Nature reviews. Cancer* 8:976-90

Meyer N, Penn LZ (2008)(b) Reflecting on 25 years with MYC. *Nature reviews. Cancer* 8:976-90

Michaud EJ, Yoder BK (2006) The primary cilium in cell signaling and cancer. *Cancer research* 66:6463-7

Muir D (2009) The potentiation of peripheral nerve sheaths in regeneration and repair. *Experimental neurology*

Murone M, Rosenthal A, Sauvage FJ de (1999) Sonic hedgehog signaling by the patched-smoothened receptor complex. *Current biology : CB* 9:76-84

Huangfu D, Anderson KV (2006) Signaling from Smo to Ci/Gli: conservation and divergence of Hedgehog pathways from *Drosophila* to vertebrates. *Development* (Cambridge, England) 133:3-14

Ingham PW, McMahon AP (2001) Hedgehog signaling in animal development: paradigms and principles. *Genes & development* 15:3059-87

Ingham PW, Taylor AM, Nakano Y (1991) Role of the *Drosophila* patched gene in positional signalling. *Nature* 353:184-7

Jia J, Jiang J (2006) Decoding the Hedgehog signal in animal development. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 63:1249-65

Jiang J (2006) Regulation of Hh/Gli signaling by dual ubiquitin pathways. *Cell cycle* 5:2457-63

Joeng KS, Long F (2009) The Gli2 transcriptional activator is a crucial effector for Ihh signaling in osteoblast development and cartilage vascularization. *Development* (Cambridge, England) 136:4177-85

Johnston L, Prober D, Edgar B, Eisenman R, Gallant P (1999) *Drosophila* myc regulates Cellular Growth during Development. *Cell* 98:779-790

Karlstrom RO, Tyurina OV, Kawakami A, Nishioka N, Talbot WS, Sasaki H, Schier AF (2003) Genetic analysis of zebrafish *gli1* and *gli2* reveals divergent requirements for gli genes in vertebrate development. *Development* (Cambridge, England) 130:1549-64

Katoh Y, Katoh M (2009) Hedgehog target genes: mechanisms of carcinogenesis induced by aberrant hedgehog signaling activation. *Current molecular medicine* 9:873-86

Kenney AM, Hatton BA, Rowitch DH, Alboran IM de, Olson JM, Knoepfler PS, Eisenman RN (2006) N-myc is an essential downstream effector of Shh signaling during both normal and neoplastic cerebellar growth. *Cancer Res* 66:8655-61

Kim W-Y, Wang X, Wu Y, Doble BW, Patel S, Woodgett JR, Snider WD (2009) GSK-3 is a master regulator of neural progenitor homeostasis. *Nature neuroscience* 12:1390-7

Kinto N, Iwamoto M, Enomoto-Iwamoto M, Noji S, Ohuchi H, Yoshioka H, Kataoka H, Wada Y, Yuhao G, Takahashi HE, Yoshiki S, Yamaguchi A (1997) Fibroblasts expressing Sonic hedgehog induce osteoblast differentiation and ectopic bone formation. *FEBS letters* 404:319-23

Müller B, Basler K (2000) The repressor and activator forms of *Cubitus interruptus* control Hedgehog target genes through common generic gli-binding sites. *Development (Cambridge, England)* 127:2999-3007

Nilsson JA, Cleveland JL (2003) Myc pathways provoking cell suicide and cancer. *Oncogene* 22:9007-21

Nüsslein-Volhard C, Wieschaus E (1980) Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila*. *Nature* 287:795-801

Palma V, Lim DA, Dahmane N, Sánchez P, Brionne TC, Herzberg CD, Gitton Y, Carleton A, Alvarez-Buylla A, Ruiz I Altaba A (2005) Sonic hedgehog controls stem cell behavior in the postnatal and adult brain. *Development (Cambridge, England)* 132:335-44

Panhuisen M, Vogt Weisenhorn DM, Blanquet V, Brodski C, Heinzmann U, Beisker W, Wurst W (2004) Effects of Wnt1 signaling on proliferation in the developing mid-/hindbrain region. *Molecular and cellular neurosciences* 26:101-11

Patil MA, Zhang J, Ho C, Cheung S-T, Fan S-T, Chen X (2006) Hedgehog signaling in human hepatocellular carcinoma. *Cancer biology & therapy* 5:111-7

Ribes V, Briscoe J (2009) Establishing and Interpreting Graded Sonic Hedgehog Signaling during Vertebrate Neural Tube Patterning: The Role of Negative Feedback. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 1:a002014

Ruiz I Altaba A, Weiner H, Beyna M, Dahmane N, Sanchez P, Sun T, Palma V, Gitton Y (2001) The Sonic Hedgehog-Gli pathway regulates dorsal brain growth and tumorigenesis. *Development* 128:5201-12

Ruiz i Altaba A, Mas C, Stecca B (2007) The Gli code: an information nexus regulating cell fate, stemness and cancer. *Trends in cell biology* 17:438-47

Ruppert C, Goldowitz D, Wille W (1986) Proto-oncogene *c-myc* is expressed in cerebellar neurons at different developmental stages. *The EMBO Journal* 5:1897-901

Sansom SN, Livesey FJ (2009) Gradients in the brain: the control of the development of form and function in the cerebral cortex. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 1:a002519

Sasaki H, Hui C, Nakafuku M, Kondoh H (1997) A binding site for Gli proteins is essential for HNF-3 $\beta$  floor plate enhancer activity in transgenics and can respond to Shh in vitro. *Development (Cambridge, England)* 124:1313-22

Schreiber-Agus N (1997) *Drosophila* Myc is oncogenic in mammalian cells and plays a role in the diminutive phenotype. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 94:1235-1240

Schuhmacher M, Staeger MS, Pajic A, Polack A, Weidle UH, Bornkamm GW, Eick D, Kohlhuber F (1999) Control of cell growth by c-Myc in the absence of cell division. *Current Biology* 9:1255-1258

Varjosalo M, Li S-P, Taipale J (2006) Divergence of hedgehog signal transduction mechanism between *Drosophila* and mammals. *Developmental cell* 10:177-86

Vita M, Henriksson M (2006) The Myc oncoprotein as a therapeutic target for human cancer. *Seminars in cancer biology* 16:318-30

Weiner AMJ, Allende ML, Becker TS, Calcaterra NB (2007) CNBP mediates neural crest cell expansion by controlling cell proliferation and cell survival during rostral head development. *Journal of cellular biochemistry* 102:1553-70

Wey A, Knoepfler PS (2010) c-myc and N-myc promote active stem cell metabolism and cycling as architects of the developing brain. 1:120-130

Winklmayr M, Schmid C, Laner-Plamberger S, Kaser A, Aberger F, Eichberger T, Frischauf A-M (2010) Non-consensus GLI binding sites in Hedgehog target gene regulation. *BMC molecular biology* 11:2

Yang Z-J, Ellis T, Markant SL, Read T-A, Kessler JD, Bourbonoulas M, Schüller U, Machold R, Fishell G, Rowitch DH, Wainwright BJ, Wechsler-Reya RJ (2008) Medulloblastoma can be initiated by deletion of Patched in lineage-restricted progenitors or stem cells. *Cancer cell* 14:135-45

Yoon JW, Gilbertson R, Iannaccone S, Iannaccone P, Walterhouse D (2009) Defining a role for Sonic hedgehog pathway activation in desmoplastic medulloblastoma by identifying GLI1 target genes. *International journal of cancer. Journal international du cancer* 124:109-19

Zimmerman KA, Yancopoulos GD, Collum RG, Smith RK, Kohl NE, Denis KA, Nau MM, Witte ON, Toran-Allerand D, Gee CE (1986) Differential expression of myc family genes during murine development. *Nature* 319:780-3