

UCH-FC
DOC-BMCN
F 181
C. 1

NETRINA1 es un blanco transcripcional directo de la vía Sonic Hedgehog (SHH)/GLI y actúa como factor de sobrevida en células progenitoras cerebelares y en células tumorales de meduloblastoma en mamíferos.



Tesis

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

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

Facultad De Ciencias

Por

Paulina Falcón Urrutia

Noviembre, 2016

Directora de Tesis: Dra. Verónica Palma Alvarado

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

Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Doctorado presentada por la candidata.

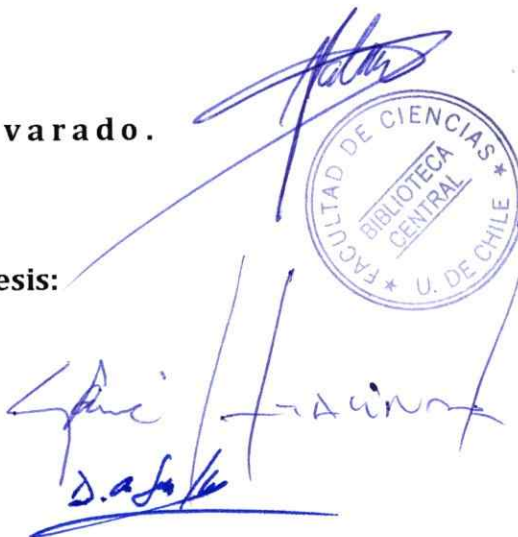
Paulina Falcón Urrutia

Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Doctor en Ciencias con mención en Biología Molecular Celular y Neurociencias, en el examen de Defensa Privada de Tesis rendido el día lunes 26 de septiembre del 2016.

Director de Tesis:
Dra. Verónica Palma Alvarado.

Comisión de Evaluación de la Tesis:

Dr. Christian Gonzalez B.
Dr. Álvaro Glavic M.
Dr. Mario Galindo
Dr. Daniel Basilio



The image shows several handwritten signatures in blue ink. One signature is at the top right, another is in the middle right, and a third is at the bottom left. A circular stamp is located in the middle right, containing the text "FACULTAD DE CIENCIAS", "BIBLIOTECA CENTRAL", and "U. DE CHILE".

PRELIMINAR

*A mis padres, mis hermanos,
a mi tata Iván Falcón Varas
y a mi marido Ilan.*

de
a
sido
de
de

de

AGRADECIMIENTOS

Quisiera comenzar agradeciendo al Laboratorio de Células Troncales y Biología del Desarrollo, y a mi tutora Dra. Verónica Palma, por recibirme, por todos estos años, y por ser campo fértil en este crecimiento académico y personal. Gracias a mi tutora Dra. Verónica Palma, por su guía, por acompañarme en este camino, quien supo exigirme y con esto, permitirme conocer mi propio potencial. Gracias profe por haber sido un real apoyo y por tu confianza en mi trabajo, y en lo personal, gracias por estar siempre ahí, en los momentos malos y los buenos, sobre todo en los momentos difíciles, en que a la distancia se puso a prueba el temple. Dentro del laboratorio, quisiera agradecer a todos lo que formaron parte de VP lab, siempre recordaré los momentos compartidos, las divagaciones sobre los experimentos, y las explicaciones posibles ante los más extraños, inexplicables, resultados. A Pablois, quien estuvo acompañando mi crecimiento desde mis primeros pasos con los oligodendrocitos en pregrado, quien a pesar de siempre andar corriendo, siempre tiene unos 5 minutos para calmar la vorágine del día a día, prepararse un café con sus medidas

calculadas a la perfección (café 10X), y filosofar al respecto de algún experimento o alguna observación de algún *paper* curioso. Muchas gracias a mi lab, siempre atesoraré y estaré orgullosa de haber crecido aquí, en VP lab.

Lejos lo más importante es la familia, he aquí mis agradecimiento a quienes siempre han creído en mi, mis fans, que siempre me han dado su apoyo irrestricto. A mis padres Paulina y Ricardo, quienes desde mis primeros pasos me enseñaron que no hay límites más que los autoimpuestos, quienes siempre han creído en mi potencial a ciegas, que si bien son los que desde pequeña me han dado alas, son el jurado más crítico al que alguien se puede someter. Gracias Papás por tanto y por todo, por ser un ejemplo de trabajo, perseverancia y temple, son mi máximo motivo de orgullo y un ejemplo a seguir, todo lo que soy es gracias a uds. Gracias a mi hermanos Ricardo y Felipe, porque siempre han creído en mi, porque aún sin entender mis proyectos siempre creen en mi, me apoyan y me transmiten su cariño, estoy muy orgullosa de tener dos hermanos como los que tengo, muchas gracias!. Y el en *corazón de la familia* yace mi compañero, mi Pelao, Ilan, quien en unos días más se convertirá en mi compañero de vida, aunque ya es mi copiloto desde hace mucho tiempo. Estoy profundamente agradecida de ti Ilan, por todo tu apoyo y por potenciar cada aspecto de mi vida, confiando plenamente en mi capacidades y en mi desempeño, por tu entrega, por ser mi fan #1, mi compañero y el regalo más lindo que me dio la vida, soy inmensamente feliz de

poder compartir todo esto, y todo el porvenir contigo, soy realmente afortunada de tener a alguien tan noble a mi lado, gracias mi amor.

Last but not the least, gracias a mis amigos, a todas aquellas personas que estuvieron conmigo y cuyos caminos se cruzaron con los míos, durante ventanas de tiempos parciales o infinitas, tiempos cortos o tiempos largos, agradezco a cada una de esas personas y me quedo con lo mejor de uds. Mención especial merecen las más cercanas, las más del alma, que estuvieron siempre, en las buenas y en las malas, mis *amigas del Rayo*, Rosana, la señora Weiss, Florencia, y de otros orígenes a Tamara, gracias por su amistad tan linda y el apoyo infinito que siempre me han brindado, las adoro. Finalmente, quiero agradecerle a la mejor, mi Sandra del alma, mi *compañerísima en absolutamente* todas, estoy profundamente agradecida de tu amistad, de tener a mi lado a alguien tremendamente apañadora y entregada, compañera en la vida y en la ciencia, eres una tremenda persona y estoy feliz de poder compartir el camino contigo.

ÍNDICE DE MATERIAS

RESUMEN BIOGRÁFICO.....	iii
AGRADECIMIENTOS.....	iv
ÍNDICE DE MATERIAS.....	vii
ÍNDICE DE TABLAS.....	x
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xi
LISTADO DE ABREVIATURAS Y NOMENCLATURA.....	xv
Abreviaturas.....	xv
Nomenclatura.....	xx
RESUMEN.....	xx
ABSTRACT.....	xxiii
INTRODUCCIÓN.....	1
Las Netrinas: Rol en guía axonal.....	1
Netrina1 y su nuevo rol como factor de supervivencia celular para receptores de dependencia de las familias Dcc/Neogenina y Unc5.....	8
Dilucidando la señalización de Netrina1: Una nueva estrategia para terapia celular	13
¿Netrina1, nuevo blanco transcripcional directo de Hedgehog/Gli?.....	15
La Señalización Shh.....	17
La señalización Shh/Gli regula el desarrollo del cerebelo.....	20
Neoplasia cerebelar: Meduloblastoma.....	23
HIPÓTESIS.....	28
OBJETIVO GENERAL.....	28
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	29

MATERIALES Y MÉTODOS.....	30
RESULTADOS	69
Objetivo 1.- Analizar la presencia y distribución de NETRINA1 en muestras de meduloblastoma humano.	69
Objetivo 2.- Evaluar NETRINA1 como blanco transcripcional directo de la vía de señalización SHH/GLI en mamíferos.....	75
A.- Demostración molecular del control que ejerce la vía de señalización SHH/GLI sobre la transcripción de NTN1.....	75
B.- Los niveles transcripcionales de NTN1 responden a la modulación de la señalización SHH/GLI en humano.....	83
C.- Los niveles transcripcionales de Netrina1 responden a la modulación de la señalización Shh/Gli en el cerebelo murino.....	86
Objetivo 3.- Evaluar el efecto que ejerce Netrina1 sobre la apoptosis, sobrevida y proliferación celular en la línea celular derivada de meduloblastoma humano, DAOY.....	89
A.- Establecimiento y validación de la línea knock-down de NTN1 en células DAOY..	89
B.- Evaluación del rol que ejerce NTN1 en la sobrevida y proliferación celular en meduloblastoma in vitro mediante la aproximación de knock-down NTN1.....	92
C.- Evaluación del rol que ejerce Netrina1 en la sobrevida y proliferación celular en meduloblastoma in vitro mediante la aproximación de CRISPR/Cas9.....	99
D.- Evaluación del rol que ejerce Netrina1 en la sobrevida celular en meduloblastoma in vitro mediante una aproximación farmacológica.....	104
Objetivo 4.- Evaluar el rol que ejerce el complejo de señalización conformado por Netrina1/Unc5C en la sobrevida celular en precursores granulares cerebelares GNP6 (P6) ex vivo en el modelo murino.	108
A.- Evaluación del rol de Netrina1 en la sobrevida celular en GNP6 (P6) mediante el uso del ligando recombinante en condiciones de privación de suero.....	108
B.- Evaluación del rol de UNC5C en la sobrevida celular en GNP6 (P6) mediante una aproximación genética en un knock-out condicional para UNC5C.....	109
RESUMEN DE RESULTADOS POR OBJETIVO	112
Objetivo 1.- Analizar la presencia y distribución de NETRINA1 en meduloblastoma humano.....	112
Objetivo 2.- Evaluar NTN1 como blanco transcripcional directo de la vía de señalización SHH/GLI en mamíferos.....	112
Objetivo 3.- Evaluar el efecto que ejerce NTN1 sobre la apoptosis, sobrevida y proliferación celular en la línea celular derivada de meduloblastoma humano, DAOY.....	114
Objetivo 4.- Evaluar el rol que ejerce el complejo de señalización conformado por Netrina1/Unc5C en la sobrevida celular en precursores granulares cerebelares GNP6 (P6) ex vivo en el modelo murino.	115
DISCUSIÓN	116
Señalización Shh/Gli	116
Netrina1 como nuevo efector de la vía Shh/Gli	117
Netrina1, como nuevo efector de la vía Shh/Gli y blanco terapéutico en el contexto del MB derivado de Shh.....	121

Expresión de Netrina1 en el contexto de aumento de actividad de Atoh1 en MB derivado de Shh.....	123
NETRINA1, factor de sobrevivencia en meduloblastoma humano.....	126
Netrina1 como factor de sobrevivencia en el desarrollo cerebelar	132
UNC5C receptor de dependencia en el contexto de MB humano	135
Unc5c como receptor de dependencia en el desarrollo cerebelar murino.....	138
UNC5C como nuevo blanco transcripcional de la vía de señalización SHH/GLI ...	139
El rol de Unc5c en el desarrollo cerebelar normal	141
Apoptosis en el desarrollo neural	145
Apoptosis como fuerza morfogenética en el desarrollo	148
CONCLUSIONES.....	151
ANEXO I.....	152
ANEXO II	153
ANEXO III.....	154
ANEXO IV	155
ANEXO V.....	156
ANEXO VI	157
ANEXO VII.....	158
ANEXO VIII	159
BIBLIOGRAFÍA.....	160

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.-Partidores para qPCR Taqman utilizados, señalándose el gen, partidores anterior y reverso, y número de sonda implementado.

Tabla 2.-Partidores diseñados para flanquear los GBS consenso en las regiones regulatorias del gen *NTN1*.

Tabla 3.-Partidores implementados para el genotipado de los ratones mutantes utilizados.

Tabla 4.- Listado de anticuerpos utilizados, detallándose la concentración de uso, reactividad y marca comercial.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.- NETRINA1 es un factor de guía axonal bifuncional fundamental para el desarrollo del sistema nervioso central.

Figura 2.- Fenotipo cerebelar del ratón mutante *Unc5c* adulto

Figura 3.- NETRINA1 actúa como un factor de supervivencia, tanto en el contexto de desarrollo como en cáncer.

Figura 4.- La señalización Sonic Hedgehog (Shh) es pivotal para el desarrollo del sistema nervioso central.

Figura 5.- El modelo murino de haploinsuficiencia de *Patched1* es la principal herramienta genética para el estudio del MB derivado de Shh *in vivo*.

Figura 6.- El meduloblastoma es un grupo complejo de enfermedades biológicamente distintas: WNT (azul), SHH (rojo), Grupo 3 (amarillo) y Grupo 4 (verde).

Figura 7.- Ajuste de máscaras para la cuantificación de confluencia celular y muerte celular en el sistema IncuCyteZOOM®.

Figura 8.- Características de la variante histológica desmoplástica/nodular de meduloblastoma, exclusiva del grupo explicado por la sobre-activación de la señalización SHH/GLI.

Figura 9.- NETRINA1 se expresa en las proliferativas del meduloblastoma desmoplástico/nodular.

Figura 10.- Caracterización cualitativa de la expresión de NETRINA1 a través de 10 muestras de pacientes de MB derivado de desregulación de la vía SHH/GLI.

Figura 11.- Los efectores GLI2 y GLI3 reconocen dos sitios de unión a GLI consenso (GBS, del acrónimo en inglés GLI Binding Site) en *NTN1*.

Figura 12.- Formas GLI activadores inducen actividad luciferasa de manera específica, en los GBS1 y 2 del promotor de *NTN1*.

Figura 13.- Los niveles transcripcionales de *NTN1* responden a la modulación de la señalización SHH/GLI en células DAOY.

Figura 14.- Los niveles de *Netrina1* responden a la estimulación de la vía Shh/Gli en precursores granulares cerebelares (GNPs) de ratón postnatal (P6) y éstos se correlacionan de manera positiva con los niveles de expresión de *Gli1*.

Figura 15.- Generación y validación de la línea *knockdown* estable de *NTN1* en la línea celular DAOY de meduloblastoma humano.

Figura 16.- Netrina1 recombinante promueve la supervivencia celular, sin afectar la proliferación celular en células DAOY.

Figura 17.- Células DAOY *knock-down* de *NTN1* exhiben un aumento de muerte celular, el cual se puede revertir de manera específica con el recombinante de Netrina1.

Figura 18.- El silenciamiento del receptor UNC5C, rescata parcialmente la muerte celular inducida en la línea *shNTN1*.

Figura 19.- En el clon *knock-out* de *NTN1* aumenta la muerte celular de manera significativa.

Figura 20.- El clon CRISPR de *NTN1* exhibe un aumento en la muerte celular, evaluado a través de tinción IP.

Figura 21.- El clon CRISPR para *NTN1* muestra una disminución significativa en el crecimiento celular poblacional.

Figura 22.- La inhibición farmacológica de la acción de NETRINA1 promueve la muerte celular.

Figura 23.- El complejo de señalización conformado por Netrina1 y su receptor Unc5c promueven la sobrevida celular en GNP's de ratón.

Figura 24.- Modelo propuesto en el presente trabajo. NETRINA1 es un blanco transcripcional directo de la señalización SHH/GLI, que actúa como factor de sobrevida en el contexto de MB humano.

Figura 25.- El patrón de expresión de NETRINA1 se encuentra asociado a las regiones proliferativas tumorales en MB humano derivado de la sobre-activación de la señalización SHH/GLI.

Figura 26.- Los componentes estructurales involucrados en las adhesiones focales no se ven afectados en DAOY con menor expresión de NETRINA1.

Figura 27.- Netrina1 recombinante rescata la muerte celular en la línea estable *knock-down* para *Smoothened*.

Figura 28.- Sobreexpresión de *UNC5C* en línea celular DAOY modula la supervivencia en presencia de Netrina1 recombinante.

Figura 29.- Regulación de la viabilidad celular en respuesta a la modulación de la señalización SHH/GLI y al bloqueo de la acción de NETRINA1 en la línea celular DAOY.

Figura 30.- *UNC5C* se encuentra sobre-expresado en MB derivado por la sobre-activación de la señalización SHH/GLI y se correlaciona positivamente con los niveles de expresión de *GLI1*.

Figura 31.- Los niveles de expresión de *NTN1* se correlacionan positivamente con los niveles de *ATOH1* en MB humano, mientras que el gen *NTN1* presenta una secuencia E-box en la región próxima al promotor.

Figura 32.- El gen humano de *UNC5C* presenta elementos regulatorios de la señalización SHH/GLI en la región próxima al promotor, y su nivel de expresión se correlaciona positivamente con los niveles de expresión de *ATOH1* en el MB humano.

LISTADO DE ABREVIATURAS Y NOMENCLATURA

Abreviaturas

2F5: Anticuerpo bloqueante contra Netrina1 (humana, murina)

3C: Captura de Conformación Cromosómica

ATG: Sitio de inicio de la traducción

ATP: Adenosín trifosfato

amb: ambiente

BSA: albúmina de suero bovino

BrdU: bromodesoxiuridina (BrdU o 5-bromo-2-desoxiuridina)

bHLH: *basic helix-loop-helix*

CC: Cuerpo calloso

ChIP: *Chromatin Immuno Precipitation, Inmunoprecipitación de cromatina*

CI: Coeficiente Intelectual

CGE: Capa granular externa del cerebelo

CGI: Capa granular interna del cerebelo

CRISPR: *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*

Cyc: Ciclopamina, inhibidor farmacológico de la vía SHH/GLI

DAB: diaminobencidina

DAOY: Línea celular derivada de meduloblastoma humano

DAPI: Diclorhidrato de 4',6-diamidino-2-fenilindol

DCC: *Deleted in Colorectal Cancer, Receptor de NETRINA1*

DNA: Ácido Desoxirribonucleico

DNAc: DNA complementario

DMEM: *Medio Dulbecco's Modified Eagle Medium*

DMSO: Dimetil sulfóxido

E: Estadío embrionario, día embrionario

E-Box: Secuencia típicamente reconocida por factores *bHLH*

Ecr-293: Línea celular humana derivada de riñón

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

EMEM: *Eagle's Minimum Essential Medium*

FA: Fosfatasa alcalina

FAK: Kinasa de adhesiones focales

GBS: *Gli Binding Site*, sitio de unión a Gli

GBS 8X: tándem de 8 secuencias del GBS de Gli1, control positivo de señalización SHH/GLI

GFP: *Green Fluorescent Protein*, proteína fluorescente verde

Gli3 *High*: forma activadora de Gli3 de alta actividad

GNP: *Granular Neural Progenitor*, precursor neural granular

gRNA: RNA guía

Gy: Gray, unidad de medición de dosis absorbida de radiación

HBL100: Línea de cáncer de mama humano

HC: *Hipocampal commissure*, comisura hipocampal

HCl: Ácido clorhídrico

HEK293: Línea celular embrionaria de riñón humano

HH: Hedgehog

HRP: *horseradish peroxidase*, Peroxidasa de rábanito

H3K4Met1: Monometilación de la lisina 4 en la histona 3.

H3K27Ac: Acetilación de la lisina 27 en la histona 3.

IF: Inmuno Fluorescencia

IgG: Inmunoglobulina G

IHQ: Inmunohistoquímica

Kb: Kilobase

Kd: Constante de disociación

kDa: Kilodalton

M: Molar

MB: Meduloblastoma

MC: Medio condicionado

mg: Miligramos

mM: Milimolar

mm: Milímetro

mRNA: Ácido ribonucleico mensajero

MTT: Metil tiazol tetrazolio

MAST: *Motif Alignment & Search Tool*

MEME: *Multiple Em for Motif Elicitation*

NaCl: Cloruro de sodio

NGF: *Neural Growth Factor*, factor de crecimiento neural

nM: Nanomolar

nm: Nanómetros

pb: pares de bases

O.N.: *Over Night*, incubación durante la noche (promedio 16 horas)

P: Día de desarrollo Postnatal

PBS: Tampón fosfato salino

PCNA: *Proliferating Cell Nuclear Antigen*

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

PFA: Paraformaldehído

pH: Potencial de hidrógeno

Ptc1: *Patched1*, receptor de HH

qPCR: Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa

Rcm: *Rostral cerebelar malformation*, malformación cerebelar rostral

RD: Receptor de Dependencia

rpm: Revoluciones por minuto

RT: Transcriptasa reversa

SDS: Dodecil sulfato de sodio

SDS-PAGE: Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico

SFB: Suero fetal bovino

SHH: Sonic hedgehog

SHH*: Medio condicionado de la línea Ecr-293, enriquecido con SHH

shNTN1: Línea celular establemente transducida con el interferente contra NTN1

shSCR: *Scrambled*, línea celular establemente transducida control

shSMO: Línea celular establemente transducida con el interferente contra SMO

siRNA: *small interfering RNA*

Smo: *Smoothened*, co-receptor de HH

SNC: Sistema Nervioso Central

T°: Temperatura

TBS: Tampón tris-salino

TBS-T: Tampón tris-salino suplementado con Tween al 0.1%.

Tg: Transgénico

Tm: Temperatura de fusión (*melting temperature*)

TOPRO: Tinción nuclear fluorescente en base a carbocianina

Tuj1: β III-tubulina

μ g: Microgramo

μ L: Microlitro

μ M: Micromolar

WB: Western blot

WNT: Señalización Wnt

WT: *Wildtype*, silvestre

Nomenclatura

Genes y proteínas:

- Murino: Los genes y proteínas murinas se denominarán con la primera letra en mayúscula. Irán en cursiva sólo cuando se refieran a genes o transcritos de esta especie, por ejemplo, los genes: *Ntn1*, *Unc5c*, *Shh* y las proteínas: Netrina1, Unc5c, Shh.
- Humano: Los genes y proteínas humanas se denominarán completamente en mayúscula. Irán en cursiva sólo cuando se refieran a genes o transcritos de esta especie, por ejemplo, los genes: *NTN1*, *UNC5C* y *SHH* mientras que las proteínas serán: NETRINA1, UNC5C y SHH.

RESUMEN

Las NETRINAS son proteínas secretadas pertenecientes a la familia de lamininas que se expresan en el Sistema Nervioso Central (SNC) durante el desarrollo. Fueron descritas originalmente como factores de guía axonal y migración celular. Los receptores de NETRINA1, el ligando más caracterizado de la familia de NETRINAS, tanto la familia de DCC/NEOGENINA1, así como la de homólogos de UNC5, forman parte del grupo denominado Receptores de Dependencia (RD). Éstos crean un estado de dependencia celular a ligandos específicos, induciendo la muerte celular programada (apoptosis) en ausencia de éste. La habilidad que presentan estos receptores de gatillar apoptosis, se ha propuesto como un mecanismo de supresión tumoral condicional, implicándose tanto en migración como supervivencia de células tumorales en el proceso de metástasis. Lo anterior sugiere que este ligando no solo desempeñaría un rol en la guía axonal sino que podría actuar como factor de supervivencia. Si bien NETRINA1 regula procesos cruciales durante el desarrollo y

ha mostrado recientemente promover la supervivencia celular en el cáncer, aún no se han descrito las vías de señalización que regulan su transcripción en mamíferos. En el presente trabajo se demuestra el control transcripcional que ejerce la señalización SHH/GLI sobre *NETRINA1* humano (*NTN1*). Por su parte, considerando los ensayos funcionales realizados en el modelo de ratón, los resultados sugieren que dicha regulación se encuentra conservada en el modelo murino. Asimismo, se demuestra el rol que desempeña *NETRINA1* como factor de supervivencia tanto durante el desarrollo cerebelar murino, como en meduloblastoma humano.

ABSTRACT

NETRINS are secreted proteins that belong to the laminin family, which are expressed in the central nervous system during the development. NETRINS were originally described as axonal guidance and cell migration factors. The most characterized ligand of the NETRIN family, NETRIN1, has two types of receptors the DCC and UNC5 homologs families; both belong to the Dependence Receptor group (DR). These receptors are able to create a cellular state of dependence to specific ligands, inducing apoptosis when the ligand is absent. The ability that these receptors display in triggering apoptosis has been proposed to be a conditional tumoral suppression mechanism, been involved in cell migration and in cell survival in tumoral cells during the metastasis process. The former suggest that NETRIN1 not only plays a role in the axonal guidance but may also acts as a survival factor. Even though NETRIN1 controls pivotal processes during the development, and recently has been involved with cell survival in cancer, which signalling pathways governs NETRIN1 expression in mammals is an issue that remains unaddressed. In this work we demonstrate the direct control that the SHH/GLI pathway exerts over NETRIN1 transcription

(*NTN1*), a regulation that seems to be conserved in mouse. Additionally, here we demonstrate the role that NETRIN1 plays acting as a survival factor, both in murine cerebellar development and in human medulloblastoma.

INTRODUCCIÓN

Las Netrinas: Rol en guía axonal

El sistema nervioso central (SNC) es un sistema biológico complejo, constituido por una red intrincada de conexiones específicas entre células neurales, lo que sostiene tanto estructural como funcionalmente a circuitos neuronales que han evolucionado para procesar y almacenar información de manera eficiente. Es así como en el cerebro humano, cada una de sus casi 10^{12} neuronas, conectan en promedio 1000 células blanco, permitiendo la formación de redes neuronales a través de un patrón de conectividad exquisita, fundamental para el correcto funcionamiento del SNC (Barallobre y col. 2005). El establecimiento de este patrón, se genera de manera precisa durante el desarrollo gracias a la acción orquestada de diversas señalizaciones y eventos moleculares que actúan de manera coordinada.

En particular, durante la morfogenesis del SNC, los progenitores neuronales nacen en nichos neurogénicos, para luego migrar hacia su ubicación final y formar contactos sinápticos con sus blancos celulares (Barallobre y col. 2005). Este proceso de migración celular, se encuentra mediado por una serie de eventos moleculares responsables de la correcta navegación de los progenitores neuronales hacia sus blancos, los que constituyen la guía axonal. En 1890 Santiago Ramón y Cajal, describe los conos de crecimiento axonal como la estructura celular responsable de guiar la extensión de la célula (Ramón y Cajal, 1890). Así, los axones son guiados por diversas rutas a través de la acción combinada de señales ambientales presentes en el medio extracelular, las que pueden actuar como atractantes o como repelentes. Por su parte, el cono de crecimiento axonal presenta un repertorio variado de receptores, mediante los cuales explora la existencia de dichas señales. De esta forma, un gradiente multidimensional de diversos factores de guía axonal permite que el axón navegue de manera correcta, siguiendo una trayectoria específica y definida.

A pesar de que el proceso de guía axonal es rico y variado en términos moleculares, es un número acotado de familias de factores de guía axonal, altamente conservados, las que participan principalmente en establecimiento de la conectividad neuronal: Netrinas, Efrinas, Semaforinas y Slits (revisado por Guan y Rao 2003). Entre éstas, las primeras en ser descritas fueron las Netrinas, tanto en SNC de invertebrados como de vertebrados.

En 1990 se identificó la primera Netrina, Unc-6, reportada en un *screen* genético en el modelo de *C. elegans* (Hedgecock y col. 1990). En este estudio, se evaluaron distintos mutantes que afectan la guía axonal en el contexto de migración circunferencial en la epidermis, identificando tres genes cuya mutación se traduce en un fenotipo descoordinado (del inglés *uncoordinated*), llamados Unc-5, Unc-6 y Unc-40, proponiendo a Unc6 como el gen que codifica para una señal de guía axonal, mientras que Unc-5 y Unc-40 codifican para receptores de Unc6. Posteriormente, en 1994 el grupo liderado por el Dr. Tessier-Lavigne identificó y purificó el ortólogo de Unc-6 en pollo, nombrándolo como Netrina por su origen del Sánscrito "*Netr*", que significa "el que guía". Este trabajo constituye la primera evidencia del rol que desempeña Netrina1 en el contexto de guía axonal en vertebrados (Serafini y col. 1994).

Dado que su primer rol biológico reportado es el de mediar procesos cruciales como la guía axonal y migración celular, es que las Netrinas fueron originalmente señaladas exclusivamente como factores de guía axonal, estando su función conservada a través de diferentes especies, como *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster*, *Danio rerio*, *Xenopus laevis*, *Mus musculus* y en humanos.

En términos estructurales, las Netrinas pertenecen a la familia de proteínas de las lamininas y, al igual que la mayoría de las moléculas de matriz extracelular y adhesión celular, presenta diversos módulos. En su extremo amino terminal

exhibe dos módulos homólogos a las subunidades N-terminales de las lamininas, los módulos V y VI, mientras que los dominios que los constituyen son VI, V1-V3 y C, siendo V1-V3 necesarios para la acción atractante de Netrina en el modelo de *C.elegans* (Lim y Wadsworth 2002). Por su parte, el dominio C-terminal comprende sitios de unión para glucolípidos de la membrana y para componentes de la matriz extracelular como proteoglicanos heparan sulfatos. Asimismo, se ha descrito que las integrinas $\alpha_3\beta_1$ y $\alpha_6\beta_4$ se pueden unir al dominio C terminal (revisado por Bradford y col. 2009).

A la fecha, se han descrito cuatro isoformas secretadas: Netrina1, Netrina2, Netrina3 y Netrina4 (también conocida como β -netrina). Sin embargo, también existen variantes ancladas a la membrana, estas son las Netrinas G1 y G2, las que presentan una modificación del tipo GPI (Sun y col. 2011).

Con respecto a los receptores de las Netrinas, los principales pertenecen a la familia de Dcc (*Deleted in colorectal cancer*) incluyendo Neogenina1, la familia de homólogos de Unc5, comprendiendo Unc5a, Unc5b, Unc5c y Unc5d y Dscam (*Down syndrome cell-adhesion molecule*) (Leonardo y col. 1997, Ackerman y col. 1997). Adicionalmente, las integrinas $\alpha_3\beta_1$ y $\alpha_6\beta_4$ han mostrado reconocer a Netrina1 en células epiteliales. Asimismo la proteína acoplada a la proteína G adenosina A2b ha sido descrita como receptor de Netrina1 (Corset y col. 2000), no obstante, a la fecha la señalización inducida por Netrina1 a través de A2b se encuentra en discusión.

En términos funcionales, el rol de guía axonal que ejerce Netrina1 es dual, dependiendo al receptor al cual se une y de la vía de transducción activada río abajo del receptor. Al unirse Netrina1 a Dcc/Neogenina1, se induce la homodimerización del receptor actuando como quimioattractante, mientras que el reconocimiento a través de homodímeros de Unc5 o heterodímeros Unc5-Dcc, promueve una respuesta quimiorelente (Colamarino y Tessier-Lavigne 1995, Hong y col. 1999)(Figura 1A). Los principales blancos identificados, río abajo de ambas señalizaciones canónicas, son proteínas que se encuentran asociadas a la regulación de proteínas responsables de la reorganización del citoesqueleto como la kinasa de adhesiones focales (FAK), la proteína tirosina kinasa Fyn, la familia Rho de pequeñas GTPasas, y proteínas asociadas a microtúbulos (revisado por Guan y Rao 2003, Rajasekharan y Kennedy 2009)(Figura 1B).

El rol que desempeña Netrina1 en la guía axonal y migración celular durante el desarrollo, fue confirmado en el modelo *in vivo* por el grupo del Dr. Tessier-Lavigne. En este trabajo se evaluó el efecto de la pérdida de función de Netrina1 en el desarrollo del sistema nervioso central murino, resultando principalmente en defectos comisurales, observándose la ausencia del cuerpo calloso, comisura hipocampal y anterior en los ejemplares nulos en día embrionario (E) 18.5, así como también deficiencias en las trayectorias de los axones comisurales de la medula espinal en E10.5 (Serafini y col. 1996)(Figura

1C). No obstante, el análisis fue restringido al desarrollo embrionario, dado que los ratones mutantes para *Netrina1* mueren perinatalmente, impidiendo el análisis postnatal. De manera complementaria, en 1998 el equipo de Marjo Salminen generó un ratón mutante para *Netrina1*, publicando en el año 2000 los defectos morfológicos observados en la formación de los canales semicirculares en el oído interno. Este artículo corresponde a una de las primeras evidencias del rol morfogenético que desempeña *Netrina1* fuera del SNC (Salminen y col. 1998, Salminen y col. 2000). Asimismo, mediante el mismo modelo, se demostró la implicancia de *Netrina1* en el desarrollo del bulbo olfatorio, cuya función es necesaria no solo para la migración de progenitores neuronales sino que también de precursores de oligodendrocitos (Hakanen y col. 2011).

Dado que el establecimiento de la red neuronal en desarrollo del SNC se asemeja a la formación del sistema vascular, puesto que ambos procesos son controlados por señales que median la correcta navegación celular, es que recientemente surgió un nuevo campo de investigación dirigido a evaluar el rol que cumple *Netrina1* en la angiogénesis. Dichos estudios principalmente están enfocados en el campo de la terapia celular (Carmeliet 2003, Bongo y Peng 2014). Sin embargo, a la fecha la función que desempeña *Netrina1* en la angiogénesis se encuentra sujeta a discusión, básicamente debido a la existencia de datos contradictorios tanto *in vitro* como *in vivo*, por lo que no existe en la actualidad consenso claro con respecto a si *Netrina1* es un factor

Netrina1 y su nuevo rol como factor de sobrevivencia celular para receptores de dependencia de las familias Dcc/Neogenina y Unc5

Recientemente, las principales familias de receptores de Netrina1, familia de homólogos de Dcc y Unc5, han mostrado pertenecer al grupo de receptores de dependencia (RD). Los RD son receptores capaces de inducir una señalización dual dependiendo de la disponibilidad de un ligando específico. En presencia de ligando, inducen una señalización positiva, promoviendo respuestas celulares como proliferación, migración y sobrevivencia celular. Por el contrario, en la ausencia de ligando, dichos receptores inducen muerte celular. La porción intracelular de los RD exhibe dominios sustrato de caspasa, cuyo corte induce apoptosis, mientras que dicha inducción se ve abolida en presencia de un inhibidor de caspasa, zVADfmk (Mehlen y Thibert 2004). Es así como los RD generan un estado de dependencia celular a la presencia del ligando específico, en este caso, de Netrina1.

Esta habilidad que exhiben los RD de gatillar apoptosis en ausencia de ligando, ha sido propuesta como un mecanismo de supresión tumoral condicional, por lo que sólo las células cancerígenas que presentan alteraciones en la señalización de los RD, serían capaces de evadir el control de la apoptosis, sobrevivir y expandirse. Estas alteraciones de la señalización de los RD

representan una ventaja selectiva, la que podría estar dada por al menos tres mecanismos: (i) pérdida o inactivación del receptor, (ii) expresión autocrina del ligando y (iii) pérdida o inactivación de complementos pro-apoptóticos intracelulares (Mehlen y Guenebeaud 2010, Mehlen y col. 2011).

A la luz de esta nueva propiedad descrita para Netrina1, la de modular la actividad pro-apoptótica de sus receptores, es que ha surgido una nueva línea de investigación, dirigida a elucidar el rol que desempeñaría Netrina1 en la sobrevivencia celular, tanto en la homeostasis tisular como en el contexto de enfermedad como el cáncer. Una de las primeras evidencias de la función de Netrina1 en la sobrevivencia celular, fue obtenida el año 2004 por el grupo de Patrick Mehlen, donde analizaron el ratón transgénico condicional para la sobre-expresión de Netrina1 en el intestino. Como resultado de la ganancia de función de Netrina1, se observaron cambios drásticos a nivel del tejido intestinal, promoviéndose la formación de hiperplasia y de adenomas. Se argumentó que esto era producto de la inhibición de la apoptosis, mientras que el mismo transgénico en fondo genético de mutante hipomorfo para *APC*, promueve la formación de adenocarcinoma (Mazelin y col. 2004) (Figura 3A). Esta observación sienta precedente sobre el papel que puede cumplir Netrina1 en el control sobre la homeostasis, en tejidos que presentan una intensa renovación celular, como el intestino. Con respecto a este rol, el modelo actual considera que las células de la cripta intestino proliferan, expresando tanto Netrina1 como Dcc, evadiendo la apoptosis. Cuando dejan de proliferar y

comienzan a diferenciarse, se desplazan hacia el extremo distal de las vellocidades, donde la concentración de Netrina1 es reducida, gatillando apoptosis. De esta manera, el gradiente de Netrina1 puede ejercer un control sobre el tiempo de vida de las células que están continuamente proliferando, siendo las células capaces de evadir este control, a través de la pérdida de función del receptor o mediante la producción autocrina de Netrina1, capaces de generar un tumor (revisado por Bernet y Fitamant 2008, Mehlen y Guenebeaud 2010).

Siguiendo en esta línea, el modelo *in vivo* de la pérdida de función de Netrina1 en el SNC murino, no sólo muestra defectos comisurales sino que también un menor número de células en el tronco encefálico, como resultado de un aumento de la muerte celular (Llambie y col. 2001, Bloch-Gallego y col.1999). Cabe destacar, que el mutante nulo de *Ntn1* en estadio E12 muestra un aumento significativo de la muerte celular con respecto a ratón silvestre, justamente en las regiones donde se expresan *Unc5h* y/o *Dcc*. Dicho aumento de la tinción de TUNEL también fue observado en el labio rómbico y en el primordio cerebelar (Llambi y col. 2001) (Figura 3B). Esta es una de las principales evidencias que demuestra la regulación que ejerce la disponibilidad de Netrina1 sobre la actividad pro-apoptótica de sus receptores *in vivo*. Asimismo, en el modelo de pérdida de función de Netrina1 desarrollado por Salminen, se observa una reducción significativa del tamaño del encéfalo en ratones en día postnatal (P) P16, en particular, de estructuras cuyo desarrollo

ocurre de manera postnatal, como el cerebelo. No obstante, los autores no repararon en la muerte celular asociada al fenotipo observado, la cual podría dar cuenta de la reducción del tamaño reportado (Alberts y col. 2002, Hakanen y col. 2011) (Figura 3C).

Dentro de la gama de receptores de Netrina1, el único receptor cuyo ratón mutante presenta fenotipo en el cerebelo corresponde a *Unc5c*, originalmente descrito como *Rcm*, por el fenotipo del ratón mutante el cual presenta una malformación cerebelar rostral (*Rostral cerebelar malformation*). En el modelo genético de *Rcm*, se han estudiado los defectos en el desarrollo del SNC originados por la pérdida de función de *Unc5c*, exhibiendo el fenotipo más drástico en el cerebelo. En particular, el ratón mutante nulo de *Unc5c* presenta una reducción dramática en el tamaño cerebelar, patrones de foliación anormales y ubicación ectópica de células de Purkinje y GNPs en el colículo inferior en el encéfalo postnatal, mostrando que se requiere de la expresión de *Unc5c* para la migración normal de las GNPs y de las células de Purkinje durante el desarrollo (Ackerman y col. 1997) (Figura 2). Considerando que *Unc5c* pertenece al grupo de receptores de dependencia, la reducción del tejido cerebelar normal observada en el mutante *Rcm*, podría deberse a la pérdida de función en la señalización positiva de supervivencia inducida por Netrina1 a través de este receptor.

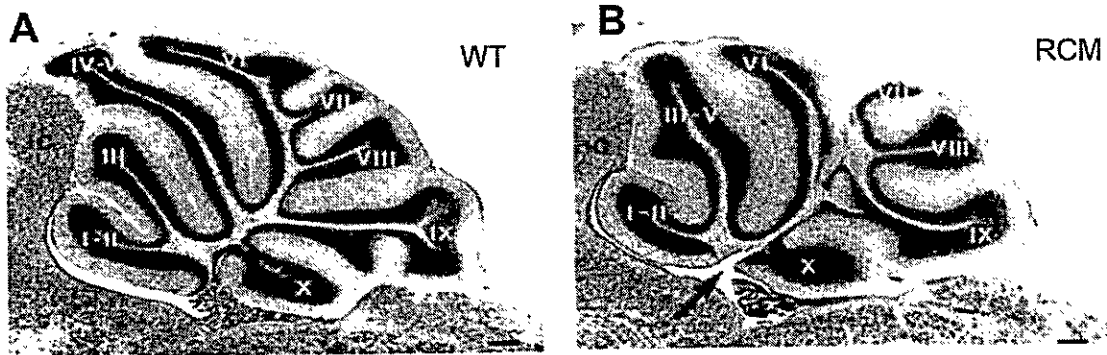


Figura 2.- Fenotipo cerebelar del ratón mutante *Unc5c* adulto. A.- Tejido cerebelar silvestre, WT (*wildtype*). B.- Cerebelo mutante de *Unc5c* (RCM), presenta alteraciones en la foliación y una reducción en el tamaño. Barra= 670 μ m. (Modificado de Ackerman y col. 1997).

Considerando que la señalización de Netrina1 se encuentra desregulada en distintas enfermedades, es que se ha evaluado la participación de *Unc5c* como RD en el contexto del cáncer. El modelo de ratón mutante *Unc5c* en el fondo genético de APC, exhibe una disminución significativa de la apoptosis en los adenomas y adenocarcinomas, mientras que la proliferación celular no se ve afectada en los tumores del colon. Así, la pérdida de función de *Unc5c*, aparenta afectar sólo a la progresión tumoral en el cáncer de colon (Bernet y col. 2007). Mientras que el rol que desempeña *Unc5c* en la iniciación y progresión tumoral en tumores neurales pediátricos como en el meduloblastoma, se desconoce a la fecha.

Por otra parte, existen antecedentes que demuestran que NETRINA1 se encuentra sobre-expresada en neuroblastoma agresivo, la cual es expresada por las células tumorales y no las estromales evaluado mediante inmuno

detección, y que la inhibición de su unión a UNC5B induce apoptosis, comportándose como un factor de supervivencia en este tipo de cáncer pediátrico (Delloye-Bourgeois y col. 2009) (Figura 3D). Es así como aproximaciones tanto *in vitro* como *in vivo* han mostrado que Netrina1 promueve la progresión tumoral, metástasis y angiogenesis en el contexto del cáncer (Delloye-bourgeois y col. 2009, Akino y col. 2014).

Dilucidando la señalización de Netrina1: Una nueva estrategia para terapia celular

Dado el rol que desempeña Netrina1 en la supervivencia celular, es que tanto el ligando como sus receptores resultan ser candidatos atractivos para el desarrollo de nuevas estrategias de terapia celular en cáncer. En el marco de aplicación clínica, se ha evaluado la implementación de los niveles plasmáticos de Netrina1 como bioindicador de distintos tipos de cáncer, puesto que se encuentra incrementado de manera significativa con respecto a pacientes control (Ramesh y col. 2011). Estudios recientes han mostrado que la interrupción de la unión Netrina1-Receptor, se asocia con la inhibición del crecimiento tumoral y metástasis. Debido a lo anterior, se ha propuesto la interrupción de la interacción ligando-receptor como una atractiva y eficiente aproximación celular para el tratamiento del cáncer (Arakawa 2004, Mehlen y col. 2011).



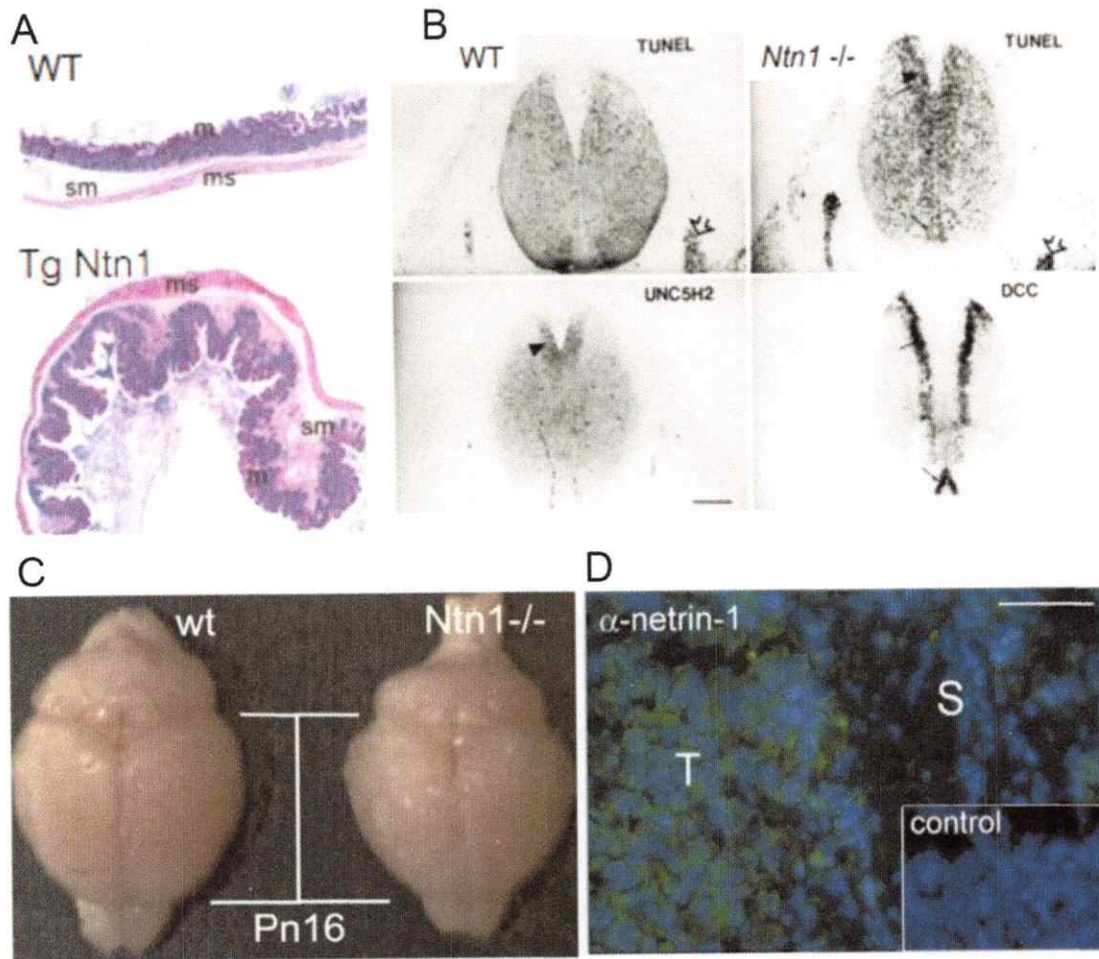


Figura 3.- NETRINA1 actúa como un factor de supervivencia, tanto en el contexto de desarrollo como en cáncer. A.- La sobreexpresión de Netrina1 en el intestino promueve la formación de alteraciones tisulares como hiperplasia y adenoma en el ratón condicional (Tg Ntn1) en comparación al ratón silvestre (*wildtype*, WT) (Modificado de Mazelin y col. 2004). **B.-** El mutante nulo de *Ntn1* en estadio embrionario temprano, ya exhibe un aumento significativo de la muerte celular con respecto a ratón silvestre (WT), en las regiones de expresión de los receptores canónicos, medido a través del ensayo de TUNEL, en corte horizontal de cerebro en E12 (Modificado de Llambi y col. 2001). **C.-** El ratón nulo de *Ntn1* presenta una reducción significativa del tamaño del encéfalo en el día P16 (Modificado de Hakanen y col. 2011). **D.-** Netrina1 se encuentra sobre-expresada en neuroblastoma agresivo, siendo expresada por las células tumorales (T) y no las estromales (S) (Modificado de Delloye-Bourgeois y col. 2009)

A pesar que Netrina1 fue originalmente descrita como un factor de guía axonal, actualmente ha sido implicada en diferentes procesos celulares en un amplia variedad de contextos. Y si bien a la fecha Netrina1 ha mostrado desempeñar un rol no solo en la guía axonal, sino que también en la angiogénesis, proliferación, sobrevivencia y migración celular en mamíferos, aún se desconoce alguna vía de señalización que controle su expresión durante el desarrollo.

¿Netrina1, nuevo blanco transcripcional directo de Hedgehog/Gli?

Hay evidencia que relaciona la señalización Hedgehog (Hh) y Netrina1 en vertebrados, tanto *in vitro* como *in vivo*. Una de las primeras observaciones fue obtenida por el grupo de Tessier-Lavigne el año 2003, en cuyo artículo describen la expresión de Netrina1 en uno de los territorios clásicamente descritos como inducido por la señalización Hh, como es la placa del piso del tubo neural en el contexto del desarrollo (Charron y col. 2003). Asimismo, existen antecedentes *in vivo* que evidencian la respuesta de los niveles transcripcionales de Netrina1 ante la modulación de dicha vía. El año 2008 en nuestro laboratorio, se estableció mediante un estudio por microarreglos a *Ntn1* como gen blanco de la vía Hh en pez cebra, validado a través de la comparación de los perfiles transcripcionales de embriones con mutaciones de inactivación de la vía Hh *versus* el fenotipo silvestre y embriones con la vía Hh

sobre-estimulada inyectados con mRNA de *Shh*. Las mutaciones de inactivación de la vía utilizadas correspondieron a: *slow-muscle omitted (smu)*, la cual inactiva el receptor Smoothened (*smo*) bloqueando la señalización Hh, y *detour(dtr)*, el cual inactiva el factor Gli1, efector principal de la vía Hh en peces. Dentro de los genes cuya expresión varió de manera sustantiva se encontró el homólogo de Ntn1 en pez cebra, *ntn1a* variando según las condiciones: *shh* mRNA/silvestre 1,4, *smu*/silvestre 0,8 y *dtr*/silvestre 1,0. Si bien en dicho estudio se consideró un aumento como significativo el de dos veces por sobre el fenotipo silvestre, este resultado sienta precedente de *Ntn1* como posible blanco transcripcional de la vía Shh/Gli (Bergeron y col. 2008). Este antecedente se ve reforzado por la observación realizada por Xu en 2006, a través del desarrollo de un microarreglo en pez cebra, en búsqueda de genes blanco de la vía de Shh. En dicho trabajo, se observó una reducción de la expresión de *ntn1a* en embriones tratados con ciclopamina, inhibidor farmacológico de la vía Shh que actúa a nivel de *smo*, mientras que presentó un fuerte aumento ante la sobre-estimulación de la vía a través del tratamiento con dnPKA, dominante negativo de PKA, que actúa como inhibidor de la vía Hh (Xu y col. 2006).

La Señalización Shh

El gen *Hedgehog* fue originalmente descrito en *Drosophila melanogaster*, y fue acuñado debido al fenotipo observado en la mosca mutante del gen, la cual presenta dentículas puntiagudas en su cutícula, semejante al aspecto de un erizo, *hedgehog* en inglés (Nüsslein-Volhard & Wieschaus 1980). Mientras que en vertebrados la familia de proteínas Hh exhibe tres genes homólogos: Sonic, Indian y Desert, los que fueron inicialmente descritos en el modelo de pollo (Riddle y col. 1993, Gilbert 2005).

La familia de proteínas Hh desempeña un rol evolutivamente conservado en metazoos, regulando el desarrollo de estructuras embrionarias y la mantención de diversas estructuras adultas, incluyendo poblaciones celulares progenitoras (revisado por Ingham y col. 2011). En particular, Shh es el único de los miembros de la familia Hedgehog cuya expresión se ha reportado en el SNC y su señalización ha sido implicada en la regulación de procesos tales como diferenciación celular, regionalización (*patterning*), proliferación, migración celular, guía axonal y auto-renovación de las células troncales y progenitoras, actuando según el contexto (Jia & Jiang 2006, Teglund & Toftgård 2010, Robbins y col. 2012).

En el desarrollo del SNC, Shh es expresado ventralmente durante estadios embrionarios tempranos, controlando la morfogénesis del cerebro anterior,

medio y posterior. Dentro de sus roles se destacan la inducción de la diferenciación neuronal en el cerebro ventral, la regulación del tamaño del cerebro medio ventral y el control del desarrollo de los ganglios basales. Después de este primer periodo en que la señalización canónica (mediada por los factores de transcripción Gli, detallado a continuación) exhibe una función ventralizante, otras zonas del cerebro comienzan a expresar este ligando durante la embriogénesis tardía, como la zona limitans intratálámica, las células de Purkinje, la amígdala, el giro dentado del hipocampo, la placa tectal, el bulbo olfatorio y neocórtex. Es así como en este periodo posterior, Shh controla la proliferación celular en las principales estructuras corticales dorsales, como la corteza cerebral, el cerebelo y el tectum (colículo inferior y superior), promoviendo la expansión de dichas estructuras, regulando finalmente su tamaño (revisado por Ruiz i Altaba y col.2002) (Figura 4C).

La vía de señalización Hh se describe como canónica cuando involucra la unión del ligando Shh al receptor de 12 dominios de transmembrana, Patched1 (Ptc1, Ptch1), que en ausencia de ligando se encuentra inhibiendo permanentemente al segundo co-receptor de la vía Smo. La unión del ligando libera a Smo de su inhibición lo que gatilla una cascada de señalización intracelular la cual permite la generación de formas activadoras de los factores transcripcionales efectores de la vía, los factores Gli (Figura 4A). Éstos se traslocan al núcleo, uniéndose a regiones promotoras de diversos genes blanco de la vía de Hh (Stecca & Ruiz i Altaba 2010, Briscoe & Théron 2013). Los

factores Gli pertenecen a la familia de factores de transcripción de dedos de zinc y en vertebrados se describen las isoformas Gli1, 2 y 3 (revisado por Jia & Jiang 2006).

La importancia del rol biológico que ejerce la señalización Hh durante el desarrollo, queda evidenciada en el fenotipo observado en el ratón mutante nulo de *Patched1* (*Ptc1*), el principal receptor de Shh, el cual presenta considerables defectos en el desarrollo, como defectos en el cierre del tubo neural, expansión del tubo neural anterior y posterior, y malformación cardíaca, en estadio embrionario E8, siendo letal entre los días E9.0 y E10.5 (Goodrich y col. 1997) (Figura 4B). Dada la vasta cantidad de procesos en que la vía Shh se encuentra involucrada, la desregulación de esta vía de señalización conlleva a alteraciones en el desarrollo, y se ha vinculado con la ocurrencia de enfermedades como el cáncer (Jia & Jiang 2006, Robbins y col. 2012). En este sentido, diversos tipos de cáncer humanos han mostrado la activación aberrante de la vía de Shh de manera ligando-independiente mediante, amplificación de *Gli1* o *Gli2*, mutaciones de *Ptc1* o *Smo*, o la expresión desregulada de genes blanco de la vía (Mazumdar y col. 2011).

La señalización Shh/Gli regula el desarrollo del cerebelo

La señalización Shh/Gli constituye la principal vía de señalización mitogénica que regula la proliferación de células progenitoras granulares del cerebelo (GNPs) (Lewis y col. 1997, Wechsler-Reya & Scott 2001, Rubin & Rowitch 2002). El cerebelo es una región del encéfalo cuya función principal es la integración de las vías sensitivas y las vías motoras. Dentro de las funciones del cerebelo se encuentran tanto funciones sensomotoras, control del equilibrio, el reflejo vestibular ocular, así como funciones cognitivas, del lenguaje y memoria espacial. La clase neuronal más prevalente en el cerebelo, así como en el SNC de mamíferos, la constituye las neuronas granulares cerebelares. Las neuronas granulares desempeñan un rol esencial en coordinar la entradas aferentes hacia las eferencias motoras, a través de sus conexiones excitatorias con las neuronas de Purkinje (Roussel & Hatten 2011).

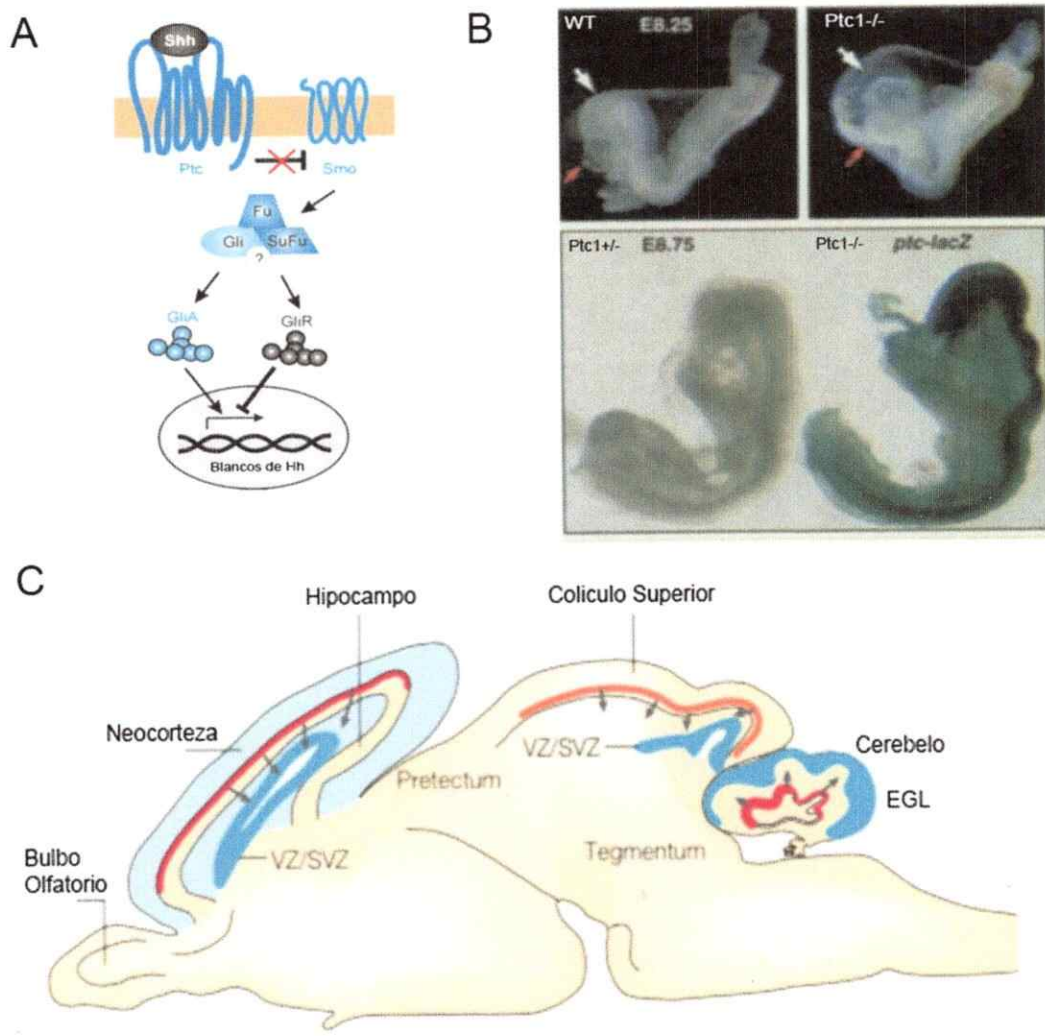


Figura 4.- La señalización Sonic Hedgehog (Shh) es pivotal para el desarrollo del sistema nervioso central. A.- Diagrama resumen de la señalización canónica Hh, en la que el ligando Shh se une a su receptor Ptc1, liberando de su represión a un Smo promoviendo la generación de formas activadoras de los factores transcripcionales Gli (Modificado de Ruiz I Altaba y col. 2002b). B.- Fenotipo del ratón mutante nulo de *Ptc1* en comparación al ratón silvestre (*wildtype*, WT), presenta defectos en el cierre del tubo neural, expansión del tubo neural anterior (flecha blanca) y posterior, y malformación cardíaca (flecha roja), en estadio embrionario E8, siendo letal entre los días E9.0 y E10.5. Este ratón presenta la inserción de un *cassette* de LacZ-β-Gal, como reportero de la expresión de *Ptc1* (Modificado de Goodrich y col. 1997). C.-Diagrama del control que ejerce Shh sobre la proliferación celular en las principales estructuras corticales dorsales, como la corteza cerebral, el

cerebelo y el tectum durante el desarrollo embrionario tardío murino, indicándose el origen de expresión de Shh (flechas) (Modificado de Ruiz I Altaba y col. 2002a).

Durante el desarrollo normal del cerebelo, los GNP_s, que se originan desde el labio rómbico próximo a la zona ventricular, proliferan extensivamente en la capa granular externa (CGE) de la superficie cerebelar. Los GNP_s responden de manera paracrina a señales mitogénicas provenientes de la capa subyacente de células de Purkinje, que secretan Shh. Los GNP_s luego migran desde la CGE a través de la capa de Purkinje, para formar la capa granular interna (CGI). En el trayecto a la CGI, los GNP_s se vuelven refractarios a las señales mitogénicas, salen del ciclo celular y se diferencian en neuronas granulares maduras. Sin embargo, se ha propuesto que cuando la vía Hh continua señalizando de manera constitutiva en los GNP_s, debido a mutaciones oncogénicas en genes de la vía, continua la proliferación de manera anómala provocando el desarrollo de Meduloblastoma (Dahmane & Ruiz I Altaba 1999, Teglund & Toftgård 2010) (Figura 5F).

Neoplasia cerebelar: Meduloblastoma

Clasificado como un tumor neuroectodermal primitivo del cerebelo, el meduloblastoma (MB) es el tumor cerebral maligno más común en niños, y se considera que se origina de anomalías genéticas en las vías de señalización requeridas para la maduración normal de la corteza cerebelar, en particular de vías involucradas en la neurogénesis de los GNPs (Low & Sauvage 2010, Teglund & Toftgård 2010, Roussel & Hatten 2011). El meduloblastoma es un complejo conjunto de enfermedades biologicamente distintas (Leary & Olson 2012). Integrando tanto un análisis genómico de número de copias como la evaluación de perfil de expresión de mRNA, en el 2011 se clasificaron 4 subgrupos de MB molecularmente distintos: SHH, WNT, Grupo 3 y Grupo 4 (o también Grupo C y Grupo D) (Northcott y col. 2011) (Figura 6A). Aproximadamente, el 30% de los MB pertenecen al subgrupo de SHH. Este grupo presenta dos *peaks* en la distribución de edad, concentrándose la mayoría entre los infantes (≤ 3 años) y adultos (≥ 16 años), y solo una pequeña fracción de tumores representados durante la niñez (4-15 años) (Ohli y col. 2015) (Figura 6B).

El modelo experimental en ratón ha provisto una importante aproximación a la patogénesis inducida por la vía de Hh en el desarrollo de MB. Considerando lo anterior, el tipo de tumor de MB muestra una fuerte conexión con la activación

aberrante de la vía de Hh, tanto en humano como en el modelo murino (revisado por Teglund & Toftgård 2010). Las características histológicas de este tipo de tumor se conservan tanto en el ratón como en el humano, dentro de las cuales se destaca la presencia de lesiones proliferativas focales, con células densamente empaquetadas con citoplasma escaso, en la vestigial CGE durante los estadios tempranos de progresión tumoral (6 a 12 semanas, ratón *Ptc1+/-*).

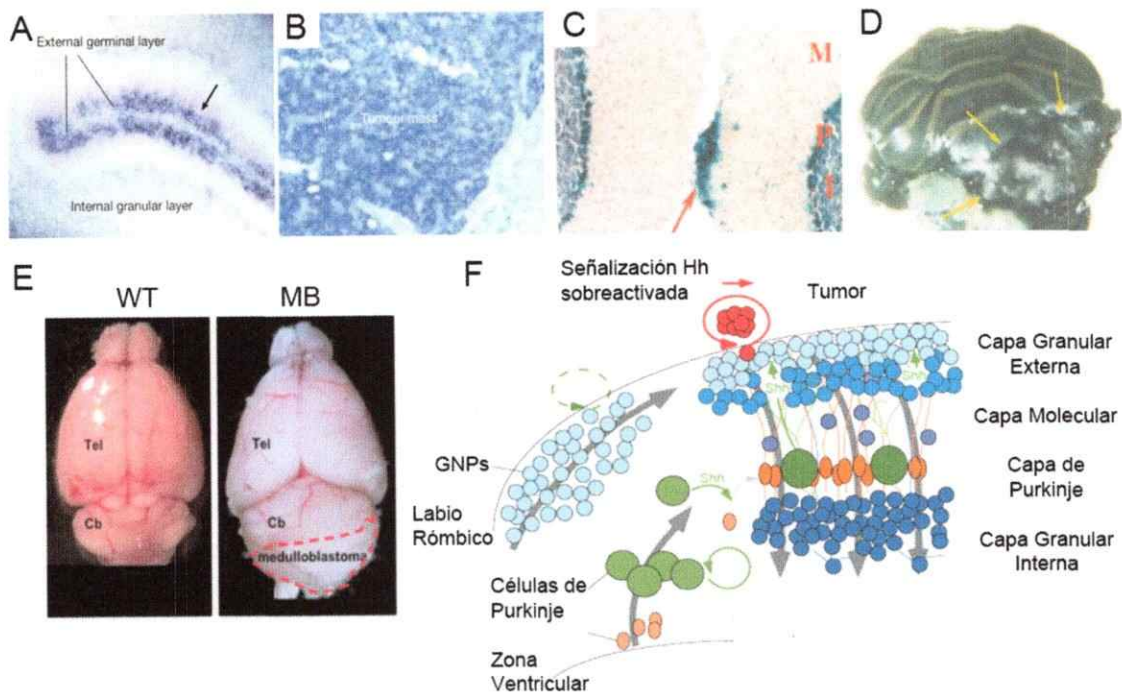


Figura 5.- El modelo murino de haploinsuficiencia de *Patched1* es la principal herramienta genética para el estudio del MB derivado de Shh *in vivo*. A.- Expresión de *Gli1*, blanco transcripcional clásico de la señalización Shh/Gli, en GNP's en la capa granular externa, en ratón día postnatal 5 (P5) (Modificado de Ruiz I Altaba y col. 2002b). B.- Expresión de *Gli1* en meduloblastoma humano (Modificado de Ruiz I Altaba y col. 2002b). C.- Expresión ectópica de *Ptc1* en grupo de GNP's en la capa granular externa en el modelo de haploinsuficiencia de *Ptc1*, *Ptc1+/-* (Corcoran y Scott 2001). D.- Masa tumoral originada por la sobreactivación de la vía Hh en GNP's, marcando

con x-gal la expresión de *Ptc1 (LacZ)* (flechas amarillas) (Corcoran & Scott 2001). E.- Formación de MB en ratón adulto (6 meses), en el modelo de *Ptc1+/-* (Modificado de Vaillant & Monard 2009). F.- Esquema del rol mitogénico que desempeña la señalización Hh sobre los GNP durante el desarrollo del cerebelo. La sobre-activación constitutiva de esta señalización conlleva a la generación del meduloblastoma derivado de Shh (Modificado de Dahmane & Ruiz I Altaba 1999).

En estadios avanzados, el MB se presenta como una masa de precursores proliferativos en el vestigio de la CGE que comprime el tejido normal del cerebelo (8 a 48 semanas, ratón *Ptc1+/-*) (Figura 5C y 5D). Asimismo, el MB conserva un perfil de expresión génica en ambas especies, mostrando la expresión de marcadores de linaje tanto neuronal como glial. Dadas las similitudes tanto histológicas como de expresión genética entre el MB murino y humano, se considera que el ratón *Ptc1+/-* como un buen modelo de estudio. Dado que en el modelo de *Ptc1+/-* la formación de MB muestra una baja frecuencia en presencia de un alelo *ptc1* silvestre, es decir, la haploinsuficiencia de *ptc1* no es suficiente como para gatillar el desarrollo del tumor, es que se considera que eventos complementarios deben ocurrir para permitir el desarrollo del MB (Corcoran & Scott 2001) (Figura 4). Dentro de las hipótesis que se han establecido al respecto, Wetmore y col. (2000) postula que la alteración de la apoptosis de manera complementaria a la pérdida de función de un alelo de *ptc1*, explicaría el desarrollo de MB, siendo entonces en particular interesante el hecho de que un factor de supervivencia como Netrina1 se

encuentre sobre-expresado en MB derivado de SHH/GLI (Datos sin publicar) (Figura 6C).

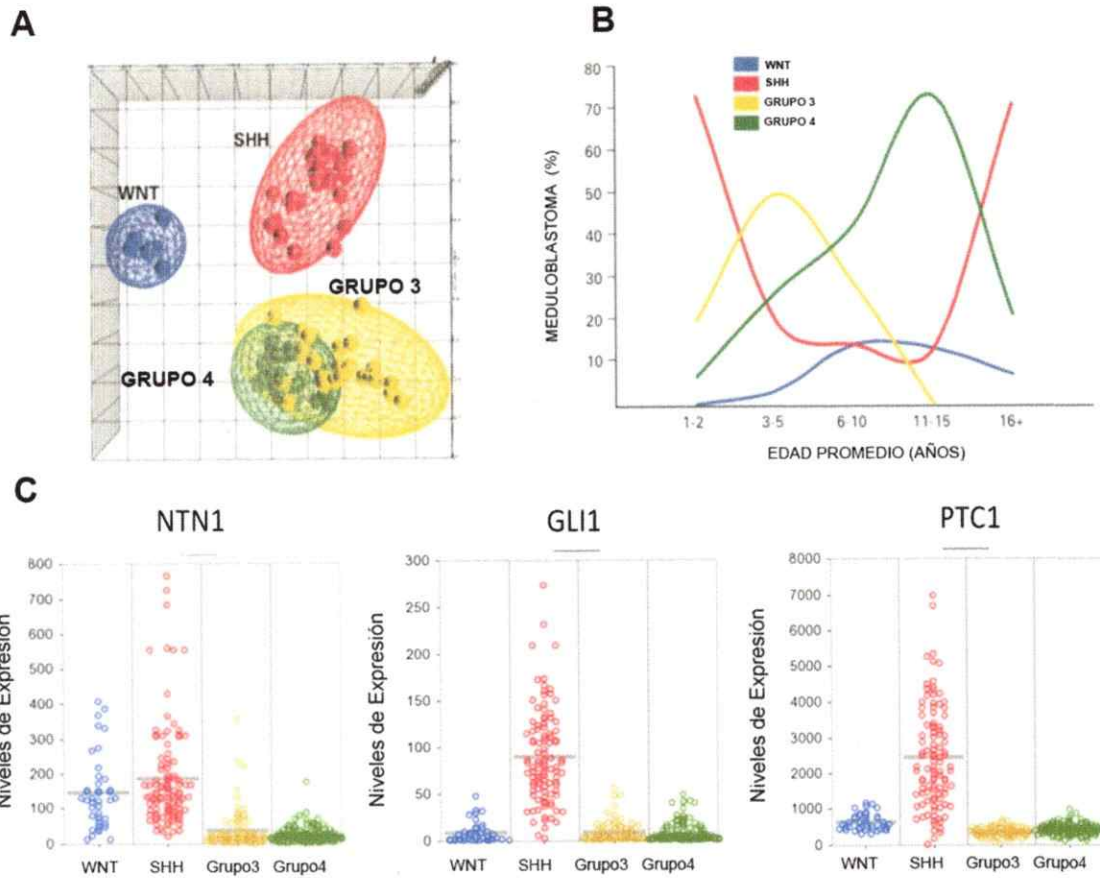


Figura 6.- El meduloblastoma es un grupo complejo de enfermedades biológicamente distintas: WNT (azul), SHH (rojo), Grupo 3 (amarillo) y Grupo 4 (verde). **A.-** Análisis de Componentes Principales, el que considerando criterios genéticos como el número de copias y perfil de expresión de ARNm, arroja 4 subgrupos de MB molecularmente distintos (Modificado de Northcott y col. 2011). **B.-** Distribución de frecuencias de la prevalencia de MB por edad (años) en los 4 subtipos de MB, presentando curvas distintas para cada enfermedad Modificado de Northcott y col. 2011). **C.-** Netrina1 se encuentra sobre expresada en MB de SHH, al igual que blancos clásicos de la vía como *GLI1* y *PTC1*, en humanos (WNT:40, SHH: 103, Grupo3: 79 y Grupo4:121 casos) (Datos sin publicar, laboratorio de M. Taylor, Brain Tumour Research Centre, Hospital for Sick Children, Toronto, Canada).

Considerando que existe evidencia que vincula la señalización de SHH/GLI1 con los niveles de expresión de *Netrina1* en humanos, así como se ha demostrado el rol que ejerce *Netrina1* en la sobrevida celular, en distintos tipos de cáncer, es que el presente trabajo postula como hipótesis al gen de *Netrina1* como un nuevo blanco transcripcional directo de la vía señalización SHH/GLI1, y que *Netrina1* actuaría como factor de sobrevida en GNP's propiciando el desarrollo de cerebelo durante el desarrollo postnatal. Una alteración del proceso proliferativo de estas células por acción de la vía SHH/GLI aberrante conllevaría a la formación de meduloblastoma en mamíferos.

HIPÓTESIS

NETRINA1 es un blanco transcripcional directo de la vía SHH/GLI y actúa como factor de supervivencia en el desarrollo cerebelar y en meduloblastoma en mamíferos.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar *NTN1* como blanco transcripcional directo de SHH/GLI, y su acción sobre la supervivencia celular en tanto en el desarrollo del cerebelo como meduloblastoma en mamíferos.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1.- Analizar la presencia y distribución de NETRINA1 en muestras de meduloblastoma humano.
- 2.- Evaluar *Netrina1* como blanco transcripcional directo de la vía de señalización SHH/GLI en mamíferos.
- 3.- Evaluar el efecto que ejerce NETRINA1 sobre la apoptosis, sobrevida y proliferación celular en la línea celular derivada de meduloblastoma humano causada por desregulación de SHH/GLI, DAOY.
- 4.- Evaluar el rol que ejerce el complejo de señalización conformado por *Netrina1/Unc5C* en la sobrevida celular en precursores granulares cerebelares GNP6 (P6) ex vivo en el modelo murino.

MATERIALES Y MÉTODOS

Este trabajo cuenta con la aprobación del Protocolo de Manejo de Especies Vivas Para Experimentación y Bioseguridad, por parte del Comité de Ética de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile, autorizado por el Presidente (s) Dra. Ceciclia Vergara (17 de marzo, 2014).

Para el estudio realizado en meduloblastoma, se obtuvieron muestras humanas, cortes de tumores embebidos en parafina, avalado por el Protocolo de Confidencialidad y Obtención de muestras de las correspondientes entidades colaboradoras. Las muestras fueron adquiridas mediante una colaboración nacional con el Dr. MD. Facundo Las Heras (Facultad de Medicina, Universidad de Chile), y dos colaboraciones internacionales con el Dr. Marcel Kool (*German Cancer Research Center (DKFZ), Heidelberg, Alemania*) y Dr. Ulrich Schüller (*Center for Neuropathology, Ludwig-Maximilians University, Munich, Alemania*).

Cultivo Celular:

- Medio DMEM, n° catálogo 12800-017, Life Technologies
- EMEM. Con L-glutamina, n° catálogo 30-2003. ATCC ®.
- Medio DMEM-F12, n° catálogo 10565-018. Gibco.
- Suplemento N-2 (100X): n° de catálogo 17502-048, ThermoFisher Scientific.
- HBSS: Calcio, magnesio, sin rojo fenol. n° catálogo: 14025-092, Gibco.
- Penicilina/Estreptomicina (10.000 U/mL / 10.000 µg/mL), n° catálogo 15 140-122, Gibco.
- Gentamicina. n° de catálogo 15750 (50mg/mL) Gibco.
- Poli-L-Ornitina. n° catálogo PP4957, Sigma.
- Poli-L-Lisina. n° catálogo P4707, Sigma.
- Suero Bovino Fetal (SBF), n° catálogo 04-001-1A, Biological Industries
- Tripsina/EDTA 10X, n° catálogo 15400, Life Technologies
- Medio de congelamiento, n° de catálogo 2X #ES-002-F, Chemicon International

- PBS 10X, nº de catálogo 46013CM, Corning.

Líneas Celulares:

- DAOY: Línea de meduloblastoma humano. (HTB-186). ATCC ®.
- HBL100: Línea de cáncer de mama humano. (HTB-124). ATCC ®.
- Ecr-293: Línea celular humana derivada de riñón. (CRL-2782). ATCC ®.
- HEK293: Línea celular embrionaria de riñón humano. (CRL-1573). ATCC ®.

Cepas de Ratones Utilizados (Mus musculus):

Chile:

- C57 BL/6J

Francia:

- *Ptc1^{+/-}* (Lac-Z, Neomicina), B6D2F1 (Goodrich y col. 1997).
- OF1
- *Math1 Cre*, inducible con tamoxifeno, C57 BL/6J. (Dr. Ayrault, Instituto Curie, Paris)
- *UNC5C*, C57 BL/6J (Dr. Mehlen, Centre Lyon Claude Beràrd, Lyon).

Tratamientos Farmacológicos:

- Sonic Hedgehog Recombinante humano (C24II). Premium grade. 25 µg. nº de orden: 130-095-723. MACS. Miltenyi Biotec.
- Sonic Hedgehog Recombinante. nº de catálogo: 461-SH, R&D.

- Ciclopamina. En solución. nº catálogo: 239807-50UG. Calbiochem.
- Gant61. En solución. nº catálogo:373403-2MG. Calbiochem.
- Molécula bloqueante de Netrina1 (desarrollada por laboratorio de Dr. Mehlen, sujeto a patente): 5,19 mg/mL (NetrisPharma®)
- Control de Molécula bloqueante de Netrina1: 6,18 mg/mL. (NetrisPharma®)

Extracción de DNA genómico de ratones mutantes

- DirectPCR Lysis Reagent (Mouse Tail). nº de catálogo: 102-T, Viagen.
- Proteinasa K. nº de catálogo: 740506.75, Macherey-Nagel.

Extracción de ARN y síntesis de ADNc

RT-PCR y qPCR

- NucleoSpin® RNA. nº de catálogo: 740955.240C.Macherey-Nagel.
- kit iScript™ cDNA Synthesis. nº de catálogo: 170-8890. BioRad.
- DNA polimerasa GoTaq. nº catálogo M82295 Promega.
- Brilliant II SYBR Green qPCR Master Mix nº catálogo ST.600828, Stratagene.
- LightCycler®TaqMan® Master. nº de catálogo:04-735536001. Roche.
- Capilares para lectura de sonda Taqman, LightCycler® Capillaries, 20 µL.

n° de catálogo: 04 929 292001. Roche.

- Sondas para qPCR Taqman: Universal Probe Library. Roche.

Western Blot

- Buffer de lisis celular: SDS 2%, glicerol 10%, Tris-HCl 5 mM, pH 6.8
- Inhibidor de Proteasas Halt™ Protease & Phosfatase Inhibitor Cocktail, Thermo Scientific
- Buffer de carga 6X: Tris-HCl 1M, pH 6.8, glicerol 3%, SDS 10%, azul de bromofenol 1.8×10^{-4} M, β -mercaptoetanol 0.7 M
- Buffer de corrida: Tris Base 25 mM, Glicina 0.19 M, SDS 0.1%
- Membrana de nitrocelulosa de 0.45 μ m de diámetro n° catálogo 88018, Thermo Scientific
- Buffer de transferencia: Tris Base 48 mM, 39 mM, SDS 0.37%, metanol 20%
- Solución de bloqueo: leche descremada al 5% preparada en TBST
- Solución de lavado (TBST): TBS-Tween al 0.1%
- TBS: Tris-HCl 0.5 M, NaCl 1.5 M, pH 7.4
- Reactivo quimioluminiscente Pierce ECL Western Blotting Picomolar n° catálogo 34077, Thermo Scientific
- Reactivo quimioluminiscente Pierce ECL Western Blotting Femtomolar n° catálogo 34095, Thermo Scientific

- BSA n° catálogo BM 0150, Winkler

Inmunofluorescencia IF

- Paraformaldehído (PFA) al 4%, Merck
- Solución PBS-Tritón X-100 al 0.1% (PBST)
- Solución de bloqueo, permeabilizante: Suero de cabra preparado al 5% y Tween al 0,1% en PBS.

Inmunofluorescencia IF para detección de BrdU

- HCl 2N
- Buffer Borato: Borato de Sodio 0.1M en agua destilada, pH 8.0.

Ensayo Actividad de Caspasa-3

- Placa de 96 pocillos de blanca: n° de catálogo 3912, Corning.
- Kit Caspase-3 Fluorometric Assay Kit (n° de catálogo:K105-400, BioVision, Inc.)

Ensayo de TUNEL

- Kit de TUNEL: n° de catálogo: 12 156 752 910. In Situ Cell Death Detection Kit, TMR red, Roche.

Ensayo de Reportero de Luciferasa

- Placa de 96 pocillos de blanca: nº de catálogo 3912, Corning.
- Dual-Luciferase® Reporter Assay System (E1960, Promega).

Transfección con Lipofectamina

- Lipofectamine 2000: nº de catálogo: 11668-019. Invitrogen.
- Plus™ Reagent. nº de catálogo: 10964-021. Invitrogen.

Inmunohistoquímica (IHQ)

- Medio de Inclusión *Histosec*, nº catálogo 111609, Merck
- Metanol 100%, nº catálogo 107018 2511, Merck
- NeoClear, nº catálogo 109843, Merck
- Solución citrato pH 3-3.3, nº catálogo H3300, Vector Biosystems
- Solución AB kit, Vectastain, nº catálogo PK6100, Vector Biosystems
- ImmPact DAB, nº catálogo #SK4105, Vector Biosystems
- Medio de montaje Entellan, nº catálogo 107901, Merck
- Hematoxilina. 104302, Merck.
- Eosina. 1345, Merck.
- Solución para desenmascarar antígenos: Buffer Citrato 10mM, EDTA 1mM y Tween-20 al 0.1%

Equipos

- Centrífuga Z233MK (Hermle)
- Centrífuga Hettich Rotofix 32
- Centrífuga 5415R (Eppendorf)
- Medidor de pH, pH211 (Hanna instruments)
- Incubador con inyección de CO₂, Serie Forma II (Thermo Scientific)
- Microscopio de contraste de fases AE200 (Motic)
- Microscopio confocal LSM 510, Zeiss
- Microscopio de epifluorescencia AxioVert 200M, Zeiss
- Balanza analítica BP 121S (Sartorius)
- Nanofotómetro, P-Class, Implen (Alemania)
- Balanza PT120 (Sartorius)
- Agitador orbital Lab 7000 (Díaz y García Electronics Ltda.)
- Lupa MZ124 (Leica) con cámara integrada modelo IC80 HD
- Mr. Frosty n° catálogo 5100-0001 (Nalgene)
- Lector de absorbancia de placas de 96 pocillos (Sunrise™, Tecan)
- Sonicador, Omni Ruptor 4000 Ultrasonic Homogenizer/Cell Disrupter. Omni International Inc.
- Transiluminador, Vilber Lourmat modelo ECX-F20-M.
- Nanodrop, nanophotometer, Implen.
- IncuCyteZOOM ®. Essen BioScience.

- LightCycler 2.0. Roche
- Centrifuga de capilares, LC Carousel Centrifuge 2.0. Roche.
- Lector de luminiscencia. Infinite® M1000 Pro. Tecan.
- Lector de Fluorescencia. Infinite® F500. Tecan.

Soluciones

- MTT 10X: 5 mg de MTT en 1 mL PBS 1X filtrado
- PBS 1X: NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, Na₂HPO₄ 4.3 mM, KH₂PO₄ 1.47 mM (pH= 7.4)
- PFA 4%: 4 gr de paraformaldehido en PBS 1X, pH 7.4.
- Solución Stop MTT: SDS 10% en HCl 0.01 M en agua
- Buffer AP: Tris 100 mM (pH 9.5), NaCl 100 mM, MgCl₂ 50 mM, Tween 0.1%
- Buffer de carga 6X: Tris-HCL 0.25 M (pH= 6.8), SDS 8%, glicerol 40%, Bromofenol 0.2%, β-mercaptoetanol 20%
- Buffer de corrida: Tris-HCL 0.025 M (pH= 8.3), glicina 0.192 M, SDS 0.1%
- Buffer de transferencia: Tris-HCL 0.025 M (pH= 8.3), glicina 0.192 M, SDS 0.1%, metanol 20%
- TBS 10X: NaCl 1.4 M, KCl 26 mM, Tris 246 mM
- TBST-0.1%: Tween 0.1% en TBS 1X

Soluciones Western Blot de Netrina1

- Blotting Buffer: Tris 25mM, 0.5M NaCl y Tween al 0.05% pH 7.4

- Buffer de Bloqueo: BSA al 3% en *Blotting Buffer* pH 7.4
- Solución de Incubación de Anticuerpo: BSA al 0.5% en *Blotting Buffer* pH 7.4

Soluciones Inmunoprecipitación de la Cromatina, (ChIP)

- Buffer de Lisis: Hepes pH 7.8 50mM, MgCl₂ 3mM, KCl 20mM, NP-40 0.1%.
- Buffer de Sonicación: Hepes pH 7.9 50mM, NaCl 140mM, EDTA 1mM, Tritón X-100 1%, deoxicolato de Na 0.1%, SDS 0.1%.
- Buffer de Lavado de IP: LiCl 500mM, Tris-Cl pH 8.0, NP-40 1%, deoxicolato de Na 0.1%.
- Buffer de Elusión: NaHCO₃ 50mM, SDS 1%.
- Buffer TE: Tris 1M pH 8.0, EDTA 0.5 M pH 8.0.

MÉTODOS

Tratamientos farmacológicos

Se sembraron las células DAOY en placas de 6 pocillos, usando 50.00 células por pocillo. Tras 24 horas, se cambio el medio a EMEM 0.5%SFB con los diversos tratamientos a los tiempos requeridos (24 o 48 horas). Transcurrido el tiempo, se lavaron las células con PBS1X, se tripsinizaron, se detuvo la tripsina con dos volúmenes de medio completo y se centrifugaron para generar un

pellet, el cual fue guardado a -20°C o fue procesado para su extracción de proteínas o de RNA.

Determinación de la actividad metabólica mediante ensayo MTT

Las células DAOY fueron sembradas en medio completo a una densidad celular de 1×10^4 células/pocillo en placas de 24 pocillos. Luego de 24 horas, se eliminó el medio y se lavaron las células con PBS 1X. Posteriormente, se evaluó el efecto de las condiciones experimentales farmacológicas sobre la actividad metabólica de las células DAOY, realizándose tratamientos en 500 μl de medio EMEM 0.5%SFB por 24 y 48 horas. Dos horas antes de que se cumpliera el tiempo experimental (24 o 48 horas), se agregaron 50 μl del reactivo MTT 10X a cada pocillo. Tras 2 horas de incubación con el reactivo MTT, se detuvo la reacción agregando un volumen (550 μl) de "Solución de Stop" a cada pocillo y se incubaron las placas en las mismas condiciones de cultivo por 16-18 horas. La "Solución de Stop" permitió la disolución del precipitado de formazán generado por la actividad metabólica mitocondrial, el cual fue cuantificado. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se recolectaron 200 μl de cada condición y se determinó la actividad metabólica a través de la medición de la absorbancia a 560 nm usando un espectrofotómetro (SunriseTM, Tecam) y usando como blanco la mezcla del medio, MTT y la "Solución Stop" en un pocillo sin células.

Extracción de DNA genómico para genotipado de ratones mutantes

Se realizó la extracción de DNA genómico a partir de 0.5 cm de cola de cada ratón. Se agregó 200µL del reactivo de lisis DirectPCR para colas (Viagen) y 2µL de Proteínasa K (48µg, Macherey-Nagel), y se incubó a 55°C O.N. para completar la lisis. Luego se inactivó la Proteínasa K incubando las muestras a 95°C durante 10 minutos.

Extracción de RNA

Para la extracción de RNA se sembraron las células DAOY o GNPs en placas de 6 pocillos a una densidad celular de 1×10^5 células por pocillo. Tras 24 horas, se realizaron los tratamientos correspondientes y trascurrido el tiempo del experimento (24 o 48 horas) se realizó la extracción de RNA. Para esto, se lavaron las células con PBS1X y se tripsinizaron. Luego, las células se resuspendieron en medio de cultivo, y se centrifugaron a 1500 rpm por 5 minutos a temperatura ambiente, quedando un *pellet*. Este *pellet* bien se guardó a -20°C para su posterior procesamiento o bien se procedió a la extracción directamente usando el kit de extracción por columnas de afinidad, NucleoSpin® RNA (Macherey-Nagel, Alemania) siguiendo las instrucciones del fabricante. Este protocolo, incluye la digestión del DNA genómico por lo que, no se realizaron más tratamientos con DNAsa. Al final de este procedimiento, las muestras fueron eluidas en 60 µl de agua libre de RNAsa incluida en el kit. Finalmente, el RNA fue cuantificado en Nanodrop, y guardadas a -20°C.

Síntesis de DNAC

Para la síntesis de DNA complementario, se utilizó el kit iScript™ cDNA Synthesis (BioRad), implementándose según las indicaciones del fabricante. En este procedimiento se utilizó para cada reacción: 1 µg de RNA, 4 µL de mix de reacción iScript 5X, 1 µL transcriptasa reversa iScript, y agua libre de nucleasas a un volumen final de 20 µL. La reacción se incubó según el programa recomendado por el fabricante: 5 minutos a 25°C, 30 minutos a 42°C y 5 minutos a 85°C en un termociclador. Finalmente, las muestras fueron diluidas hasta un volumen final de 100 µL con agua libre de nucleasas. El DNAC se mantuvo a -20°C hasta posterior su uso.

PCR cuantitativo (qPCR)

Ensayo basado en sondas de Taqman en capilares

Para la cuantificación de niveles de transcritos en respuesta a distintos tratamientos en las células DAOY y células aisladas de cultivo primario GNPs, se implementó la aproximación de PCR cuantitativo por sonda Taqman, con lectura en capilar. Para esto, se utilizaron partidores ya diseñados y validados por el laboratorio de Dr. Patrick Mehlen (Lyon, Francia) con sondas específicas para cada amplicón Universal Probe Library (Roche) (Tabla 1). Para la reacción se utilizó el kit LightCycler®TaqMan® Master (Roche) siguiendo las indicaciones del fabricante, usando un total de 7.5µl de mix de reacción más 2.5 µl de muestra. Luego, se agregó la reacción a un capilar LightCycler® capillaries (Roche), el cual se centrifugó en una centrifuga LC Carousel

Centrifuge2.0 (Roche). Una vez centrifugados los capilares, estos se colocaron en lector LightCycler 2.0 (Roche) y se inició la medición de la fluorescencia utilizando el *software* LightCycler Software 4.05. En los casos de muestras humanas como las células DAOY, el control normalizador correspondió a β -*ACTINA*, mientras que para muestras murinas como las células GNPs, el control normalizador utilizado correspondió a *Hprt*. Se obtuvieron los valores de Ct de cada punto, tanto para el gen normalizador como para los genes evaluados en cada experimento. Para la cuantificación de los niveles de expresión, se realizó el siguiente cálculo:

Δ Ct variable: Ct gen x – Ct gen normalizador (tratamiento)

Δ Ct control: Ct gen x – Ct gen normalizador (control)

Para evaluar las veces de cambio de los transcritos en la condición experimental con respecto a la condición control, se dividió el valor obtenido en la condición experimental por el valor observado en la condición control.

Ensayo basado en sondas de SYBR Green

Para la cuantificación de la presencia de los GBS candidatos en el DNA genómico inmunoprecipitado mediante el protocolo de ChIP, se utilizó la aproximación de qPCR basado en sondas de SYBRGreen. Para esto, se diseñaron los partidores flanqueando cada GBS, de forma tal de que los tamaños de los fragmentos amplificados tuviesen un tamaño entre 70 y 200 pb (Tabla 2). Se ajustaron los parámetros de cada par de partidores usando una curva de concentraciones decrecientes a partir del *INPUT* obtenido en el ChIP.



Con esta curva se analizaron las curvas de disociación, curva de *melting* y curva de eficiencia, con el objeto de ajustar la amplificación de un fragmento único a alta eficiencia, respectivamente. Para ajustar los partidores, se utilizaron eficiencias entre 92 y 115%. Para la reacción se utilizaron 10 μ L de MasterMix, 0.3 μ L sonda ROX (utilizada como control interno de la reacción), partidador anterior y reverso 250-400 nM y agua para hacer un volumen total de 20 μ L de reacción. La cuantificación se llevó a cabo en el equipo 3000X Stratagene y el programa MxPro para el análisis de los datos. Para cada cuantificación del DNA genómico obtenido en el CHIP, se realizó una curva de concentración decreciente del respectivo INPUT experimental, con el objeto de poder interpolar los valores observados para cada punto de inmunoprecipitación, obteniéndose el valor de templado inicial en la reacción. Para el análisis se calculó la cantidad final de DNA genómico, multiplicando la cantidad inicial de templado observada en la reacción por 10, el factor de dilución de la muestra analizada, obteniéndose finalmente el porcentaje del INPUT.

Extracción de proteínas

Las células fueron sembradas en placas de 6 pocillos y fueron lisadas con buffer de lisis suplementado con inhibidor de proteasas (Roche) utilizando 100 μ l, se recolectó todo el lisado con un *cell scraper* y se agregó a un tubo de 1.5 ml en hielo. Las muestras fueron homogeneizadas con jeringa tuberculina (10 veces) y se centrifugaron a 10.000 rpm en centrífuga (Hettich Rotofix 32) por 5

minutos a 4°C. Se rescató el sobrenadante y se congelaron a -80°C hasta su uso, además de almacenó una alícuota de 10 µl para cuantificación.

Cuantificación de proteínas

Las muestras se cuantificaron usando el sistema comercial Bio-Rad DC Protein Assay, siguiendo las indicaciones del fabricante, usando BSA como proteína estándar para la curva de calibración. La absorbancia de las muestras fue leída en un lector de placas a 595 nm (Sunrise™, Tecan).

Western blot

Se descongelaron las muestras de proteínas en hielo y se cargaron entre 50-70 µg de proteínas por carril dependiendo del epítipo a analizar (50µg para β-actina, 70 µg para NTN1). Se agregó buffer de carga 6X y se calentaron por 5 minutos a 95°C. Las muestras se cargaron en geles de acrilamida/bisacrilamida al 12%. La electroforesis se realizó en buffer de corrida en voltaje constante de 70 V por 15 minutos y luego a 100 V durante 90-120 minutos. Posteriormente, las muestras fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa de 0.45 µm de poro en buffer de transferencia durante 15-60 minutos en sistema de transferencia semi-seca Transblot (Biorad). Para evaluar el paso de las proteínas hacia la membrana, ésta se tiñó por 5 minutos con el colorante Rojo Ponceau y luego se destiñó con TBS-T. Luego, las membranas fueron bloqueadas en 5% leche en TBS-T, en agitación constante a T° ambiente (1

hora para β -actina). Posteriormente, las membranas fueron incubadas con el anticuerpo primario preparado en 5% leche en TBS-T por una hora, en agitación constante a 4°C (Tabla 4). Las membranas fueron lavadas con TBS-T, 3 veces por 10 minutos en agitación para luego incubar con el anticuerpos secundario acoplados a HRP anti-cabra, ratón o conejo (1:5000) durante 1 hora a temperatura ambiente en 5% leche TBS-T (Tabla 4). Finalmente, la membrana se lavó tres veces durante 10 minutos en solución de lavado y se reveló con el reactivo quimioluminiscente (Pierce). Luego, la reacción de HRP fue revelada usando filmes fotográficos (Fuji Film) en el equipo Curix 60 (AGFA) y las bandas detectadas fueron cuantificadas con el software Image J. El Western blot contra Netrina1 se realizó con modificaciones al protocolo, utilizando el AF6419 (R&D) hecho en oveja (Tabla 4). Este protocolo consta de un bloqueo de 1 hora usando *Buffer* de Bloqueo, luego se incuba el anticuerpo primario anti-Netrina1 diluído en Solución de Incubación durante la noche en agitación a 4°C, se hacen tres lavados de 10 minutos con *Blotting Buffer*, se incuba el anticuerpo secundario anti-oveja acoplado a HRP diluído en Solución de Incubación durante 3 horas en agitación a 4°C, y finalmente, 3 lavados de 10 minutos con *Blotting Buffer*.

Inmunofluorescencia de células en monocapa

Se sembraron las células DAOY en placas de 24 pocillos a una densidad de 10.000 células/pocillo, sobre cubre-objetos redondos de 12mm. Luego de 24 horas, se eliminó el medio de cultivo y se lavaron con PBS 1X, 2 veces a T°

ambiente. Luego fueron fijadas en PFA 4% por 20 minutos a T° ambiente, se eliminó el PFA y se lavaron con PBS 1X, 3 veces. Las células fueron permeabilizadas y bloqueadas usando una solución de bloqueo permeabilizante (5% BSA en TBS-T 0.1%) por una hora a T° ambiente. Posteriormente, se realizó la incubación con el anticuerpo primario (concentración según Tabla 4) preparado en solución de bloqueo en cámara húmeda O.N. Se lavaron los cubre-objetos con PBS 1X, 3 veces para incubar las células con el anticuerpo secundario correspondiente (Tabla 4). Además se utilizó faloidina para teñir los filamentos de actina polimerizados (1/5000). Luego de una hora a T° ambiente, se lavaron las muestra con PBS 1X, 3 veces y se realizó una incubación final de 5 minutos con DAPI (10 µg/ml en PBS 1X) para teñir los núcleos. Para los casos en que se utilizó TOPRO (T3605 Invitrogen), este se incubó en la solución con los anticuerpos secundarios (Tabla 4). Posteriormente, los cubre-objetos se lavaron con PBS 1X, luego con agua destilada y los fueron fijados con medio de montaje Fluorsave en portaobjetos de vidrio. Una vez secas, las muestras fueron visualizadas usando un microscopio de epifluorescencia AxioVert 200M (Carl Zeiss) o microscopio confocal LSM 510 (Carl Zeiss).

Inmunofluorescencia para BrdU de células en monocapa

La incorporación de BrdU, es una aproximación que permite cuantificar la proliferación celular tanto en cultivos celulares como en tejidos *in vivo*. La bromodesoxiuridina (BrdU o 5-bromo-2-desoxiuridina) es un nucleótido

sintético, en particular, una pirimidina análoga a la timidina, la cual es incorporada en el DNA en las células durante la fase de replicación (S) del ciclo celular. Para la detección de la incorporación de BrdU, se da un pulso de 3µg/mL de BrdU, y se incuba 2 horas. Posteriormente, se procede a las células dos veces con PBS1X, y se fijan con PFA al 4% siguiendo el protocolo convencional de inmunofluorescencia. Luego, para denaturar el DNA las células se tratan con HCl 2N por 15 minutos a 37 °C, luego se realizan dos lavados con PBS. Para neutralizar la acidez del HCl, las células se lavan con *buffer* borato 0,1M por 10 minutos y luego se lava el sodio borato con 3 lavados con PBS. Se continua con el protocolo convencional para inmunofluorescencia, descrito anteriormente.

IHQ de muestras de meduloblastoma

En primera instancia, los cortes fueron desparafinados, incubándolos a 60°C durante 30 minutos en un baño termostático, luego fueron lavados con xilol, pasando por un gradiente descendiente de alcoholes (100%, 90%, 80%, 70%, 50%). Una vez desparafinados las muestras, se realizó una incubación con solución citrato pH 3-3.5 para desenmascarar el antígeno durante 30 min a 80°C. Luego, se procedió a eliminar la peroxidasa endógena usando la solución: 3% H₂O₂, 50% metanol en PBS. Luego, se realizaron sucesivos lavados con PBS. Las muestras fueron bloqueadas con una solución de bloqueo permeabilizante, durante 1 hora a T° ambiente. Posteriormente, se incubó en el anticuerpo primario (Tabla 4) diluido en solución de bloqueo

durante toda la noche a 4°C. Luego, se lavaron las muestras con PBS 1X tres veces, se incubó el anticuerpo secundario (Tabla 4) 1 hora a temperatura ambiente, y se lavó con PBS 1X dos veces. Posteriormente, se incubó en solución AB durante 30 minutos a T° ambiente, y se lavaron dos veces antes del revelado. El revelado se realizó incubando con la solución de DAB en su diluyente. Posteriormente, las muestras fueron deshidratadas, pasando por una batería de concentraciones crecientes de alcoholes, y se lavó con xilol 3 veces. Finalmente, se montaron las muestras con Entellan y fueron fotografiadas en microscopio óptico Olympus BX51 con los objetivos de 10 y 20 X.

Inmunofluorescencia para muestras de meduloblastoma

Se realizó la desparafinación y se desenmascaró el antígeno, al igual que el procedimiento para IHQ. Luego, las muestras fueron permeabilizadas y bloqueadas usando una solución de bloqueo permeabilizante (5% BSA en TBS-T 0.1%) por una hora a T° ambiente. Posteriormente, se realizó la incubación con el anticuerpo primario (concentración según Tabla 4) preparado en solución de bloqueo en cámara húmeda O.N. Se lavaron las muestras con PBS 1X, 3 veces para luego incubar el anticuerpo secundario correspondiente (Tabla 4). Luego de una hora a temperatura ambiente, se lavaron las muestras con PBS 1X, 3 veces y se realizó una incubación final de 5 minutos con DAPI (10 µg/ml en PBS 1X) para teñir los núcleos. Para los casos en que se utilizó TOPRO, este se incubó en la solución con los anticuerpos secundarios (Tabla 4). Posteriormente, los porta-objetos se lavaron con PBS 1X, luego con agua

destilada y los fueron fijados con medio de montaje Fluorsave en portaobjetos de vidrio. Una vez secas, las muestras fueron visualizadas usando un microscopio de epifluorescencia AxioVert 200M (Carl Zeiss) o microscopio confocal LSM 510 (Carl Zeiss).

Inmunoprecipitación de la Cromatina (ChIP)

Este protocolo fue adaptado de Soutoglou y Talianidis (2002) por el laboratorio de Regulación Génica, Universidad Andres Bello (Investigador principal, Dr. Martín Montecinos).

Obtención de Extractos Nucleares

Para cada sonicación se usaron dos botellas de 75 cm² con células DAOY confluentes, representando un total aproximado de 10×10^6 de células. Se colocaron las placas de cultivo en hielo y se lavaron dos veces las células con PBS frío. Luego se realizó el entrecruzamiento con formaldehído al 1% en PBS por 10 minutos a temperatura ambiente en agitación suave (5 mL por placa de 100 mm). Se adicionó glicina a una concentración final de 0.125M y se incubó por 5 minutos a temperatura ambiente en agitación suave. Se lavaron dos veces las células con PBS frío y colectaron las células en 5 mL de PBS con inhibidores de proteasas. Se centrifugaron las muestras a 4°C por 5 minutos a 1.800 rpm y se resuspendió el *pellet* de células en buffer de Lisis con inhibidores de proteasas (1mL por placa de 100 mm). Se incubó en hielo por 10 minutos, y se homogeneizó con un homogenizador Dounce (20 golpes de

bastón suelto). Se centrifugaron las muestras a 4°C por 5 minutos a 6.000 rpm y se resuspendieron los núcleos en buffer de Sonicación con inhibidores de proteasas (0.3 mL por placa de 100mm). Se transfirieron los núcleos a tubos de microcentrifuga y se sonicaron con el siguiente programa: Potencia media, pulser 50% 5 minutos, tres veces, en el sonicador. Se centrifugaron las muestras a 4°C por 15 minutos a máxima velocidad, se recuperó el sobrenadante y se cuantificó la cantidad de cromatina mediante el lector Nanodrop.

Evaluación de los tamaños de fragmentos de cromatina

Con el objeto de evaluar la calidad de la sonicación y tamaño de los fragmentos de cromatina, se toman 4 µg de cromatina, se aforan a 20 µL con agua libre de nucleasas, se agrega 10 µg de RNAsa A y se incuba O.N. a 65°C. Al día siguiente, se agregan 25 µg de Proteasa K y se incuba a 50°C por 2 horas. Finalmente, se carga todo el volumen en un gel de agarosa al 1%, el cual se corrió a 90 volts por 50 minutos, se fotografió en un transiluminador. Se ajustaron las condiciones de sonicación con el objeto de que el tamaño de los fragmentos de cromatina estuviera concentrado entre los 200 pb y los 500 pb.

Inmunoprecipitación

Una vez cuantificados los extractos nucleares, se tomaron 25 µg de cromatina para punto de inmunoprecipitación, esto incluye para cada experimento un control de IgG Normal (Tabla 4), la Histona 3 como control positivo de

inmunoprecipitación (Tabla 4), y el extracto nuclear que en adelante será nombrado como INPUT, como control positivo del experimento. Los 25 μg de cromatina se llevaron a 500 μL con buffer de Sonicación y se procedió a realizar el preaclaramiento. Para el pre-aclarado, se adicionaron 50 μL de Proteína A más 2 μg de anticuerpo anti-IgG Normal a cada tubo y se agitaron por 2 horas a 4°C. Luego se centrifugaron las muestras, a 4°C por 5 minutos a 4.000 rpm. Se recuperó el sobrenadante, se adicionó el anticuerpo (5 μg) y se agitó a 4°C O.N. Al día siguiente, se adicionaron 50 μL de Proteína A (*beads*), y se agitó a 4°C por una hora. Posteriormente, se centrifugaron las muestras a 4°C por 5 minutos, a 4.000 rpm. Se lavaron las *beads* con los siguientes buffer: 1 lavado con buffer de Sonicación, 1 lavado con buffer de Lavado de IP y 1 lavado con buffer TE pH 8.0. Cada uno de los lavados fueron realizados con 500 μL , luego se agitó a 4°C por 5 minutos y se centrifugó a 4°C por 5 minutos a 4.000 rpm. Una vez terminados estos tres lavados, se descartó el sobrenadante y se resuspendieron las *beads* en 100 μL de buffer de Elusión. Se vortexearon las muestras suavemente durante 15 segundos, y se incubaron a 65°C por 15 minutos. Luego, se centrifugaron las muestras a máxima velocidad por 1 minuto y se recuperó el sobrenadante el cual se transfirió a otro tubo. Se adicionó NaCl a una concentración final de 200mM.

Reversión del Entrecruzamiento

En esta etapa se incluyó el INPUT (extractos nucleares), llevándolo a 100 μL con buffer de Elusión y agregando NaCl a concentración final de 200mM.

Luego, se agregó 10 µg de RNAsa A, y se incubó a 65°C O.N. Al día siguiente, se añadió 25 µg de Proteinasa K, y se incubó a 50°C por 2 horas. Se agregaron 200 µL de buffer TE pH 8.0. Se realizó una extracción Fenol-Cloroformo, usando un volumen Fenol:Cloroformo:Alcohol Isoamílico (300 µL), y se centrifugó a máxima velocidad por 5 minutos a temperatura ambiente. Luego, se tomó el sobrenadante, se extrajo con un volumen de Cloroformo:Alcohol Isoamílico (300 µL), y se centrifugó a máxima velocidad por 5 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se tomó el sobrenadante, se transfirió a otro tubo y se precipitó con 2.5 volúmenes (750 µL) de etanol absoluto, 0.1 volumen de Acetato de Sodio (30 µL 3M) y 20 µg de glicógeno, a -20°C O.N. Al día siguiente, se centrifugó a 12.500 rpm por 25 minutos a 4°C. Se lavaron los *pellets* con 500 µL de etanol 70% y se centrifugaron a 12.500 rpm por 10 minutos a 4°C. Luego, se resuspendieron las muestras en 50 µL de buffer TE pH 8.0 y el INPUT en 100 µL. Se guardaron las muestras a -20°C. Para la cuantificación a través de qPCR se utilizaron 1 µL de INPUT y 5 µL de muestra.

Cultivo Primario de Precusores Granulares Cerebelares, (GNPs), silvestres y/o de ratones transgénicos

Durante el procedimiento de obtención de GNPs se requieren dos soluciones:

- 1.- Medio de GNPs: DMEM-F12: 44 mL, Penicilina/Estreptomina: 0,5 mL, suplemento N2: 0,5 mL, KCl (2M): 6,25 µL, SFB al 10%.

2.- HBSS + Glucosa

En primera instancia, se tratan las placas en las que recolectarán las GNPs con Poli-o- Lisina (calculando un rendimiento de una placa p35 para 3 cerebelos), y las placas en las que se sembrarán finalmente las GNPs con Poli Ornitina (Placa de 6 pocillos). Éstas se tratan durante la disección en la campana de flujo laminar.

Procedimiento de Disección

Se lavan los ratones con etanol 70%, y se decapitan usando tijeras grandes ubicando las cabezas en una placa p100. Se hace un corte en la línea media de la piel y se separa del cráneo. Luego, se corta el cráneo y se remueve usando pinzas Dumont N°5. Se ubican los cerebros en otra placa p100 con HBSS. Posteriormente, se separa el cerebelo del resto del encéfalo con ayuda de pinzas. Se remueven las meninges y se pone el cerebelo en HBSS en un falcon de 15 mL en hielo.

Tripsinización/ Digestión

Se descarta todo el HBSS recuperándolo con pipeta y se agrega 1 mL de tripsina (cada 3 cerebelos) y se añaden 16 μ L de DNAsal (1mg), y se incuba a 37°C por 10 minutos, moviéndolo cada 2 minutos.

Mientras, se lavan las placas tratadas con poli-ornitina y poli-o-lisina con agua estéril dos veces o con PBS.

Luego, se agrega 1mL de SFB para inactivar la tripsina y se descarta el exceso con una pipeta, y se añade 1 mL de HBSS (con glucosa). Se homogeniza el cerebelo pipeteando usando una P1000, disgregando el tejido. Se repite el pipeteo unas 40 veces, o más hasta que el tejido quede completamente disgregado.

Se dejan las células por 2 minutos y se centrifugan a 1000 rpm por 5 minutos. Se resuspenden en 2 mL de medio de GNP con suero.

Adhesión Diferencial

Se agregan 2 mL de células a una placa p35 tratada con Poli-o-Lisina y se incuba a 37°C por 30 minutos en el incubador. Transcurrido la media hora, se golpea la placa suavemente y se recuperan todas las células no-adherentes a un falcon de 15mL. Se hace el recuento celular y se siembran 3×10^6 células por cada pocillo de placa de 6 pocillos, tratadas con Poli-Ornitina en un volume de medio total de 1,5 mL.

Genotipado de Ratones Ptc1+/-

Para el genotipado de los ratones Ptc1+/- se extrajo DNA genómico mediante el uso del reactivo DirectPCR (Tail, Viagen). Posteriormente, se realizó un PCR

con la siguiente reacción: 3µL DNA, 10 µL de Red Extract, y 2 µL de cada uno de los siguientes 4 partidores: Ptc1-WT3, Ptc1-WT4, Ptc1-Neo3 y Ptc1-PT3 (Tabla 3). El programa de PCR utilizado para esta reacción, es: 94°C por 2 minutos, 38 ciclos de: 94°C por 1 minuto, 66°C por 1 minuto, 72°C por 1 minuto, y una extensión final a 72°C por 4 minutos. Luego, el producto del PCR se cargó en un gel de agarosa al 1%, y se fotografió con el objeto de evaluar los tamaños de las bandas obtenidas. En caso de individuos *wildtype* (silvestres), se obtuvo una sola banda de un tamaño de 200 pb, mientras que para los individuos mutantes se obtuvieron dos bandas: una de 200 pb y otra de 510 pb.

Genotipado de Ratones Math1 Cre/UNC5C

Para el genotipado de los ratones *Math1 Cre/UNC5C* se extrajo DNA genómico mediante el uso del reactivo DirectPCR (Tail, Viagen). Posteriormente, se realizaron dos reacciones de PCR, una para la amplificación de la inserción del sitio Cre en el gen *Math1* y otra reacción PCR para la amplificación del gen *UNC5C* floxeado. La reacción PCR para *Math1 Cre* es la siguiente: 4µL DNA, 12,5µL de EconoTaq, 4,5µL de agua y 1µL de cada uno de los siguientes 4 partidores: Math1-Cre 42, 43, 84 y 85 (Tabla 3). El programa de PCR utilizado para esta reacción, es: 94°C por 5 minutos, 34 ciclos de: 94°C por 1 minuto, 60°C por 1 minuto, 72°C por 1 minuto, y una extensión final a 72°C por 5 minutos. Luego, el producto del PCR se cargó en un gel de agarosa al 1%, y se fotografió con el objeto de evaluar los tamaños de las bandas obtenidas. En caso de individuos *wildtype* (silvestres), se obtuvo

una sola banda de un tamaño de 300 pb, mientras que para los individuos mutantes se obtuvieron dos bandas: una de 180 pb y otra de 300 pb. La reacción PCR para *UNC5C* es la siguiente: 4µL DNA, 12,5µL de EconoTaq, 4,5µL de agua y 1µL de cada uno de los siguientes partidores: UNC5C-3697 y UNC5C-4780 (Tabla 3). El programa de PCR utilizado para esta reacción, es: 94°C por 3 minutos, 2 ciclos de: 94°C por 1 minuto, 62°C por 1 minuto, 72°C por 1 minuto, y 30 ciclos de: 94°C por 30 segundos, 62°C por 30 segundos, 72°C por 30 segundos, y una extensión final a 72°C por 3 minutos. Luego, el producto del PCR se cargó en un gel de agarosa al 1%, y se fotografió con el objeto de evaluar los tamaños de las bandas obtenidas. En caso de individuos *wildtype* (silvestres), se obtuvo una sola banda de un tamaño de 1068 pb, mientras que para los individuos mutantes nulos se obtuvo una banda de 627 pb.

Ensayo Caspasa-3 Activada

Para la medición de la actividad Caspasa-3 se sembraron 50.000 células DAOY en cada pocillo en placa de 6 pocillos con medio EMEM 10%SFB. Transcurridas 24 horas, se iniciaron los tratamientos cambiando el medio a EMEM 0,5%SFB a distintos tiempos. Para la medición de la actividad Caspasa-3 se lavaron las células con PBS1X y se tripsinizaron. Luego, se detuvo la tripsina con 2 volúmenes de medio completo (EMEM 10%SFB), se colectaron las células y se centrifugaron, quedando un *pellet* el cual se guardó a -20°C o se usó directamente para el ensayo. Para la medición, se utilizó el kit Caspase-

3 Fluorometric Assay Kit (nº de catálogo:K105-400, BioVision,Inc.) siguiendo las indicaciones del fabricante. Para esto, se resuspendió el *pellet* en 50µL de *buffer* de Lisis (Kit Caspasa-3, BioVision, Inc.), se incubó en hielo durante 15 minutos, se centrifugó a máxima velocidad por 3 minutos y se transfirió el sobrenadante a otro tubo. A partir del sobrenadante, se cuantificó la concentración de proteínas de la muestra mediante el método de Bradford. Luego, se transfirieron 30 µg de proteínas de la muestra a una placa de 96 pocillos de blanca (Corning) en un volumen total de 50 µL en *buffer* de lisis. A cada pocillo se añadieron 50 µL del mix: 50 µL de *buffer* de reacción, 0.5µL de DTT y 1µL de DEVD+AFC (sustrato fluorescente). Se hizo la medición de la cinética de la fluorescencia usando un lector Infinite® F500 (Tecan), ajustando la excitación en 450nm y la emisión en 510nm. Para la cuantificación se evaluó las veces de cambio de la pendiente obtenida en la medición de la fluorescencia en el tiempo, sobre la misma pendiente observada en la condición control.

Ensayo Reportero de Actividad Luciferasa

Con el objeto de evaluar la funcionalidad de los sitios de unión de los factores gli, (*Gli Binding Site*, GBS) los GBS candidatos fueron clonados en el vector pGL3, río arriba del gen *luciferasa*. Para realizar este ensayo, se utilizó la línea celular HBL100 en la cual la actividad de la señalización Hedgehog es baja, siendo más sensible a su inducción, sembrándose 10⁵ células por pocillo en placa de 12 pocillos en medio completo. Tras 24 horas, se transfectaron las

células usando el protocolo de Lipofectamina Plus (Invitrogen), con los constructos conteniendo tanto los GBS a testear como el mismo GBS mutado y con los factores Gli de manera simultanea como inductores de la actividad transcripcional. Transcurridas 48 horas a partir de la transfección se procedió a la lisis celular y medición de la actividad luciferasa mediante la utilización del kit Dual-Luciferase® Reporter Assay System (E1960, Promega), siguiendo las instrucciones del fabricante. La luminiscencia emitida fue registrada en el equipo Infinite® M1000 Pro (Tecan).

Procesamiento de imágenes de células vivas mediante IncuCyte (Live Cell Imaging)

Para el monitoreo de la dinámica de la muerte celular frente a distintos tratamientos, se utilizó el sistema IncuCyte ZOOM® (Essen BioScience) el cual permite la adquisición de imágenes de las células al interior del incubador, y el procesamiento de estas imágenes para la cuantificación de muerte celular y crecimiento poblacional. Para esto, se ajustaron los parámetros para la cuantificación en la línea celular DAOY, estableciendo máscaras para la cuantificación precisa de células positivas para la tinción de yoduro de propidio y para el área celular, ajustándose al contorno celular (Figura 6). Para la medición de la muerte celular, se sembraron 5×10^3 células/cm² en placas de 12 pocillos con medio completo. Transcurridas 24 horas, se cambió el medio a EMEM 0.5%SFB como base para los tratamientos, y se agregó yoduro de propidio a una dilución de 1/6000 y se ubicaron las placas en el dispositivo

IncuCyte dispuesto al interior del incubador de líneas celulares. Una vez ubicadas las placas en el IncuCyte, se configuró el registro de las imágenes para los tiempos requeridos de manera remota mediante un software suministrado por el fabricante, ajustando la cuantificación de los parámetros de muerte celular y confluencia a distintos tiempos.

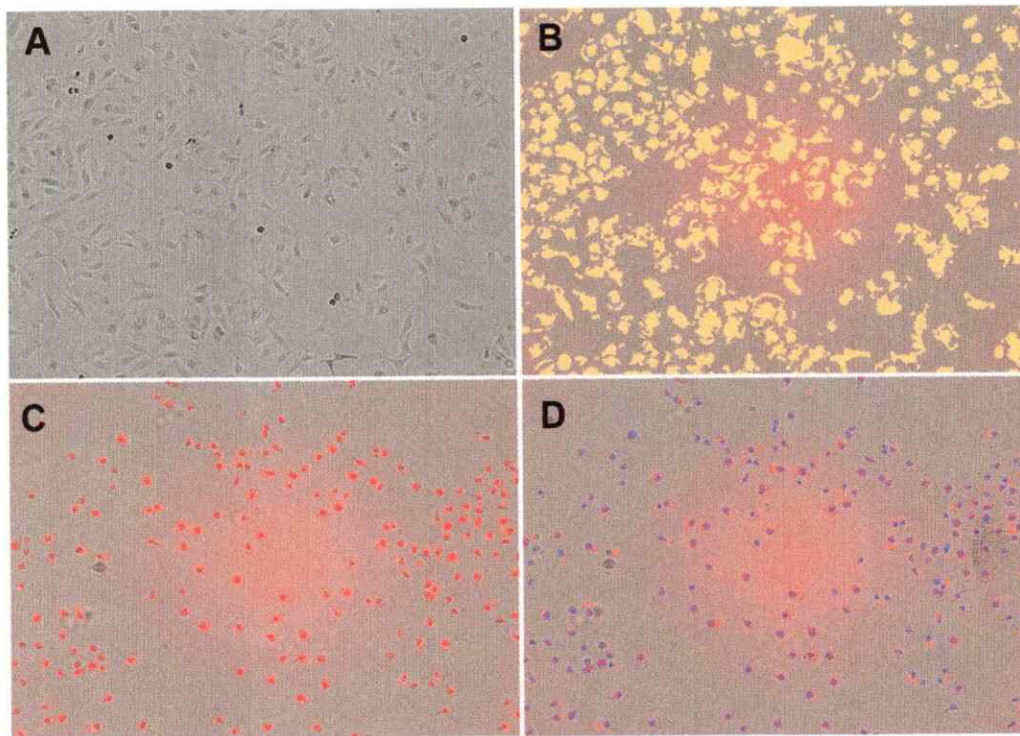


Figura 7.- Ajuste de máscaras para la cuantificación de confluencia celular y muerte celular en el sistema IncuCyteZOOM®. A.- Imagen adquirida sin filtros de las células DAOY. B.- Máscara ajustada para la medición de confluencia celular de la imagen en A. C.- Control positivo de muerte celular con tinción de yoduro de propidio (células rojas). D.- Máscara para cuantificación de la muerte celular a través de la tinción de yoduro de propidio, cuantificándose en azul todas las células muertas (rojas) de la imagen adquirida en C.

Ensayo de Tunel

Para la cuantificación de la muerte por apoptosis, se implementó el ensayo de Tunel. Para esto se sembraron 10^4 células en cubre-objetos de 12 mm con medio completo. Cumplido el tiempo del experimento, se procedió a medir la apoptosis usando el kit in situ *Cell Death Detection Kit, TMR red* (Roche), según las indicaciones del fabricante. Luego, las células fueron visualizadas y fotografiadas a través de un microscopio confocal LSM 510, Zeiss.

Transfección con Lipofectamina

Se sembraron 10^5 células en placas de 6 pocillos en medio completo EMEM 10%SFB. Transcurridas 24 horas, se cambió el medio a DMEM sólo y se transfectaron las células usando Lipofectamina 2000 (Invitrogen), siguiendo las indicaciones del fabricante. La reacción se incubó durante 3-5 horas, y posteriormente se cambió el medio a EMEM 10%SFB. Tras 24 horas, se dio inicio a los tratamientos a distintos tiempos experimentales. En el caso de la transfección con constructos para realizar el ensayo de reportero de Luciferasa, se realizó el protocolo de transfección de Lipofectamina añadiendo el reactivo Plus™ Reagent (Invitrogen) siguiendo las indicaciones del fabricante.

Producción de Partículas Lentivirales

Con el objeto de generar una línea celular DAOY *knock-down* estable para Netrina1 (*shNetrina1*), se produjo el vector lentiviral conteniendo el interferente para Netrina1, para posteriormente infectar la línea DAOY. Como control, se generaron partículas lentivirales conteniendo una secuencia *scrambled*. Para la obtención de partículas lentivirales se co-transfectaron los vectores VSV-G, pCMV-Delta 8.9 y la secuencia interferente para Netrina1 en las células humanas HEK293 (confluencia 80%), utilizando el método de precipitación con fosfato de calcio según lo descrito por Li y col. (2012). Una vez obtenido el sobrenadante con partículas lentivirales, éste se recolectó, se filtró con un filtro de jeringa de porosidad 0,22 μm y se guardó a -80°C hasta su uso. Posteriormente, para la infección de la línea celular DAOY, se sembraron 5×10^5 células por pocillo en placa de 6 pocillos y se mantuvieron por 24h con medio de cultivo completo. Transcurridas las 24h, se cambió el medio (1 mL medio con antibióticos), se agregó 1ml del sobrenadante con partículas lentivirales filtrado y se mantuvo la infección durante 48h. La secuencia interferente para Netrina1 incluye un *cassette* IRES-GFP, el cual permite identificar las células transducidas con la expresión del GFP, y otro de resistencia a la puomicina, lo que permite seleccionar las células transducidas mediante el tratamiento con este antibiótico (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Es así, que una vez realizada la infección, se seleccionaron las células mediante el uso de puomicina.

Generación de Clones CRISPR knock-out para Netrina1 en la línea celular DAOY

La implementación de la aproximación CRISPR para la obtención de una línea DAOY *knock-out* para Netrina1, se realizó en colaboración con el laboratorio de Dr. Patrick Mehlen (Lyon, Francia). Con este objeto, se siguió el protocolo descrito por Ran y col. (2013). Se co-transfectaron 4 RNA guías (RNAg) insertados en el vector 1963_pSpCas9(BB)-2A-GFP (AddGene PX458) (9289 pb) mediante el protocolo de transfección LipoPlus, según las indicaciones del fabricante. Para esto, se sembraron 1×10^6 células DAOY en una placa de 12 pocillos, utilizando 2.5µg de cada vector para las respectivas guías (para secuencias, véase tabla 5). Una vez transfectadas las células, se seleccionaron las células clones CRISPR según la expresión de GFP mediante *cell sorting*.

Tabla 1.-Partidores para qPCR Taqman utilizados, señalándose el gen, partidores anterior y reverso, y número de sonda implementado.

Gen	Anterior	Reverso	Sonda
hGli1	5'-GGA GAA GCG TGA GCC TGA ATC-3'	5'-TGG ATG TGC TCG CTG TTG ATG-3'	46
hGli2	5'-CAC GCT CTC CAT GAT CTC TG-3'	5'-CCC CTC TCC TTA AGG TGC TC-3'	30
hGli3	5'-TCA AAC CCG ATG AAG ACC TC-3'	5'-TTG TTC CTT CGG GCT GTT-3'	26
hShh	5'-TGT ACT ACG AGT CCA AGG CAC A-3'	5'-GAA GCA GCC TCC CGA TTT-3'	86
hPtc1	5'-CCG ACT ACA TGC CTG AAA CA -3'	5'-GAA CTG GGC ATA CTC GAT GG-3'	74
hNeo1	5'-GCG AGG AAT GAG ACC AAA AA-3'	5'-GGA TGG GCA CTA ATC ACA GG-3'	83
hNtn1	5'-AAA AGT ACT GCA AGA AGG ACT ATG C-3'	5'-CCC TGC TTA TAC ACG GAG ATG-3'	31
hUNC 5A	5'-AGC ACA GAC GGG AGC AGT-3'	5'-CCT GCT GCC TTG AGA CAT TA-3'	44
hUNC 5B	5'-GAC ACG CCT GTA GCA CTG AA-3'	5'-CCA AGT ATC CGC CCA GAG T-3'	67
hUNC 5C	5'-CCG AGG ACT GGA AAA TAC TGC-3'	5'-CGA CCA CCA CCA CAT CCT-3'	27
hUNC 5D	5'-TGC ACT TCT CTT TGT CCT GTG-3'	5'-GAC TGC AGA CGG ACC ATT C-3'	24
hDCC	5'-TCT CAG TGG ACC GAG GTT TC-3'	5'-TGT TGG GTA GTT GGT CCT TCA-3'	4
hβ Actina	5'-ATT GGC AAT GAG CGG TTC-3'	5'-GGA TGC CAC AGG ACT CCA-3'	11
mNeo 1	5'-GGG GAA TGA GAC CAA AAA TG-3'	5'-GGA TGG GCA CTA ATC ACA GG-3'	83
mNtn1	5'-GCA AGC TGA AGA GAT GAA CAT GA-3'	5'-CTT TGT CGG CCT TCA GGA T-3'	56
mNtn1	5'-CCC TGC ATA AAG ATC CCT GT-3'	5'-TGC AGT AGG AAT CGC AGT CTT-3'	25
mUN C5A	5'-GGG CAG AAT GTC CAG AAA AC-3'	5'-GCA GCT GAC CAC TTA TCC-3'	78
mUN C5B	5'-TTC AGC TGC ACA CAA CG-3'	5'- GCA AGC AGA GAG CAT CCA-3'	40
mUN C5C	5'-CCG AGG ACT GGA AAA ACT GC-3'	5'-CGA CCA CCA CCA CAT CCT-3'	27
mUN C5C	5'-AAT ATT GTT GCC AAG AGA AAA AGC-3'	5'-GGA CCA GCC ACC ATT AAC AT-3'	76
mUN C5D	5'-GCA CTG CTC TTT GTC CTG TG-3'	5'-GCT GCA GAC TGA CCA TTC AC-3'	33
mDC C	5'-CTG TCT TGG ACC GAG GTT T-3'	5'-GGT TGG TCC TTC ACT CAC AGA-3'	15

Tabla 2.-Partidores diseñados para flanquear los GBS consenso en las regiones regulatorias del gen *NTN1*.

GBS	Forward (5'>3')	Reverse (5'>3')	Tm (°C)
Nº1	CCT TCT TCC AAG GAG ACG GA	GCT CCA TTA AGT GCC TCA GTT T	58
Nº2	ACC AAA GGA TGC TGT CAC TGT	ATG ATG GTG TCA TGG GGC AT	58
Nº3	GGG ATT CCC AGG GTT TTG CTA	CCA AAC TGA CGG CAA GAC CT	58
Nº4	ATG ATG ATT AAC CCT GGA GGA C	TGG AAA AGC AGC ACA GTG GA	58

Tabla 3.-Partidores implementados para el genotipado de los ratones mutantes utilizados.

Gen	Secuencia (5'>3')	Tm (°C)
PTC1_WT3	TTG CGG CAA GTT TTT GGT TG	55,3
PTC1_WT4	AGG GCT TCT GGT TGG CTA CAA G	62,1
PTC1_Neo3	TGT CTG TGT GTG CTC CTG AAT CAC	62,7
PTC1_PT3	TGG GGT GGG ATT AGA TAA ATG C	60,6
Math-Cre 42	CTA GGC CAC AGA ATT GAA AGA TCT	59,3
Math-Cre 43	GTA GGT GGA AAT TCT AGC ATC ATC C	61,3
Math-Cre 84	GCG GTC TGG CAG TAA AAA CTA TC	60,6
Math-Cre 85	GTG AAA CAG CAT TGC TGT CAC TT	58,9
UNC5C-3697	CCC CTT TCT GGT GCC CAT CAG TCA GAA	68,18
UNC5C-4780	GGG AGA GAG AGA GAG AAA GGA AGG GA	64,23

Tabla 4.- Listado de anticuerpos utilizados, detallándose la concentración de uso, reactividad y marca comercial.

Anticuerpo	Concentración	Reactivo a	Marca
Netrina1	1/50	Humano/Ratón/Rata	H-104, Santa Cruz
Netrina1	1/400	Humano/Ratón/Rata	AF6419, R&D
Tuj1 (β-III Tubulina)	1/1000	Humano/Ratón/Rata	T8660 Sigma
BrdU	1/200	Humano/Ratón/Rata	M0744, Dako
PCNA	1/100	Vertebrados	13-3900 Invitrogen
Sox2	1/200	Humano/Ratón/Rata	ab97959, ABCAM
Paxilina	1/100	Humano/Ratón/Rata	610052, BD Biosciences
Talina	1/500	Humano/Conejo	MAB1676, Chemicon
VGluT1	1/100	Humano/Ratón/Rata	ab77822, ABCAM
β-Actina	1/1000	Humano/Ratón/Rata	(C4), sc-47778, Santa Cruz
Gli1	5 µg	Humano/Ratón	NB600-600, Novus Biologicals
Gli2	5 µg	Humano/Ratón	ab26056, ABCAM
Gli3	5 µg	Humano/Ratón/Rata	H-280, Santa Cruz
H3	2 µg	Humano/Ratón/Rata	ab1791, ABCAM
H3K4Met1	2 µg	Humano/Ratón	ab8895, ABCAM
H3K27Ac	2 µg	Humano/Ratón/Rata	ab4729, ABCAM
IgG Normal	2 y 5 µg	Conejo	sc-2027, Santa Cruz
Secundarios IF			
Anti- Rabbit-488	1/500	Conejo	A11034 Invitrogen
Anti-Mouse-555	1/500	Ratón	A21424 Invitrogen
Secundarios WB			
Conjugado a a Peroxidasa	1/1000	Oveja	HAF016, R&D
Conjugado a a Peroxidasa	1/1000	Conejo	sc- 2004, Santa Cruz
Conjugado a Peroxidasa	1/2000	Ratón	sc- 2006, Santa Cruz
Tinciones Fluorescentes			
DAPI	1/10.000		D1306, Life Technologies
TOPRO	1/200		T3605 Invitrogen
Hoechst-33342	2 µg/mL		H3570 Invitrogen

Tabla 5.-Secuencias de RNA guías utilizados para la generación de clones CRISPR para Netrina1.

gRNA	Secuencia (5'>3')
1.1	GGC GGA GCC GGC GGC GGG TG
1.2	GGT GAG TGG GTG CGT GAG CA
4.1	CGC AGC TCC CTT CTC TCC GC
4.2	GCG CGG GAG GTC GAG AGC CG

La presente tesis se enmarca en el proyecto FONDECYT, número 1140697, dirigido por la Dra. Verónica Palma A., titulado "La producción autocrina de Netrina1 y su receptor Neogenina 1 media la tumorigénesis en neoplasias producidas por desregulación de la vía de señalización SHH/Gli".

Para la realización de la presente tesis se contó con el financiamiento de los fondos adjudicados en la Beca de Doctorado Nacional 2012 CONICYT, número de folio: 21120358 y su extensión. Asimismo, se contó con el apoyo de la Beca Gastos Operacionales número de folio: 21120358, CONICYT. Mientras que las pasantías realizadas en el extranjero (Francia) fueron financiadas por la Beca de Pasantías en el Extranjero para Doctorado Nacional CONICYT, los años 2014 y 2015.

RESULTADOS

Objetivo 1.- Analizar la presencia y distribución de NETRINA1 en muestras de meduloblastoma humano.

Considerando los resultados arrojados por el análisis transcriptómico en MB humano desarrollado por nuestro grupo colaborador liderado por el Dr. M Taylor, en los que se observan un aumento de los niveles de expresión de *NTN1* en el subgrupo explicado por la sobre-activación de la señalización SHH/GLI, es que se planteó evaluar en primera instancia, la presencia y distribución de NETRINA1 en muestras de MB humano. Con este fin, se analizó la presencia y distribución de NETRINA1 en muestras patológicas pertenecientes a los cuatro distintos subgrupos descritos (WNT, SHH, grupo 3 y grupo 4). En total se analizaron 20 muestras patológicas (11 del grupo SHH y 9

de los otros grupos) obtenidas a través de colaboraciones simultáneas con distintos centros de investigación, uno nacional y dos internacionales, en particular con el Dr. MD. Facundo Las Heras (Facultad de Medicina, Universidad de Chile), Dr. Marcel Kool (*German Cancer Research Center (DKFZ)*, Heidelberg, Alemania) y Dr. Ulrich Schüller (*Center for Neuropathology, Ludwig-Maximilians University, Munich, Alemania*).

El meduloblastoma, es un grupo complejo de enfermedades, cada subgrupo presenta características moleculares, histológicas y clínicas distintas. En particular, la variante histológica característica del sub-grupo de SHH corresponde a la desmoplástica/nodular (Kim y col. 2011, Northcott y col. 2012, Millard & De Braganca 2015). Esta variante se caracteriza por la presencia de nódulos pálidos, en tinciones de hematoxilina-eosina, en los que se observa la diferenciación neuronal (synaptofisina positivos), estando estos nódulos rodeados por células hipercromáticas densamente empaquetadas en las zonas internodulares, encontrándose en éstas células tumorales con sobre-activación de la señalización SHH/GLI (Crawford y col. 2007, Northcott y col. 2012) (Figura 8A-C).

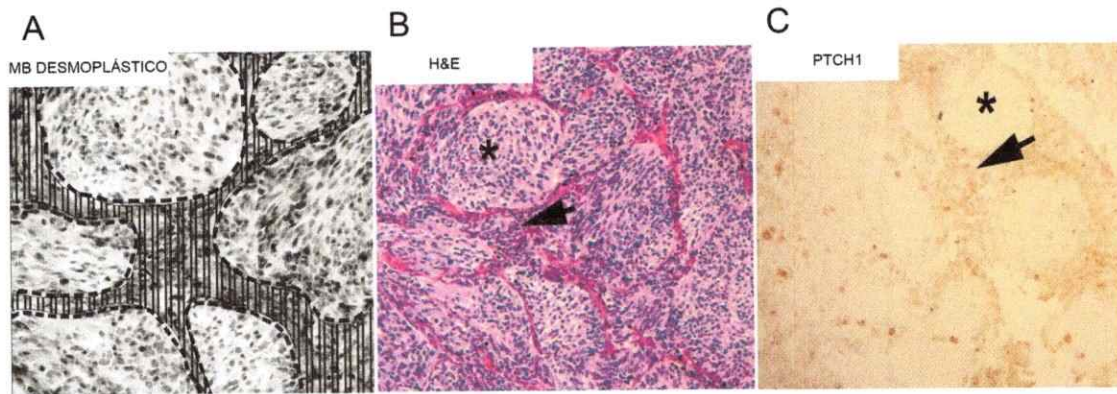


Figura 8.- Características de la variante histológica desmoplástica/nodular de meduloblastoma, exclusiva del grupo explicado por la sobre-activación de la señalización SHH/GLI. A.- Representación histológica del meduloblastoma desmoplástico/nodular, el cual se caracteriza por la presencia de nódulos de diferenciación neuronal y de una zona internodular (área destacada), la que presenta células pequeñas altamente proliferativas (tumorales). **B.-** Tinción de Hematoxilina-Eosina de tumor desmoplástico, señalándose un nódulo (asterisco,*) y la zona internodular (flecha), correspondiendo ésta a la zona tumoral (Aumento=20X). **C.-**Tinción histoquímica del receptor PTC1, *read-out* de la señalización SHH/GLI el cual es expresado en las zonas internodulares de los tumores, donde las células tumorales presentan la sobreactivación de la vía (Aumento=10X).

En este análisis, se evaluó la presencia de NETRINA1 a nivel de proteína mediante inmunohistoquímicas e inmunofluorescencias en cortes de meduloblastoma, observándose diversos patrones de expresión de NETRINA1 respecto a la distribución de la proliferación celular, marcada con PCNA. En los casos en que coincidieron las distribuciones de NETRINA1 y PCNA, correspondieron efectivamente a los tumores de histología desmoplástica nodular derivados de la sobre-activación de la vía HH (ANEXO I).

Se detectó la presencia de NTN1 en las zonas internodulares, región en la que se encuentran las células tumorales proliferativas (PCNA positivas), encontrándose excluida de los nódulos en los que se concentra la diferenciación neuronal (Tuj1 positivas) (Figura 9). Al caracterizar cualitativamente la expresión de NETRINA1 en los casos de MB-SHH/GLI, comparando los niveles de expresión de NETRINA1 en las zonas internodulares (tumorales) y regiones nodulares (no tumorales), se observó que en la mayoría de los casos, la expresión de NETRINA1 se encuentra enriquecida en la zona internodular, con respecto a un nivel basal de expresión en las regiones nodulares (no tumorales) (Figura 10). Con el objeto de corroborar la actividad de la señalización SHH/GLI en las células tumorales, se analizó la expresión de SOX2, *read-out* de la señalización, cuya expresión se vio restringida a la zona internodular (Takanaga y col. 2009, Figura 9). Recientemente, se demostró que las células SOX2 positivas, en el meduloblastoma derivado de la sobre-activación de la señalización SHH/GLI, representan una subpoblación quiescente dentro de células tumorales, responsable del rebrote de los tumores, resistentes a tratamientos de quimioterapia y radioterapia (Ahlfeld y col. 2013, Vanner y col. 2014).

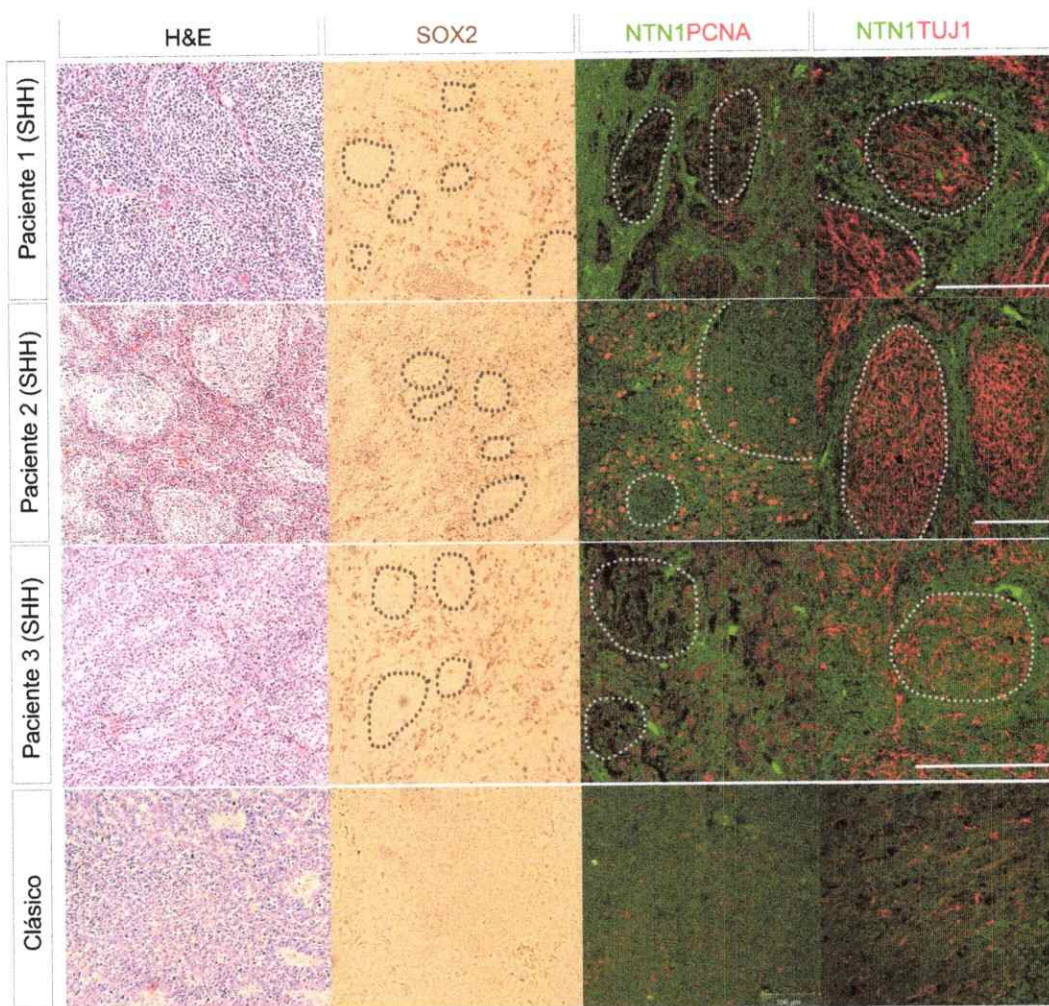


Figura 9.- NETRINA1 se expresa en las proliferativas del meduloblastoma desmoplástico/nodular. Se muestra un set representativo de 3 muestras de meduloblastoma desmoplástico/nodular. NETRINA1 (NTN1) se expresa en la zona internodular en tumores desmoplásticos/nodulares, exhibiendo un patrón de expresión similar al observado con PCNA, quedando principalmente excluido de los nódulos (marcados con TUJ1) donde se concentra la diferenciación neuronal (Barra= 100µm). Como *read-out* de la señalización SHH/GLI, se evaluó la expresión de SOX2, cuya expresión se observa únicamente en la zona internodular, donde la dicha vía permanece activa. Se presenta un meduloblastoma de la variante histológica clásica como control.

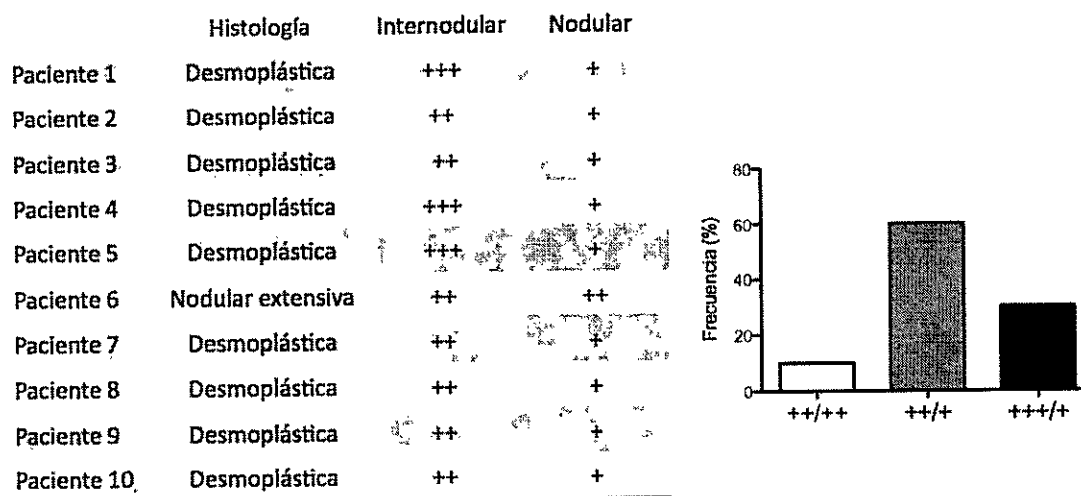


Figura 10.- Caracterización cualitativa de la expresión de NETRINA1 a través de 10 muestras de pacientes de MB derivado de desregulación de la vía SHH/GLI. A la izquierda.- Tabla resumen de datos obtenidos a partir de un total de 10 muestras de MB derivados de la sobre-activación de la vía SHH/GLI (10 muestras tabuladas), evaluando la expresión de NETRINA1 en las regiones proliferativas tumorales. Se compara la expresión de NETRINA1 en las regiones internodulares (tumorales) *versus* las zonas nodulares (no tumorales). **Derecha.-** Distribución de frecuencias, expresada en porcentaje, de los distintos niveles cualitativos de expresión de NETRINA1 en los tumores. Los datos presentados, corresponden al subgrupo de tumores de SHH/GLI (10 pacientes), de un total de 20 pacientes analizados.

Considerando los datos recolectados en el conjunto de muestras de meduloblastoma humano evaluados, se puede concluir que NETRINA1 es expresada por las células tumorales, presentes en las zonas de alta proliferación en el tumor, en las que la señalización SHH/GLI se encuentra sobre-activada.

Objetivo 2.- Evaluar NETRINA1 como blanco transcripcional directo de la vía de señalización SHH/GLI en mamíferos.

A.- Demostración molecular del control que ejerce la vía de señalización SHH/GLI sobre la transcripción de NTN1.

Con el objeto de evaluar el control transcripcional que ejerce la vía SHH/GLI sobre la expresión de NETRINA1 en humano (*NTN1*), se realizó un análisis *in silico* en busca de sitios de unión de factores Gli consenso, GBS (Gli Binding Site) en las regiones regulatorias de este gen. En primera instancia, se generó un logo probabilístico de 9 bases nitrogenadas a través de la herramienta MEME (Multiple Em for Motif Elicitation) (Figura 11C), usando secuencias GBS consenso cuya actividad biológica ha sido previamente demostrada (revisado por Milla y col. 2012) y se procedió a buscar los GBS arrojados en la región regulatoria de *NTN1*, 2 kb río arriba del sitio de inicio de la traducción (ATG) y en regiones intrónicas (primer y segundo intrón) con la ayuda de MAST (Motif Alignment & Search Tool) (Figura 11B). Esta búsqueda arrojó 4 sitios de coincidencia exacta con el motivo generado por MEME, 2 sitios consenso en el promotor proximal (-2 kb) y 2 GBS consenso en el segundo intrón (Figura 11B). Posteriormente, se diseñaron partidores para amplificar los sitios putativos, ajustando los parámetros de amplificación para su uso en PCR cuantitativo SYBER Green.

Para la realización de la Inmuno Precipitación de la Cromatina (ChIP), se procedió según el protocolo adaptado de Soutoglou y Talianidis (2002). Para esto, se optimizaron las condiciones experimentales para la sonicación de las células derivadas de meduloblastoma humano, DAOY (10^6 células, ATCC®). Se determinó el programa de sonicación optimizado para la obtención de fragmentos de cromatina de un tamaño comprendido entre los 200 pb – 500 bp (Figura 11C), utilizando 25µg de cromatina por punto de inmunoprecipitación. Para la inmunoprecipitación, se utilizaron anticuerpos dirigidos contra los efectores GLI (1-3) (5µg por punto, tabla adjunta) usando el anticuerpo contra Histona 3 (tabla adjunta) como control positivo de la inmunoprecipitación. Asimismo, se realizó la inmunoprecipitación dirigida contra modificaciones post-traduccionales de histonas con el objeto de evaluar la presencia de los GBS putativos en regiones *enhancer* del gen. Como control positivo de la actividad de la señalización SHH/GLI, se evaluó el GBS de *PTCH1* (Milla y col. 2013).

En la ChIP el GBS de *PTCH1* mostró un aumento tanto en la precipitación con Gli2 y Gli3 de 3,78 y 10,70 veces respectivamente, sobre el IgG, en un ChIP representativo de 3 experimentos, mientras que el control positivo de la Histona 3 dio un aumento de 75,4 veces sobre el IgG (Figura 11D y 11E). En la región próxima al promotor de *NTN1*, el GBS putativo 1 no mostró diferencias significativas al inmunoprecipitar con Gli1 ni con Gli2, (1,10 y 1,72 veces sobre el IgG, respectivamente), mientras que mostró un aumento significativo con Gli3 de 3,37 veces sobre el IgG (Kruskal Wallis, *p-value*=0.0227, N=3), así como el

control positivo de Histona 3 aumentó 34,7 veces sobre el IgG (Figura 11G y 11H).

El GBS putativo 2 mostró una tendencia al aumento al inmunoprecipitar con Gli1 (1,93 veces sobre IgG), mientras que no mostró diferencias con Gli2 (0,97 veces el IgG). Mientras que al inmunoprecipitar contra Gli3 (3,58 veces el IgG), se observa un aumento significativo (Kruskal Wallis, p -value=0.0302, N=2) (Figura 11J). Se muestra también el respectivo control positivo de inmunoprecipitación con Histona 3 (Figura 11K).

Con respecto los GBS putativos arrojados en el segundo intrón, el GBS 4 mostró un aumento significativo precipitando con Gli2 no así con Gli3 (Kruskal Wallis p -value = 0.021, N=3) (Figura 11F). Mientras que al evaluar el GBS 3, este no precipitó ni con Gli2 ni Gli3 (N1). Dada la posición relativa del GBS putativo 4, se evaluó si su presencia se asocia a un *enhancer*, usando marcas de *enhancer* transcripcionalmente activado, en particular, las modificaciones post-traduccionales de las histonas como H3K4Met1 y H3K27Ac (Kimura 2013). En este sentido, se observó un aumento significativo de la presencia del GBS4 en ambas marcas, 66,37 y 19,81 veces sobre el IgG (Kruskal Wallis p -value = 0.0152, N=3), mientras que el control positivo de la Histona 3 aumentó 12,81 veces sobre IgG (Figura 11I).

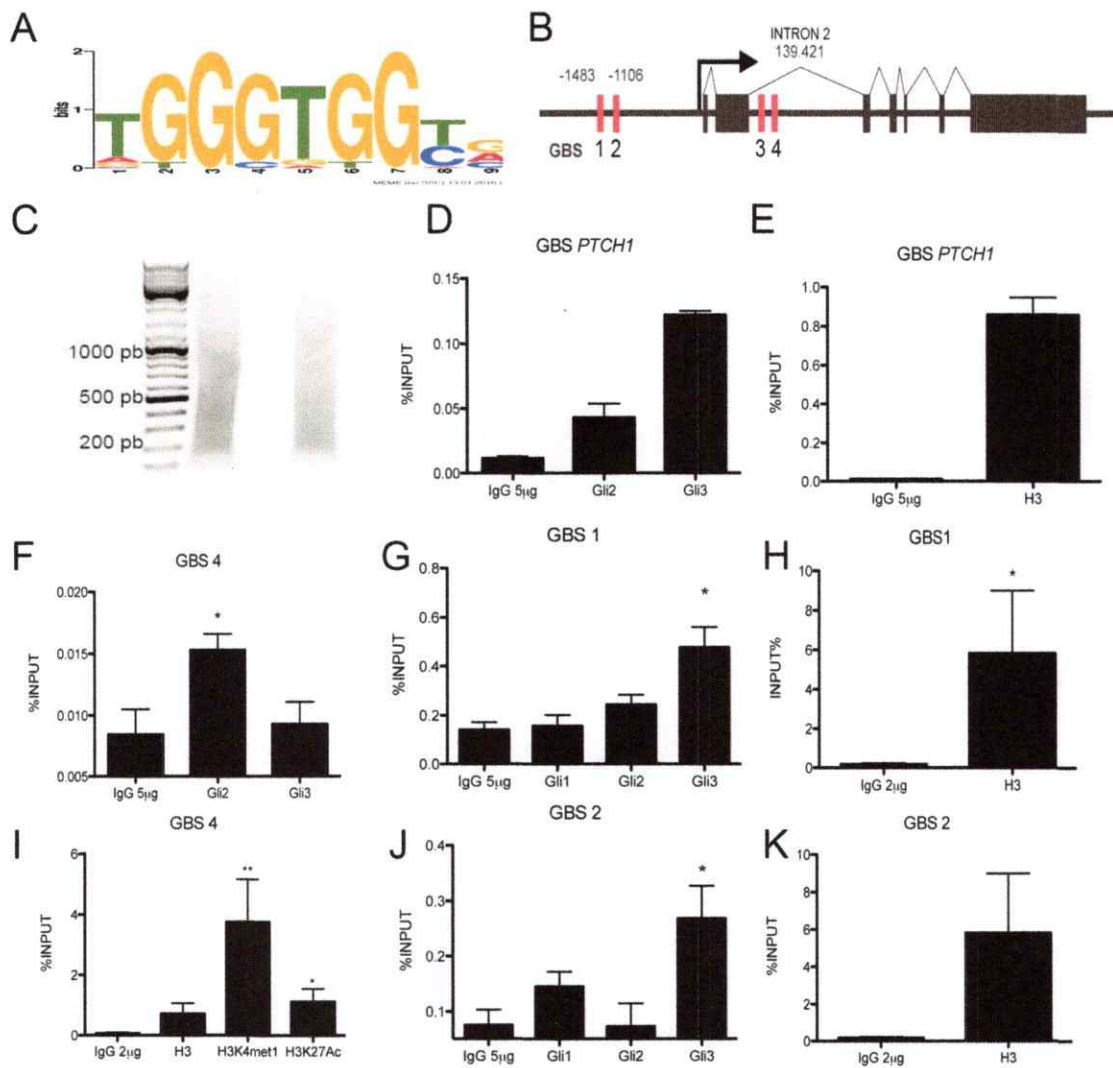


Figura 11.- Los efectores GLI2 y GLI3 reconocen dos sitios de unión a GLI consenso (GBS, del acrónimo en inglés GLI Binding Site) en *NTN1*. Mediante la aproximación de ChIP, se observó el reconocimiento de Gli3 en el promotor proximal y de Gli2 en el segundo intrón del gen de *NTN1* humano. **A.-** Logo probabilístico generado en el análisis *in silico* mediante el uso de MEME. **B.-** Representación del gen de *NTN1* humano y la distribución de los GBS consenso identificados mediante el análisis *in silico*. **C.-** Imagen representativa de un gel del extracto entrecruzado correspondiente a cromatina fragmentada de 10^6 células DAOY enriquecida entre 200-500 pb. Las muestras fueron cuantificadas mediante PCR en tiempo real utilizando partidores específicos

para los sitios que flanquean los GBS putativos. **D.-** El GBS de *PTCH1*, usado como control positivo de la señalización SHH/GLI, aumenta tanto al precipitar con Gli2 y Gli3; (*p-value* <0.05, N=3). Además se muestra el control positivo de la inmunoprecipitación de histona H3 (**E**). **F.-** El GBS consenso 4, ubicado en el segundo intrón de *NTN1* en tanto es reconocido por Gli2 (*p-value* <0.05, N=3), y se encuentra en una región que presenta marcas de *enhancer* transcripcionalmente activado, en particular H3K4Met1 y H3K27Ac (**I**) (*p-value* <0.05, N=3). **G.-** El GBS consenso 1 ubicado en la región próxima al promotor, es reconocido por Gli3 y no así por Gli1 ni Gli2 de manera significativa (*p-value* <0.05, N=3), se acompaña el control positivo de H3 (**H**). **J.-** El GBS consenso 2 ubicado en la región próxima al promotor, es reconocido por Gli3 de manera significativa (*p-value* <0.05, N=2), mientras que se observa una tendencia con Gli1, se acompaña el control positivo de H3 (**K**).

Con el objeto de corroborar la funcionalidad de los GBS consenso encontrados en el promotor proximal, evaluados mediante ChIP, se realizó el ensayo de luciferasa en las células DAOY. Se clonaron los GBS presentes en la región promotora, 1 y 2, en el constructo pGL3 río arriba del gen que codifica la luciferasa. Además se generaron constructos con la mutación de tres pares de bases en la porción central del GBS respectivo (Figura 12A). Ambos GBS fueron co-transfectados ya sea con el mayor efector activador de la señalización, Gli1 (donado por Dr. Ruiz i Altaba) o con una forma activadora de Gli3 de alta actividad (*Gli3High*, correspondiente al factor Gli3 con su dominio aminoterminal represor mutado lo que lo convierte en un potente activador, donado por Dr. Briscoe (Stamatakis y col. 2005), co-transfectando con los respectivos vectores vacíos como control experimental. Mientras que como control positivo de la activación de la señalización, se evaluó la actividad luciferasa inducida por un tándem de 8 secuencias de la secuencia consenso

GBS (GBS 8X, Sasaki y col. 1997), observándose un aumento en promedio de la actividad de 14,16 veces inducida con Gli1 y de 24,15 veces inducida con Gli3*High* (Figura 12B).

En primera instancia, se realizó el ensayo de luciferasa induciendo la activación transcripcional del promotor de *NTN1* (-2Kb) en condición de activación de la señalización co-transfectando ya sea con Gli1 o Gli3*High*, en dos dosis del inductor (150 ng y 300 ng), con el objeto de evaluar la contribución de cada efector sobre la activación del promotor (Figura 12C). Se pudo observar un aumento de la actividad en el promotor de 2,34 veces con la primera dosis de Gli1, y de 3,78 veces al doblar la dosis con Gli1, apreciándose una respuesta lineal dosis-dependiente. Por su parte, al co-transfectar con Gli3*High* también fue posible observar una respuesta lineal en la inducción de la actividad del promotor de *NTN1*, siendo de 1,70 veces en la primera dosis y 2,88 veces la actividad del promotor en la segunda dosis. En términos generales, se pudo observar una respuesta dosis dependiente en la activación transcripcional del promotor de *NTN1*, tanto al inducirla con Gli1 como Gli3 *High* (N=2).

Al evaluar la actividad luciferasa en los GBS mutados, se observó una disminución significativa de la actividad al inducir la activación con Gli1 en el GBS2 mutado, reduciéndose a un 61,48% de la actividad total del promotor (Mann Whitney *p-value*<0.05, N=3), no así al activar con Gli3*High*. Por su parte, el GBS1 mutado mostró una reducción significativa de la actividad del 42,85%

en promedio de la actividad total del promotor, al inducirla con *Gli3High* (Mann Whitney $p\text{-value}<0.05$, $N=3$) (Figura 12D) y no respondió a la activación con *Gli1*.

Considerando un estudio realizado por el grupo de Dr. Scott (2010), en que se sugiere que *Gli1* podría cooperar con factores transcripcionales bHLH que reconozcan la secuencia E-box para regular la expresión de genes, mediando así la transformación de GNP a células tumorales en el MB (Lee y col. 2010), es que se evaluó la presencia de secuencias E-box, en la región próxima al promotor de *NTN1*. Así, fue posible identificar la presencia de una secuencia E-box contigua al GBS2, sitio de unión que mostró actividad luciferasa al inducir con *GLI1* (Figura 12A). Lo anterior podría sugerir que *GLI1* cooperaría con un factor bHLH en el control transcripcional del gen *NTN1*.

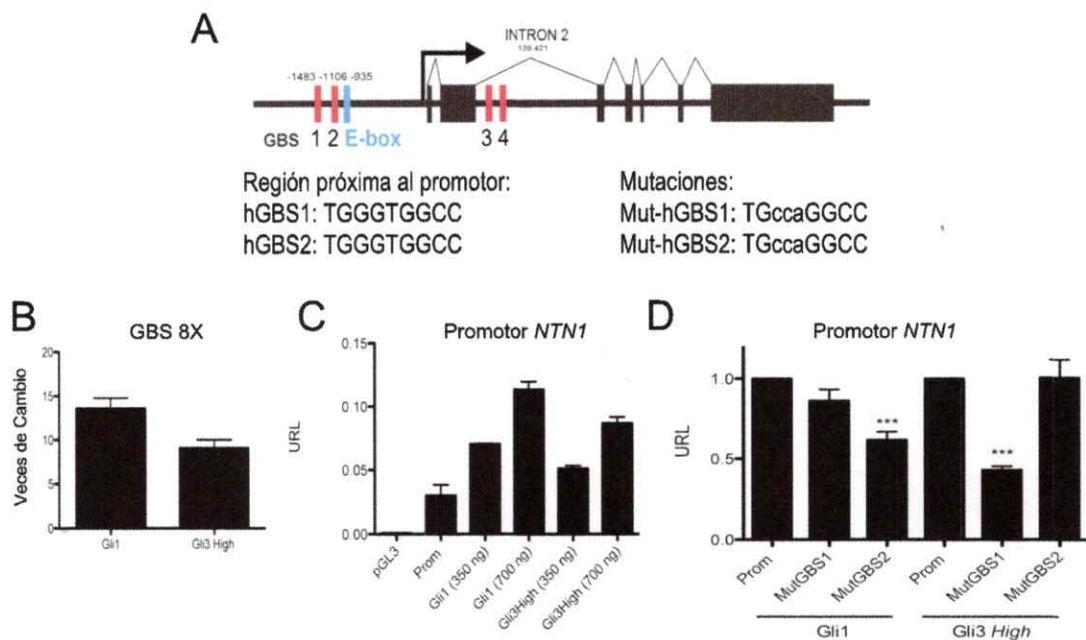


Figura 12.- Formas GLI activadores inducen actividad luciferasa de manera específica, en los GBS1 y 2 del promotor de *NTN1*. A.- Esquema de *NTN1* destacando las mutaciones de tres pares de bases, introducidas en el centro de cada GBS, y la presencia de una secuencia E-box próxima al GBS2. B.- Control positivo de la activación de la señalización SHH/GLI, observándose en promedio un aumento de 14,16 y 24,15 veces sobre el control, inducido con Gli1 y Gli3High, respectivamente. C.-Contribución de Gli1 y Gli3 activador en la activación del promotor de *NTN1*, en dos dosis (1: 150 ng y 2: 300 ng) en la reacción, observándose una respuesta dosis-dependiente en la inducción del promotor. D.-La mutación específica del GBS1, revierte parcialmente la actividad inducida por Gli3High, mientras que la mutación del GBS2, revierte parcialmente la actividad inducida por Gli1 (Mann Whitney p -value<0.05, N=3) expresado en unidades relativas de luciferasa (URL).

Colectivamente, los resultados obtenidos demuestran que la señalización SHH/GLI controla la expresión de Netrina1 transcripcionalmente. En particular, mediante los efectores de la señalización canónica de SHH, las proteínas GLI en su forma activadora, actuando sobre GBS consensos localizados en regiones promotoras de *NTN1*. Sin embargo, en virtud del resultado del ChiP no se puede descartar una función de GLI3 actuando como represor y una

competencia de las proteínas GLI activadoras *versus* represoras por los GBS de *NTN1*, por lo que posiblemente la modulación sea integrada a nivel celular dependiendo del contexto.

B.-Los niveles transcripcionales de NTN1 responden a la modulación de la señalización SHH/GLI en humano.

Se evaluó la respuesta transcripcional de *NTN1* en la línea celular DAOY, ante la modulación de la señalización SHH/GLI. Para esto, se procedió a estimular la vía SHH/GLI de dos maneras. La primera mediante el uso de medio condicionado de células humanas Ecr-293, inducidas para la producción del ligando Shh, y la segunda mediante el uso de SHH recombinante (Sonic Hedgehog humano recombinante purificado, C24II. Miltenyi Biotec) a una concentración final de 20nM. A través de la estimulación de la línea celular DAOY con el medio condicionado (Ecr-293, 5ng/mL)(SHH*) *versus* DMEM, se observa un aumento significativo de los niveles transcripcionales de blancos clásicos de la señalización SHH, como son *GLI1* y *PTC1*, acompañado de un aumento significativo de los niveles de *NTN1*, a las 48h de tratamiento (N=3, *p-value* <0.05, Mann-Whitney. Figura 13 A-C). Dado que sólo se observó una tendencia al aumento de los niveles de expresión de *NTN1* a las 24h mediante el uso de medio condicionado, es que se trató la línea DAOY con el recombinante de SHH (20nM concentración final). Asimismo, el uso del recombinante de SHH permitió evaluar de manera específica el efecto de la estimulación de la vía, en comparación al uso del medio condicionado. Usando

el recombinante de SHH fue posible observar un aumento significativo de los niveles transcripcionales de *Gli1* acompañado de un aumento de los niveles de *NTN1* a las 24h, en comparación a la condición tratada sólo con BSA 0,1% (N=3, *p-value*<0.05; Mann-Whitney. Figura 13 D-E).

De manera complementaria, con el objeto de corroborar la respuesta a nivel de proteína de NETRINA1 al modular la señalización SHH/GLI, es que se evaluó mediante *western blot* los cambios en la cantidad de NETRINA1 al estimular con Shh recombinante, 20 nM durante 24h. Se pudo observar un aumento de la expresión de NETRINA1 entorno al doble (1,81 veces) en comparación a la condición control, el cual corresponde a la tratamiento con BSA 0,1%. En este experimento se utilizó como control de carga, la expresión de β - Actina (N=1, Figura 13F).

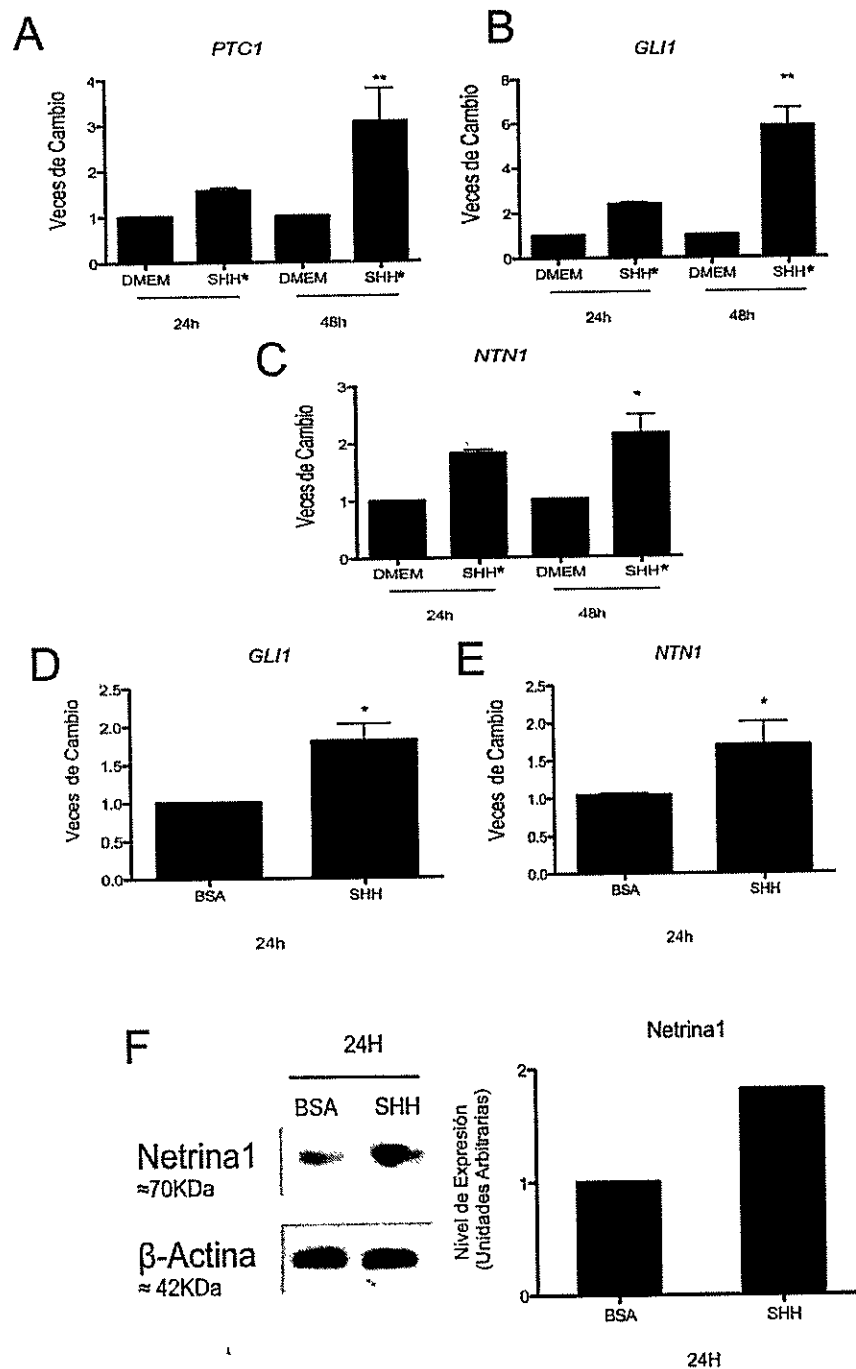


Figura 13.- Los niveles transcripcionales de *NTN1* responden a la modulación de la señalización SHH/GLI en células DAOY. A-C.-Utilizando medio condicionado de la línea celular Ecr-293, inducidas para la expresión de SHH (5ng/mL) (SHH*), se observó un aumento a las 48h significativo en los niveles transcripcionales de los blancos

clásicos de la vía como *PTCH1* (A) y *GLI1* (B) (promedio de $2,88 \pm 0,73$ y $5,54 \pm 0,81$ veces sobre el control, respectivamente) así como de *NTN1* (C) (promedio $2,00 \pm 0,33$ veces sobre el control). ($p\text{-value} < 0.05$, $N=3$). D-F.- Paralelamente, se estimuló la vía a través del uso del recombinante de SHH 20nM, usando como control BSA 0,1%, observándose un aumento significativo tanto de los niveles de transcrito de *GLI1* (D) (promedio $1,81 \pm 0,22$ veces sobre el control), como de los niveles de *NTN1* (E) ya a las 24h ($p\text{-value} < 0.05$, $N=3$). La estimulación de la vía durante 24h se traduce en el aumento de la expresión de NETRINA1 (F). Como control de carga se usó la expresión de β - Actina ($N=1$).

C.- -Los niveles transcripcionales de Netrina1 responden a la modulación de la señalización Shh/Gli en el cerebelo murino.

Clasificado como un tumor neuroectodermal primitivo del cerebelo, el MB se origina de anomalías genéticas en las vías de señalización requeridas para la maduración normal de la corteza cerebelar, en particular de vías involucradas en la neurogénesis de los GNPs en el cerebro postnatal. La activación aberrante de la vía de Shh/Gli1 ha sido asociada con un tipo de MB (Northcott y col. 2012a). Con el objeto de evaluar la regulación que ejerce la señalización Shh/Gli1 sobre los niveles transcripcionales de *Netrina1* en las células progenitoras GNPs de ratón, se plantearon dos protocolos experimentales. Siendo la primera aproximación farmacológica a través de la estimulación con el recombinante de Shh (50nM), tratamiento que previamente ha mostrado modular la señalización en cuestión en este tipo celular (Izzi y col. 2011). A través de dicha estimulación fue posible observar un aumento significativo en los niveles transcripcionales de *Gli1*, tanto a las 24 como a las 48h. El aumento de este *read-out* clásico de la vía, fue acompañado por el aumento del transcrito de *Netrina1* de manera significativa a las tanto a las 24h como a las 48h en la

condición de tratamiento con recombinante de Shh (50nM) *versus* BSA 0,1%(p-value<0.05; Mann-Whitney, N=3. Figura 14A y B).

En segunda instancia, se planteó la aproximación genética mediante el empleo del modelo murino de haploinsuficiencia del receptor de la vía Shh/Gli1, *Ptc1*, modelo ampliamente usado para el estudio de enfermedades originadas por la sobre-activación de señalización Hh. En particular, constituye una herramienta genética valiosa para el estudio de la tumorigénesis del meduloblastoma, como resumen Corcoran & Scott (2001). Por medio del empleo del modelo murino de *Ptc1+/-*, se buscó evaluar los niveles de expresión de *Netrina1*. Se analizaron 3 camadas distintas de ratones *Ptc1+/-*, cada una con tres ratones heterocigotos y se realizaron cultivos de GNP's independientes para cada individuo en P6, estimado como el día *peak* de la proliferación de GNP's. Una vez aislados los GNP's, fueron tratadas por 48h con medio completo (10%SFB+suplementos) para a establecer el cultivo primario enriquecido en GNP's. Al analizar los niveles de expresión, dado que los propios niveles de transcrito de *Gli1* mostraron una gran variabilidad entre los individuos heterocigotos con respecto a los silvestres, es que se evaluó la correlación entre los niveles de transcrito de *Gli1* y de expresión de *Netrina1*, para cada camada. Al analizar dicha correlación, se observó que en las tres camadas los niveles de expresión de *Netrina1* se correlacionan positivamente con los niveles de expresión de *Gli1*, exhibiendo índice de correlación R=0,96 en la primera camada, R=0,66 en la segunda y R=0,78 en la tercera (Figura 14 A-C).



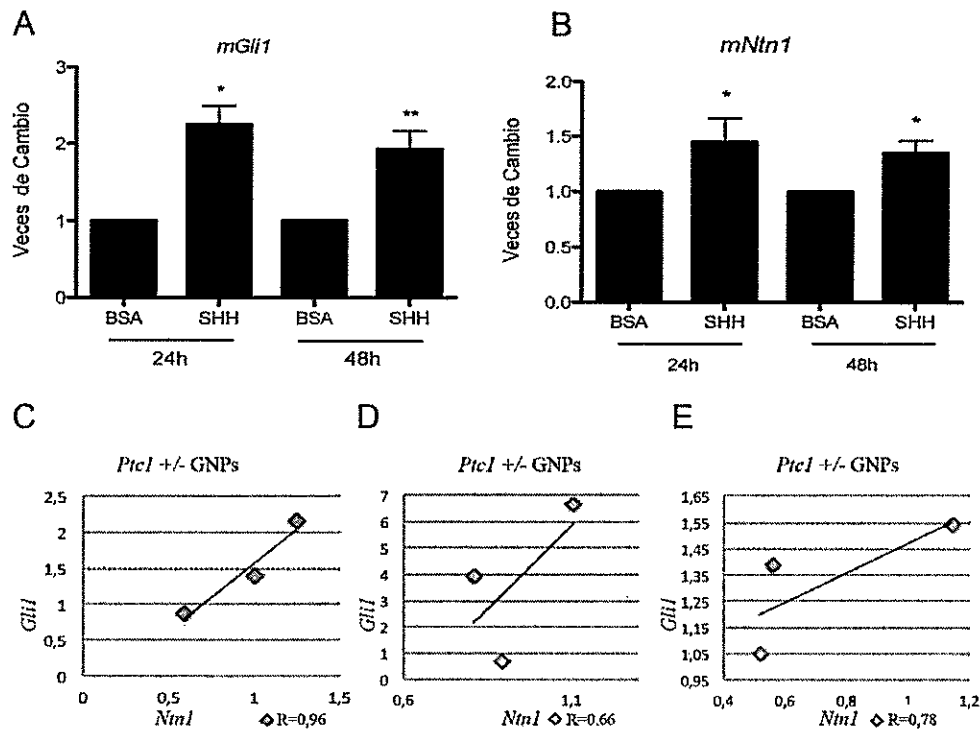


Figura 14.- Los niveles de *Netrina1* responden a la estimulación de la vía Shh/Gli en precursores granulares cerebelares (GNPs) de ratón postnatal (P6) y éstos se correlacionan de manera positiva con los niveles de expresión de *Gli1*. Superior: Al estimular la señalización en GNPs a través del tratamiento con 50nM de recombinante de Shh, aumenta el nivel de expresión de *Gli1* (A) y de *Netrina1* (B) de manera significativa tanto a las 24h como a las 48h, en comparación al tratamiento con BSA 0,1% (N=3; p-value<0.05). Los niveles de expresión de *Netrina1* se correlacionan de manera positiva con los niveles transcripcionales de *Gli1* en GNPs aisladas a partir de ratones mutantes, heterocigotos de *Patched1* (*Ptc1 +/-*), en tres camadas independientes (C-E). Índice de correlación por camada de mutante: N=1: R=0,96; N=2: R=0,66; N=3: R=0,78).

En conjunto, los resultados obtenidos en el segundo objetivo permiten concluir que NETRINA1 es un blanco transcripcional directo de la señalización canónica

SHH/GLI, y que de manera complementaria, dicho control transcripcional aparenta estar conservado en ratón.

Objetivo 3.- Evaluar el efecto que ejerce Netrina1 sobre la apoptosis, sobrevida y proliferación celular en la línea celular derivada de meduloblastoma humano, DAOY.

A.-Establecimiento y validación de la línea knock-down de NTN1 en células DAOY.

Con el objeto de evaluar el rol que desempeña Netrina1 en la apoptosis, sobrevida y proliferación celular *in vitro*, se analizaron estos procesos en células en las que se encuentra silenciada la expresión de NETRINA1 de manera estable, con respecto a una línea control (*scrambled*). Para este fin, en primer lugar, se procedió a generar las líneas celulares DAOY establemente transducidas, *shNTN1* y *shScrambled (shSCR)*, mediante la infección de las células con partículas lentivirales del interferente acoplado al reportero de GFP. Una vez transducidas las células, se seleccionaron a través del empleo de puromicina a una concentración de 5 µg/ml (Figura 15A y B).

Para la validación de la línea *knock-down* de *NTN1* en la línea DAOY, se evaluaron los niveles de expresión de *NTN1* en las líneas celulares *shSCR* y *shNTN1*, tanto a nivel de transcrito como a nivel de proteína. Los niveles de transcrito se analizaron mediante la técnica de PCR cuantitativo Taqman, observándose una reducción al 43% y 41% de la expresión total observada en el control *shSCR*, a las 24 y 48 horas respectivamente (Figura 15C). Los niveles

de proteínas se evaluaron a través de la técnica de *western blot*, examinándose los cambios a nivel de dicho ligando, mientras que como control de carga se detectaron los niveles de β -actina. En este aspecto, se observó una disminución de los niveles proteína de NTN1 en la línea shNTN1 con respecto a lo observado para la línea DAOY shSCR (Figura 15D).

Se evaluó la condición de adhesión celular en la línea de meduloblastoma DAOY shNTN1, con el objeto de descartar posibles alteraciones en este fenómeno que pudiesen afectar la sobrevivencia celular. Específicamente, se examinó la presencia y distribución de proteínas involucradas en la adhesión celular, en particular de Talina y Paxilina, a través de inmunofluorescencia en DAOY. Considerando las características de dichas proteínas involucradas en las adhesiones focales, es que al comparar la condición shNTN1 con la condición control shSCR, es que no se observan mayores diferencias en términos de adhesión celular (ANEXO II Figura A y B).

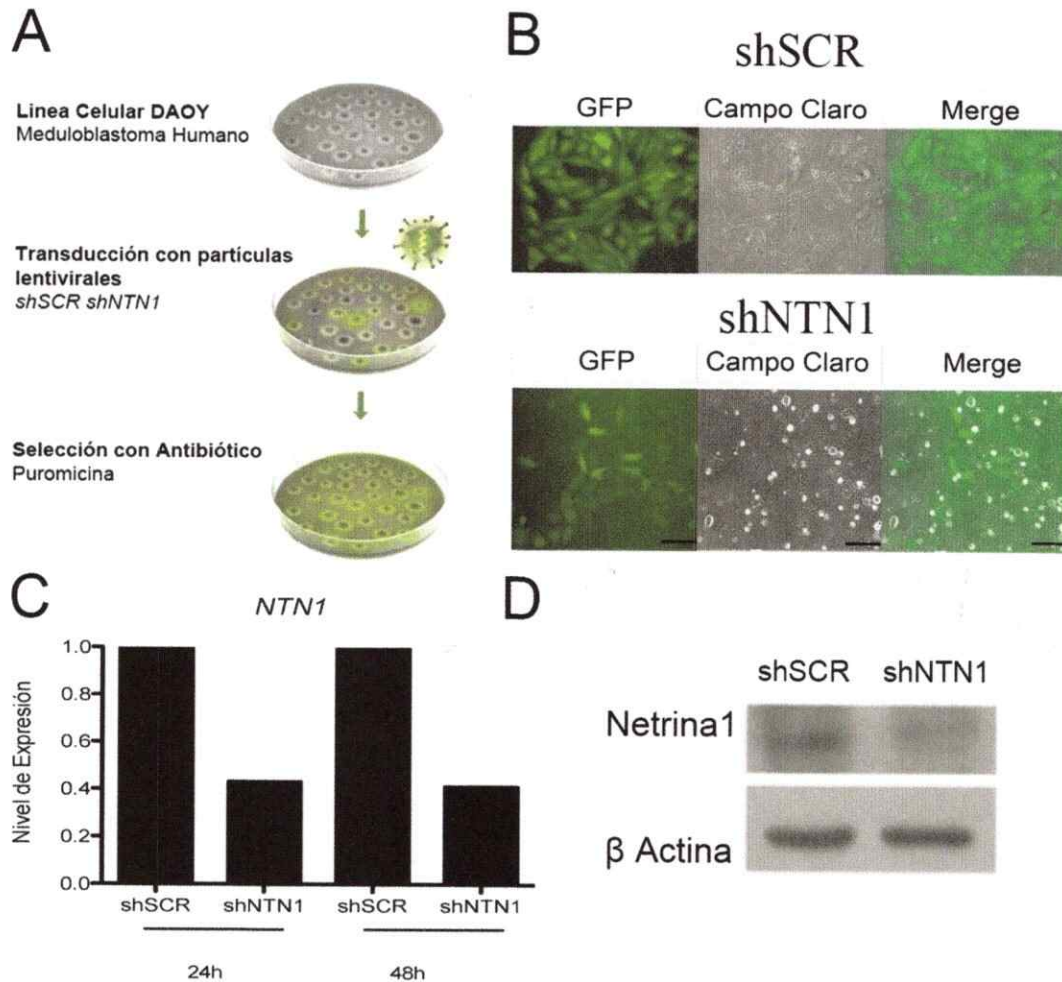


Figura 15.- Generación y validación de la línea *knockdown* estable de *NTN1* en la línea celular DAOY de meduloblastoma humano. A.- Diagrama resumen de metodología implementada para la obtención de líneas transducidas estables, a través de la infección con partículas lentivirales del interferente *shNTN1*, considerando como control, las células transducidas con el constructo *shSCR*, estando la expresión de ambos acoplada a la expresión del reportero GFP. B.- Imágenes representativas de las líneas DAOY *shScr* y *shNTN1*, expresando el reportero GFP. Barra=100 μ m. C.- Validación del *knock-down* a través de qPCR Taqman, observándose una reducción de la expresión a nivel de transcrito al 43% y 41% a las 24 y 48h, respectivamente. N=1 D.- Validación a nivel de proteína, usando 70 μ g de proteína/carril, apreciándose una disminución de NTN1 en la línea *shNTN1* en comparación del control *shSCR*, mediante *western blot*, mostrándose el control de carga, β -Actina. N=1.

B.-Evaluación del rol que ejerce NTN1 en la supervivencia y proliferación celular en meduloblastoma in vitro mediante la aproximación de knock-down NTN1.

Para descartar un posible efecto de la pérdida de función de *NTN1* sobre la proliferación celular de las DAOY en el *knock-down*, se evaluó dicho proceso a través de la incorporación de BrdU, con un pulso de 2 h. Se cuantificó el número de células BrdU positivas con respecto al total de células, estimado a través de la tinción nuclear con TOPRO, y se compararon dichas razones para las líneas shSCR y sh*NTN1* tanto a las 24 como a las 48 h. Cabe destacar que el tiempo de duplicación poblacional de esta línea celular es de 34 horas. No se observaron diferencias estadísticamente significativas (*p-value* >0,001), indicando que la proliferación de estas células no se ve afectada por el silenciamiento de *NTN1* (Figura 16 A y B).

Con el objeto de evaluar el rol que ejerce *NTN1* como factor de supervivencia, se procedió a realizar el ensayo de TUNEL en las células modelo DAOY sh*NTN1*, en comparación a la shSCR, después de 24 h. Se observó un aumento significativo en el número de células TUNEL positivas en el grupo DAOY sh*NTN1* (mediana 46,67% ±3,0), en comparación a las células shSCR (mediana 19,17% ±2,1) (ANOVA, *p-value*<0,001, $\alpha=0.05$, N=1) (Figura 16 C y D). Asimismo, con el fin de analizar el efecto de *NTN1* en la supervivencia celular, se evaluó la viabilidad celular a través del ensayo de MTT, ensayo colorimétrico basado en la reducción metabólica del compuesto Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) en un producto de color azul,

formazán. Se realizó la medición de la densidad óptica a 550 nm, de las dos condiciones por triplicado de DAOY, shSCR y DAOY shNTN1, a las 24. En este caso, la línea shNTN1 ($0,0757 \pm 0,013$) mostró una disminución significativa en la densidad óptica con respecto a la línea shSCR ($0,166 \pm 0,023$) en ambos tiempos ($p\text{-value} < 0.001$, $N=3$) (Figura 16E y F).

Por último, de manera complementaria, se examinó la muerte celular inducida por el silenciamiento de la expresión de NTN1 a través de la medición de actividad caspasa-3. De manera consistente con los resultados obtenidos con el ensayo de TUNEL, se observó un aumento significativo de la actividad caspasa-3, tanto a las 24h como a las 48h en la línea shNTN1 ($N=3$, $p\text{-value} < 0.05$, Mann-Whitney) (Figura 17A). Con el objeto de evaluar de la especificidad en la inducción de la muerte celular en la condición shNTN1 con respecto al shSCR, se realizaron los mismos experimentos agregando $1 \mu\text{g/mL}$ de recombinante de Netrina1. Por medio de la tinción de yoduro de propidio (IP) (Imágenes representativas Figura 16C), se pudo observar una reversión parcial de la muerte celular al emplear Netrina1 recombinante en las células shNTN1 versus la condición sin recombinante (Figura 17B). Similar reversión pudo ser observada mediante el análisis de la actividad caspasa-3 en las células shNTN1, llegando a niveles de muerte celular comparables a la shSCR, sin presentar diferencias significativas entre la condición shSCR y la condición shNTN1+Recombinante de Netrina1 ($p\text{-value} > 0.05$; Mann-Whitney, $N=3$. Figura 17A).

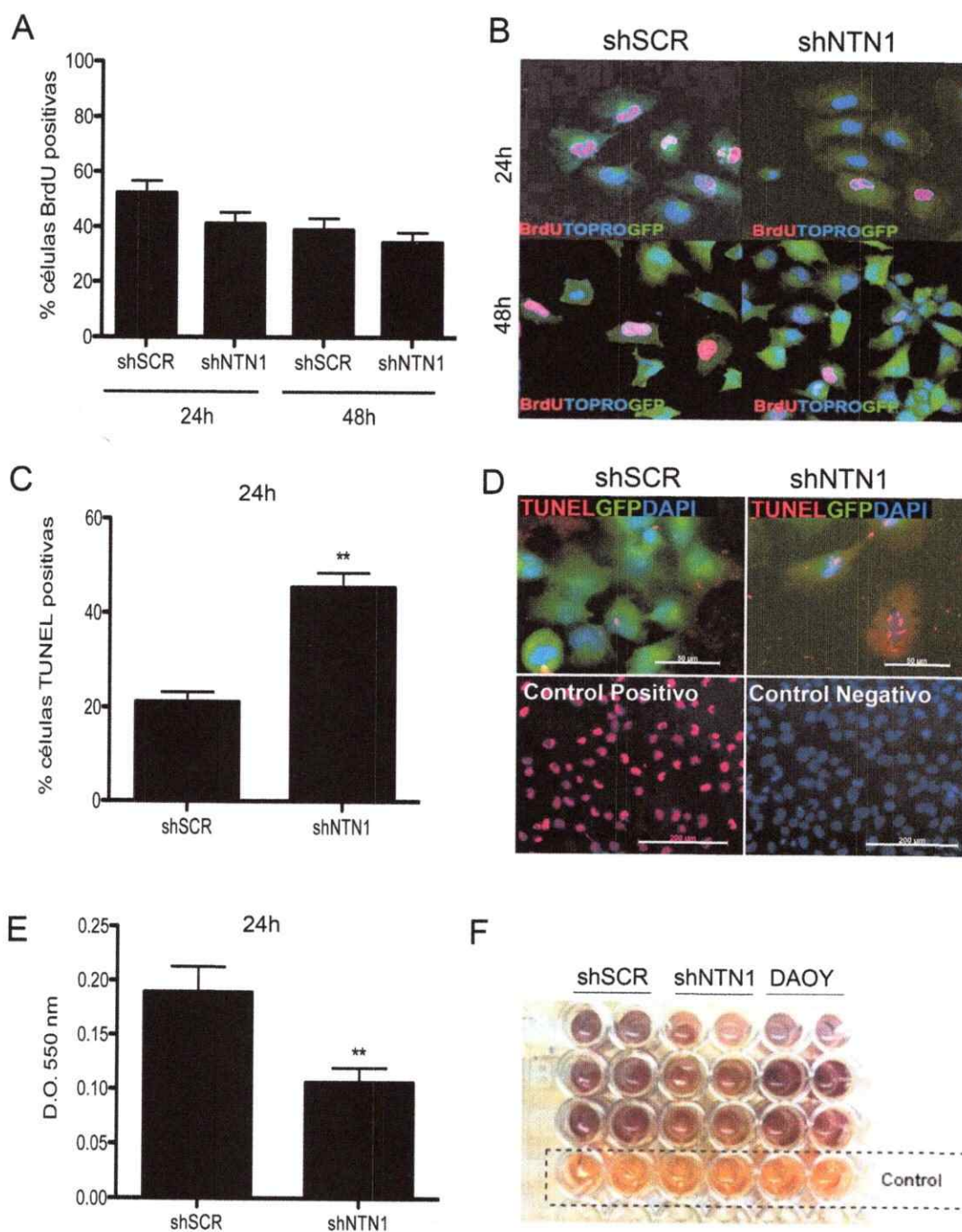


Figura 16.-NTN1 recombinante promueve la sobrevivencia celular, sin afectar la proliferación celular en células DAOY. A.- Cuantificación de la proliferación celular en las líneas celulares shSCR y shNTN1, mediante la incorporación de BrdU (pulso de 2 horas) evaluado a los tiempos indicados, N=1. **B.-** Imágenes representativas de la proliferación en las líneas celulares indicadas, evaluado en dos tiempos mediante doble Inmunofluorescencia anti BrdU/ anti GFP, a 24 y

48 h. N=1. Aumento objetivo: 40X. **C.-** La muerte celular aumenta en las células en las que la expresión de NETRINA1 se encuentra silenciada (*shNTN1*), en comparación al control *shSCR*, medido a través del ensayo de TUNEL a las 24 h (*p-value*<0,001, N=1). **D.-** Imágenes representativas del ensayo para células *shSCR* y *shNTN1* en panel superior, barra= 50µm. Se señalan los controles de la reacción, en el control negativo, células DAOY en las que la reacción del ensayo de TUNEL no se efectuó y el control positivo, células DAOY tratadas con DNAsa, previo a la realización del ensayo, que revela núcleos picnóticos. Barra=200µm. **E.-** Evaluación de viabilidad celular en líneas DAOY *shSCR* y *shNTN1*, a través de ensayo MTT a las 24 h. La densidad óptica medida en *shNTN1* disminuye significativamente con respecto a la línea *shSCR* a las 24 h (*p-value*<0,001, N=3). **F.-** Imagen representativa del ensayo de MTT, mostrándose cada una de las condiciones.

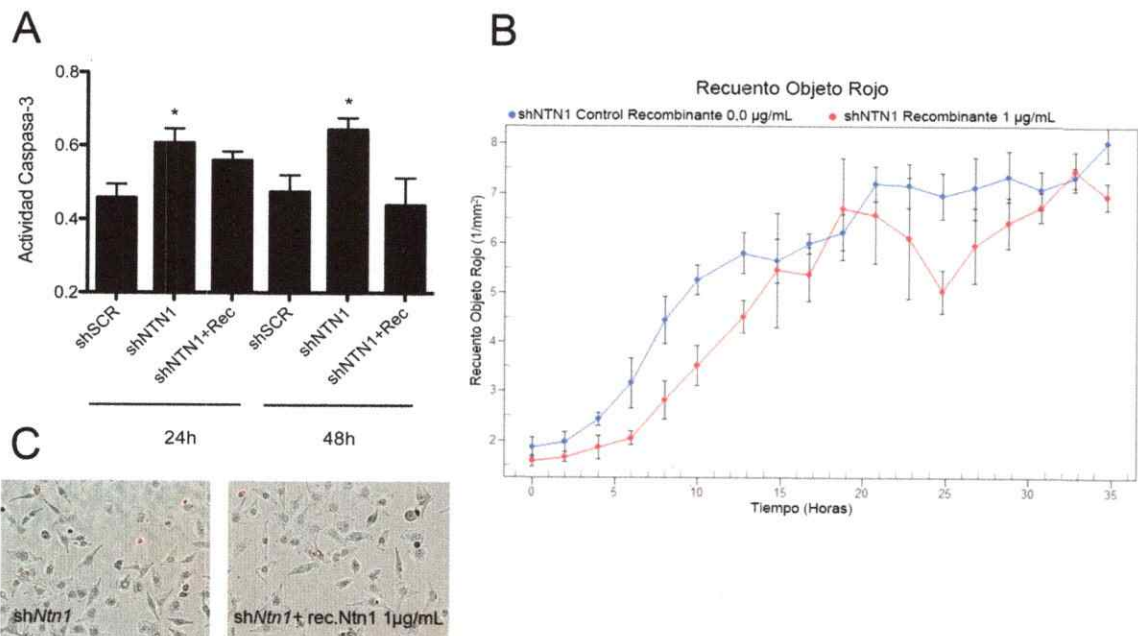


Figura 17.- Células DAOY *knock-down* de NTN1 exhiben un aumento de muerte celular, el cual se puede revertir de manera específica con el recombinante de Netrina1. A.- Células *shNTN1* presentan un aumento significativo de la muerte celular, medido mediante actividad caspasa-3, con respecto al control *shSCR*, el cual se revierte al agregar 1µg/mL de recombinante de Netrina1 (p -value>0.05; Mann-Whitney, N=3). B.- Mediante la tinción de IP, se pudo observar la reversión parcial de la muerte celular al agregar el recombinante de Netrina1 (1 µg/mL, línea roja) a la línea *shNTN1* (línea azul). C.- Imágenes representativas de la tinción IP (rojo) para las condiciones de *shNTN1* y *shNTN1*+ recombinante de Netrina1 (1µg/mL).

Una vez verificada la función de factor de supervivencia que ejerce Netrina1, se buscó examinar cual de sus receptores DR mediaría la muerte celular. Netrina1 ha mostrado unirse principalmente a dos familias de receptores: los homólogos de DCC, y homólogos de UNC-5 (Leonardo y col. 1997). En particular, de este repertorio de receptores clásicos, los candidatos que son expresados en las GNP y a los cuales Netrina1 ha mostrado unirse con alta afinidad son DCC, UNC5B y UNC5C (Leonardo y col. 1997). En primera instancia, se examinaron

los niveles de expresión de dichos receptores en la línea celular DAOY a través de Taqman qPCR, donde *DCC* resultó no ser expresado (detección entorno al ciclo 35 mediante Taqman qPCR) . En tanto, los miembros de la familia UNC5 ambos homólogos son expresados (Figura 18C).

Dado que previamente se mostró el aumento significativo de la muerte celular en la línea *shNTN1* con respecto al *shSCR*, se buscó rescatar la muerte celular en la línea *shNTN1*, al silenciar los homólogos *UNC5B* o *UNC5C*, mediante la transfección transitoria de los siRNA comerciales con lipofectamina. Al silenciar tanto *UNC5C* como *UNC5B*, se corroboró la baja en su expresión mediante Taqman qPCR. Se observó una reducción de la expresión de *UNC5C* de hasta el 63,6%, en comparación al control, por su parte, la expresión de *UNC5B* se redujo al 14,9% (Figura 18B). Una vez transfectadas, las células fueron expuestas a una cantidad reducida de suero por 24h como inductor de apoptosis. Transcurrido este tiempo se evaluó la muerte celular a través de ensayo de actividad caspasa-3. Al silenciar *UNC5C*, se revierte parcialmente la muerte celular, disminuyendo en promedio hasta un 67%, hecho coherente con su acción como DR para Netrina1 en las DAOY, sugiriendo la existencia de un delicado balance entre la cantidad de receptor y la disponibilidad de ligando, que regula la supervivencia celular. Al analizar estadísticamente esta reducción, la disminución no alcanza a hacer significativa mediante el *test* no-paramétrico Mann-Whitney ($p\text{-value}=0,06$), mientras que al analizarlo mediante el *test* no-

paramétrico Kruskal-Wallis esta disminución si es significativa (p -value=0,03)(N=3, Figura 18). Por el contrario, al silenciar UNC5B se observa un aumento de la muerte celular, del 152% en promedio.

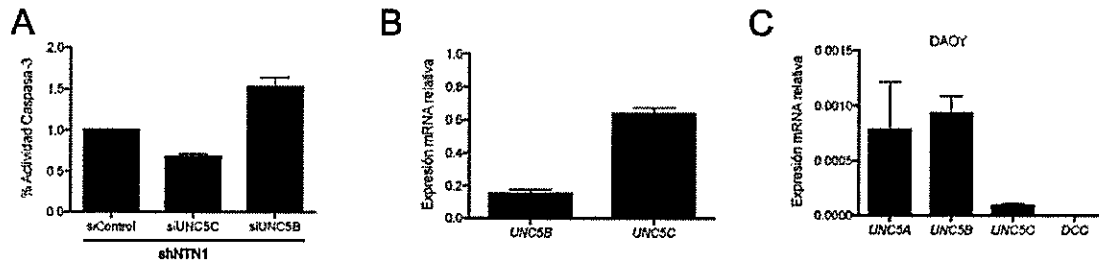


Figura 18.- El silenciamiento del receptor UNC5C, rescata parcialmente la muerte celular inducida en la línea shNTN1. A.- Al silenciar el receptor UNC5C se reduce la muerte celular, medida a través de actividad caspasa-3, en la línea shNTN1, mientras que al silenciar UNC5B se observa el efecto opuesto, aumentando la muerte celular a las 24h (N=3). B.- Reducción de los niveles de expresión de los receptores silenciados, normalizados por el control, medido mediante Taqman qPCR. El receptor *UNC5B* mostró una disminución al 14,9% en promedio, mientras que la expresión de *UNC5C* se redujo al 63,6%. C.- Niveles de expresión de receptores de la familia de homólogos de UNC5 y DCC, en la línea celular DAOY.

C.-Evaluación del rol que ejerce Netrina1 en la supervivencia y proliferación celular en meduloblastoma *in vitro* mediante la aproximación de CRISPR/Cas9.

Con el objeto de evaluar la pérdida de función total de Netrina1 en meduloblastoma, se generaron clones CRISPR *knock-out* para *NTN1* en la línea celular DAOY, mediante la transfección de 4 guías gRNA usando el vector 1963_pSpCas9 (BB)-2A-GFP (Addgene PX458), implementando el protocolo de transfección de Lipofectamina LTX Plus. Una vez obtenidos los clones, éstos fueron seleccionados en base al nivel de expresión de GFP mediante *sorting* celular. Posteriormente se evaluó los niveles de expresión de *NTN1* en los clones a través de *western blot*, obteniéndose de un total de 25, sólo un clon en el cual no se detectó la presencia de Netrina1 a nivel de proteína, el clon 22, en comparación a otros clones (véase como ejemplo clones 19 y 21) (Figura 19A). Al comparar los niveles de expresión de Netrina1 en el clon 22 con los niveles en la línea parental DAOY, se observa una reducción completa de la proteína (Figura 19 B). Al comparar la muerte celular del clon CRISPR (#22) con otros clones, usando como referencia otros dos clones independientes (#21 y #23), se puede observar un aumento de la actividad caspasa-3 de manera significativa a las 24h ($p\text{-value}<0,01$, $N=3$) (Figura 19 C). Cabe mencionar, que no se evaluaron los niveles de expresión de los receptores de NETRINA1 en estos clones.

Mediante la tinción de yoduro de propidio (IP), fue posible cuantificar la muerte celular del clon *knock out* NTN1 #22 seleccionado, de manera independiente a través de la tecnología *Incucyte*. Se observó un aumento significativo de la muerte celular, medido en número de células IP positivas, en el clon #22 *versus* los otros clones de referencia (19, 21 y 23) (Figura 20A y B). El clon 22 mostró un aumento significativo de la muerte celular con respecto a 3 clones usados como referencia, en todos los tiempos evaluados 24, 48 y 72h, en condiciones de privación de suero ($p\text{-value}<0.05$, $N=3$. Figura 20C-E).

Dado el efecto observado del *knock-out* de *NTN1* sobre la muerte celular, se procedió a evaluar el crecimiento celular, en términos poblacionales dado por el porcentaje de confluencia, cuantificado mediante tecnología *Incucyte*. Se observó una disminución del crecimiento a las 24h, significativo con respecto al clon #21, mientras que a las 48h y 72h, el clon CRISPR 22, mostró una reducción significativa con respecto al resto a clones ($p\text{-value}<0.05$, $N=3$. Figura 21A-D).

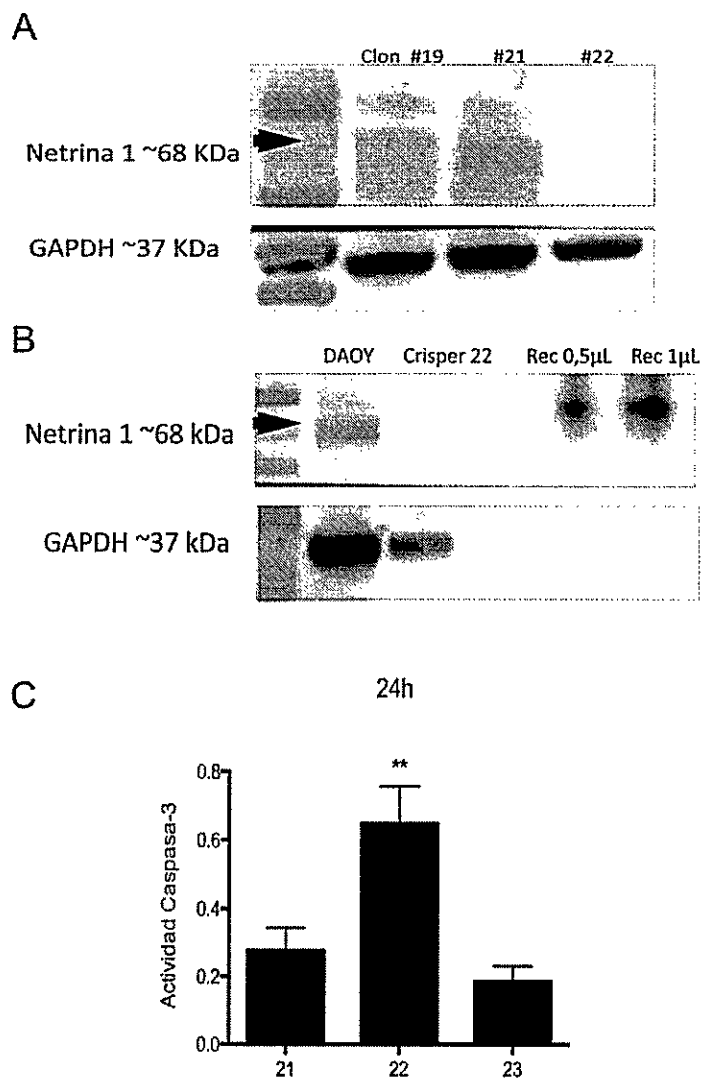


Figura 19.- En el clon *knock-out* de *NTN1* aumenta la muerte celular de manera significativa. A.- En el clon #22 se observa una drástica reducción de la expresión de NETRINA1, en comparación con otros clones (19 y 21). Se muestra el control de carga, GAPDH. B.- El clon CRISPR muestra una fuerte reducción del nivel de expresión de NETRINA, con respecto a la línea parental

DAOY. En este *western blot* representativo se muestra adicionalmente como control positivo el uso de Netrina1 recombinante y como control de carga, los niveles de GAPDH. C.- El clon CRISPR de NETRINA1, muestra un aumento significativo en la muerte celular a las 24h en privación de suero, medido en la actividad caspasa-3, en comparación a los otros clones ($p\text{-value} < 0.05$, $N=3$).

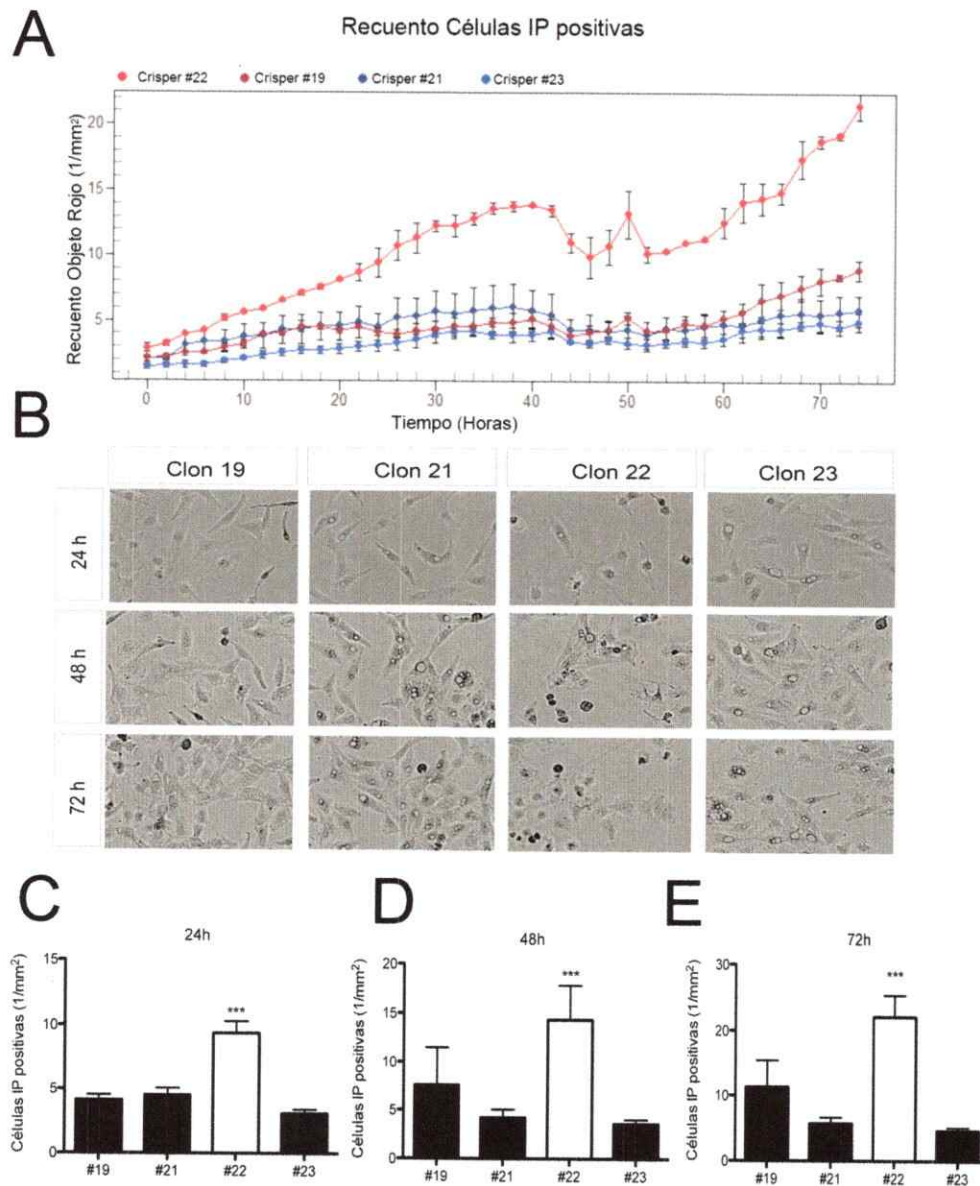


Figura 20.- El clon CRISPR de *NTN1* exhibe un aumento en la muerte celular, evaluado a través de tinción IP. A.- Cuantificación de las células IP

positivas para cada clon y su dinámica en el tiempo correspondiendo a: línea roja, clon #22; línea roja oscura, clon #19; línea azul oscuro, clon #21, y línea azul claro, #23. **B.**- Imágenes representativas para cada uno de los clones, para cada punto de tiempo evaluado (24, 48 y 72h). El clon CRISPR para *NTN1* presenta un aumento de muerte celular en comparación a los demás clones de manera estadísticamente significativa, para todos los tiempos evaluados ($p\text{-value}<0.05$, $N=3$).

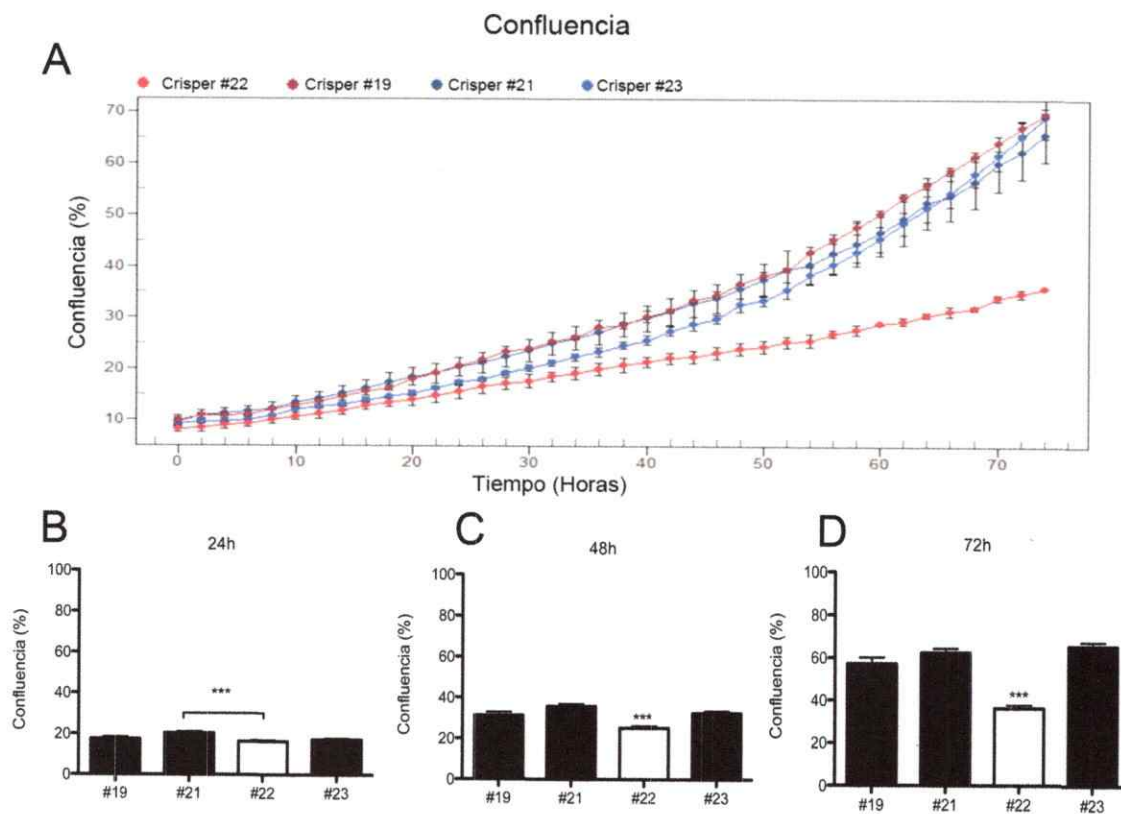


Figura 21.- El clon CRISPR para *NTN1* muestra una disminución significativa en el crecimiento celular poblacional. A.- El clon CRISPER (línea roja) presenta un menor crecimiento en comparación al resto de los clones evaluados (línea roja oscura, clon 19; línea azul oscura, clon 21; y línea azul, clon 23). B-D.- El clon #22, muestra una disminución significativa del crecimiento poblacional desde las 48h en adelante ($p\text{-value}<0.05$, $N=3$).

D.-Evaluación del rol que ejerce Netrina1 en la sobrevivencia celular en meduloblastoma in vitro mediante una aproximación farmacológica.

Con el objeto de evaluar el rol que ejerce NTN1 en la sobrevivencia celular en meduloblastoma *in vitro*, se planteó de manera complementaria una aproximación farmacológica, la cual consistió en el empleo del anticuerpo bloqueante de NTN1 2F5, anticuerpo desarrollado y donado por Dr. Patrick Mehlen (Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon) que reconoce de manera específica a NTN1, usando como control, el control de isotipo IgG1. Tras la evaluación de distintas condiciones experimentales, en términos tanto de concentración de anticuerpo como de densidad celular del cultivo (datos no mostrados), se estableció como condición óptima el uso de 0,5 µg/mL de anticuerpo bloqueante 2F5 a ser ensayado sobre una densidad celular de 5×10^3 células/cm².

Se evaluó la muerte celular en la línea celular DAOY después de 24h y 48h de exposición al anticuerpo 2F5, mediante el ensayo de actividad caspasa-3, la tinción vital de yoduro de propidio y el ensayo de MTT. Mediante el ensayo de actividad caspasa-3 se observó un aumento significativo de la muerte en la condición tratada con 2F5 con respecto al control IgG1 a las 24h, mientras que esta diferencia no es significativa a las 48h (*p-value*<0.05, N=3) (Figura 22A). Con el objeto de evaluar la especificidad del efecto en la muerte celular inducida por el uso del anticuerpo 2F5, se procedió a repetir estos experimentos en

presencia de recombinante de Netrina1. En presencia de 0,5 μ g/mL de anticuerpo 2F5, se observa que la concentración de 0,5 μ g/mL (circulo) de recombinante de Netrina1 es insuficiente para revertir la muerte inducida por el anticuerpo 2F5, mientras que la concentración de 1 μ g/mL del ligando revierte la muerte celular inducida por el anticuerpo bloqueante (cuadrado azul) con respecto al control IgG1 (cuadrado rojo) medido a través del número de células IP positivas (Figura 22B). Se acompañan imágenes representativas de dicha tinción por condición (Figura 22C).

Por su parte, al evaluar la muerte celular a través del ensayo de actividad caspasa-3, es posible observar una reversión parcial de la muerte celular inducida por el anticuerpo 2F5 a las 24h, tanto con 0,5 como con 1 μ g/mL de Netrina1 recombinante a las 24h (N=2, Figura 22F).

De manera complementaria, se evaluó la viabilidad celular en la línea DAOY tratada con el anticuerpo bloqueante 2F5, mediante el ensayo de MTT. Tras 24h de tratamiento con el anticuerpo, se observa una disminución significativa en la densidad óptica al usar la concentración de 1 μ g/mL, no así con 0,5 μ g/mL (*p-value*<0.05, N=2. Figura 22D).

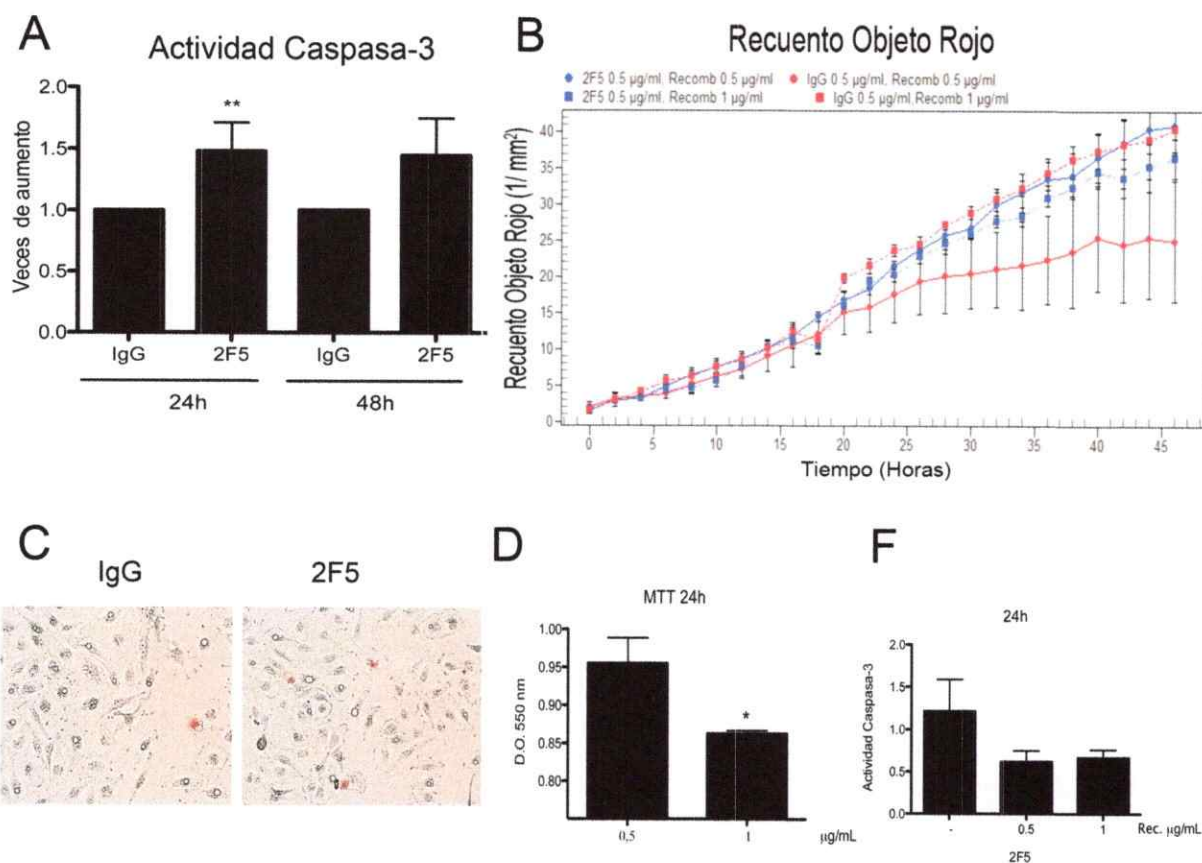


Figura 22.- La inhibición farmacológica de la acción de NETRINA1 promueve la muerte celular. A.- El uso del anticuerpo 2F5 aumenta la actividad caspasa-3 con respecto al control, siendo significativo a las 24h ($p\text{-value} < 0.05$, $N=3$). **B.-** La acción apoptótica del anticuerpo 2F5 se puede revertir al usar 1 µg/mL de recombinante de Netrina1 (cuadrado, rojo control y azul 2F5), mientras que 0,5 µg/mL es insuficiente (círculo). **C.-** Imágenes representativas de la tinción de yoduro de propidio en la condición control (IgG, izquierda) y tratamiento con 2F5 (derecha). Aumento=10X. **D.-** El bloqueo farmacológico de la acción de Netrina1, muestra una disminución significativa de la viabilidad celular, al tratar con 1 µg/mL de Netrina recombinante esto se revierte, siendo 0,5 µg/mL insuficiente para observar un efecto las 24h de tratamiento ($p\text{-value} < 0.05$, $N=2$). **F.-** Mediante el uso del recombinante de Netrina1 es posible revertir parcialmente la muerte celular inducida por 2F5, medido mediante la actividad caspasa-3 ($N=2$).

En conjunto, todos los experimentos ensayados en el marco del tercer objetivo, tanto mediante aproximaciones genéticas como farmacológicas, permiten demostrar que NTN1 promueve la supervivencia celular en un modelo de meduloblastoma causado por sobreactivación de la señalización SHH/GLI *in vitro*. Los datos sugieren que la muerte celular inducida por la pérdida de función de Netrina1 podría ser mediada por la actividad de UNC5C, receptor de Netrina1 que se comportó como receptor de dependencia en este contexto *in vitro*.

Objetivo 4.- Evaluar el rol que ejerce el complejo de señalización conformado por Netrina1/Unc5C en la sobrevivencia celular en precursores granulares cerebelares GNP6 (P6) ex vivo en el modelo murino.

A.-Evaluación del rol de Netrina1 en la sobrevivencia celular en GNP6 (P6) mediante el uso del ligando recombinante en condiciones de privación de suero.

El meduloblastoma es un conjunto de enfermedades causadas por la desregulación del desarrollo normal del cerebelo, dando origen a un tumor en el tejido del cerebelo. Es por esto que se planteó evaluar el rol que desempeña Netrina1 en la sobrevivencia celular durante el desarrollo cerebelar murino.

Con el objeto de evaluar la participación de Netrina1 en la sobrevivencia celular en GNP6 de ratón, se trataron GNP6 aislados de ratón cepa OF1 en P6 con 5µg/mL de Netrina1 recombinante bajo distintas condiciones de suero, específicamente 0; 0,5; 2,5 y 5% de suero. Por medio del tratamiento con Netrina1 recombinante, fue posible observar una disminución de la muerte celular medida a través del ensayo de actividad caspasa-3, con excepción de la condición 5% de suero a las 24h de tratamiento (N=3, Figura 23A). En particular, la condición en la que se observa una baja significativa del nivel de muerte celular corresponde al 2,5% de suero, exhibiendo una reducción en promedio al 66,17% ($\pm 0,05$) de la muerte observada en la condición control ($p\text{-value} < 0.05, N=3$).

B.- Evaluación del rol de UNC5C en la sobrevida celular en GNP's (P6) mediante una aproximación genética en un knock-out condicional para UNC5C.

Dado que el silenciamiento transitorio del receptor UNC5C en el *knock-down* de Netrina1 en células DAOY rescata parcialmente la muerte celular inducida por el interferente de Netrina1, y considerando que el fenotipo del ratón mutante de dicho receptor corresponde a una malformación cerebelar, es que se consideró UNC5C como el receptor candidato a mediar la sobrevida celular inducida por Netrina1 en el desarrollo cerebelar así como en el contexto de meduloblastoma.

Con el objeto de determinar la contribución de UNC5C a la sobrevida celular en el contexto de desarrollo del cerebelo, se examinó la muerte celular mediante la cuantificación de la actividad caspasa-3, en cultivos de GNP's P6 obtenidas de ratones mutantes para la pérdida de función de UNC5C en un sistema inducible bajo el tratamiento con tamoxifeno (ratones generados y donados gentilmente por Dr. Patrick Mehlen). Considerando los resultados obtenidos con el tratamiento con el recombinante de Netrina1 en la sobrevida celular, es que se evaluó la muerte celular inducida por la ausencia del receptor en dos condiciones de suero, 2,5% y 10% a las 48h de tratamiento. Se analizaron los resultados agrupando según el genotipado, obteniéndose una disminución significativa de la muerte celular en las GNP's aisladas a partir de ratones mutantes nulos (-/-) *versus* los heterocigotos (+/-) y los silvestres (WT) en la condición de 2,5% suero ($p\text{-value}<0.05, N=3$. Figura 23B). Mientras que los niveles de muerte celular observados para las GNP's aisladas de los ratones

heterocigotos (+/-) y silvestre (WT) mostraron ser comparables sin existir diferencias significativas entre ellos. Por su parte, al analizar la muerte celular inducida por los distintos genotipos en condiciones de 10% de suero, no se observaron diferencias ($p\text{-value}>0.05, N=3$. Figura 23B).

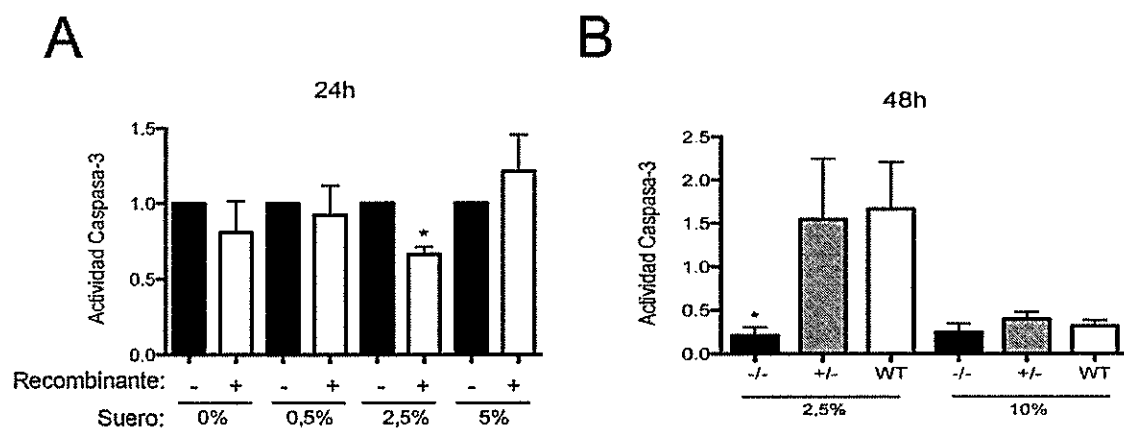


Figura 23.- El complejo de señalización conformado por Netrina1 y su receptor UNC5C promueven la sobrevida celular en precursores granulares cerebelares de ratón. A.- Mediante el uso de 5µg/mL Netrina1 recombinante se puede observar un rescate de la muerte celular en condiciones de 2,5% de suero ($p\text{-value}<0.05, N=3$) en GNPs (P6). **B.-** El ratón nulo de UNC5C presenta una disminución significativa de la muerte celular en GNPs en condiciones de 2,5% de suero, *versus* los ratones heterocigotos (+/-) y silvestres (WT) a las 48h de tratamiento ($p\text{-value}<0.05, N=3$). Mientras que bajo condiciones de 10% de suero, no se observan diferencias entre los genotipos de los ratones examinados.

Los experimentos realizados en este objetivo permiten concluir que, Netrina1 promueve la sobrevida celular, permitiendo sugerir que el receptor Unc5c actúa como receptor de dependencia para progenitores cerebelares durante

desarrollo de cerebelo murino. No obstante, no se puede descartar la participación de receptores como DCC en la integración de la señal de Netrina1 en este contexto.

RESUMEN DE RESULTADOS POR OBJETIVO

Objetivo 1.- Analizar la presencia y distribución de NETRINA1 en meduloblastoma humano.

- NETRINA1 se expresa en las regiones tumorales del meduloblastoma derivado de la sobre-activación de la señalización Hh, presentando el mismo patrón de distribución que el marcador de proliferación PCNA.
- La expresión de NETRINA1 se co-distribuye en regiones donde se expresa SOX2, *read-out* de la vía SHH/GLI.
- Los tumores cerebelares que no se originan por la sobre-activación de SHH/GLI, no presentan un patrón de expresión de NETRINA1 asociado.
- **NETRINA 1 es un potencial biomarcador de células tumorales en meduloblastoma humano derivado de SHH.**

Objetivo 2.- Evaluar NTN1 como blanco transcripcional directo de la vía de señalización SHH/GLI en mamíferos.

- Los efectores GLI reconocen sitios consenso GBS ubicados en la región próxima al promotor (-2Kb) de NTN1.
- El efector Gli3 reconoce el sitio consenso GBS1, ubicado en la región

proximal al promotor de *NTN1*.

- El efector Gli2 reconoce el sitio consenso GBS4, el cual se encuentra localizado en el segundo intron de *NTN1*.
- El GBS4 se encuentra en una región con presencia de marcas de enhancer transcripcionalmente activo (H3K4Met1 y H3K27Ac).
- Los efectores GLI activan la transcripción del promotor de *NTN1* mediante los GBS consenso presentes en la región próxima al promotor (GBS1 y GBS2).
- Los niveles de expresión de *NTN1* responden a la modulación de la señalización SHH/GLI *in vitro* en meduloblastoma humano.
- Los niveles de expresión de *Ntn1* responden a la modulación de la señalización Shh/Gli *ex vivo*, en GNP's aisladas de ratón (P6).
- En ambos sistemas, al estimular la señalización con el recombinante de Shh, aumentan los niveles de transcrito de *Netrina1*.
- Los niveles de expresión de *Ntn1* se correlacionan de manera positiva, con los niveles de expresión de *Gli1*, en el modelo de haploinsuficiencia de *Ptc1*, modelo genético clásico de estudio de meduloblastoma.
- **Netrina1 se comporta como blanco transcripcional directo de la señalización Shh/Gli, tanto en el contexto de desarrollo del cerebelo así como en el cáncer.**

Objetivo 3.- Evaluar el efecto que ejerce NTN1 sobre la apoptosis, sobrevida y proliferación celular en la línea celular derivada de meduloblastoma humano, DAOY.

- La pérdida de función de *NTN1* mediante el uso del *knock-down*, se traduce en un aumento de la muerte celular en un modelo *in vitro* de MB humano. Esta muerte se puede rescatar de manera específica, utilizando el recombinante de Netrina1.
- El receptor de NETRINA1, UNC5C se comporta como receptor de dependencia en el contexto de MB humano, mediando la muerte celular inducida por la pérdida de función de Netrina1 en este sistema.
- La pérdida de función de *NTN1*, mediante la implementación del *knock-out*, se traduce en un aumento de muerte celular en un modelo *in vitro* de MB humano, teniendo como consecuencia la disminución del crecimiento poblacional celular.
- El bloqueo de la acción de NETRINA1 a nivel de proteína, induce a muerte celular a las 24H de tratamiento, la cual se puede revertir mediante el uso de recombinante.
- **NETRINA1 actúa como un factor de sobrevida en el meduloblastoma humano, lo que se pudo observar mediante el uso de aproximaciones genéticas como el *knock-down* y *knock-out* de**

Netrina1, así como a través de una aproximación farmacológica, como fue la implementación del anticuerpo bloqueante para Netrina1.

Objetivo 4.- Evaluar el rol que ejerce el complejo de señalización conformado por Netrina1/Unc5C en la sobrevida celular en precursores granulares cerebelares GNP (P6) ex vivo en el modelo murino.

- Netrina1 actúa como factor de sobrevida en el desarrollo del cerebelo murino, en un modelo *ex vivo*.
- El receptor de Netrina1, Unc5c, se comporta como receptor de dependencia durante el desarrollo del cerebelo murino, gatillando apoptosis en condiciones de disponibilidad reducida de ligando.
- **Netrina1, a través de la unión a su receptor UNC5C, promueve la sobrevida celular de GNP en el desarrollo del cerebelo murino postnatal.**

DISCUSIÓN

Señalización Shh/Gli

La señalización Shh/Gli es una de las principales vías que gobierna el desarrollo en vertebrados, regulando una amplia variedad de procesos como la inducción neural ventral, establecimiento de nichos de células troncales, y formación de los primordios de extremidades (Milenković y col. 1999, Ruiz i Altaba y col. 2002a).

Dada la significancia biológica que la vía Shh/Gli desempeña en un amplio repertorio de procesos celulares, tanto durante el desarrollo como en la homeostasis en el adulto, es que la identificación y caracterización de nuevos blancos de los efectores Gli es un desafío, clave para dilucidar el mecanismo de cómo la señalización integra la función de sus efectores de manera finamente orquestada.

Netrina1 como nuevo efector de la vía Shh/Gli

Existen diversos antecedentes que vinculan la señalización Shh/Gli con los niveles de expresión de *Netrina1*. En el contexto del desarrollo del SNC, *Netrina1* es expresada en territorios que se encuentran clásicamente bajo la fuerte inducción de la señalización Shh/Gli como la placa del piso del tubo neural (Charron y col. 2003). Asimismo, los niveles transcripcionales de *Netrina1* en la porción más ventral de la médula espinal se pierden en el ratón mutante nulo de *Gli2* durante el desarrollo, en E12.5 (Watanabe y col. 2006). Por otra parte, los niveles del transcrito del ortólogo de *Netrina1* en pez cebra *Net1a*, son regulados al modular la señalización Hedgehog tanto a través de aproximaciones genéticas como farmacológicas (Bergeron y col. 2008, Xu y col. 2006). De modo similar, *Netrina1* ha mostrado ser un efector río abajo de Shh en células endoteliales, en el marco del establecimiento de la barrera hematoencefálica (Podjaski y col. 2015). En este sentido, si bien la regulación que ejerce la vía Shh/Gli sobre la expresión del gen de *Netrina1* se ha evaluado en distintos contextos, y aparenta ser un mecanismo conservado entre distintas especies, a la fecha no se ha logrado establecer si esta regulación es directa o indirecta.

Mediante los resultados obtenidos en esta tesis se puede concluir que *Netrina1* es un blanco transcripcional directo de Shh/Gli en el SNC y que además actúa

como efector de la señalización promoviendo la sobrevivencia de progenitores neurales cerebelares.

En este trabajo se evaluó el control que ejerce SHH/GLI sobre el gen humano *NTN1* mediante la identificación de dos sitios GBS consenso en la región próxima al promotor (-2Kb). A través de la aproximación de CHIP fue posible observar la unión de proteínas GLI a estos sitios, mientras que mediante el ensayo de luciferasa fue posible demostrar que formas GLI activadoras participan en la activación del promotor *NTN1*. En efecto, *Netrina1* tanto en humano como en el ratón, mostró responder a la estimulación de la señalización Shh/Gli a nivel transcripcional. Asimismo, los niveles del transcrito de *Netrina1* se correlacionaron de manera positiva con los niveles de expresión de *Gli1* en el modelo de haploinsuficiencia de *Ptc1*, modelo clásico de estudio de MB. Mientras que a nivel de proteína, fue posible observar un aumento en la expresión de *NETRINA1* al estimular la vía en la línea celular de MB, DAOY. De manera complementaria, se pudo apreciar que *NETRINA1* se expresa en las regiones donde se encuentra sobre-activada la señalización Shh/Gli en MB. En conjunto, tanto los resultados obtenidos a partir de los ensayos moleculares, como los obtenidos de la modulación de la señalización Shh/Gli así como el análisis en muestras de pacientes humanos, permiten concluir fehacientemente que *Netrina1* es un efector directo de la vía Shh canónica.

En términos técnicos, la implementación como modelo *in vitro* de la línea celular de meduloblastoma humano derivada de la sobre-activación de la vía SHH/GLI,

DAOY, resultó representar una estrategia acertada, puesto que permitió tanto la realización de los ensayos moleculares dirigidos a demostrar el control que ejerce SHH/GLI sobre *NTN1*, como llevar a cabo los experimentos de pérdida de función de *NTN1* orientados a evaluar el rol que desempeña este ligando en la supervivencia celular.

Si bien, se demostró que la vía SHH/GLI controla la activación del promotor de *NTN1* mediante la acción de sus efectores GLI sobre sitios GBS consenso, también se encontró un sitio consenso GBS en el segundo intrón el cual mostró ser unido por GLI2 mediante ChIP. Este GBS intrónico mostró marcas fuertes de *enhancer* transcripcionalmente activo como la H3K4Met y la H3K27Ac (Figura 10) (Revisado por Kimura 2013), lo que sugiere que este GBS podría estar actuando como *enhancer*. Los *enhancer* son elementos regulatorios en *Cis* que presentan patrones de marcas de modificaciones de histonas altamente específicas a nivel celular que se correlacionan fuertemente con los niveles de expresión de sus genes blanco (Heintzman y col. 2009).

Sin embargo, para poder demostrar el carácter *enhancer* de este sitio, en primera instancia, es necesario mostrar el enriquecimiento de ambas marcas en el GBS4 con respecto a otra región que no sea regulatoria, como control negativo. En consecuencia, llevar a cabo un ChIP-seq permitiría evaluar el enriquecimiento de estas marcas sobre el *enhancer* putativo, mientras que la aproximación de ChIP-chip no permitiría evaluar dicho enriquecimiento puesto que los microarreglos que comúnmente se comercializan, son elaborados para reconocer los promotores de los genes a testear, y no con secuencias

regulatorias distales intrónicas. Específicamente, para poder demostrar que esta secuencia actúa como *enhancer* sobre el promotor del *NTN1*, se requeriría llevar a cabo la aproximación de captura de conformación cromosómica (3C), metodología que permite evaluar la disposición espacial de los elementos regulatorios de un gen (Revisado por Smallwood & Ren 2013).

Considerando el complejo patrón de expresión de *Netrina1* durante el desarrollo, en particular del SNC, es que la presencia de elementos regulatorios del tipo *enhancer* podrían explicar la integración de la acción de los factores transcripcionales que actúan sobre *Netrina1*, permitiendo así el control preciso de su expresión espacio-temporalmente.

Si bien, clásicamente se ha descrito el control que ejerce la señalización Shh/Gli sobre la expresión de sus genes blanco como directo, es decir, mediado directamente por los efectores Gli, factores transcripcionales que se unen a los GBS presentes en las regiones regulatorias de sus genes blanco, recientemente se ha descrito que la señalización Shh/Gli induce cambios epigenéticos en los genes río abajo. En particular, la vía Shh/Gli disminuye la unión del complejo de metilación PRC2 a *Gli1*, éste cataliza la tri-metilación en el residuo H3K27, y promueve el reclutamiento de Jmjd3, demetilasa que remueve dichas marcas de represión, sobre el promotor de *Gli1* en el contexto de desarrollo de cerebelo murino (Shi y col. 2014). Es así como la señalización Shh/Gli regula la expresión de genes blancos, no sólo a través de la acción de

sus efectores Gli, sino que induciendo cambios epigenéticos mediados por el reclutamiento de distintos complejos en el promotor de sus genes blanco. Considerando los diversos mecanismos en que la vía Shh/Gli regula la expresión de sus genes blanco, es que no se puede descartar que controle de manera indirecta la expresión de Netrina1.

Netrina1, como nuevo efector de la vía Shh/Gli y blanco terapéutico en el contexto del MB derivado de Shh

La señalización Shh/Gli controla la expansión del cerebelo, principalmente durante el desarrollo postnatal. Los GNPs responden al ligando Shh proliferando en la primordia cerebelar. Cuando la señalización Shh/Gli se ve alterada, y se mantiene constitutivamente activada la proliferación se genera un tumor, en particular, un MB derivado de la sobre-activación de Shh/Gli (Dahmane & Ruiz i Altaba 1999). Si bien, clásicamente se ha considerado que la acción de la señalización SHH/GLI en el desarrollo cerebelar es primordialmente mitogénica, en este trabajo se muestra que NETRINA1, como un nuevo efector de la señalización SHH/GLI, promueve la sobrevida celular tanto en el contexto del desarrollo del cerebelo como en el contexto del MB. Esto sugiere que la vía SHH/GLI es capaz de controlar procesos celulares que se complementan como son la sobrevida y la proliferación celular, en un mismo contexto fisiológico.

El MB representa a un grupo complejo de enfermedades, constituido por cuatro subgrupos independientes, molecular y clínicamente diferentes, a saber: SHH, WNT, Grupo 3 y Grupo 4 (Northcott y col. 2010, Northcott y col. 2012a). Según las estadísticas más actualizadas del Ministerio de Salud, el año 2012 murieron 229 pacientes con MB en Chile (www.deis.cl). Los pacientes con MB han alcanzado una sobrevida entorno al 70-80% gracias a tratamientos convencionales, que incluyen la combinación de cirugía, radioterapia craneoespinal (en niños mayores a 3 años) y quimioterapia. Si bien se ha obtenido una mejora en el campo clínico, permitiendo que una gran proporción de los pacientes con MB sean curados mediante las terapias convencionales, lamentablemente se ha logrado a costa de efectos adversos que sufren la mayoría de los sobrevivientes en el largo plazo, incluyendo defectos en el desarrollo, neurológicos, neuroendocrinos y psicosociales (Northcott y col. 2012a). Dentro de las secuelas más importantes de la radioterapia se encuentran los considerables efectos sobre el desarrollo cognitivo de los pacientes. En términos de dosis absorbida, desde los 36 Gy (gray) de irradiación craneoespinal, el Coeficiente Intelectual (CI) de un niño puede disminuir hasta 30 puntos, mientras que la dosis de 24 Gy representa una caída de entre 10-15 puntos de CI (Ellison 2010). Es por esto que resulta primordial el estudio de cada uno de los subgrupos de MB, considerando los aspectos moleculares de la enfermedad, de manera que permitan la estratificación de los pacientes de forma específica y su tratamiento en función de los requerimientos

del subtipo en particular, con el objeto de obtener mejoras no sólo en la tasa de sobrevivientes, sino que poder reducir las secuelas adversas en los niños afectados.

Por otra parte, considerando que *NTN1* se encuentra sobreexpresado sólo en MB del subgrupo SHH y que esta señalización promueve la sobrevida celular, es que interferir el reconocimiento específico de NETRINA1 a nivel de proteína en el contexto de MB podría representar un nuevo blanco terapéutico para tratar de manera específica el MB derivado de Shh.

Expresión de Netrina1 en el contexto de aumento de actividad de Atoh1 en MB derivado de Shh.

Diversos genes, descritos originalmente por su papel en la diferenciación celular o señalización durante el desarrollo, al ver alterada su expresión pueden tener un impacto significativo en la tumorigénesis. Es así como la activación aberrante de los genes blanco de Shh resulta en una división celular desenfrenada y eventualmente en MB, en el caso del cerebelo. En este contexto, al evaluarse la unión de Gli1 a sus blancos transcripcionales, se encontraron diferencias dramáticas en las redes genéticas que son directamente dirigidas por Gli1 en GNP y MB-Shh en el modelo murino. Al examinar regiones de unión a Gli, el análisis arrojó dos motivos enriquecidos de manera significativa, el primero fue una secuencia GBS consenso y la segunda correspondió a una secuencia E-box CANNTG, típicamente reconocida por

factores bHLH (*basic helix-loop-helix*), cuya frecuencia se vio enriquecida en MB (46%) *versus* en GNP (26%). En este estudio, se sugiere que Gli1 podría cooperar con factores que reconozcan la secuencia E-box para regular la expresión de genes, mediando así la transformación de GNP a células tumorales en el MB (Lee y col. 2010).

Interesantemente, *Atoh1* es un factor transcripcional del tipo bHLH que ha mostrado mantener las GNP en un estado responsivo a Shh, inhibiendo su diferenciación neuronal. Asimismo, *Atoh1* y *Gli1* mostraron cooperar en la transformación de GNP a precursores iniciadores de MB, promoviendo el crecimiento tumoral de manera agresiva en el modelo murino. En este sentido, si bien no se han evaluado los niveles transcripcionales de *Netrina1* en el ratón mutante nulo de *Math1 (Atoh1)*, al sobre-expresar *Atoh1* en GNP se mostró un aumento significativo en la expresión de *Netrina1* (+2,16 veces de cambio) (Ayrault y col. 2010). De igual modo, los niveles de expresión de *NTN1* se correlacionan de manera positiva ($R=0,8565$) con los niveles de expresión de *ATOH1* en meduloblastoma humano (Northcott y col. 2012). Mientras que en el contexto del desarrollo en GNP, la señalización Shh/Gli regula la estabilidad de *Atoh1* previniendo su degradación fosfodependiente mediada por Huwe1 (ubiquitina ligasa E3), inhibiendo de esta manera la diferenciación neuronal, promoviendo así la expansión de GNP (Forget y col. 2014). Por lo que, en el escenario de sobre-activación de la vía Shh/Gli, la regulación directa de blancos transcripcionales de Gli1 se ve potenciada por el aumento de actividad de *Atoh1*

inducido por la propia señalización. En este sentido, en el presente trabajo de encontraron dos GBS consenso en la región próxima al promotor de *NTN1*. De manera interesante, se encontró una secuencia E-box próxima al sitio de unión de Gli1 (GBS2), a 171 pb de distancia (ANEXO VI). Tomando en cuenta los antecedentes, que Gli1 y Atoh1 cooperan en el control de genes blanco en la transformación de GNP a precursores iniciadores de MB, que la sobreexpresión de Atoh1 resulta en una sobre-expresión de *Netrina1* y que los niveles de expresión de *NTN1* se correlacionan con los niveles de *ATOH1* en MB humano, es que GLI1 y ATOH1 podrían estar cooperando en el control transcripcional de *NETRINA1*, promoviendo la desregulación de su expresión en este cáncer, regulación que se ve potenciada por el control que ejerce la vía SHH/GLI sobre la actividad de ATOH1. En términos clínicos, considerando que mediante un análisis Kaplan-Meier en pacientes humanos de MB se observó que la baja expresión de *Huwe1* se asocia a una prognosis pobre sólo en el grupo de Shh-MB (Forget y col. 2014), es que el diseño de estrategias dirigidas a bloquear la señalización de ATOH1 en específico en el subgrupo de SHH, podría reducir la agresividad tumoral, representando una mejora en la supervivencia de los pacientes de este grupo. Mientras que con respecto a la función de *Atoh1* en el desarrollo cerebelar, el ratón mutante nulo para *Math1 (Atoh1)* presenta defectos en el tejido cerebelar, observándose no sólo un cerebelo de menor tamaño, sino que ausencia de la formación de folias (Jensen y col. 2004). Estos defectos sugieren que *Atoh1* podría participar del control transcripcional de efectores que regulen la supervivencia celular, particularmente de *Netrina1*.

NETRINA1, factor de sobrevida en meduloblastoma humano

NETRINA1, es una proteína secretada que fue originalmente descrita como factor de guía axonal, no obstante ha mostrado actuar como factor de sobrevida en el contexto del cáncer. Actualmente, se ha vinculado NETRINA1 con la sobrevida y la progresión tumoral, cuya expresión se encuentra aumentada en diversos tipos de cáncer como el pancreático, de colon, neuroblastoma entre otros (Akino y col. 2014). En particular en el MB, recientemente se demostró que los niveles de proteína NETRINA1 se encuentran aumentados en el MB, entre 5 y 10 veces, con respecto al cerebelo normal. Asimismo, se observó un aumento de la cantidad de la NETRINA1 secretada en la orina de niños con MB (4,8pg/ μ g), de 9 veces sobre los controles sanos (0,5 pg/ μ g), por lo que los autores plantean que los niveles de NETRINA1 en la orina podrían utilizarse como un nuevo bioindicador no invasivo de MB. Interesantemente, la extirpación del tumor resulta en una fuerte baja en los niveles de NETRINA1 en la orina (Pre-operación: 13 pg/ μ g y post-operación: 0.8 pg/ μ g), lo que sugiere que el tumor sería una fuente del ligando detectada en la orina (Akino y col. 2014). Si bien se sabe que NETRINA1 actúa como factor de sobrevida en diversos tipos de cáncer, así como que los niveles de NETRINA1 se encuentran aumentados en el MB, a la fecha se desconoce si NETRINA1 participa en la sobrevida celular en el MB humano.



Considerando los datos obtenidos mediante el análisis transcriptómico en muestras de MB humano pertenecientes a los cuatros sub-grupos, en los que se observa la sobre-expresión de *NTN1* en el sub-grupo derivado de la sobre-activación de la vía SHH/GLI, es que en primera instancia, se evaluó la presencia y distribución de NETRINA1 en muestras de MB humano. Los resultados obtenidos mostraron que a nivel de proteína, NETRINA1 es expresada en las zonas tumorales en los MB derivados de la sobre-activación de la vía Shh, lo que se condice con el hecho de que *NTN1* es un nuevo blanco transcripcional de la señalización. Cabe destacar que, en este trabajo se realizaron además inmunohistoquímicas dirigidas contra SOX2, factor transcripcional blanco de la señalización SHH/GLI (Takanaga y col. 2009), como control positivo de la actividad de la señalización. La marca de SOX2 se apreció distribuida en las zonas tumorales del MB, regiones donde también se detectó la presencia de NETRINA1. Recientemente, se demostró que las células SOX2 positivas en los tumores derivados de sobreactivación de señalización SHH representan una sub-población de células troncales cancerígenas, células quiescentes resistentes a los tratamientos tanto de quimio como radio terapia, responsables del rebrote del tumor en los pacientes (Ahlfeld y col. 2013, Vanner y col. 2014). Estudios posteriores deberán determinar si colocaliza la marca de NETRINA1 con la de SOX2, lo que apoyaría la idea de que precisamente son las células troncales cancerígenas las que sobreviven en el tumor producto de la acción de NETRINA1, producida de manera autocrina.

Por otra parte, si bien se detectó la expresión de NETRINA1 en muestras de MB pertenecientes a sub-grupos no derivados de la sobre-activación de la vía SHH/GLI, esta expresión no se encontró asociada a ningún patrón de proliferación o de diferenciación neuronal particular.

Los datos recopilados en pacientes se acompañaron con un estudio detallado dirigido a evaluar el rol que desempeña NETRINA1 en la sobrevida celular en el contexto del MB humano *in vitro*. Para este objetivo se llevaron a cabo distintas aproximaciones experimentales, en particular, dos estrategias genéticas y una farmacológica. Dentro de las aproximaciones genéticas se implementó el *knock-down* de NETRINA1, mediante el cual fue posible observar una disminución de la viabilidad celular, acompañado por un aumento de muerte celular, la cual fue revertida con el uso de la proteína recombinante de NETRINA1, mostrando la especificidad de la inducción de la muerte gatillada por la pérdida de función de NETRINA1. Asimismo, al evaluar la pérdida de función mediante el *knock-out* NETRINA1 a través del sistema CRISPR/Cas9, fue posible observar un aumento de la muerte celular en el clon en que se perdió la expresión del ligando, representando dicha muerte un retraso en el crecimiento celular a nivel poblacional, mostrando una disminución significativa del crecimiento en comparación a clones silvestres. Si bien, se pudo demostrar que NETRINA1 promueve la sobrevida mediante la aproximación de CRISPR/Cas9, lamentablemente, no fue posible evaluar los eventuales efectos que podrían

observarse en otros procesos celulares, tanto de proliferación como de adhesión celular en los clones CRISPR para *NETRINA1*. Asimismo, lamentablemente no fue posible continuar con los experimentos de rescate de la muerte celular con el recombinante de *NETRINA1* en este sistema, puesto que los experimentos con esta aproximación se llevaron a cabo durante la realización de una pasantía en el extranjero (Laboratorio de Dr. Mehlen, Lyon, Francia).

Netrina1 es un factor secretado, el cual es reconocido en el medio extracelular. Esto representa una ventaja para el diseño de herramientas de intervención moleculares, constituyendo una estrategia atractiva para la terapia celular. Esto es especialmente interesante para los cánceres pediátricos como tumores neurales, en los que el tratamiento clásico como la quimioterapia y radioterapia exhiben efectos secundarios negativos para el crecimiento de los niños, afectando su desarrollo cognitivo (Ellison 2010). Es por esto que, en colaboración con el laboratorio del Dr. Patrick Mehlen en Francia, se probó el efecto de un anticuerpo bloqueante para este ligando desarrollado por dicho laboratorio, en la supervivencia en un modelo de MB humano *in vitro*, las células DAOY. En resumen, si bien los diversos experimentos permitieron modular la muerte celular al interferir en el reconocimiento del ligando a su receptor putativo mediante el uso del anticuerpo bloqueante de *NETRINA1*, esta inducción de la muerte fue sólo apreciable a las 24h, lo que se puede atribuir a la inestabilidad del anticuerpo en el tiempo o a la tasa de recambio de la

expresión de NETRINA1 en condiciones de estrés celular como es la privación de suero. En términos clínicos, consideramos que por ahora la implementación de este anticuerpo bloqueante como herramienta para el tratamiento del cáncer no sería una aproximación eficiente, dado que presenta limitantes farmacocinéticas que impiden su acción sostenida en el tiempo, requiriendo aún mejoras.

En conclusión, fue posible modular la muerte celular inducida tanto a través de la pérdida de función de NETRINA como mediante la interferencia de su reconocimiento a nivel extracelular, permitiendo demostrar que NETRINA1 promueve la sobrevida en MB humano *in vitro*. En este sentido, para poder evaluar el papel que desempeña NETRINA1 en la sobrevida celular como efector de la señalización SHH/GLI en MB, se requeriría evaluar el bloqueo de la acción de este ligando en el escenario de modulación de la vía SHH/GLI, enfoque complejo de implementar experimentalmente. Se realizaron distintas pruebas, con el objeto tanto de modular la muerte a través del bloqueo del reconocimiento de NETRINA1, como modular la muerte a través de la estimulación de la vía Shh/Gli. Lamentablemente, no fue posible observar diferencias en la viabilidad celular, medida mediante el ensayo MTT, en ninguna de las condiciones experimentales, ni al utilizar el anticuerpo bloqueante contra NETRINA1 ni al modular la vía Shh/Gli (ANEXO V). Presumimos que esto se debió a problemas con la sensibilidad de la técnica. De manera complementaria, existen problemas técnicos que impedirían regular la muerte a

través de NETRINA1 sobre la modulación de la vía SHH/GLI principalmente el hecho de que las condiciones experimentales (densidad celular, % suero, tiempo, entre otros) necesarias para observar efectos en la sobrevida a través del uso del anticuerpo bloqueante de Netrina1, son distintas a las requeridas para modular la señalización SHH/GLI.

Otra aproximación mediante la cual sería posible regular la sobrevida/apoptosis inducida por la señalización de Netrina1 en el contexto de modulación de la vía SHH/GLI, es mediante el uso del recombinante de Netrina1 en la línea *knock-down* shSMO. Implementando esta estrategia, fue posible observar una desaceleración del crecimiento población en la línea shSMO, en comparación a la línea shSCR. Al tratar la línea estable shSMO con el recombinante de NETRINA1 es posible apreciar una disminución en la muerte celular medida tanto a través de la tinción de yoduro de propidio como mediante el ensayo de la actividad de caspasa-3 (ANEXO III). Indudablemente, estos experimentos muestran que es posible desacoplar la acción de sobrevida de NETRINA1 de la acción más amplia que pueda ejercer la vía de SHH/GLI actuando sobre sus genes blanco, confirmando su acción como ligando de sobrevida.

Netrina1 ha mostrado desempeñar distintas funciones biológicas, tanto durante el desarrollo como en enfermedades como el cáncer, actuando como señal de guía axonal, factor de sobrevida, así como participando en procesos como la angiogénesis. Si bien, en el presente trabajo se demostró el rol que desempeña NETRINA1 como factor de sobrevida en el MB humano, no se descarta que

pueda cumplir otras funciones biológicas en el nicho tumoral, como por ejemplo promover la angiogénesis en células endoteliales presentes en el nicho. Las diferentes funciones que desempeña Netrina1 en los diversos contextos celulares, se deben principalmente al variado repertorio de receptores que reconocen a este ligando, haciendo posible que un mismo ligando, dentro de un mismo nicho sea capaz de inducir distintas respuestas celulares en diversos tipos celulares.

Netrina1 como factor de sobrevivencia en el desarrollo cerebelar

Considerando los resultados obtenidos en MB *in vitro*, donde NETRINA1 desempeña un rol promoviendo la sobrevivencia celular, es que se evaluó su papel en el contexto del desarrollo del cerebelo. Cabe destacar que, para llevar a cabo este objetivo, en un inicio se planteó analizar la pérdida de función de Netrina1 en cultivos primarios de GNPs, pero lamentablemente para esto se requería disminuir la cantidad de suero de manera tal de ser posible la modulación de la muerte mediada por Netrina1. Esta condición de privación de suero, se tradujo en una muerte celular masiva. Este resultado evidencia que el cultivo primario de una población celular presenta un alto requerimiento nutricional al estar en continua proliferación, siendo muy sensible a los niveles de suero disponible, dificultando la evaluación del efecto particular en la sobrevivencia celular inducido por la pérdida de función de Netrina1. Por su parte, la

realización del silenciamiento de *Netrina1* mediante la transfección de los precursores induciría un fuerte aumento de la muerte basal por la toxicidad intrínseca de la técnica, dificultando aún más la modulación de la muerte por la pérdida de *Netrina1*. Mientras que, para poder tratar las GNP's con el anticuerpo bloqueante de *Netrina1*, sería necesario realizar el experimento en ausencia de suero lo que gatillaría un muerte celular masiva, nuevamente imposibilitando observar diferencias entre el tratamiento con el anticuerpo bloqueante con respecto al control de isotipo.

Por el contrario, la línea celular DAOY mostró ser resistente a los tratamientos en condición de privación de suero, ya que a diferencia de los precursores altamente proliferativos, las células de la línea DAOY presentan un crecimiento poblacional lento, y un ciclo celular largo de 34 horas, lo que permitió evaluar la pérdida de función de *Netrina1*.

Dadas las limitaciones técnicas para evaluar la pérdida de función de *Netrina1* en las GNP's, es que se planteó el experimento inverso, es decir, examinar el rescate de la muerte celular mediante el uso del recombinante de *Netrina1* (5µg/mL) en una curva de privación de suero, con el objeto de encontrar la ventana de concentración en la que es posible observar la acción de *Netrina1*. Fue así como se apreció que al usar 2,5% de suero es posible incrementar la sobrevivencia celular de manera significativa, al tratar las células con *Netrina1*. Cabe destacar, que este experimento tiene un enorme significado dado que

permite inferir que, Netrina1 no sólo actúa como factor de supervivencia en el contexto patológico (cáncer), sino que también en el desarrollo del cerebelo. Justamente en ese escenario, en el modelo *in vivo* de pérdida de *Ntn1* en el SNC murino, que se reporta no sólo defectos comisurales sino que también un menor número de células en el tronco encefálico, como resultado de un aumento de la muerte celular (Llambie y col. 2001, Bloch-Gallego y col.1999). Como se mencionó anteriormente, el mutante nulo de *Ntn1* en estadio embrionario E12 muestra un aumento significativo de la muerte celular con respecto a ratón silvestre, justamente en las regiones donde se expresan sus principales receptores (Unc5b y Dcc). Dicho aumento de muerte celular también fue observado tanto en el labio rómbico como en el primordio cerebelar (Llambie y col. 2001). En conjunto estos antecedentes, sumados a los resultados obtenidos en el presente trabajo, permiten establecer irrefutablemente que Netrina1 desempeña un rol de factor de supervivencia en el desarrollo cerebelar, mediante la regulación que ejerce la disponibilidad de Netrina1 sobre la actividad pro-apoptótica de sus receptores.

Considerando los resultados obtenidos en el presente trabajo, se plantea como modelo que NETRINA1, como nuevo blanco transcripcional de la vía SHH/GLI, actúa como factor de supervivencia mediante el control que ejerce sobre la actividad pro-apoptótica de sus receptores de dependencia, como por ejemplo UNC5C (Figura 24).

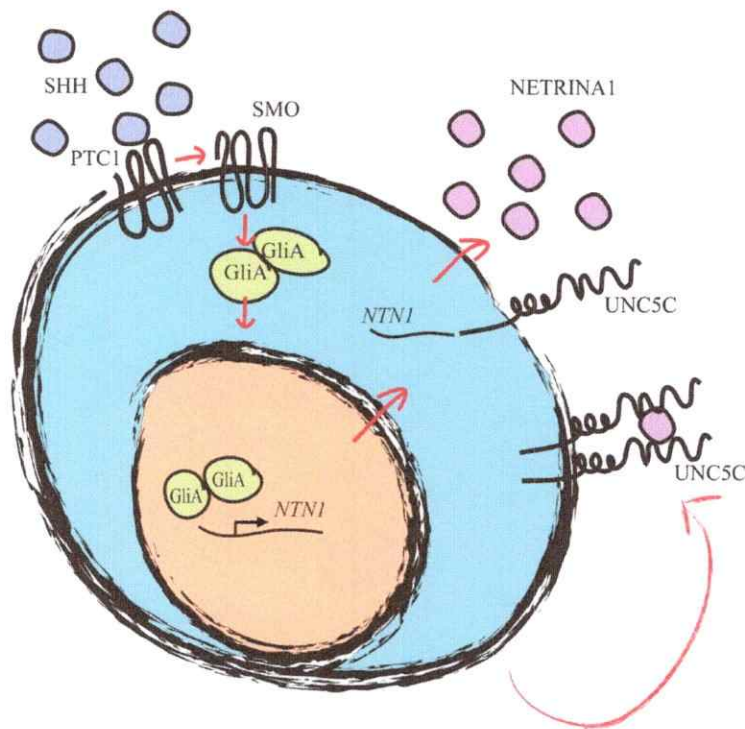


Figura 24.- Modelo de trabajo. NETRINA1 es un blanco transcripcional directo de la señalización SHH/GLI, que actúa como factor de sobrevida en el contexto de MB humano. La vía SHH/GLI controla la transcripción de NTN1 directamente mediante la acción de los efectores GLI. La expresión de NETRINA1 autocrina/paracrina promueve la sobrevida celular mediante el control que ejerce sobre sus receptores de dependencia, como por ejemplo UNC5C.

UNC5C receptor de dependencia en el contexto de MB humano

La muerte celular evaluada en el contexto del presente trabajo, se debe a que Netrina1 controla la actividad pro-apoptótica de sus receptores, y considerando que la mayoría de los receptores de Netrina1 han mostrado comportarse como receptores de dependencia, es que se planteó dilucidar cuál receptor media la

muerte celular inducida por la pérdida de función de Netrina1 en este contexto. En este sentido, considerando los receptores que exhiben mayor afinidad por Netrina1 y que son expresados por las GNP's durante el desarrollo del cerebelo murino, son tres los receptores candidatos que cumplen con estos criterios: UNC5B, UNC5C y DCC (Leonardo y col. 1997). En el modelo celular *in vitro* DAOY, en el cual se evaluó el rol de factor de sobrevivencia de Netrina1 en MB humano, no se expresa el receptor de dependencia por excelencia, DCC. Dado que del repertorio de receptores de Netrina1, el único receptor cuyo ratón mutante presenta fenotipo en el cerebelo corresponde a *Unc5c*, es que se propuso evaluar *Unc5c* como mediador de la sobrevivencia/apoptosis inducida por la señalización de Netrina1. Para esto, se planteó el rescate de la muerte celular inducida por la pérdida de función de Netrina1 mediante el *knock-down* estable en DAOY. Con este objeto, se silenció de manera transitoria la expresión de UNC5C en el *knock-down* de *NTN1*, lo que resultó en la disminución de la muerte celular observada en el *shNTN1*. Cabe destacar que, la eficiencia del silenciamiento de UNC5C resultó en una baja entorno al 63% de la expresión, la cual representó una disminución de la muerte celular hasta el 67%. En términos técnicos, el poder repetir dicho experimento implementando otras secuencias de siRNA contra *UNC5C* con el objeto de mejorar la eficiencia del silenciamiento, podría permitir apreciar una disminución más drástica de la muerte celular.

Interesantemente, se observó un rescate de la muerte celular inducida por el *shNTN1* al silenciar UNC5C y no así con UNC5B. Por el contrario, al silenciar

UNC5B se observó un aumento de la muerte celular. Este comportamiento no se ha reportado a la fecha en la literatura, y podría deberse a que ambos receptores reclutan efectores río abajo de la señalización de muerte, siendo UNC5C el receptor que gatilla la apoptosis, mientras que UNC5B actuaría como tampón, secuestrando elementos de la maquinaria de apoptosis disminuyendo su disponibilidad frente a la señalización de UNC5C. En particular, este experimento sugiere que específicamente UNC5C y no UNC5B, media la muerte celular inducida por la pérdida de función de Netrina1. Asimismo, considerando que la familia de homólogos de UNC5 han mostrado formar heterodímeros en el reconocimiento de Netrina1, es que sería interesante poder evaluar el efecto sobre la muerte celular al silenciar ambos receptores de manera transitoria.

De manera complementaria, se evaluó el efecto a la sobre-expresión de *UNC5C* en la supervivencia celular en la línea celular DAOY. Al sobre-expresarse *UNC5C* en un contexto de limitada disponibilidad de ligando (0,5% suero), se puede observar un aumento de viabilidad celular medido a través del ensayo de MTT, de manera significativa tanto a las 24H como a las 48H con respecto a la expresión del vector vacío (control). Asimismo, se examinó el efecto de la sobre-expresión de *UNC5C* en el fenotipo celular en ausencia de ligando, mediante la detección de la marca HA acoplada a la expresión del receptor, y se pudo observar un fenotipo alterado de la morfología celular el cual se puede rescatar al añadir recombinante de Netrina1 al medio, tanto a las 24H como a

las 48H (ANEXO IV). En este sentido, estas observaciones sugieren que la disponibilidad de NETRINA1 promueve la sobrevivencia inhibiendo la actividad pro-apoptótica de su receptor UNC5C, modulando la muerte celular gracias a un fino balance entre la presencia del receptor y la disponibilidad del ligando.

Unc5c como receptor de dependencia en el desarrollo cerebelar murino

En vista de los resultados obtenidos en la línea celular DAOY, modulando la muerte celular mediante la pérdida de función de *NTN1* y su posterior rescate al silenciar UNC5C, es que se planteó examinar el posible rol que ejerce dicho receptor en la sobrevivencia celular en el contexto de desarrollo. Con este objetivo, se aislaron GNP's a partir del ratón mutante condicional para *Unc5c* inducible bajo el tratamiento con tamoxifeno, y se evaluó la muerte celular inducida por la privación de suero como estímulo pro-apoptótico. En este sentido, fue posible observar un aumento significativo de la muerte celular en la condición de privación de suero (2,5%) en las GNP's aisladas de ratones heterocigotos y silvestres, en comparación con el ratón nulo. Mientras que en la condición de un 10% suero no se observó diferencias en la muerte celular entre los genotipos de la camada. Cabe destacar que la condición de privación de suero en la que se observa el rescate de la muerte con la pérdida de función de *Unc5c* (2,5%) es la misma concentración a la cual es posible apreciar el efecto de *Netrina1* promoviendo la sobrevivencia en las GNP's murinas. Ya que la pérdida de función

de *Unc5c* rescata el aumento de la muerte celular inducido por privación de suero, es que estos resultados sugieren que *Unc5c* actuaría como receptor de dependencia no sólo en el contexto de MB, sino que también durante el desarrollo cerebelar normal. En particular, con el fin de corroborar la especificidad de esta inducción de la muerte celular, se debiese realizar el mismo experimento rescatando la muerte celular inducida por la privación de suero, en GNP's de ratones heterocigotos y silvestres para *Unc5c*, mediante el uso del recombinante de *Netrina1*, para así demostrar que *Netrina1* induce la sobrevivencia mediante su receptor *Unc5c* en el contexto de desarrollo.

UNC5C como nuevo blanco transcripcional de la vía de señalización SHH/GLI

Considerando que, para poder aumentar la actividad de la señalización de *Netrina1* en el contexto de MB, río abajo de la vía SHH/GLI, se requiere un aumento en el eje receptor-ligando, es que el aumento de la expresión de *Netrina1* debiese verse acompañado por el aumento de la expresión del receptor, para desregular la señalización de sobrevivencia de manera sostenida y finalmente, promover la generación de un tumor. Es por esto que se planteó como objetivo adicional de esta tesis evaluar al receptor UNC5C como efector putativo de la señalización SHH/GLI. En primera instancia, se analizó la expresión de los receptores de *Netrina1* en tres subgrupos de MB: SHH, Grupo 3 y Grupo 4, en una cohorte caracterizada por el Dr. Mark Remke del grupo

liderado por el Dr. Michael Taylor (Toronto, Canada; Datos no publicados, ANEXO VI). En este análisis, *UNC5C* resultó ser el único receptor que mostró un aumento en su expresión en el grupo de SHH en comparación a los otros dos grupos, por lo que su expresión podría estar siendo controlada por la vía Shh/Gli, encontrándose desregulada en el MB derivado de la sobreactivación de dicha vía.

Interesantemente, al evaluar los niveles de expresión de *UNC5C* en MB humano, se observó una correlación positiva entre los niveles transcripcionales de *UNC5C* y los niveles de expresión de *GLI1* ($R=0,6333$) (Datos no publicados, Dr. Olivier Ayrault, Paris, Francia). De manera complementaria, los niveles de expresión de *UNC5C* se encuentran correlacionados positivamente con los niveles de expresión de *ATOH1* ($R=0,6847$), factor transcripcional cuya actividad es controlada por la vía SHH/GLI; encontrándose aumentada en MB humano y que ha mostrado cooperar con GLI1 en el control de genes blanco de la vía (Northcott y col. 2012b). Considerando estos antecedentes, es que se planteó evaluar *UNC5C* como blanco transcripcional directo de la señalización SHH/GLI. Para esto, se llevó a cabo un análisis *in silico*, implementando la misma matriz probabilística utilizada para encontrar GBS consenso en las regiones regulatorias de *NETRINA1*. Se realizó la búsqueda de GBS consenso en las primeras 2kb río arriba del ATG de *UNC5C*, encontrándose cuatro sitios putativos distribuidos en los primeros 1000 pb próximos al promotor. Los cuatro

sitios GBS arrojados por el programa presentan un *mismatch* o desajuste de sólo 1 base nitrogenada (ANEXO VIII).

Tomando en cuenta los antecedentes que vinculan la señalización SHH/GLI con la expresión de UNC5C, la correlación de los niveles de expresión de UNC5C con un *read-out* de la señalización y la presencia de GBS en la región próxima al promotor del gen de UNC5C humano, es que en conjunto estos resultados permiten postular a UNC5C como un nuevo blanco transcripcional directo de la señalización Shh/Gli. De demostrarse lo anterior, la señalización SHH/GLI controlaría la expresión del eje receptor-ligando, posibilitando la regulación de la sobrevivencia a través de estos efectores no sólo en el contexto del cáncer sino que también en el desarrollo y la homeostasis.

El rol de Unc5c en el desarrollo cerebelar normal

El gen que codifica para el receptor de Netrina1, *Unc5c*, fue originalmente descrito como *Rcm*, acuñado por el fenotipo del ratón mutante el cual presenta una malformación cerebelar rostral (*Rostral cerebelar malformation*). Con respecto a la función celular asociada a *Unc5c*, esta ha sido descrita clásicamente como un receptor de Netrina1, que media la quimio-repulsión en los procesos de migración celular y guía axonal. En el modelo genético de *Rcm*, se han estudiado los defectos en el desarrollo del SNC originados por la pérdida

de función de *Unc5c*, exhibiendo el fenotipo más drástico en el cerebelo. En particular, el ratón mutante nulo de *Unc5c* presenta una reducción dramática en el tamaño cerebelar, patrones de foliación anormales y ubicación ectópica de células de Purkinje y GNPs en el colículo inferior en el encéfalo postnatal, argumentándose que se requiere de la expresión de *Unc5c* para la migración normal de las GNPs y de las células de Purkinje durante el desarrollo (Ackerman y col. 1997).

En vista de lo observado en este modelo, la señalización *Unc5c/Netrina1* probablemente no es el único complejo receptor-ligando que controla los movimientos celulares en el cerebelo, ya que muchas células en migración se mantienen dentro de territorio cerebelar normal en los individuos mutantes. Asimismo, se esperaría que el ratón mutante nulo de *Ntn1*, presentara defectos cerebelares similares a los exhibidos por los homocigotos de *Unc5c*, no obstante, el modelo de pérdida de función de *Netrina1* no presenta el mismo fenotipo de migración celular. Lo anterior indicaría que otros ligandos podrían activar *Unc5c* y por consiguiente compensar la pérdida en los mutantes de *Ntn1*. El desarrollo aparentemente normal de diversas comisuras y la repulsión de axones trocleares en mutantes de *Ntn1 in vitro* serían ejemplos de la compensación de otros ligandos ante la falta de *Netrina1* (Przyborski y col. 1998). Si bien, se consideraba a *Unc5c* como un receptor exclusivo para *Netrina1*, el 2009 se demostró que también une BMP7, con una afinidad estimada de $K_d=4\text{nM}$, comparable a la observada por *Netrina1*. Esto es

interesante no sólo porque *Unc5c* es un receptor que es capaz de integrar dos señalizaciones distintas como la señalización de Netrina1 y de BMP7, sino que éste podría representar un mecanismo molecular plausible mediante el cual se compensa la pérdida de Netrina1 en el ratón mutante (MacNeil y col. 2009).

Con respecto al desarrollo cerebelar, cabe destacar que los cerebelos mutantes para *Unc5c* son significativamente más pequeños al nacer, lo que sugiere una posible función de *Unc5c* durante la embriogénesis, la que podría estar asociada a la proliferación o a la muerte celular, causando dicha disminución del tamaño que se mantiene hasta el ratón adulto. En relación a la expresión de *Unc5c* durante el desarrollo del cerebelo, los niveles de transcrito alcanzan un *peak* en estadio P7 y luego disminuye significativamente en P21. Durante la fase de máximo crecimiento cerebelar, en P6/P7, *Unc5c* es expresado en GNP's proliferativas en la EGL, en progenitores migrando en la capa molecular y células postmigratorias en la IGL (Ackerman y col. 1997). Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en el presente trabajo, revelando el rol que desempeña *Unc5c* en la sobrevida celular en una aproximación *ex vivo*, actuando como receptor de dependencia en el contexto del desarrollo del cerebelo murino, y dado que *Unc5c* es expresado por los progenitores cerebelares durante su fase de máxima expansión, es que en conjunto los datos sugieren que *Unc5c* promovería la sobrevida celular en el cerebelo murino, por lo que su pérdida de función en el modelo genético de ratón podría traducirse en una disminución de la sobrevida, *ergo* en una reducción el tamaño del tejido cerebelar.

En otro escenario, como es la regeneración axonal, también se ha evaluado la participación de Unc5c como receptor que media la respuesta quimio-repelente tras el daño axonal. En este sentido, en el SNC de mamíferos, las neuronas no logran regenerar sus axones tras una lesión en el adulto. Se sabe que este defecto se debe, en parte, a la presencia de moléculas inhibitorias del crecimiento axonal en el ambiente local en la mielina de los axones rotos. Sin embargo, aún después de la neutralización de estos inhibidores, el número de axones dañados que regeneran es bajo, reflejando una disminuida habilidad intrínseca para regenerar de las neuronas o la existencia de factores inhibidores adicionales. Una hipótesis atractiva que se ha postulado, es que las moléculas quimio-repelentes, capaces de inducir el colapso de los conos de crecimiento y que repelen los axones en crecimiento y neuronas en migración, pudieran ser sobre-expresados en el lugar de la lesión y entorno a la cicatriz glial tras el daño en el SNC adulto (Wehrle y col. 2005).

En este contexto, en un reporte se evaluó la expresión de diversos receptores de Netrina1 tras realizar una lesión en el cerebelo. Interesantemente, ningún receptor de Netrina1 cambió sus niveles de expresión tras el daño (Dcc, Unc5a ni Unc5b), excepto Unc5c, cuya expresión se vio aumentada en las GNP's circundantes de la lesión. Estas GNP's no fueron axotomizadas por la lesión, pero una gran proporción de ellas fueron re-aferenciadas. Las GNP's expresan transitoriamente Unc5c durante el desarrollo, sugiriendo que luego de la lesión, las GNP's reiniciarían el programa de desarrollo (Wehrle y col. 2005). En virtud

de los resultados obtenidos en el presente trabajo, es que proponemos que la expresión de Unc5c en las GNP's tras la lesión, podría representar un mecanismo mediante el cual se promovería la supervivencia celular de los precursores que fueron re-aferenciados adyacentes a la lesión.

Apoptosis en el desarrollo neural

Durante el desarrollo en vertebrados, el 50% de las neuronas experimentan la muerte celular apoptótica, proceso crucial para el establecimiento de los patrones de conectividad neuronal. Esto es conocido como muerte celular neurotrófica, la cual es regulada por la competencia por una cantidad limitada de factor trófico neural (NGF), el cual es secretado por las células blanco a inervarse (Yeo & Gautier 2004). Si bien esta muerte celular ocurre en neuronas diferenciadas, también ocurre apoptosis temprana en el desarrollo, en progenitores indiferenciadas que aún se encuentran proliferando (Yeo & Gautier 2004). En este sentido, la muerte celular programada ha sido detectada en el desarrollo temprano del sistema nervioso en un amplio espectro de organismos, desde *C. elegans* hasta en mamíferos.

Esta apoptosis, se ha detectado en células indiferenciadas, tanto en precursores proliferativos como en neuroblastos postmitóticos. A diferencia de la muerte celular trófica, la cual se lleva a cabo en neuronas diferenciadas,

detalles acerca de esta muerte celular temprana son aún mayoritariamente desconocidos. La teoría neurotrófica, ilustra la eliminación de un excedente de células durante estadíos tardíos del desarrollo del sistema nervioso central. Por su parte, la apoptosis como mecanismo de control del número de células, sería más eficiente en estadíos tempranos del desarrollo neural, actuando en precursores neurales proliferativos considerando el crecimiento exponencial de estos precursores posteriormente en el desarrollo. En este sentido, se ha planteado que la apoptosis controlaría el tamaño de la corteza de mamíferos (Yeo & Gautier 2004, Yamaguchi & Miura 2015).

La muerte celular neural en estadíos tempranos de desarrollo es esencial para el desarrollo del SNC, y el requerimiento de esta muerte temprana es independiente a la neurotrófica surge la pregunta del mecanismo de señalización que media la apoptosis en este contexto. Es así, como existen diversas moléculas que actúan como factor de supervivencia regulando la apoptosis durante el desarrollo. En particular, en el desarrollo del SNC de vertebrados, el morfógeno Shh actúa como factor de supervivencia en el contexto del tubo neural. Lo anterior se pudo observar al remover quirúrgicamente la placa del piso y la notocorda en pollo, lo que resultó en una apoptosis masiva del tubo neural y tejidos axiales. Este fenotipo de muerte fue revertido al agregar Shh exógeno (Charrier y col. 2001). Tomando en cuenta los datos obtenidos en el presente trabajo, en particular, que *Netrina1* es un blanco transcripcional directo de la señalización Shh/Gli, de manera adicional, que *Netrina1* actúa como un factor

de sobrevivencia en el desarrollo del SNC y que se expresa en la placa del piso, es que se sugiere que Netrina1 podría participar como efector de la vía en la sobrevivencia celular, contribuyendo al control que ejerce la señalización Shh/Gli sobre la apoptosis neural temprana en el desarrollo del SNC.

A la fecha se ha propuesto, que las moléculas que regulan la muerte celular neural temprana, son las mismas que regulan el desarrollo neural temprano, coordinando e integrando la apoptosis con otros procesos de desarrollo neural, lo que representaría un sistema eficiente de control del número de células en estadios tempranos del desarrollo (Yeo & Gautier 2004). Si bien, en el presente trabajo se demostró que Netrina1 actúa como factor de sobrevivencia tanto en el desarrollo como en el MB, existen limitaciones que dificultan el análisis directo del efecto sobre la apoptosis en el modelo genético de pérdida de función de *Ntn1*, en el cerebelo. Principalmente, que el ratón mutante nulo de *Ntn1* presenta letalidad perinatal, imposibilitando la evaluación de fenotipos en estructuras de desarrollo postnatal como el cerebelo. No obstante, en virtud de los resultados obtenidos en el presente trabajo, es posible sugerir que la señalización de Unc5c/Netrina1 promueve la sobrevivencia celular, regulando la apoptosis temprana en GNPs, precursores en continua proliferación. Dicha apoptosis, distinta a la neurotrófica observada en las neuronas diferenciadas, permitiría balancear la producción de células y la pérdida de células, traducándose en el control del tamaño de una población celular.

Apoptosis como fuerza morfogénica en el desarrollo

De manera clásica, se ha considerado que la contribución de la apoptosis a la morfogénesis es pasiva, cuya función se reduce a la remoción local de células innecesarias. Recientemente, gracias a los avances tecnológicos en el área de adquisición de imágenes en células vivas, se ha posibilitado el estudio de la dinámica de la apoptosis en varios contextos. Lo anterior ha permitido cambiar el enfoque clásico del rol biológico que cumple la apoptosis, incorporando la visión de que las células que mueren remodelan su entorno activamente. La perspectiva convencional del rol biológico de la apoptosis, se debe en parte a que el estudio de la muerte celular programada ha sido limitado al nivel celular, principalmente en cultivo celular, no considerando el análisis de la dinámica de las células apoptóticas y su influencia en su entorno en un tejido (Teng & Toyama 2011, Monier & Suzanne 2015).

Últimamente, se ha demostrado que las células apoptóticas generan una fuerza, tanto en el plano de la superficie apical induciendo una constricción apical, como en el eje apico-basal deformando la superficie apical, lo que finalmente permite el plegamiento de tejidos. Un ejemplo de la contribución de la apoptosis al remodelamiento de tejidos en el desarrollo, ocurre durante la embriogénesis en *Drosophila*, en particular, en el cierre dorsal. Para esto, se requiere que una fracción pequeña de células (10-20%) experimenten apoptosis en la amnioserosa, deformando su entorno al ser extruídas, permitiendo así que

el cierre dorsal se complete (Toyama y col. 2008). Considerando el rol activo que ejerce la apoptosis en el remodelamiento de tejidos durante el desarrollo, y que el cerebelo es un órgano cuyo desarrollo requiere del plegamiento del tejido cerebelar, permitiendo por consiguiente la formación de folias, y que en adición, el ratón mutante de *Unc5c* no sólo exhibe un cerebelo de menor tamaño, sino que presenta también una alteración en la foliación en el desarrollo, es que en virtud de los resultados obtenidos en el presente trabajo, no se descartaría la posibilidad de que la señalización *Unc5c/Netrina1* controlara la apoptosis en las GNP, durante el desarrollo temprano del cerebelo. Esto último podría no sólo representar un mecanismo de control del número de células y por ende del tamaño cerebelar, sino que podría participar de manera activa en el proceso de foliación del cerebelo.

Los resultados obtenidos en la presente tesis demuestran que *NETRINA1* es un nuevo efector de la vía *SHH/GLI*, el cual promueve la supervivencia celular tanto en el contexto del desarrollo del cerebelo, como en *MB-SHH*. Si bien *NETRINA1* exhibe un amplio repertorio de receptores, los que permiten la integración diferencial de la señalización de *NETRINA1* en diferentes tipos celulares en el nicho tumoral, el candidato a mediar la supervivencia corresponde a *UNC5C*. Este eje receptor-ligando conformado por *NETRINA1/UNC5C* mostró modular la muerte celular no sólo en meduloblastoma, sino que en el desarrollo del cerebelo. Considerando que recientemente se ha demostrado el rol que desempeña la apoptosis como fuerza morfogenética en el desarrollo, es que la señalización de *NETRINA1* mediada por *UNC5C*, no sólo podría participar en el

establecimiento del tamaño del tejido cerebelar, sino que también en su forma, en el establecimiento de las folias, contribuyendo de manera activa al remodelamiento del tejido cerebelar.

CONCLUSIONES

- NETRINA1 se expresa en células tumorales en meduloblastoma humano.
- *NTN1* es un blanco transcripcional directo de la señalización SHH/GLI en humano.
- NETRINA1 actúa como factor de supervivencia tanto en meduloblastoma humano como durante el desarrollo cerebelar murino.
- UNC5C actúa como receptor de dependencia tanto en meduloblastoma humano como durante el desarrollo cerebelar murino.

ANEXO I

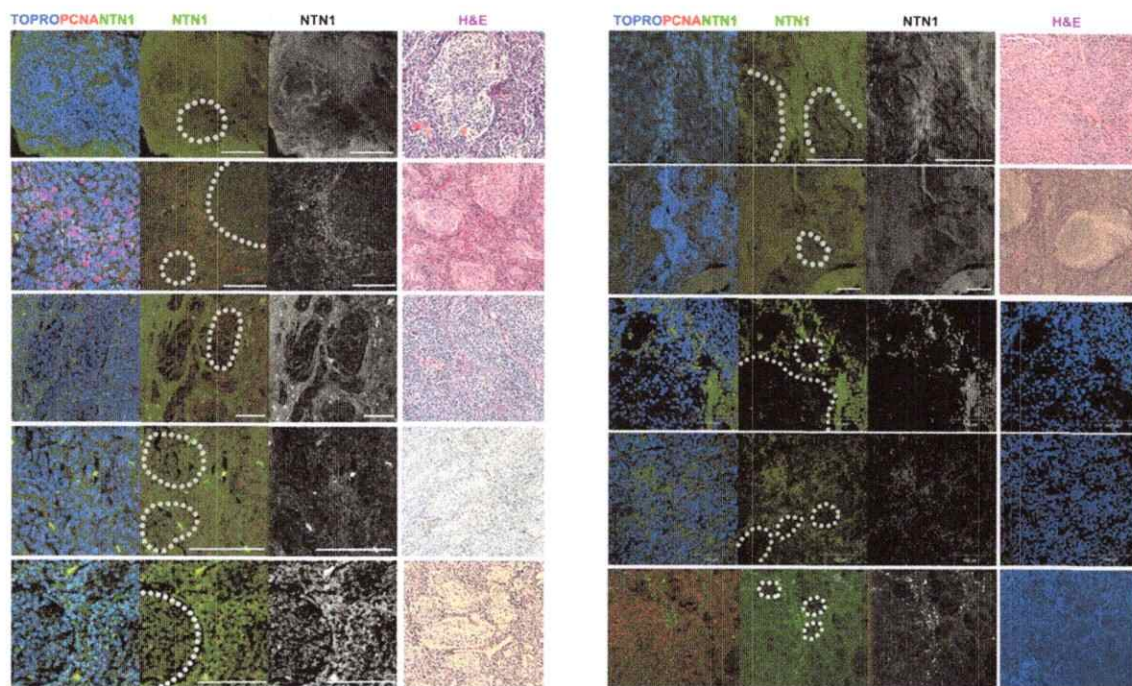


Figura 25.- El patrón de expresión de NETRINA1 se encuentra asociado a las regiones proliferativas tumorales en MB humano derivado de la sobre-activación de la señalización SHH/GLI. Muestras de 10 pacientes con MB derivado de SHH/GLI, en los que se evaluó la presencia y distribución de Netrina1 mediante inmunofluorescencia. En este subtipo de MB de histología desmoplástica/nodular, se apreció la expresión de Netrina1 (verde) en la regiones proliferativas tumorales, marcadas por la detección de PCNA (rojo). Se muestran tinciones de hematoxilina y eosina de los casos por paciente, excepto los últimos tres casos donde se muestra el tejido con la tinción nuclear TOPRO (Barra=100 μ).

ANEXO II

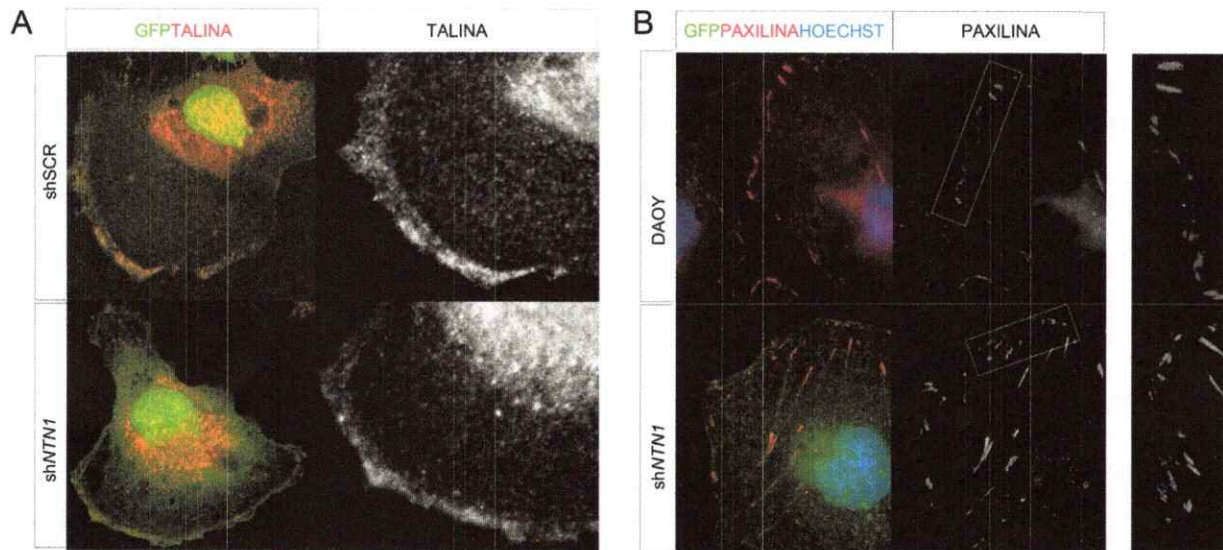


Figura 26.- Los componentes estructurales involucrados en las adhesiones focales no se ven afectados en DAOY con menor expresión de **NETRINA1**. La expresión y distribución tanto de talina (A) como de paxilina (B) en la célula shNTN1 no presentan alteraciones observables con respecto al control, shSCR.

La Paxilina, es un *scaffold* componente de las adhesiones focales, presenta sitios de fosforilación serina/tirosina, y es fosforilada en respuesta a distintos estímulos como factores tróficos, activación de integrinas, interleuquinas y oncogenes. La localización subcelular de la Paxilina se restringe al extremo de las fibras de estrés, mostrando una distribución en estructuras discretas conformando las adhesiones focales (Turner y col.1990). La Talina es una proteína adaptadora, la cual no sólo participa en la transducción de señales de adhesión desde las integrinas hacia el citoesqueleto de actina, sino que es capaz de modular la afinidad de las integrinas por su ligando en un tipo de señalización llamada "*Inside-out*". La localización subcelular de la Talina depende de su actividad, al encontrarse inactiva se localiza en el citosol, mientras que en respuesta a estímulos de adhesión se redistribuye hacia la membrana plasmática para interactuar con integrinas (Banno y col.2012).

ANEXO III

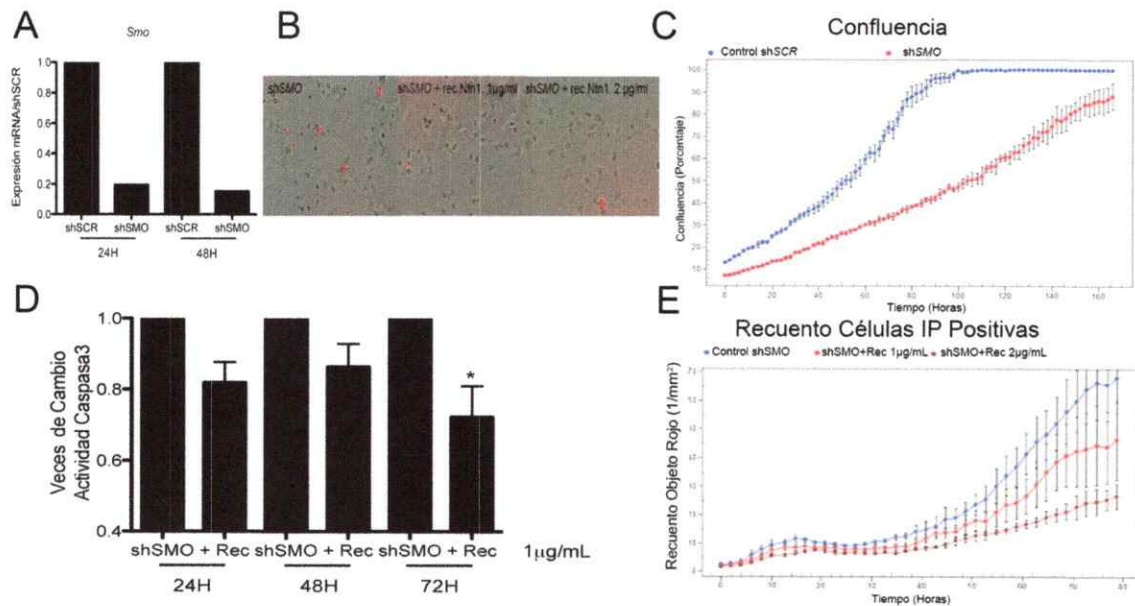


Figura 27.-NETRINA1 rescata la muerte celular en la línea estable *knock-down* para *Smoothened*. **A.-** Validación del interferente de *shSMO*, mediante la detección de los niveles de expresión a través de qPCR Taqman, observándose una reducción entorno al 80% en el transcrito de *Smoothened* a las 24h y 48h. N=1 **B.-** Imágenes representativas de la tinción de yoduro de propidio, mostrando la disminución de la muerte celular observada en la línea *shSMO* al usar Netrina1 recombinante (1 y 2µg/mL). **C.-**El crecimiento celular poblacional del *knock-down* es desacelerado en comparación al observado en la línea *shSCR*. N=1 **D.-**El tratamiento con Netrina1 recombinante rescata la muerte celular en la línea *shSMO*, mostrando una disminución significativa a las 72h de tratamiento con 1µg/mL, mediante el ensayo de activación de caspasa-3. **E.-**El tratamiento con Netrina1 recombinante 1µg/mL (línea roja) y 2µg/mL (línea roja oscura), revierte la muerte celular observada en la línea *shSMO*, medido a través de la tinción de yoduro de propidio (*p-value*<0.05, N=3, Kruskal-Wallis).

ANEXO IV

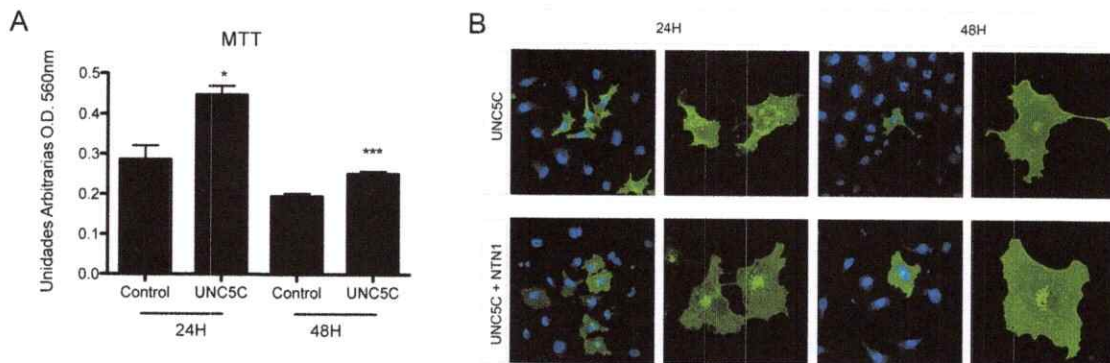


Figura 28.- Sobreexpresión de *UNC5C* en línea celular DAOY modula la sobrevida en presencia de *NETRINA1*. A.- La sobre-expresión de *UNC5C* promueve la sobrevida en presencia de ligando (0,5% suero), aumentando significativamente la viabilidad celular mediante MTT, tanto a las 24H como a las 42H (N=2, *p-value*<0.05, Mann-Whitney). **B.-** La sobre-expresión de *UNC5C* afecta la morfología de las células (marca HA, verde), observándose un fenotipo celular alterado, el cual es revertido al añadir recombinante de Netrina1 en el medio (24H y 48H) (Aumento Objetivo=40X, Zoom óptico).

ANEXO V

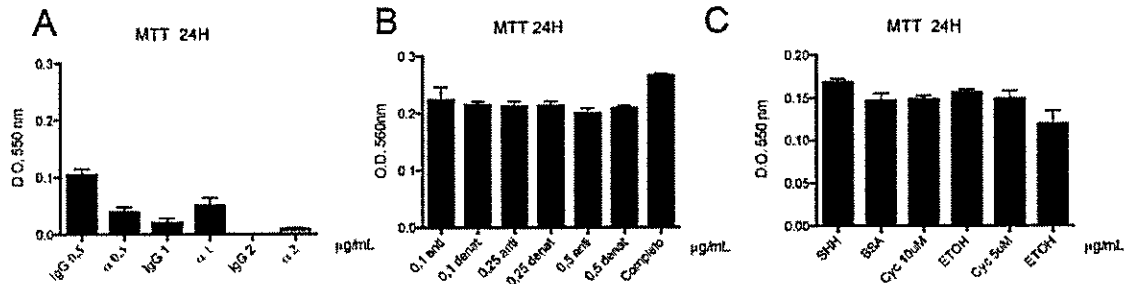


Figura 29.- Regulación de la viabilidad celular en respuesta a la modulación de la señalización Shh/Gli y al bloqueo de la acción de Netrina1 en la línea celular DAOY. A.- Al usar diferentes concentraciones del anticuerpo bloqueante contra Netrina1 (0.5, 1 y 2 µg/mL), no se observaron diferencias significativas con respecto al control de isotipo IgG, a las 24h de tratamiento mediante MTT. **B.-** El uso de concentraciones de anticuerpo bloqueante dentro de un rango de 0.1-0.5 µg/mL, no produjo cambios en la viabilidad celular con respecto al control utilizado (la misma concentración del anticuerpo de naturado). **C.-** Al modular la señalización SHH/GLI, tanto al estimular la vía con el uso del recombinante de Shh como al reprimir la señalización mediante el uso de un inhibidor farmacológico (Ciclopamina, Cyc), no se observan cambios en la viabilidad celular medida a través del ensayo de MTT. N=1.

ANEXO VI

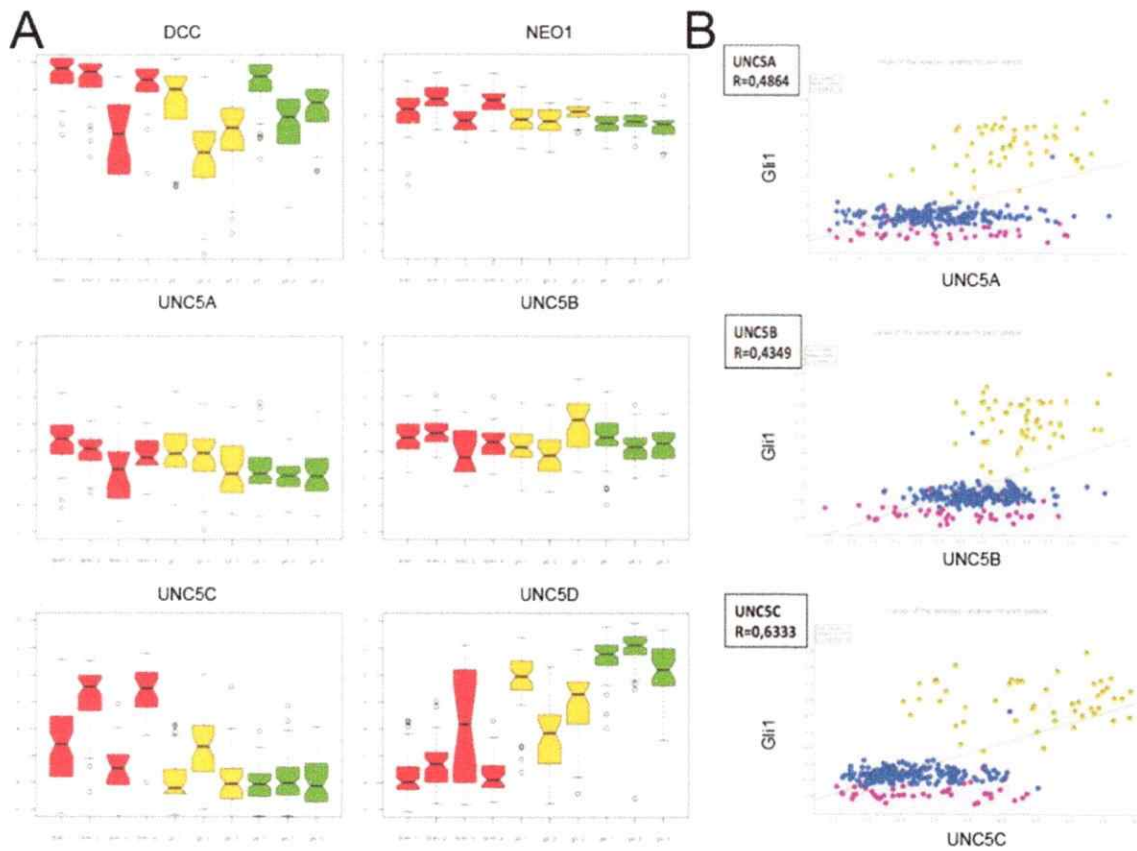


Figura 30.-UNC5C se encuentra sobre-expresado en MB derivado por la sobre-activación de la señalización SHH/GLI y se correlaciona positivamente con los niveles de expresión de GLI1. A.- Análisis transcriptómico de meduloblastoma humano. *UNC5C* es el único receptor de Netrina1 cuya expresión se encuentra aumentada en el subgrupo derivado de SHH (rojo) en comparación a los otros dos subtipos: grupo 3 (amarillo) y grupo 4 (verde). Este análisis fue realizado por Dr. Mark Remke (2013, datos no publicados). **B.-** De igual modo, *UNC5C* es el único receptor de Netrina1 cuyos niveles de transcrito se encuentran positivamente correlacionados con los niveles de expresión de *GLI1* ($R=0,633$) (Northcott y col. 2012).



ANEXO VII

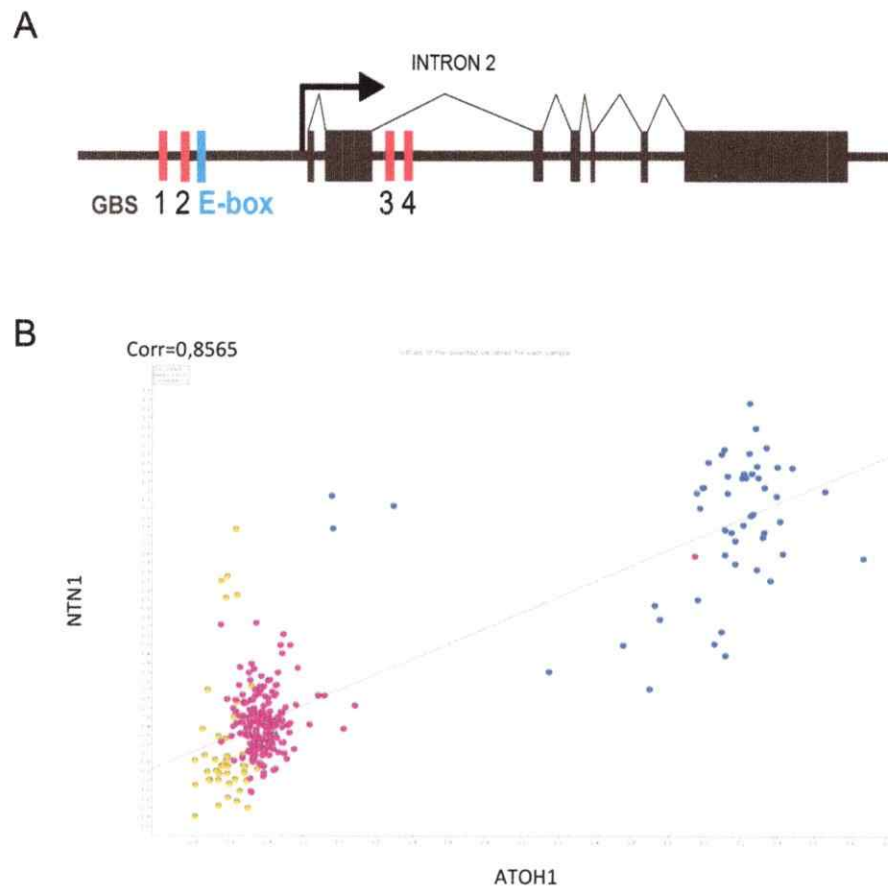


Figura 31.- *NTN1* presenta una secuencia E-box en la región próxima al promotor y sus niveles de expresión se correlacionan positivamente con los niveles de *ATOH1* en MB humano., A.- En la región próxima al promotor de *NTN1*, se encontró una secuencia E-Box, adyacente al GBS2, a 171 pb de distancia. B.-Los niveles de transcrito de *NTN1* exhiben una correlación positiva con los niveles de transcrito de *ATOH1* ($R=0,8565$) (Northcott y col. 2012).

ANEXO VIII

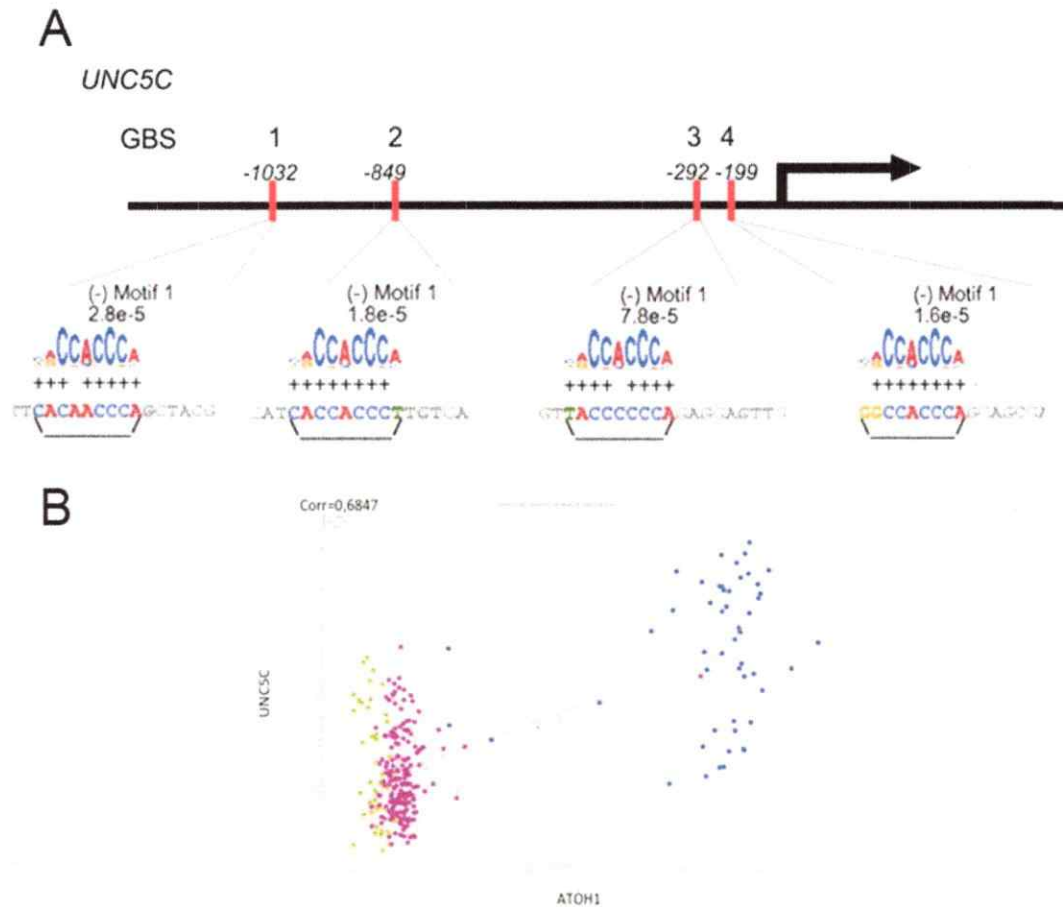


Figura 32.- *UNC5C* presenta elementos regulatorios de la señalización SHH/GLI en la región próxima la promotor, y su nivel de expresión se correlaciona positivamente con los niveles de expresión de *ATOH1* en el MB humano. A.- *UNC5C* exhibe 4 GBS consenso en la región próxima al promotor, dentro de los primeros 1 Kb pb río arriba del sitio de inicio de transcripción indicado por flecha. B.- Los niveles de transcrito de *UNC5C* se correlacionan con los niveles de expresión de *ATOH1* en MB ($R=0,6847$) (Northcott y col. 2012).

BIBLIOGRAFÍA

Ackerman S.L., Kozak L.P., Przyborski S.A., Rund L.A., Boyer B.B., Knowles B.B. 1997. The mouse rostral cerebellar malformation gene encodes an UNC-5-like protein. *Nature*. 24; 386 (6627):838-42.

Ahlfeld J., Favaro R., Pagella P., Kretzschmar H.A., Nicolis S., & Schüller U. 2013. Sox2 Requirement in Sonic Hedgehog-Associated Medulloblastoma. *Cancer Res*; 73(12): 3796-3807.

Akino T., Han X., Nakayama H., McNeish B., Zurakowski D., Mammoto A., Klagsbrun M., Y Smith E. 2014. Netrin-1 Promotes Medulloblastoma Cell Invasiveness and Angiogenesis, and Demonstrates Elevated Expression in Tumor Tissue and Urine of Patients with Pediatric Medulloblastoma. *Cancer Research*. 74(14).

Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. 2002. *Molecular Biology of the Cell*, 4th edition. New York, Garland Science.

Arakawa H. 2004. Netrin-1 and its receptors in tumorigenesis *Nature Reviews. Cancer*. 4: 978- 987.

Avilés E.C., Wilson N.H. y Stoeckli E.T. 2013. Sonic hedgehog and Wnt: antagonists in morphogenesis but collaborators in axon guidance. *Front. Cell. Neuroscience*. 7(86):1-17.

Ayrault O., Zhao H., ZindY F., Qu C., Sherr C. J., & Roussel M. F.2010. Atoh1 Inhibits Neuronal Differentiation and Collaborates with Gli1 to Generate Medulloblastoma-Initiating Cells. *Cancer Res*; 70(13)

Barallobre M.J., Pascual M., Del Río J.A., Soriano E. 2005. The Netrin family of guidance factors: emphasis on Netrin-1 signalling. *Brain Research Reviews* 49: 22–47.

Bernet A. y Fitamant J. 2008. Netrin-1 and its receptors in tumour growth promotion *Expert Opinion on Therapeutic Targets*. 12:8, 995-1007.

Bergeron S. A., Milla L.A., Villegas R., Shen M-C., Burgess S. M., Allende M.L., Karlstrom R. O., & Palma V. 2008. Expression profiling identifies novel Hh/Gli regulated genes in developing zebrafish embryos. *Genomics*. 91(2): 165–177.

Bloch-Gallego E., Ezan F., Tessier-Lavigne M., & Sotelo C. 1999. Floor Plate and Netrin-1 Are Involved in the Migration and Survival of Inferior Olivary Neurons *The Journal of Neuroscience*.19(11):4407–4420

Bernet A., Mazelin L., Coissieux M-M., Gadot N., Ackerman S. L., Scoazec J-Y., & Mehlen P. 2007. Inactivation of the UNC5C netrin-1 receptor is associated with tumor progression in colorectal malignancies. *Gastroenterology*. 133(6): 1840–1848.

Bongo J. B. & Peng D. Q. 2014. The neuroimmune guidance cue netrin-1: A new therapeutic target in cardiovascular disease. *Journal of Cardiology*. 63: 95–98.

Bradford D., Cole S.J. & Cooper H.M. 2009. Netrin-1: Diversity in development. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 41: 487–493

Briscoe J. & Théron P.P. 2013. The mechanisms of Hedgehog signalling and its roles in development and disease. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*.14: 419-429

Carmeliet P. 2003. Blood vessels and nerves: common signals, pathways and diseases. *Nature Reviews Genetics*, 4: 710-720.

Charrier, J.B., Lapointe, F., Le Douarin, N.M., & Teillet, M.A., 2001. Anti-apoptotic role of sonic hedgehog protein at the early stages of nervous system organogenesis. *Development* 128, 4011–4020.

Charron F., Stein E., Jeong J., McMahon A.P., & Tessier-Lavigne M. 2003. The Morphogen Sonic Hedgehog Is an Axonal Chemoattractant that Collaborates with Netrin-1 in Midline Axon Guidance. *Cell*.113, 11–23.

Colamarino S. A. & Tessier-Lavigne M. 1995. The Axonal Chemoattractant Is Also a Chemorepellent for Trochlear Motor Axons. *Cell*, 81: 621-629.

Corcoran R.B. & Scott M.P. 2001. A mouse model for medulloblastoma and basal cell nevus syndrome. *Journal of Neuro-Oncology*. 53: 307–318.

Corset V., Nguyen-Ba-Charvet K. T., Forcet C., Moysé E., Chédotal A., & Mehlen P. 2000. Netrin-1-mediated axon outgrowth and cAMP production requires interaction with adenosine A2b receptor. *Nature*. 407: 747-750.

Crawford J.R., MacDonald T.J., & Packer R.J. 2007. Medulloblastoma in childhood: new biological advances. *Lancet Neurol. Review*. 6(12):1073-85.

Dahmane N. & Ruiz I Altaba A. 1999. Sonic hedgehog regulates the growth and patterning of the cerebellum. *Development* 126:3089-3100.

Delloye-Bourgeois C., Fitamant J., Paradisi A., Cappellen D., Douc-Rasy S., Raquin M. A., Stupack D., Nakagawara A., Rousseau R., Combaret A., Puisieux A., Valteau-Couanet D., Bénard J., Bernet A., & Mehlen P. 2009. Netrin-1 acts as a survival factor for aggressive neuroblastoma. *J. Exp. Med.* Vol. 206 No. 4 833-847.

Ellison D.W. 2010. Childhood medulloblastoma: novel approaches to the classification of a heterogeneous disease. *Acta Neuropathol.* 120:305–316

Finci L., Zhang Y., Meijers R., & Wang J.H. 2015. Signaling mechanism of the netrin-1 receptor DCC in axon guidance. *Progress in Biophysics and Molecular Biology* 118: 153-160.

Forget A., Bihannic L., Cigna S. M., Lefevre C., Remke M., Barnat M., Dodier S., Shirvani H., Mercier A., Mensah A., Garcia M., Humbert S., Taylor M. D., Lasorella A., & Ayrault O. 2014. Shh Signaling Protects Atoh1 from Degradation Mediated by the E3 Ubiquitin Ligase Huwe1 in Neural Precursors. *Developmental Cell*. 29: 649–661.

Gajjar A.J. & Robinson G.W. 2014. Medulloblastoma-translating discoveries from the bench to the bedside. *Nature Review Clin Oncol.* 11(12):714-22.

Gilbert S.F. 2005. *Biología del desarrollo*. Ed. Médica Panamericana.

Goodrich L.V., Milenkovic L., Higgins K.M., & Scott M.P. 1997. Altered Neural Cell Fates and Medulloblastoma in Mouse *patched* Mutants. *Neurosci*;33: 389–400.

Grady W.M. 2007. Making the case for DCC and UNC5C as Tumor-Suppressor Genes in the Colon. *Gastroenterology*. Vol.133(6): 2045-2048.

Guan K.L. & Rao R. 2003. Signalling mechanisms mediating neuronal responses to guidance cues. *Nature Reviews. Neuroscience*.4: 94 – 956.

Guijarro P., Simo S., Pascual M., Abasolo I., Del Rio J. A. & Soriano E. Netrin1 exerts a chemorepulsive effect on migrating cerebellar interneurons in a Dcc-independent way. *Mol Cell*

Guo H., Jia Y., Shang M., Zhang Y., Xie F., Wang H., Yuan M., Yuan L., & Ye J. 2014. Comparison of two in vitro angiogenesis assays for evaluating the effects of netrin-1 on tube formation. *Acta Biochim Biophys Sin.* 46(9): 810-816.

Hakanen J., Duprat S. & Salminen M. 2011. Netrin1 is required for neural and glial precursor migrations into the olfactory bulb. *Developmental Biology* 355: 101–114.

Hedgecock E.M., Culotti J.G. & Hall D.H. 1990. The unc-5, unc-6, and unc-40 genes guide circumferential migrations of pioneer axons and mesodermal cells on the epidermis in *C. elegans*. *Neuron*. 4(1): 61-85.

Heintzman N. D., Hon G. C., Hawkins R. D., Kheradpour P., Stark A., Harp L. F., Ye Z., Lee L. K., Stuart R. K., Ching C. W., Ching K. A., Antosiewicz-Bourget J. E., Liu H., Zhang X., Green R. D., Lobanenkov V. V., Stewart R., Thomson J. A., Crawford G. E., Kellis M. & Ren B. 2009. Histone modifications at human enhancers reflect global cell-type-specific gene expression *NATURE Letters*.459:108-112.

Hong K., Hinck L., Nishiyama M., Poo M.M., Tessier-Lavigne M. & Stein E. 1999. A ligand-gated association between cytoplasmic domains of UNC5 and DCC family receptors converts netrin-induced growth cone attraction to repulsion. *Cell* 97: 927–941.

Ingham P.W., Nakano Y. & Seger C. 2011. Mechanisms and functions of Hedgehog signalling across the metazoa. *Nature Reviews. Genetics*.12: 393– 406.

Jensen P., Smeyne R., & Goldowitz Dan. 2004. Analysis of Cerebellar Development in *math1* Null Embryos and Chimeras. *The Journal of Neuroscience*. 24(9): 2202–2211

Jia J. & Jiang J. 2006. Decoding the Hedgehog signal in animal development. *Cellular and Molecular Life Sciences* 63:1249-1265.

Kennedy T.E., Serafini T., R. de la fore J., & Tessier-Lavigne M. 1994. Netrins Are Diffusible Chemotropic Factors for Commissural Axons in the Embryonic Spinal Cord. *Cell*. Vol. 79, 425-435.

Kerr J. F. R., Wyllie A. H. & Currie A.R. 1972. Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide- ranging implications in tissue kinetics. *British Journal of Cancer* 26: 239-257.

Kim W, Choy W, Dye J, Nagasawa D, Safaee M, Fong B & Yang I. 2011. The tumor biology and molecular characteristics of medulloblastoma identifying prognostic factors associated with survival outcomes and prognosis. *Journal of Clinical Neuroscience* 18: 886–890.

Kimura H. 2013. Histone modifications for human epigenome analysis. *Journal of Human Genetics* 58: 439–445.

Larrieu-Lahargue F., Thomas K. R., & Li D.Y. 2012. Netrin Ligands and Receptors: Lessons from neurons to the endothelium. *Trends Cardiovasc Med*. 22(2): 44–47

Lauderdale J.D., Pasquali S. K., Fazel R., van Eeden F. J. M., Schauerte H. E., Haffter P. & Kuwada J.Y. 1998. Regulation of netrin-1a Expression by Hedgehog Proteins *Molecular and Cellular Neuroscience* 11, 194–205.

Lee E. Y., Ji H., Ouyang Z., Zhou B., Ma W., Vokes S. A., McMahon A. P., Wong W. H. & Scott M. P. 2010. Hedgehog pathway-regulated gene networks in cerebellum development and tumorigenesis. *PNAS*. vol. 107. 21:9736–9741

Leonardo E.D., Hinck L., Masu M., Keino-Masu K., Ackerman S.L., & Tessier-Lavigne M. 1997. Vertebrate homologues of *C. elegans* UNC-5 are candidate netrin receptors. *Nature*. 24;386 (6627):833-8.

Lear J., Hoban P., Strange R. & Fryer A. 2005. Basal cell carcinoma: from host response and polymorphic variants to tumour suppressor genes. *Clinical and Experimental Dermatology*, 30: 49–55.

Leary S.E. S., & Olson J.M. 2012. The Molecular Classification of Medulloblastoma: Driving the next generation clinical trials. *Curr Opin Pediatr*. 24(1): 33–39.

- Lewis P.M., Gritti-Linde A., Smeyne R., Kottmann A., & McMahon A.P. 1997. Sonic hedgehog signaling is required for expansion of granule neuron precursors and patterning of the mouse cerebellum. *Science*. 277:1109-1113
- Li M., Husic N., Lin Y., & Snider B.J. 2012. Production of Lentiviral Vectors for Transducing Cells from the Central Nervous System. *Journal of Visualized Experiments*.63, e4031: 1- 5.
- Lim Y.S. & Wadsworth W.G. 2002. Identification of domains of netrin UNC-6 that mediate attractive and repulsive guidance and responses from cells and growth cones. *The Journal of Neuroscience*.15;22(16):7080-7.
- Llambi F., Causeret F., Bloch-Gallego E., & Mehlen P. 2001. Netrin-1 acts as a survival factor via its receptors UNC5H and DCC. *EMBO J*. 20(11):2715-22.
- Low J. & Sauvage F. 2010. Clinical Experience with Hedgehog Pathway Inhibitors. *Journal of Clinical Oncology*. 28 (36):5321-5326
- MacNeil L. T., Hardy W. R., Pawson T., Wrana J. L., & Culotti J. G. 2009. UNC-129 regulates the balance between UNC-40 dependent and independent UNC-5 signaling pathways. *Nat Neurosci*. 12(2): 150–155.
- Mazelin L., Bernet A., Bonod-Bidaud C. Pays L., Arnaud S., Gespach C., Bredesen D.E., Scoazec J.Y. & Mehlen P. 2004. Netrin-1 controls colorectal tumorigenesis by regulating apoptosis. *Nature*. 431: 80-84.
- Mazumdar T., DeVecchio J., Agyeman A., Shi T. & Houghton J. 2011. The GLI genes as the molecular switch in disrupting Hedgehog signaling in colon cancer. *Oncotarget* 2: 638 – 645.
- Mehlen P. & Guenebeaud C. 2010. Netrin-1 and its dependence receptors as original targets for cancer therapy. *Current Opinion in Oncology*. 22: 46–54.
- Mehlen P. & Thibert C. 2004. Dependence receptors: between life and death. *Cell Mol Life Sci*.61: 1854–1866.
- Mehlen P., Delloye-Bourgeois C. & Chédotal A. 2011. Novel roles for Slits and netrins: axon guidance cues as anticancer targets?. *Nature reviews. Cáncer*.11(3):188–97.
- Milla L.A., González-Ramírez C.N. & Palma V. 2012. Sonic Hedgehog in cancer stem cells: a novel link with autophagy. *Biol Res* 45: 223-230.

Milla L.A., Arros A., Espinoza N., Remke M., Kool M., Taylor M.D., Pfister S.M., Wainwright B.J., Palma V. 2013. Neogenin1 is a Sonic Hedgehog target in medulloblastoma and is necessary for cell cycle progression. *International Journal of Cancer* . 134(1): 21-31.

Millard N.E. & De Braganca, K.C. 2015. Medulloblastoma. *Journal of Child Neurology*. 1-13.

Monier B., & Suzanne M. 2015. The Morphogenetic Role of Apoptosis. *Current Topics in Developmental Biology*. 114:335-362

Noguchi K.K., Cabrera O.H., Swiney B.S., Salinas-Contreras P., Smith J.K., & Farber N.B. 2015. Hedgehog regulates cerebellar progenitor cell and medulloblastoma apoptosis. *Neurobiology of Disease*. 83: 35-43

Nord A. S., Pattabiraman K., Visel A., & Rubenstein J.L.R. 2015. Genomic Perspectives of Transcriptional Regulation in Forebrain Development. *Neuron*. 85:27-47.

Northcott P. A., Jones D.T.W., Kool M., Robinson G. W., Gilbertson R. J., Cho Y-J., Pomeroy S. L., Korshunov A., Lichter P., Taylor M. T., & Pfister S. M. 2012a. Medulloblastomics: The End of the Beginning. *Nat Rev Cancer*. 12(12): 818-834.

Northcott P.A., Shih D.J.H., Peacock J., Garzia L., Morrissy S., Zichner T., Stütz A.M., Korshunov A., Reimand J., Schumacher S. E., Beroukhim R., Ellison D. W., Marshall C. R., Lionel A. C., Mack S., Dubuc A., Yao Y., Ramaswamy V., Luu B., Rolider A., Cavalli F., Wang X., Remke M., Wu X., Chiu R. Y. B., Chu A., Chuah E., Corbett R. D., Hoad G. R., Jackman S. D., Li Y., Lo A., Mungall K. L., Nip K. M., Jenny Qian J. Q., Raymond A. G. J., Thiessen N., Varhol R. J., Birol I., Moore R. A., Mungall A. J., Holt R., Kawauchi D., Roussel M. F., Kool M., Jones D. T. W., Witt H., Fernandez-L A., Kenney A. M., Wechsler-Reya R. J., Dirks P., Aviv T., Grajkowska W. A., Perek-Polnik M., Haberler C. C., Delattre O., Reynaud S. S., Doz F. F., Pernet-Fattet S. S., Cho B-K., Kim S-K., Wang K-C., Scheurlen W., Eberhart C. G., Fèvre-Montange M., Jouvett A., Pollack I. F., Fan X., Muraszko K. M., Gillespie G. Y., Di Rocco C., Massimi L., Michiels E. MC., Kloosterhof N. K., French P. J Kros J. M., Olson J. M., Ellenbogen R.G., Zitterbart K., Kren L., Thompson R. C., Cooper M. K., Lach B., McLendon R. E., Bigner D. D., Fontebasso A., Albrecht S., Jabado N., Lindsey J. C., Bailey S., Gupta N., Weiss W. A., Bognár L., Klekner A., Van Meter T. E., Kumabe T., Tominaga T., Elbabaa S. K., Leonard J. R., Rubin J. B., Liao L. M., Van Meir E. G., Fouladi M., Nakamura H., Cinalli G., Garami M., Hauser P., Saad A. G., Iolascon A., Jung S., Carlotti C. G., Vibhakkar R., Ra Y. S., Robinson S., Zollo M., Faria C. C., Chan J. A., Levy M. L., Sorensen P. H. B., Meyerson M.,

Pomeroy S. L., Cho Y-J., Bader G. D., Tabori U., Hawkins C. E., Bouffet E., Scherer S. W., Rutka J. T., Malkin D., Clifford S. C., Jones S. J.M., Korbel J. O., Pfister S. M., Marra M. A., & Taylor M. D. 2012b. Subgroup specific structural variation across 1,000 medulloblastoma genomes. *Nature*. 488(7409): 49–56.

Northcott P.A., Korshunov A., Witt H., Hielscher T., Eberhart C.G., Mack S., Bouffet E., Clifford S.C., Hawkins C.E., French P., Rutka J.T., Pfister S., & Taylor M.D. 2010. Medulloblastoma Comprises Four Distinct Molecular Variants. *J Clin Oncol* 29:1408-1414.

Nüsslein-Volhard C. & Wieschaus E. 1980. Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila*. *Nature*. 287(5785): 795-801.

Ohli J., Neumann J.E., Grammel D., & Schüller U. 2015. Localization of SHH medulloblastoma in mice depends on the age at its initiation. *Acta Neuropathol.*130:307–309

Rajasekharan S. & Kennedy T.E. 2009. The netrin protein family *Genome Biology*. 10:239.

Ramesh G., Berg A., & Jayakumar C. 2011. Plasma netrin-1 is a diagnostic biomarker of human cancers. *Biomarkers* 16(2): 172–180.

Ramón y Cajal S. 1890. *Notas Anatómicas: I. Sobre la aparición de las expansiones celulares en la médula embrionaria.* Gaceta Sanitaria de Barcelona.

Ran F.A., Hsu P. D., Wright J., Agarwala V., Scott D. A., & Zhang F. 2013. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nat Protoc*. 8(11): 2281–2308.

Riddle R.D., Johnson R.L., Laufer E., & Tabin C. 1993. Sonic hedgehog Mediates the Polarizing Activity of the ZPA. *Cell* 75: 1401-1416.

Robbins DJ, Fei D.L. & Riobo N.A. 2012. The Hedgehog Signal transduction network. *Science Signaling* 5.

Roussel M. & Hatten M. 2011. Cerebellum: Development and Medulloblastoma. *Curr Top Dev Biol* 94: 235–282.

Rubin J. & Rowitch D. 2002, Medulloblastoma: A problem of developmental biology. *Cancer Cell* 2(1): 7-8.

Ruiz i Altaba A, Palma V. & Dahmane N. 2002a. Hedgehog-Gli signalling and the growth of the brain. *Nature Reviews. Neuroscience.* 3(1): 24-33.

Ruiz i Altaba A., Sánchez P. & Dahmane N. 2002b. Gli and hedgehog in cancer: tumours, embryos and stem cells. *Nature Reviews. Cancer.* 2(5): 361-72.

Salminen M., Meyer B.I. & Gruss P. 1998. Efficient Poly A Trap Approach Allows the Capture of Genes Specifically Active in Differentiated Embryonic Stem Cells and in Mouse Embryos. *Developmental Dynamics.* 212: 326–333.

Salminen M., Meyer B.I., Bober E. & Gruss P. 2000. Netrin 1 is required for semicircular canal formation in the mouse inner ear. *Development* 127: 13-22.

Sasaki, H., Hui, C. C., Nakafuku, M. & Kondoh, H. 1997. A Binding site for Gli proteins is essential for HNF-3 β floor plate enhancer activity in transgenics and can respond to Shh in vitro. *Development* 124: 1313-1322.

Sasaki H., Nishizaki Y., Hui C., Nakafuku M., & Kondoh H. 1999. Regulation of Gli2 and Gli3 activities by an amino-terminal repression domain: implication of Gli2 and Gli3 as primary mediators of Shh signaling. *Development.* 126 (17):3915-24.

Sawan C. & Herceg Z. 2010. Histone Modifications and Cancer. *Advances in Genetics.* 70:57-85.

Sen S. 1992. Programmed cell death: concept, mechanism and control. *Biol Rev Camb Philos Soc.* 67(3):287-319.

Serafini T., Colamarino S.A., Leonardo E.D., Wang H., Beddington R., Skarnes W.C. & Tessier-Lavigne M. 1996. Netrin-1 Is Required for Commissural Axon Guidance in the Developing Vertebrate Nervous System. *Cell,* 87:1001–1014,

Serafini T., Kennedy T.E., Galko M.J., Mirzayan C., Jessell T.M. & Tessier-Lavigne M. 1994. The Netrins Define a Family of Axon Outgrowth-Promoting Proteins Homologous to *C. elegans* UNC-6 *Cell.*12;78(3): 409-24.

Shi X., Zhang Z., Zhan X., Cao M., Satoh T., Akira S., Shpargel K., Magnuson T., Li Q., Wang R., Wang C., Ge K. & Wu J. 2014. An epigenetic switch induced by Shh signalling regulates gene activation during development and medulloblastoma growth. *Nature Communications.*

Smallwood A. & Ren B. 2013. Genome organization and long-range regulation of gene expression by enhancers. *Current Opinion in Cell Biology*. 25:387–394.

Stamatakis D., Ulloa F., Tsoni S.V., Mynett A., & Briscoe J. 2005. A gradient of Gli activity mediates graded Sonic Hedgehog signaling in the neural tube. *Genes Dev*. 19(5): 626–641.

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

Soutoglou E. & Talianidis I. 2002. Coordination of PIC Assembly and Chromatin Remodeling During Differentiation-Induced Gene Activation. *SCIENCE* 295: 1901-1904.

Sun K. L. W., Correia J. P. & Kennedy T. E. 2011. Netrins: versatile extracellular cues with diverse functions. *Development* 138, 2153-2169.

Taylor M.D., Northcott P. A., Korshunov A., Remke M., Cho Y.J., Clifford S. C., Eberhart C. G., Parsons D. W., Rutkowski S., Gajjar A., Ellison D. W., Lichter P., Gilbertson R. J., Pomeroy S. L., Kool M., & Pfister S. M. 2012. Molecular subgroups of medulloblastoma: the current consensus. *Acta Neuropathol*. 123:465–472.

Takanaga H. , Tsuchida-Straeten N. , Nishide K. , Watanabe A. , Aburatani H. , & Kondo T. 2009. Gli2 Is a Novel Regulator of Sox2 Expression in Telencephalic Neuroepithelial Cells. *STEMCELLS*. 27:165–174.

Teglund S. & Toftgård R. 2010. Hedgehog beyond medulloblastoma and basal cell carcinoma. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1805:181-208.

Teng X. & Toyama Y. 2011. Apoptotic force: Active mechanical function of cell death during morphogenesis. *Develop. Growth Differ*. 53, 269–276.

Toyama, Y., Peralta, X. G., Wells, A. R., Kiehart, D. P. & Edwards, G. S. 2008. Apoptotic force and tissue dynamics during *Drosophila* embryogenesis. *Science*. 321, 1683–1686.

Vaillant C. & Monard D. 2009. SHH Pathway and Cerebellar Development. *Cerebellum*. 8:291–301.

Vanner R. , Remke M. , Gallo M. , Selvadurai H. J. , Coutinho F. , Lee L. , Kushida M., Head R. , Morrissy S. , Zhu X. , Aviv T. , Voisin V. , Clarke I.D. , Li Y., Mungall A.J. , Moore R.A. , Ma Y. , Jones S.J.M. , Marra, Malkin D. ,

Northcott P.A. , Kool M. , Pfister S.M. , Bader G., Hochedlinger K. , Korshunov A., Taylor M.D., & Dirks P.B. 2014. Quiescent Sox2+ Cells Drive Hierarchical Growth and Relapse in Sonic Hedgehog Subgroup Medulloblastoma. *Cancer Cell* 26:1–15.

Watanabe K., Tamamaki N., Furuta T., Ackerman S. L., Ikenaka K., & Ono K. 2006. Dorsally derived netrin 1 provides an inhibitory cue and elaborates the 'waiting period' for primary sensory axons in the developing spinal cord. *Development*. 133, 1379-1387.

Wechsler-Reya R. & Scott M. 2001. The Developmental Biology of Brain Tumors. *Annual Reviews Neuroscience* 24:385-428.

Wehrle R., Camand E., Chedotal A., Sotelo C., & Dusart I. 2005. Expression of netrin-1, slit-1 and slit-3 but not of slit-2 after cerebellar and spinal cord lesions. *European Journal of Neuroscience*. 22:2134–2144.

Wetmore C., Eberhart D. & Curran T. 2000. The Normal *patched* Allele Is Expressed in Medulloblastomas from Mice with Heterozygous Germ-Line Mutation of *patched*. *Cancer Research* 60, 2239–2246.

Wilson B., li M., Park K. W., Suli A., Sorensen L. K., Larrieu-Lahargue F., Urness L. D., Suh W., Asai J, Kock G. A., Thorne T., Silver M., Thomas K. R., Chien C. B., Losordo D. W., & Li D. Y. 2006. Netrins Promote Developmental and Therapeutic Angiogenesis. *Science*. 313, pp.640-644.

Xu J., Srinivas B., Tay S., Mak A., Yu X., Lee S., Yang H., Govindarajan K., Leong B., Bourque G., Mathavan S., & Roy S. 2006. Genomewide Expression Profiling in the zebrafish Embryo Identifies Target Genes Regulated by Hedgehog Signaling During Vertebrate Development. *Genetics* 174: 735–752.

Yamaguchi Y. & Miura M. 2015. Programmed Cell Death in Neurodevelopment *Developmental Cell*. 32: 478-490.

Yeo W. & Gautier J. 2004. Early neural cell death: dying to become neurons. *Developmental Biology* 274: 233–244.