

UCH-FC
Biotecnología
A 778
C.1



UNIVERSIDAD DE CHILE -FACULTAD DE CIENCIAS -ESCUELA DE
PREGRADO



Netrina-4 anula la actividad proapoptótica del receptor de dependencia Neogenina 1, en un modelo de neuroblastoma humano.

Seminario de Título entregado a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular

Andrea Marisol Arros Villanueva

Directora del Seminario de Título:
Dra. Verónica Palma Alvarado
Co-Director del seminario de Título:
Dr. Luis Milla Brito

Enero -2014

Santiago-Chile



INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TITULO

Se informa a la Escuela de Pregrado de la Facultad de Ciencias, de la Universidad de Chile que el Seminario de Título, presentado por la Srta Andrea Marisol Arros Villanueva

“Netrina-4 anula la actividad proapoptótica del receptor de dependencia Neogenina 1, en un modelo de neuroblastoma humano”

Ha sido aprobado por la Comisión de Evaluación, en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniera en Biotecnología molecular

Dr(a) Verónica Palma
Director Seminario de Título

Handwritten signature of Verónica Palma in black ink, written over a horizontal line.

Comisión de Evaluación

Dr. Elías Utreras
Presidente Comisión

Dr(a). Lorena Norambuena
Evaluador

Handwritten signature of Elías Utreras in black ink, written over a horizontal line.

Handwritten signature of Lorena Norambuena in blue ink, written over a horizontal line.



Santiago, 15 de Enero de 2014



*A mi familia, a mi Amorcito Bello y en especial a mi mamita, a la Lula y a mi tata
Germán, que me acompañan desde el cielo...*

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se lo dedico principalmente a mis tutores Dra. Verónica Palma y Dr. Luís "Polo" Milla. Sin la guía y apoyo de ambos no podría haber logrado madurar tanto académicamente y como persona. Muchas gracias por confiar en mí. Gracias por todo.

A mis compañeros del laboratorio: Pablo, Gabi, Mati, Cata, Lucho, Cynthia, Pauli, Bárbara. A los chicos de MA y AG, por hacerme el día a día más llevadero y responder siempre todas las dudas que tuve con la mejor de las ganas.

A la pandilla: Sami, Carolilla, Nata, Claudita y Gunter. Uds. me hicieron disfrutar la vida de tesista, los extraño mucho. Mis grandes amigos que no son de la pandilla: Lita, Sole, Chini, Naty. A mis amigos del colegio que me aguantaron siempre que les contara cosas de mi tesis aunque no la entendieran.

A mi amorcito Jorge Bello, Gracias por acompañarme al laboratorio, darme tu apoyo, oído, tiempo y que me aguantes y ames. Te amo mucho.

A mi Cuchito que está en el cielo de los gatos ahora. Gracias por darme tu amor incondicional hasta que último día de tu vida.

A mi familia, mi tía margarita y mi tía Ceci. A mi mamita que ya no está aquí para verme titularme. Gracias por todo, por hacer la persona que soy ahora. Sé que desde donde estés estas muy orgullosa de mí, Te amo. A la lula, al fin me titularé. Ojala pudieran acompañarme en este proceso pero Dios no quiso. Las extraño mucho. A mis tíos y primos, gracias por estar conmigo.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

AGRADECIMIENTOS	iii
ÍNDICE DE FIGURAS	vii
ÍNDICE DE TABLAS	ix
LISTADO DE ABREVIATURAS	x
RESUMEN	xi
ABSTRACT	xiii
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Aspectos generales de Neogenina 1 y sus ligandos (RGM y Netrina):	1
1.2 Neogenina 1 como regulador transcripcional.	8
1.3 Neogenina 1 como receptor de dependencia.....	11
1.4 Neogenina 1 y sus ligandos en cáncer.....	14
1.5 Expresión de ligandos de Neogenina 1 en neuroblastoma.....	17
2. HIPÓTESIS:	20
3. OBJETIVOS:	20
3.1 Objetivo general	20
3.2 Objetivos específicos.....	20
4. MATERIALES Y MÉTODOS	21
4.1 Materiales	21
4.1.1 Cultivos Celulares	21
4.1.2 Cultivos Primarios de tejidos humanos y de ratón	21
4.1.3 Anticuerpos	21
4.1.4 Plasmidios.....	22
4.2 MÉTODOS	22
4.2.1 Cultivos Celulares.....	22
4.2.2 Extracción de RNA total.....	23
4.2.3 Síntesis de DNA complementario y PCR.....	24
4.2.4 Western Blot	25
4.2.5 Inmunocitoquímica.....	26

4.2.6 Inmunofluorescencia	27
4.2.7 Generación de partículas lentivirales shRNA.....	28
4.2.8 Transducción y generación de una línea estable shNTN4 en células SH-SY5Y.....	29
4.2.9 Viabilidad con Yoduro de Propidio.....	30
4.2.10 Fraccionamiento Celular.....	30
4.2.11 Análisis Estadístico	31
5. RESULTADOS.....	32
5.1 Caracterización de la expresión de Neogenina 1 y sus ligandos RGMa y Netrina-1 y -4 en las líneas celulares de neuroblastoma humano SH-SY5Y y SK-N-SH.....	32
5.1.1 Neogenina 1 se expresa, en cambio DCC no se expresa en las líneas celulares de neuroblastoma humano.	32
5.1.2 Netrina-4 se expresa en las líneas celulares de neuroblastoma SH-SY5Y y SK-N-SH.....	33
5.2 Evaluación de la translocación nuclear del dominio intracelular de Neogenina 1, en respuesta a sus ligandos RGMa y Netrina-1, en células SH-SY5Y.....	35
5.2.1 El Neo ICD transloca constitutivamente al núcleo en la línea celular SH-SY5Y.....	35
5.2.2 RGMa y Netrina-1 recombinante aumentan significativamente la translocación nuclear de Neo ICD en células SH-SY5Y.	37
5.2.3 Netrina-1 modifica la localización subcelular de Neo ICD en células SH-SY5Y	39
5.3 Evaluación de la translocación nuclear de Neo ICD en respuesta a sus ligandos RGMa y Netrina-1 en las células SH-SY5Y silenciadas para Netrina-4.....	42
5.3.1 Generación de una línea estable de células SH-SY5Y silenciadas para Netrina-4.	42
5.3.2 RGMa exógeno aumenta la cantidad de Neo ICD en el núcleo, en células con Netrina-4 silenciada establemente.	43
5.4 Determinación de la función como receptor de dependencia de Neogenina 1 en respuesta a Netrina-4, en las células SH-SY5Y.....	47
5.4.1 Las células SH-SY5Y silenciadas para Netrina-4 son menos viables en privación de suero que células control.	47
5.4.2 Células SH-SY5Y silenciadas para Netrina-4 poseen un aumento en la marca para Caspasa-3 activadas con respecto a las células control, en un contexto de privación de suero.....	48

6. DISCUSIÓN	50
6.1 Neogenina 1 y Netrina-4 son expresados en las líneas celulares de neuroblastoma SH-SY5Y y SK-N-SH.....	50
6.2 Translocación nuclear del fragmento intracelular de Neogenina 1	52
6.3 Neogenina 1 como receptor de dependencia actuando a través de Netrina-4.....	57
6.4 Neogenina 1 y Cáncer.....	60
7. RESUMEN DE RESULTADOS	63
8. CONCLUSIONES:	64
8. BIBLIOGRAFÍA:	65

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema de la estructura de la proteína Neogenina 1 y de sus ligandos.....	3
Figura 2. Esquema ilustrativo de las distintas funciones de Neogenina 1 dependientes de los ligando RGM y Netrina.....	4
Figura 3. Esquema de los sitios de unión de ligandos a Neogenina 1 e identidad de secuencia entre dominios de Neogenina 1 y DCC.....	8
Figura 4. Esquema resumen del trabajo de Goldschneider y cols, 2008.....	10
Figura 5. Esquema resumen de la función de los receptores de dependencia.....	11
Figura 6. Mecanismo de receptor de dependencia en contexto de cáncer.....	15
Figura 7. Esquema que muestra el planteamiento de este seminario de título.....	19
Figura 8. Obtención de partículas lentivirales shRNA.....	29
Figura 9. Expresión de Neogenina 1 en las líneas de neuroblastoma humano y expresión de DCC en células SH-SY5Y.....	33
Figura 10. Expresión de los ligandos de Neogenina 1, RGMa, Netrina-1 y Netrina-4 en las líneas celulares de neuroblastoma humano.....	34
Figura 11. El dominio intracelular de Neogenina 1 (Neo ICD) transloca constitutivamente al núcleo en células SH-SY5Y.....	36
Figura 12. Efecto de los tratamientos con ligandos exógenos, RGMa y Netrina-1 (NTN1), en la translocación nuclear de Neo ICD.....	38
Figura 13. Cuantificación de los tratamientos con ligandos exógenos en presencia de LMB en la línea celular SH-SY5Y.....	39
Figura 14. Fraccionamiento celular de la línea celular SH-SY5Y, con tratamientos con ligandos exógenos RGMa o Netrina-1.....	40
Figura 15. Cuantificación de la translocación de Neo ICD al núcleo y al citoplasma.....	41
Figura 16. Silenciamiento de Netrina-4 en células SH-SY5Y utilizando shRNA mediante la transducción con lentivirales.....	43

Figura 17. Fraccionamiento celular de células SH-SY5Y silenciada para Netrina-4 tratadas con ligandos exógenos RGMa y Netrina-1.....	44
Figura 18. Cuantificación de la translocación de Neo ICD en células silenciadas para NTN4 en núcleo y citoplasma	45
Figura 19. Comparación del efecto de los ligandos endógenos en la translocación de Neo ICD al núcleo en células shNTN4 comparadas con células controles.....	46
Figura 20. Ensayo de viabilidad de yoduro de propidio de células silenciadas para Netrina-4 privadas de suero por 12 h.....	48
Figura 21. Las células shNTN4 tienen un aumento significativo de la apoptosis a las 24 h de privación de suero vía Caspasa-3 activada.....	49
Figura 22. Suma relativa estandarizada con respecto al control de Neo ICD total dependiendo de los tratamientos con ligandos exógenos RGMa y Netrina-1 en células shNTN4.....	55
Figura 23. Modelo propuesto con los resultados de este trabajo.....	62

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Partidores usados para RT-PCR.....	25
--	----

LISTADO DE ABREVIATURAS

APP	: amyloid precursor protein
CCM2	: cerebral cavernous malformation 2
cDNA	: DNA complementario
DAPI	: 4',6-diamidino-2-fenilindol
DCC	: Deleted in colorectal cancer
DEPC	: Di-etil pirocarbonato
DMEM	: Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	: Acido desoxirribonucleico
FNIII	: Fibronectina tipo 3
GADPH	: Glutaraldehído 3-fosfato deshidrogenasa
GFP	: Proteína fluorescente verde
GLHR1	: Grainyhead like 1
GNPs	: Células granulares progenitoras de cerebello
GPI	: Glicosilfosfatidil inositol
HUVEC	: Células endoteliales de la vena de cordón umbilical
Ig	: Inmunoglobulina
Kb	: Kilobase
kDa	: Kilodalton
LMB	: Leptomicina B
mRNA	: RNA mensajero
MIN6	: Células beta de islotes pancreáticos
NBCS	: Suero de ternera recién nacida
Neo1	: Neogenina 1
Neo ICD	: fragmento intracelular de Neogenina 1
NTN1	: Netrina-1
NTN4	: Netrina-4
PBS	: Búfer fosfato salino
PFA	: Para-formaldehído
PC12	: Línea celular de feocromocitoma de la médula adrenal de rata
DRG	: Ganglios de la raíz dorsal
RGMa	: Molécula de guía repulsiva A
RNA	: Ácido ribonucleico
rpm	: Revoluciones por minuto
RT-PCR	: Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa
SFB	: Suero fetal bovino
SK-N-SH	: Línea celular de neuroblastoma humano
shNTN4	: shRNA de Netrina-4
shRNA	: small hairpin RNA, RNA de interferencia
shSCR	: shRNA Scramble (control)
SH-SY5Y	: Línea celular de neuroblastoma humano
TFIIB	: Factor de transcripción IIB
UNC5	: Uncoordinated 5

RESUMEN

Neogenina 1, homólogo del receptor "Deleted in Colorectal Cancer" (DCC), es un receptor transmembrana implicado en guía axonal, angiogénesis, diferenciación neuronal, morfogénesis y muerte celular (apoptosis). Este receptor tiene sitios de unión a dos familias de ligandos, "Repulsive Guidance Molecules" (RGMs) y Netrinas. En el contexto de la guía axonal, la unión de Neogenina 1 con RGMA favorece la quimiorrepulsión, en tanto con Netrina-1, la quimioatracción. Una clasificación complementaria para Neogenina 1 lo ubica en la familia funcional de receptores de dependencia, los cuales poseen la característica común de iniciar o amplificar la apoptosis celular en ausencia de su ligando. Para Neogenina 1, a la fecha, sólo se ha reportado a RGMA como un ligando capaz de bloquear su actividad de receptor de dependencia, pero en otros contextos no se descarta a Netrina como posible ligando de dependencia del receptor. La unión de Neogenina 1 con RGMA propiciaría el procesamiento del tallo citoplasmático de Neogenina 1, liberando un fragmento (Neo ICD) que, al ser translocado al núcleo, actuaría como un regulador transcripcional. Nos parece, por tanto, interesante explorar si Netrina comparte esta función de ligando de dependencia en contextos celulares donde no se exprese RGMA.

Partiendo de la premisa que la expresión de Neogenina 1 es alta en líneas celulares humanas de neuroblastoma (SH-SY5Y y SK-N-SH), se caracterizó los ligandos de Neogenina 1 que estas líneas celulares producen. Se demostró que Netrina-4 es expresado por ambas líneas celulares, mientras que RGMA no fue detectado. Además las células SH-SY5Y no expresan DCC constituyéndose, por ende, en un modelo de estudio ideal para ensayar si el ligando expresado por dichas células, Netrina-4, es capaz de inhibir la función de receptor de dependencia de Neogenina 1 y determinar el mecanismo por el cual esto ocurre. Se evaluó si Neogenina 1 unido a

Netrina-4, sufre el procesamiento de su fragmento intracelular y posterior translocación al núcleo de forma constitutiva y se cuantificó la tasa de translocación nuclear de Neo ICD. Esto último, se realizó a través de tratamientos con RGMA o Netrina-1 exógeno en células nativas y silenciadas para Netrina-4. Se demostró que en células SH-SY5Y, además, hay una translocación basal de NeoICD dependiente del ligando Netrina-4 endógeno. No obstante, RGMA exógeno efectivamente aumentó la translocación nuclear de Neo ICD.

Finalmente, para determinar la contribución de Netrina-4 en la inhibición del efecto pro-apoptótico de Neogenina 1, se midió la muerte celular en células SH-SY5Y silenciadas para Netrina-4 por tinción con yoduro de propidio y por células positivas para Caspasa-3 activada, mediante citometría de flujo e inmunofluorescencia, respectivamente. Se observó que la muerte celular aumentó al doble en células silenciadas para Netrina-4 y que el número de células positivas para Caspasa-3 activada son significativamente mayores en células silenciadas para Netrina-4. Esto último, indicaría que la apoptosis es mediada por Caspasa-3, la cual es la vía de apoptosis mediada por Neogenina 1.

Por lo tanto, en este trabajo se demostró que Netrina-4 actúa como ligando de dependencia para Neogenina 1 y que la unión de Netrina-4 a Neogenina 1 propicia el corte del fragmento intracelular Neo ICD, el cual se transloca al núcleo impidiendo así, la actividad pro-apoptótica de Neogenina 1 en células de neuroblastoma humano.

ABSTRACT

Neogenin 1, a DCC (Deleted in Colorectal Cancer) homologue, is a transmembrane receptor implicated in axonal guidance, angiogenesis, neuronal differentiation, morphogenesis and apoptosis. This protein has binding sites for two families of ligands, RGMs (Repulsive Guidance Molecules) and Netrins. In the context of axonal guidance, the binding of Neogenin 1 to RGMa stimulates chemorepulsion, whereas with Netrin-1, the chemoattraction. A complementary classification for this receptor, places it in the functional family of dependence receptors, which have the common characteristic of initiating or amplifying the apoptosis pathway when the ligand is absent. For Neogenin 1, to date, only RGMa has been reported as a ligand capable to block its dependence receptor activity, but in other contexts, it is possible that Netrin could act as a dependence ligand for Neogenin 1. RGMa binding to Neogenin 1 promotes the processing of cytoplasmic tail of Neogenin 1, releasing a fragment (Neo ICD) that translocates to the nucleus and acts as a transcriptional regulator. Therefore, it seems interesting to explore whether Netrins shares this feature of ligand dependence in cellular contexts where RGMa is not expressed.

This work was based on the finding that Neogenin 1 expression is high in neuroblastoma cell lines (SH-SY5Y and SK-N-SH). Characterization reveals Netrin-4 expression in both cell lines while RGMa was not detected. Also, SH-SY5Y cells do not express DCC which makes them an ideal model to test if the ligand expressed by these cells, Netrin-4, is able to inhibit function of Neogenin 1 as dependence receptor and to evaluate the mechanism by which this occurs. We assessed whether Neogenin 1 bound to Netrin-4 undergoes processing of its intracellular fragment and posterior translocation to the nucleus by quantifying the nuclear translocation ratio of Neo ICD. This was done by applying either exogenous RGMa or Netrin-1 to native cells

compared to cells silenced for Netrin-4. Indeed, exogenous RGMa increased nuclear translocation of Neo ICD in SH-SY5Y cells, but it was shown that in these cells, there is also an endogenous ligand-dependent (Netrin-4) basal translocation.

Finally, in order to determine the contribution of Netrin-4 in the inhibition of pro-apoptotic function of Neogenin 1, cell death was measured by propidium iodide staining quantification by flow cytometry in SH-SY5Y cells silenced for Netrin-4. In addition, we measured activated caspase-3 positive cells by immunofluorescence to determine the mechanism which cell death is produced. We observed a two-fold increase in cell death in cells silenced for Netrin-4, while the number of activated Caspase-3 positive cells is significantly higher for cells silenced for Netrin-4, indicating that apoptosis is mediated by Caspase-3, which is the apoptotic pathway mediated by Neogenin 1.

In summary, in this work we showed that Netrin-4 acts as a dependence ligand for Neogenin 1 and that the binding of Netrin-4 to Neogenin 1 promotes cleavage of its intracellular fragment, Neo ICD, which translocate to the nucleus, preventing the pro-apoptotic activity of Neogenin 1 in human neuroblastoma cell lines.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Aspectos generales de Neogenina 1 y sus ligandos (RGM y Netrina):

Neogenina 1 (Neo1) es miembro de la superfamilia inmunoglobulina de receptores de transmembrana. Es un receptor multifuncional implicado en guía axonal, diferenciación neuronal, morfogénesis y muerte celular. La expresión de Neogenina 1 es prácticamente ubicua durante el desarrollo embrionario, particularmente en regiones donde existe una vigorosa proliferación, diferenciación y migración celular (Cole y cols, 2007). Se expresa en una variedad de tejidos, tales como sistema nervioso, músculo cardíaco, epitelio y mesénquima pulmonar, intestinal y estomacal. Además, está presente en el epitelio pancreático, mesénquima de las glándulas adrenales y riñón, cartílago en diferenciación ósea, en el músculo liso vascular y en tejido conectivo de extremidades y de la cara (Fitzgerald y cols, 2006).

Durante el desarrollo embrionario en el Sistema Nervioso Central, Neogenina 1 se expresa en precursores neurogénicos y gliogénicos en división. En el adulto, su expresión se mantiene en aquellas estructuras cerebrales que sostienen una activa neurogénesis post-natal, como ocurre en el hipocampo y en el cerebelo. Además, es posible encontrarla en poblaciones de células neurales troncales adultas residentes en la zona subventricular del prosencéfalo, atribuyéndole a Neogenina 1 un rol de mantención y proliferación de células troncales y progenitores en el adulto (Fitzgerald y cols, 2006; Fitzgerald y cols, 2007, Milla y cols, 2013).

En el Sistema Nervioso Periférico, se describió inicialmente la expresión de Neogenina 1 en el desarrollo de los ganglios de la raíz dorsal (DRG) en el modelo de pollo. Neogenina 1 se expresa en el estadio 23 del desarrollo (E3.5) en todos los DRG, con un aumento sostenido hasta el estadio 35 (E8.5), donde alcanza su máximo nivel

de expresión (Guan y cols., 2003). Este dato es relevante, ya que el modelo a utilizar en este trabajo, el neuroblastoma, se genera justamente en los DRG durante su desarrollo.

Neogenina 1 fue inicialmente descrita como un homólogo de DCC. Estas proteínas comparten alrededor del 50% de identidad aminoacídica y poseen la misma estructura secundaria, consistente en un dominio extracelular que contiene cuatro bucles tipo Inmunoglobulina y seis regiones repetidas tipo Fibronectina-III (FnIII), seguido por una única región transmembrana y un tallo citoplasmático conteniendo tres dominios conservados con DCC, referidos como P1, P2 y P3 (Figura 1) (Wilson y Key, 2007). Además, el tallo citoplasmático posee un sitio consenso conservado de corte por Caspasa-3, cuya secuencia aminoacídica CCTD (Matsunaga y cols, 2004) es altamente conservada en mamíferos (Goldschneider y Mehlen, 2010). Además, en la región N-terminal del tallo citoplasmático se encuentran señales de localización nuclear y en la región C-terminal, señales de exportación nuclear. Finalmente, flanqueado por estas señales de destinación, se ubica el sitio de corte para Caspasa-3 (Goldschneider y cols, 2008).

Neogenina 1 interactúa con miembros de las familias de ligandos RGM (Repulsive Guidance Molecule) y Netrina (Figura 1). Neogenina 1 fue inicialmente descrito como un receptor de guía axonal. Así, la interacción entre Neogenina 1 y RGMa repele axones y genera el colapso del cono de crecimiento. Por otro lado, la interacción entre Netrina-1 y Neogenina 1 promueve la guía axonal quimioattractiva y la migración celular como también la adhesión célula a célula (Wilson y Key, 2006). RGM es una glicoproteína unida a un tallo GPI (glicosilfosfatidil inositol) que no tiene homología con otras moléculas de guía axonal. Los tres ortólogos en ratón de esta

proteína son RGMa, RGMb (DRAGON) y RGMc (Hemojuvelina) (Wilson y Key, 2006). Por otro lado, la familia de las Netrinas pertenece a la superfamilia de proteínas tipo laminina las cuales contienen cinco miembros distintivos: Netrina-1, -2, -3,-4 y Netrina-G. Netrina-4 es el miembro más distante de la familia de las Netrinas en términos de su secuencia primaria y en su dominio estructural globular, el cual está más relacionado con Laminina que con otras Netrinas (Yin y cols, 2000). Neogenina 1 puede unir a Netrina-1 -2 -3 -4 pero fisiológicamente la actividad de Netrina-1 y Netrina-3 son redundantes con respecto a Neogenina 1 (Wilson y Key, 2006).

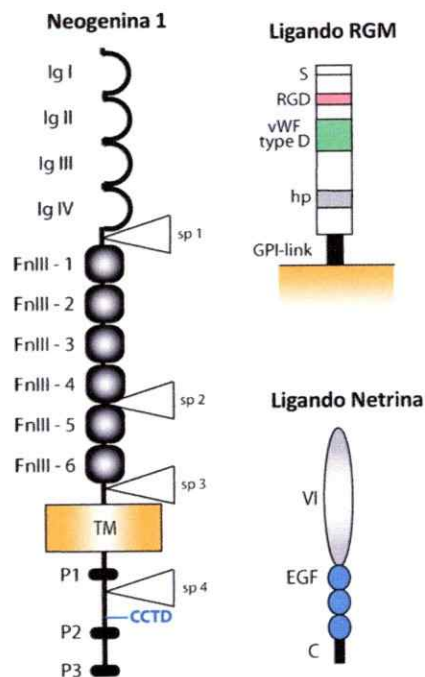


Figura 1. Esquema de la estructura de la proteína Neogenina 1 y sus ligandos. Neogenina 1 consiste en cuatro dominios tipo Ig, seis repeticiones de fibronectina tipo III (FNIII), un dominio transmembrana y un tallo citoplasmático con tres dominios conservados con DCC, P1, P2 y P3. También, presenta un dominio de sustrato para Caspasa-3, CCTD. Se indican en triángulos los sitios de procesamiento alternativo descritos en la secuencia de ratón. Además, se muestran los ligandos Netrina y RGM de Neogenina 1 (Adaptado de Wilson & Key, 2006.)

Las distintas funciones de Neogenina 1 producto de la unión a cada uno de sus ligandos son detalladas a continuación (Figura 2). Con respecto a las funciones de Neogenina 1 en interacción con RGM, se identificó a RGMa como un ligando de alta afinidad usando una librería de cDNA de retina (Rajalopalan y cols, 2004). También se demostró que Neogenina 1 es el receptor de guía axonal responsable de la quimiorepulsión mediada por RGMa en axones de la retina temporal en el tectum anterior de pollo (Wilson y Key, 2006). Además, se ha visto que Neogenina 1 participa en la diferenciación neuronal en el embrión de pollo a través de su unión a RGMa, ya que la sobreexpresión o el silenciamiento de RGMa en tectum de pollo embrionario causa una proyección errante de los axones retinales (Matsunaga y cols, 2006). Ambas evidencias sugieren fuertemente una función quimiorepulsiva de RGMa.

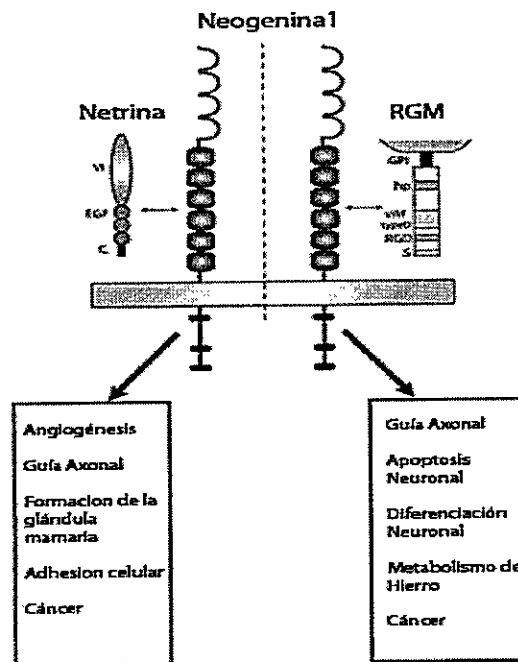


Figura 2: Esquema ilustrativo de las distintas funciones de Neogenina 1 dependiendo de la unión a sus ligando RGM o Netrina. (Adaptado de Wilson y Key, 2006.)

Tanto RGMb como RGMa se expresan en el sistema nervioso en patrones de expresión complementarios durante el desarrollo. RGMb está localizado en neuronas post-mitóticas donde la expresión de DCC es prominente. En contraste, RGMa está restringido a la zona ventricular donde se sobrepone fuertemente con la expresión de Neogenina 1 (De Vries y Cooper, 2008). Por otro lado, RGMa induce condrogénesis mediante la formación de un supercomplejo que involucra a la vía de señalización de BMP (Bone Morphogenetic Protein). Así, RGMa propicia la formación de un complejo en balsas lipídicas que involucra al receptor de BMP y Neogenina 1 (Zhou y cols, 2011). Además, RGMa tiene un papel en la actividad pro-apoptótica de Neogenina 1, como será detallado más adelante. En tanto, RGMc se expresa ampliamente en músculos estriados e hígado aunque no se ha reportado expresión en el sistema nervioso. Se ha visto, además, que esta proteína posee una función en la homeostasis de hierro, ya que mutaciones en su secuencia causan hemato cromatosis juvenil. Más aún, se ha reportado que hay acumulación de hierro dependiente de la interacción entre Neogenina 1 y RGMc en células HEK293 (Wilson y Key, 2006). En conjunto, estos antecedentes sugerirían que la interacción de Neogenina 1 con RGMc mantendría los niveles de hierro intracelular. En resumen, las interacciones descritas de la familia de los RGM con Neogenina 1 están involucradas en guía axonal, diferenciación neuronal, apoptosis y homeostasis de hierro.

Las interacciones de las Netrinas con Neogenina 1 no son redundantes entre los distintos miembros de esta familia, ya que el contexto celular es muy importante para las distintas respuestas celulares que se generan producto de estas interacciones. Por ejemplo, la unión de Netrina-1 con Neogenina 1 participa en la guía axonal de forma quimioattractiva y probablemente promueve el establecimiento del epitelio

pseudoestraficado del tubo neural promoviendo la adhesión celular (De Vries y Cooper, 2008). Netrina-1 es requerida para el desarrollo de la glándula mamaria mediante su receptor Neogenina 1 (Srinivasan y cols, 2003), mostrando nuevamente una función adhesiva y migratoria. Netrina-1 tiene un papel como un factor no clásico pro-angiogénico en células musculares lisas vasculares durante la angiogénesis (Wilson y Key, 2006). Además, la interacción entre Netrina-3 y Neogenina 1 ha sido implicada en la inducción de mioblastos cultivados para formar miotubulos (Wilson y Key, 2006). También, se ha reportado que Netrina-4 participa en la angiogénesis en un contexto dependiente. Así, se demostró que Netrina-4 es un factor anti-angiogénico que media la unión entre Neogenina 1 y UNC5B (receptor transmembrana de Netrinas) (Lejmi y cols, 2008). Estos autores además indicaron que Netrina-4 se une directamente a Neogenina 1 y no a los receptores UNC5B o UNC5C. Igualmente, al neutralizar la unión de Neogenina 1 a Netrina-4 utilizando anticuerpos contra Neogenina 1, se inhibió el efecto quimioattractante de Netrina-4 sobre células epiteliales de la vena de cordón umbilical (HUVEC). Similarmente, el silenciamiento de UNC5B o Neogenina 1 produjo la neutralización del efecto inhibitorio de Netrina-4, sugiriendo que *in vitro* ambos receptores son esenciales para su función (Lejmi y cols, 2008). Por otro lado, en el contexto del desarrollo del pez cebra se demostró que Netrina-4 actúa como un factor pro-angiogénico por lo que existe una posible función de Netrina-4 contexto dependiente con respecto a su potencial angiogénico (Lambert y cols, 2012).

La expresión de Netrina-4 comprende ampliamente el sistema nervioso durante el desarrollo y en individuos adultos. Netrina-4 se localiza en zonas como el bulbo olfatorio, la retina, células granulares de cerebelo, neuronas hipocampales y corticales así como en neuronas de los DRG (Yin y cols, 2000). Esto último es relevante ya que

este antecedente podría dar luces del ligando que estaría interactuando con Neogenina 1 en las células de los DRG que originan al neuroblastoma.

Se ha demostrado que la interacción de Neogenina 1 con sus ligandos tiene distinta afinidad. Así, DCC y Neogenina 1 se unen a Netrina-1 con similar afinidad, mientras que Netrina-3 muestra cuatro veces mayor afinidad con Neogenina 1 comparado con DCC (Wilson y Key, 2006). RGMa en tanto se une específicamente a Neogenina 1 con una afinidad diez veces mayor que Netrina-1 y su sitio de unión está dentro de los seis dominios FNIII en Neogenina 1 (Rajagopalan y cols, 2004). Similarmente el sitio de unión putativo para Netrina-1, dado la alta homología de Neogenina 1 con DCC, está entre el 4^{to} y 5^{to} dominio FNIII de Neogenina 1, el cual podría superponerse con el sitio de unión a RGMa. De hecho, la pre-incubación de células PC12 (derivadas de feocromocitoma de rata) con Netrina-1 previene el colapso del cono de crecimiento dependiente de la interacción de Neogenina 1 con RGMa (Conrad y cols, 2007), dando evidencia que estos sitios estarían sobrepuestos. Sin embargo, aún no está claro si Netrina-1 y RGMa se pueden unir a Neogenina 1 simultáneamente o alternativamente si es que el ligando es mutuamente excluyente (De Vries y Cooper, 2008). Por su parte, RGMc se une a Neogenina 1 entre el 5^{to} y 6^{to} dominio FNIII en la región próxima a la membrana (Yang y cols, 2008). En la Figura 3, se resumen los sitios de unión de los ligandos a Neogenina 1 conocidos y los porcentajes de similitud de secuencia por dominio de Neogenina 1 con DCC (De Vries y Cooper, 2008).

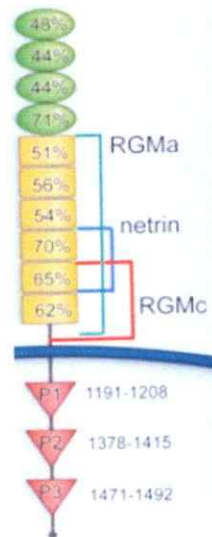


Figura 3: Esquema de los sitios de unión de ligandos a Neogenina 1 e identidad de secuencia entre dominios de Neogenina 1 y DCC. Los ovalos verdes representan a los dominios inmunoglobulina y los cuadros amarillos representan los dominios fibronectina III, los triángulos invertidos representan a los sitios P1, P2 y P3 entre Neogenina 1 y DCC, altamente conservados. RGMa interactúa con Neogenina 1 dentro de los seis dominios FNIII, Netrina-1, por homología con DCC interactúa entre el 4^{to} y 5^{to} dominio de FNIII y RGMc entre el 5^{to} y el 6^{to} y la zona proximal a la membrana. Se logra observar que las interacciones entre ligandos podrían solaparse (Adaptado de De Vries y Cooper, 2008).

1.2 Neogenina 1 como regulador transcripcional.

En el año 2008, Goldschneider y cols., presentaron evidencia que sugiere que el fragmento intracelular de Neogenina 1 (Neo ICD) se transloca al núcleo en presencia de su ligando RGMa. La porción extracelular de Neogenina 1 es cortada por una α -secretasa exponiendo un sitio de corte en su dominio extracelular, lo cual expone un sitio de corte en la porción intracelular de Neogenina 1, el cual es proteolizado por una γ -secretasa liberando el Neo ICD, el cual es importado o exportado desde y hacia el núcleo (Goldschneider y cols, 2008). La translocación de Neo ICD en el núcleo regula la transcripción génica de ciertos genes como el factor de transcripción GRHL1 (grainyhead like 1) y una proteína que participa en la formación de vasos sanguíneos

en sistema nervioso, llamada CCM2 (cerebral cavernous malformation 2). Asimismo, los autores determinaron que RGMa aumentó la unión de Neo ICD a las secuencias promotoras de los genes descritos anteriormente, tanto en células que expresan Neogenina 1 como en las que sobreexpresan Neo ICD *in vitro* (Goldscheider y cols, 2008). En resumen, estos resultados proponen que Neo ICD actuaría como regulador transcripcional de genes blanco, en presencia de su ligando RGMa (Figura 4). Sin embargo, se desconoce si Netrina-1 o Netrina-4 pudiesen tener dicha función descrita para RGMa como mecanismo de sobrevida celular.

La α -secretasa TACE (Tumor necrosis factor-alfa converting enzyme) o ADAM17 fue identificada como una metaloproteasa de transmembrana, la cual regula la sensibilidad de neuronas a RGMa mediante la inducción del corte del dominio extracelular de Neogenina 1 (Okamura y cols, 2011). El corte del dominio extracelular de Neogenina 1 por la proteína TACE inhibe el efecto de RGMa sobre las neuronas. Así, la inhibición de la TACE endógena aumentó la inhibición del crecimiento de las neuritas y el colapso de cono de crecimiento inducido por la interacción de RGMa con Neogenina 1 en neuronas corticales embrionarias. Por otro lado, la expresión exógena de TACE inhibió el efecto de RGMa (Okamura y cols, 2011). Sin embargo, es necesario determinar si TACE corresponde a la α -secretasa mencionada en el trabajo de Goldschneider y cols, 2008.

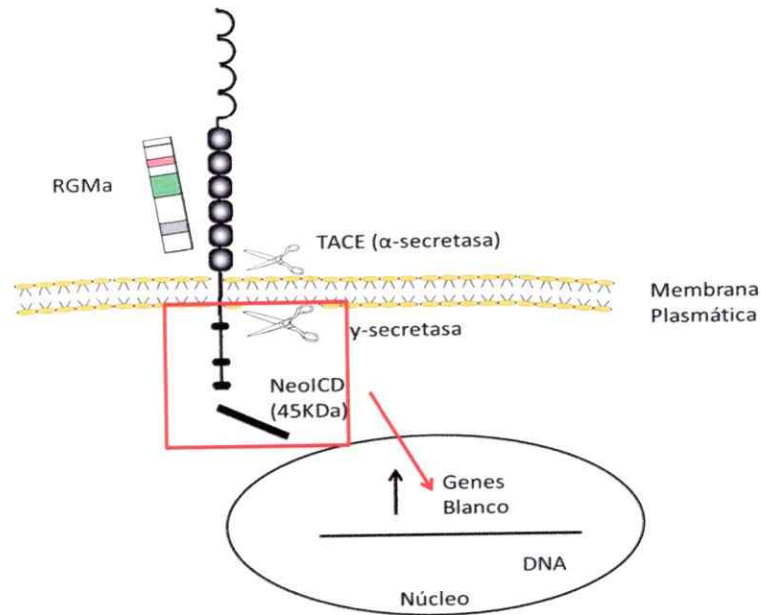


Figura 4: Esquema resumen del trabajo de Goldschneider y cols, 2008. Se observa que la unión de RGMa, genera el corte proteolítico de la porción extracelular de Neogenina 1 seguido el corte la fracción intracelular de Neogenina 1 por una γ -secretasa, liberando así Neo ICD. De esta manera, Neo ICD se transloca al núcleo y colabora en la transcripción de sus genes blanco. El fragmento Neo ICD está resaltado con un cuadro rojo. (Adaptado de Goldschneider y cols, 2008).

Similarmente se demostró que Neo ICD interactúa directamente con el co-activador transcripcional LMO4 (LIM domain only 4) en las líneas celulares SH-SY5Y de neuroblastoma y en células Ntera (carcinoma testicular), así como en neuronas corticales de rata. Así la unión de RGMa a Neogenina 1 indujo la separación de LMO4 y de Neo ICD; en cambio Netrina-1 no logra inducir este fenómeno (Schaffar y cols, 2008). Además, el silenciamiento de LMO4 previene la activación de RhoA, GTPasa que regula el citoesqueleto de actina y se activa por la interacción entre Neogenina 1 y RGMa. Además, el silenciamiento de LMO4 neutraliza la actividad repulsiva de RGMa a través de la desactivación de Rho en líneas celulares y en neuronas corticales de rata. Estos resultados sugieren que la interacción entre RGMa y Neogenina 1 inhibe la interacción de LMO4 con el fragmento intracelular de Neogenina 1 activando así a

RhoA (Schaffar y cols, 2008). De esta manera, la inhibición de la unión entre LMO4 y Neogenina 1 podría deberse al corte de Neo ICD mostrado en el trabajo de Goldschneider y cols, 2008. Sin embargo, faltan mayores antecedentes para entender el mecanismo intracelular de acción de Neogenina 1 mediante su unión a sus ligandos y dilucidar si las Netrinas (Netrina-1 o Netrina-4) podrían tener alguna función en este proceso.

1.3 Neogenina 1 como receptor de dependencia.

Neogenina 1 funciona como un receptor de dependencia en ciertos contextos celulares. Un receptor de dependencia es un receptor tal que la unión de su ligando bloquea el procesamiento proteolítico y su consecuente actividad pro-apoptótica observada en ausencia del ligando (Goldschneider y Mehlen, 2010). Esto genera un estado celular de dependencia a sus respectivos ligandos en una situación fisiológica (Figura 5).

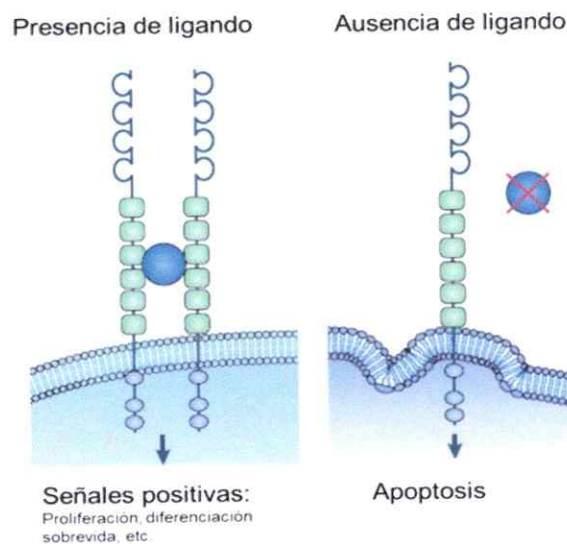


Figura 5: Esquema resumen de la función de los receptores de dependencia. Se observa que en presencia de su ligando, Neogenina 1 señala positivamente induciendo diferenciación o proliferación, mientras que en ausencia de su ligando, Neogenina 1 exhibe su actividad pro-apoptótica y lleva a la célula a apoptosis mediada por Caspasa-3. (Adaptado de Mehlen y cols, 2011).

A la fecha, se conocen cerca de una docena de receptores de dependencia, de diversa estructura pero igual comportamiento. De esta manera, la apoptosis es causada por el corte proteolítico del respectivo receptor mediada por la activación de caspasa-3 u otras proteasas, exponiendo así una región pro-apoptótica del dominio citoplasmático del receptor, tal como es el caso de DCC, Patched1, etc., o bien debido a la formación de fragmentos citoplasmáticos que inducen señales apoptóticas, tal como es el caso de RET, UNC5H, etc. (Goldschneider y Mehlen, 2010). La primera evidencia de la actividad pro-apoptótica de Neogenina 1 se encuentra a nivel de su estructura. El tallo citoplasmático contiene un sitio consenso de corte para Caspasa-3 que comienza en Asp1323 (secuencia aminoacídica CCTD). Cuando Neogenina 1 es cortado en este sitio, la porción N-terminal anclada a la membrana exhibe una actividad pro-apoptótica, induciendo la activación de Caspasa-3 y la subsecuente muerte celular (Wilson y Key, 2006). Cuando Neogenina 1 se une a su ligando RGMA, el corte inicial mediado por la Caspasa-3 activada es inhibido, permitiendo la supervivencia celular. En el contexto del desarrollo del tubo neural de embrión de pollo, se reportó que Neogenina 1 se comporta como un factor de dependencia en ausencia de su ligando RGMA. También, se demostró que Netrina1 no revertió el efecto pro-apoptótico de Neogenina 1. Adicionalmente, una forma soluble de RGMA también reprimió la actividad pro-apoptótica de Neogenina 1, por lo que, la unión entre Neogenina 1 y su ligando es suficiente para inhibir su actividad y el anclaje a la membrana (Matsunaga y cols, 2004).

Por otro lado, se reportó que Neogenina 1 puede interactuar con DAPK (Death Associated Protein Kinase) y que esta unión es suprimida por RGMA. Sin embargo, Netrina-1 no tiene el mismo efecto supresor (Fujita y cols, 2008). La interacción de Neogenina 1 con DAPK, regula su autofosforilación en el residuo de Ser308 localizado

en el dominio de unión a Calmodulina con una subsecuente inhibición de su actividad kinasa. Así, la interacción de DAPK con Neogenina 1, causa inhibición de autofosforilación de DAPK, mientras que la presencia del ligando RGMA restaura su función (Fujita y cols, 2008). Por otro lado, DCC no interactúa con DAPK, sugiriendo que su actividad pro-apoptótica procedería mediante otro mecanismo (Forcet y cols, 2001). De esta manera, se demostró que DCC interactúa tanto con Caspasa-3 y Caspasa-9 produciendo la activación de Caspasa-3 a través de Caspasa-9 sin el requerimiento de Citocromo C o Apaf-1 (Forcet y cols, 2001).

La muerte celular mediada por Neogenina 1 es inhibida en presencia de RGMA. Dado que la sobreexpresión de Neogenina 1 o el silenciamiento de RGMA induce apoptosis en el tubo neural de pollo *in vivo* (Matsunaga y cols, 2004), la co-expresión del dominante negativo o el siRNA de DAPK atenúa ese efecto, comprobando que la muerte celular mediada por Neogenina 1 depende de su interacción con DAPK (Fujita y cols, 2008). Se reportó además, que la muerte celular no fue inducida en la ausencia de RGMA en células granulares progenitoras de cerebelo (GNPs), por lo que estos resultados sugieren que la inducción de la muerte celular de Neogenina 1 es tipo celular específica y que podría depender del ligando que esté disponible. Con respecto a esto último, se ha observado que RGMA no es capaz de rescatar de la muerte celular mediada por Neogenina 1 en células de DRG y en células PC12. En ambos casos, frente a la adición de RGMA no se observó una disminución de la muerte celular determinado por TUNEL o marca para activada Caspasa-3 (Conrad y cols, 2007). Esto último sugiere que la muerte celular mediada por Neogenina 1 es contexto dependiente y que podría depender del ligando que se encuentre en el microambiente celular. En apoyo de esta hipótesis, se reportó que cuando se añadía Netrina-1 o Netrina-4

exógeno, hubo una disminución de la activación de Caspasa-3 bajo condiciones de alta glucosa en células beta de islotes pancreáticos (MIN6). Esto fue vinculado con la interacción de Neogenina 1 y UNC5H sin lograr discriminar al receptor por el cual sucede este fenómeno (Yang y cols, 2011). Por lo tanto, Netrina-4 también podría tener un rol como ligando de dependencia de Neogenina 1, lo cual no se ha confirmado aún en el sistema nervioso.

1.4 Neogenina 1 y sus ligandos en cáncer.

En condiciones fisiológicas se ha demostrado que Neogenina 1 funciona como receptor de dependencia, sin embargo en cáncer, existe poca información de su comportamiento. Dentro de los posibles mecanismos propuestos en cáncer para inhibir la función de un receptor de dependencia, se ha postulado: 1) la expresión autocrina de su ligando; 2) la pérdida de función del receptor mediante heterocigosis o silenciamiento epigenético, y 3) la pérdida de interacción con moléculas proapoptóticas como se muestra en la Figura 6 (Mehlen y cols, 2011). Por este motivo se buscó información sobre los niveles de expresión de Neogenina 1 y sus ligandos en cáncer.

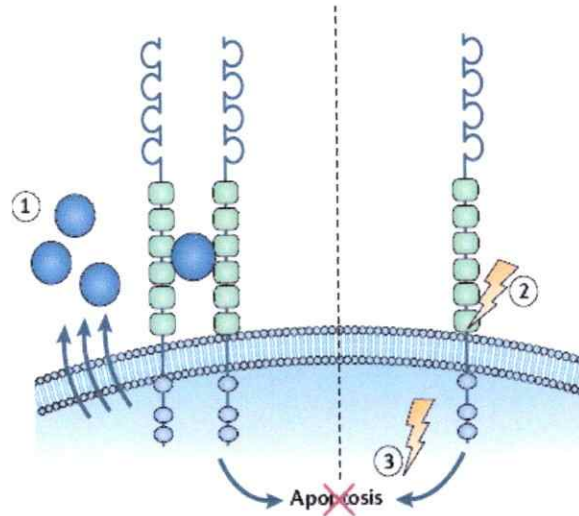


Figura 6: Mecanismo de receptor de dependencia en contexto de cáncer. Los mecanismos para reducir la actividad pro-apoptótica de los receptores de dependencia en una célula tumoral. 1) Expresión autocrina de ligando, 2) Pérdida de función del receptor mediante pérdida de heterocigosis o silenciamiento epigenético y 3) Pérdida de interacción con moléculas pro-apoptóticas. (Adaptado de Mehlen y cols, 2011.)

El gen de *Neogenina 1* se encuentra en el cromosoma 15q22, una región infrecuentemente alterada en cáncer. No se observaron alteraciones en la expresión de *Neogenina 1* en más de 50 tipos de cánceres estudiados incluidos neuroblastoma, colorectal, mama, cervical y pancreático (Meyerhard y cols, 1997). Sin embargo, en contexto de cáncer esofágico y en meduloblastoma se encontró un aumento de la expresión del gen *Neogenina 1* (Hu y cols, 2001; Milla y cols, 2013). Por el contrario, en cáncer de mama se observó una baja en la expresión de *Neogenina 1* con respecto a tejido sano (Lee y cols, 2005). En adenomas y cáncer colorectal, también se observó disminución en la expresión de *Neogenina 1* y de su ligando *RGMA*, producto de mecanismos epigenéticos, a través de la metilación del promotor de estos genes (Li y cols, 2009). En gliomas se observó que el nivel de expresión de *Neogenina 1* es menor en tumores que en los tejidos no neoplásicos que los rodean. Además, se encontró metilación en el promotor de *Neogenina 1* en líneas celulares de glioma (Wu y cols,

2012). Estos antecedentes indican que probablemente la expresión de *Neogenina 1* depende del contexto tisular de donde proviene el cáncer o su estado de progresión.

Con respecto a los ligandos de Neogenina, se observó que Netrina-4 inhibe la tumorigénesis de cancer colorectal bloqueando la angiogénesis mediante su interacción con Neogenina 1 (Eveno y cols, 2011). Un análisis de más de 400 tumores primarios de "The Cancer Genome Atlas Repository", reveló que la expresión de Netrina-4 está significativamente disminuida en glioblastomas. La supresión de la expresión de Netrina-4 en líneas celulares de glioblastoma reduce significativamente la proliferación y motilidad celular y aumenta la apoptosis inducida por privación de suero (Yizhu y cols, 2012). Por otro lado, la sobreexpresión de Netrina-4 redujo marcadamente la progresión del cáncer colorectal en términos del número de tumores y del volumen de metástasis al hígado en ratones utilizados como modelo ortotópico de metástasis en el hígado (Eveno y cols, 2013). Además, la sobreexpresión de Netrina-4 disminuyó la recurrencia del tumor y la metástasis luego de la resección quirúrgica vía un efecto anti-angiogénico (Eveno y cols, 2013).

Por otra parte, se observó que Netrina-1 muestra una actividad proto-oncogénica en algunos cánceres, debido a su la habilidad de estimular sobrevida y angiogénesis cuando se une a sus receptores. Se reportó además que algunos cánceres producen una forma truncada intranuclear de Netrina-1 a través de un promotor alternativo interno. Esta forma truncada promueve la proliferación celular potencialmente por aumentar específicamente la biogénesis del ribosoma (Delloye-Bourgeois y cols, 2012).

1.5 Expresión de ligandos de Neogenina 1 en neuroblastoma.

El modelo que se utilizará en este trabajo es neuroblastoma, un cáncer pediátrico derivado de las células de la cresta neural, las cuales expresan Neogenina 1 durante su desarrollo y cuya expresión se mantiene durante el proceso cancerígeno. El neuroblastoma es uno de los tumores sólidos malignos más frecuentes en los niños y más frecuente en el periodo de lactante. El 95% de los casos se diagnostica antes de los 10 años de edad y el 90% ocurre en menores de 5 años. En la casuística del grupo cooperativo chileno del Programa Infantil de Drogas Antineoplásicas (PINDA), el neuroblastoma representa el 4,2% de las neoplasias de la infancia (Carmen y cols, 2005).

El neuroblastoma se origina a partir de alteraciones en la conducta de los neuroblastos simpáticos post-ganglionales derivados de la cresta neural embrionaria. La cresta neural es una estructura transitoria que surge durante el cierre del tubo neural (Thiele, 1998). Este cáncer es propio de células no diferenciadas de los DRG, las cuales pueden diferenciarse, sufrir regresión, maduración a ganglioneuroma benigno o tumor metastásico (Choudhury y cols, 2012). Por lo tanto, un crecimiento celular descontrolado de las células de la cresta neural ubicadas en los DRG, dan origen a neuroblastoma durante el desarrollo embrionario. Las características genéticas del neuroblastoma incluyen amplificación o pérdida alélica del oncogen *N-Myc*; deleción del brazo corto del cromosoma 1; y alta expresión de los receptores de neurotrofinas (TrkA y TrkB). Todas estas características están asociadas con malignidad y progresión del tumor. Además los tumores malignos de neuroblastoma están altamente vascularizados para sostener el crecimiento, invasión y metástasis (Choudhury y cols, 2012).

Existen diversas líneas de evidencia que indican que la resistencia a la apoptosis es un pre-requisito para la progresión de los neuroblastomas (Delloye-Bourgeois y cols, 2009), por lo que resulta importante establecer el posible rol de Neogenina 1. A la fecha, no se ha estudiado la expresión de RGMA en las células de neuroblastoma, sin embargo, se sabe que la expresión de Netrina-1 está disminuida o es indetectable en el 50% de los neuroblastomas y tumores intracraneales estudiados. También, se han reportado mutaciones *missense* en codones altamente conservados de Netrina 1 en neuroblastomas (Meyerhard y cols, 1999). Por el contrario, otro estudio reveló que en una gran fracción de neuroblastomas, extraídos de pacientes en estadio 4 (etapa final del cáncer: metástasis del tumor en tejidos distantes) existía una sobreexpresión de Netrina-1, la cual confería una ventaja selectiva para la sobrevivencia de las células de neuroblastoma. Además, se observó que la disrupción de la expresión de Netrina-1 inhibió la metástasis en modelos de tumorigénesis de ratón y de pollo (Delloye-Borgeois y cols, 2009). Asimismo, los autores demostraron una baja expresión de Netrina-1 en líneas celulares, incluyendo las células SH-SY5Y (Delloye-Borgeois y cols, 2009). Finalmente, tomando como antecedente que Netrina-4 se expresa en neuronas de los DRG (Yin y cols, 2009), se sugiere que dicha expresión podría verse alterada en un contexto de neuroblastoma.

Considerando lo anterior, se propone a Netrina como ligando que podrían mediar la actividad de Neogenina 1 como receptor de dependencia, promoviendo la translocación nuclear de Neo ICD en células de neuroblastoma humano como parte de un mecanismo de supervivencia celular del tumor. Un esquema representativo de la propuesta se observa en la Figura 7.

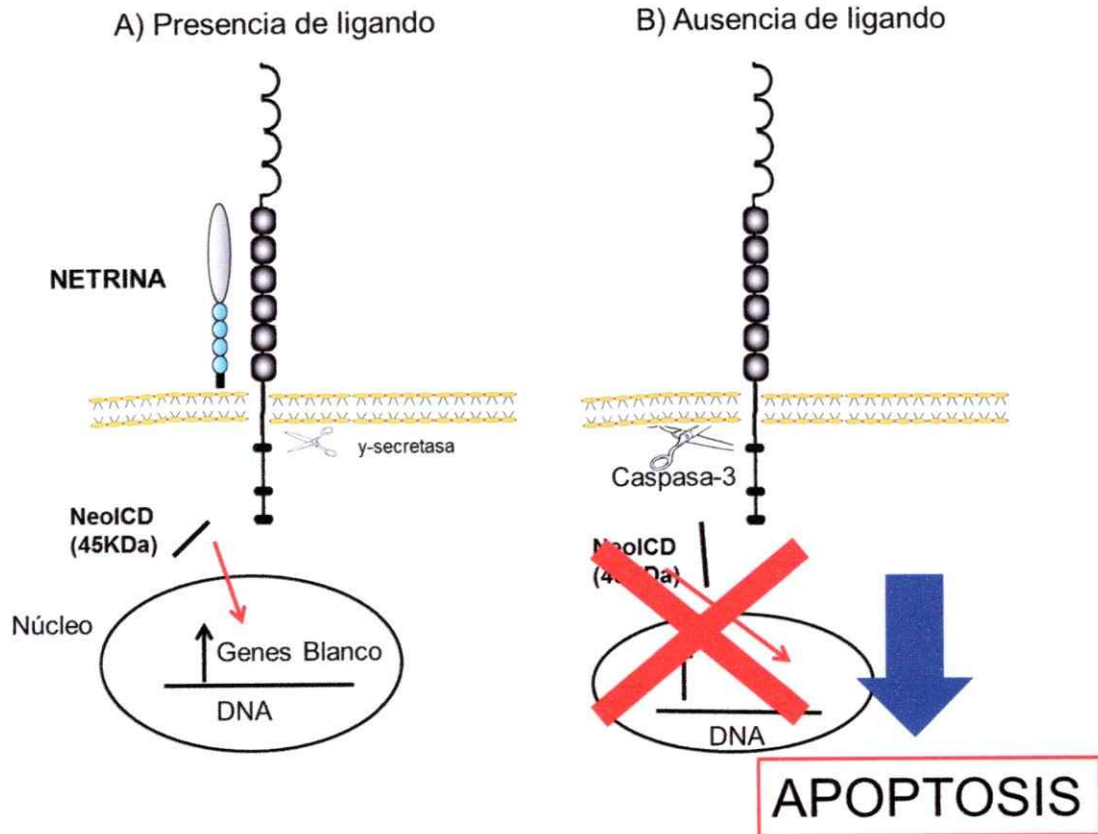


Figura 7: Esquema que muestra la hipótesis de este seminario de título. Netrina inhibe la función pro-apoptótica de Neogenina 1 mediante el favorecimiento de la translocación nuclear de Neo ICD. A) En presencia de ligando, se produciría el corte y translocación al núcleo de Neo ICD, proceso que bloquearía la apoptosis mediada por Neogenina 1. B) En ausencia de ligando, Neogenina 1 sería cortada en su porción intracelular por Caspasa-3 activada, lo cual propiciaría la apoptosis celular.

2. HIPÓTESIS:

La función pro-apoptótica del receptor de dependencia Neogenina 1 es inactivada mediante la translocación nuclear de su fragmento intracelular en respuesta a Netrina en células de neuroblastoma humano.

3. OBJETIVOS:

3.1 Objetivo general

Comprobar la inactivación de la función de Neogenina 1 como factor de dependencia en respuesta a Netrina a través de la translocación del fragmento intracelular de Neogenina 1 al núcleo en un modelo *in vitro* de neuroblastoma humano.

3.2 Objetivos específicos

1. Caracterizar la expresión de Neogenina 1 y sus ligandos, RGMa, Netrina-1 y -4, en las líneas celulares de neuroblastoma humano SH-SY5Y y SK-N-SH.
2. Evaluar la translocación nuclear del dominio intracelular de Neogenina 1 en respuesta a los ligandos RGMa y Netrina-1 en la línea celular de neuroblastoma humano SH-SY5Y.
3. Evaluar la translocación nuclear del dominio intracelular de Neogenina 1 en respuesta a los ligandos RGMa y Netrina-1 en las células SH-SY5Y silenciadas para Netrina-4.
4. Determinar la función como receptor de dependencia de Neogenina 1 en las células SH-SY5Y en respuesta a Netrina-4.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Materiales

4.1.1 Cultivos Celulares

- Las células SH-SY5Y (ATCC #CRL-2266) y SK-N-SH (ATCC #HTB-11) provienen de la metástasis en médula ósea de un neuroblastoma humano.
- Células HEK293T (ATCC # CRL-1573) originadas desde riñón embrionario humano.

4.1.2 Cultivos Primarios de tejidos humanos y de ratón

- Células endoteliales de la vena de cordón umbilical humano (HUVEC).
- Cultivo primario de células precursoras granulares neuronales de cerebelo (GNP) de ratón en estadio P7.

4.1.3 Anticuerpos

- Los anticuerpos primarios anti-Neogenina 1 (#sc-6536), anti-DCC (#sc-6535), anti-TFIIB (#sc-225) y anticuerpos secundarios HRP-anti Goat (#sc-2020) fueron obtenidos de Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, California, USA).
- Los anticuerpos primarios anti-Netrina 4 (HYR01) y anti-RGMA (AF2459) fueron obtenidos de R & D Systems.
- Los anticuerpo primarios anti β -actina (A5316), anti α -tubulina (T9026) fueron obtenidos de Sigma (Taufkirchen, Germany).
- El anticuerpo primario anti-Notch activado (ab8925) fue obtenido de Abcam (San Francisco, California, E.E.U.U.)
- El anticuerpo primario anti-cleaved Caspase-3 (9661) fue obteniendo de Cell Signaling (Beverly, MA, E.E.U.U.)

- Los anticuerpos secundarios IgG Alexa Fluor ® 555 Donkey anti-goat (A21432) y IgG FITC Goat anti-rabbit (81-6111) fueron obtenidos de Invitrogen (New York, EEUU).

4.1.4 Plasmidios

- pCMV-VSV-G (plásmido que codifica para la proteína VSV-G de la cápside viral), Openbiosystems, Huntsville, AL.
- p8.91 (plásmido que codifica las proteínas de replicación viral), Openbiosystems, Huntsville, AL.
- pGIPZ-shRNA (plásmido que contiene la secuencia de interferencia, además del marcador de selección GFP), Openbiosystems, Huntsville, AL.

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Cultivos Celulares

Las líneas celulares de neuroblastoma humano SH-SY5Y y SK-N-SH se cultivaron en medio DMEM (# 12800-017, Invitrogen) en un rango de concentraciones de SFB (# SH30071.03, Invitrogen) que va desde 2.5% a 10%, dependiendo del experimento. Las células se mantuvieron en incubador húmedo a 37°C y al 5% de CO₂. El medio se suplementó con Penicilina/Streptomycin (Thermo Scientific) con una concentración final de 50 U/mL /50 µg/mL, respectivamente. Las células se subcultivaron al alcanzar una confluencia del 80%. Todos los experimentos se realizaron con células entre los pasajes 20 y 30.

La línea celular HEK293T fue mantenida en medio DMEM con 10 % de SFB con antibióticos (Penicilina/Streptomycin 50 U/mL /50 µg/mL). Las células fueron utilizadas entre los pasajes 10 y 17.

El cultivo primario de HUVEC se generó a partir de cordones umbilicales humanos, que fueron facilitados por el banco de células madre Vida Cell previo consentimiento informado de los donantes, en el marco de una colaboración establecida con la Dra. Verónica Palma. Luego de la entrega, fueron transportados desde la sala de maternidad al laboratorio. Brevemente, la vena umbilical fue lavada con PBS 1X temperado a 37°C y las células endoteliales fueron aisladas por digestión con colagenasa (0.2 mg/mL) (# 41h12762, Worthington) y cultivadas a 37°C a 5% CO₂ hasta el pasaje 6 en medio M199 (#31100-035, Invitrogen) suplementado con 10% suero de ternera recién nacido (#16010-159, Invitrogen); 10% SFB (Invitrogen), 3.2 mM de L-glutamina (Invitrogen) y 100 U/mL de Penicilina-Estreptomicina (Thermo Scientific).

4.2.2 Extracción de RNA total

Una vez alcanzado el 80% de confluencia, las células se lavaron tres veces con PBS frío y se les adicionó RNA-Solv (Omega Bio-tek) en la proporción de 1 mL/ 60 cm² de superficie del cultivo. Luego, las células se homogenizaron con jeringa tuberculina y se les adicionó 200 µL de cloroformo, se mezcló en vórtex por 15 segundos y se incubó en hielo por 10 min. Después, se centrifugó a 14.000 g por 15 min a 4°C. Se extrajo la fase acuosa y se transfirió a un nuevo tubo con 500 µL de isopropanol frío. Las muestras fueron suavemente invertidas y se observó el ovillo de precipitación de RNA. Las muestras se incubaron por 10 min a temperatura ambiente y se centrifugaron a 12.000 g por 15 min a 4°C. El sobrenadante fue descartado y el precipitado se lavó con 500 µL de etanol al 80%, se mezcló en vórtex y se centrifugó a 7500 g por 5 min a 4°C. El etanol se descartó y se dejó secar a temperatura ambiente por 15 min. El precipitado se resuspendió en agua con DEPC.

4.2.3 Síntesis de DNA complementario y PCR

Tratamiento con DNAsa

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

Síntesis de DNA complementario

Al RNA tratado con DNAsa se le agregó 0,5 µL de partidores de secuencia aleatoria (3 µg/µL de concentración), 4 µL de tampón de reacción 5X, 0,5 µL de RNAsin, 2 µL de dNTPs (10 mM), 1 µL de la enzima Reverted AID TM Transcriptase (200 U/µL) y se llevó a 20 µL con agua DEPC. Se incubó por 1 h a 42°C. La reacción se detuvo incubando 10 min a 70°C. El cDNA fue almacenado a -20°C.

RT-PCR

Las amplificaciones de cDNA se realizaron utilizando el sistema comercial GoTaq (Promega), siguiendo las especificaciones del fabricante. La amplificación de Neogenina 1, RGMa, Netrina-1, Netrina-4 se realizaron con 35 ciclos de amplificación y GAPDH con 30 ciclos de amplificación. La visualización de las bandas se hizo en un gel de agarosa al 2% de resolución. Los partidores utilizados se indican en la tabla 1.

Tabla 1: Partidores utilizados en RT-PCR, donde se muestra la secuencia sentido y antisentido, la Temperatura de Melting (TM) de cada partidor y el tamaño en pares de bases de cada fragmento obtenido

Partidores RT-PCR	Secuencia Sentido	Secuencia Antisentido	TM (°C)	Fragmento (bp)
<i>GAPDH</i>	5' TGCACCACCAACT GCTTAGC 3'	5' GGCATGGACTGTGGT CATGAG 3'	55	87
<i>Neogenina 1</i>	5' GCTTCATCAAATT GACGTGGCGGA 3'	5' AGATGTACACGGTCG CTGGCATT 3'	57	168
<i>RGMa</i>	5' ATGGATGGGTATG GGGAGAG 3'	5' TGCACTTGAGGATCT TGCAC 3'	55	116
<i>Netrina-1</i>	5' TGCAAGAAGGACT ATGCCGT 3'	5' GCTCGTGCCCTGCTT ATACAC 3'	55	108
<i>Netrina-4</i>	5' TCAGCACAACACA GAAGGACA 3'	5' GGATGGCAGGAACAC GGTTTG 3'	55	111

4.2.4 Western Blot

Las células fueron lisadas con tampón de lisis (SDS 2%, glicerol 10%, Tris-HCl 5 mM pH 6,8) suplementado con inhibidor de proteasas (Halt™ Protease & Phosfatase Inhibitor Cocktail, Thermo Scientific.). Luego se homogenizaron con una jeringa tuberculina y se calentaron por 5 min a 95°C en tampón de carga 6X (Tris-HCl 1M, pH 6,8, glicerol 3%, SDS 10%, azul de bromofenol 1,8 x10⁻⁴ M, β-mercaptoetanol 0,7 M.). Se reservaron alícuotas de las muestras para cuantificar la concentración de

proteínas por sistema comercial Bio-Rad DC Protein Assay, siguiendo las indicaciones del fabricante. Se cargaron 20 µg de proteína en un gel al 7,5% acrilamida/bisacrilamida. La electroforesis se realizó en tampón de corrida (Tris Base 25 mM, Glicina 0,19 M, SDS 0,1%) aplicando voltaje constante de 100 V durante 90 min. La electrotransferencia de proteínas se realizó a una membrana de nitrocelulosa en tampón de transferencia (Tris Base 48 mM, 39 mM, SDS 0,37%, metanol 20%) durante 2 h a 400 mA. Para la visualización de las proteínas transferidas se usó el colorante Rojo Ponceau.

Para la inmunodetección de proteínas, la membrana se bloqueó 1 h con solución de bloqueo (leche descremada al 5 ó 1% disuelta en solución TBS [Tris-HCl 0,5 M, NaCl 1,5 M, pH 7,4] –Tween] a temperatura ambiente en agitación. Después, la membrana se incubó con el anticuerpo primario en solución de bloqueo toda la noche a 4°C en agitación moderada. Luego, la membrana se lavó con solución de lavado (TBS-Tween al 0,1%.) tres veces 10 min en agitación fuerte. Se incubó con el anticuerpo secundario acoplado a HRP durante 1 h a temperatura ambiente, diluido en solución de bloqueo. Finalmente, la membrana se lavó tres veces 10 min en solución de lavado y se procedió a revelar con el reactivo quimioluminiscente Pierce ECL Western Blotting.

4.2.5 Inmunocitoquímica

Células SH-SY5Y fueron sembradas en placa de 24 pocillos y tratadas con Leptomicina B (Sigma) a una concentración final de 50 ng/ml por 6 h y luego fueron fijadas con PFA 4%. Luego se lavó con PBS y se eliminó la peroxidasa endógena por medio de la solución que contenía: 3% H₂O₂, 50% Metanol en PBS. Luego, se realizaron sucesivos lavados con PBS. Al término de este paso, se bloquearon las

proteínas inespecíficas, incubando con una solución de suero de caballo al 5% en PBS (Vector Biosystems) durante 1 h a temperatura ambiente. Posteriormente, se incubó con el anticuerpo primario diluido en solución de bloqueo durante toda la noche a 4°C. Después de la incubación con anticuerpo secundario, se procedió a lavar con PBS y posteriormente, se incubó en solución AB (Vectastain) durante 30 min a temperatura ambiente, seguido de un último lavado antes del revelado. El proceso de revelado se realizó incubando con una solución de DAB en su diluyente (ImmPact DAB, Vector). Posteriormente, se deshidrataron las muestras, lavando en concentraciones crecientes de etanol a partir de agua, luego, para luego montar con Entellan (Merck). Las muestras fueron observadas en microscopio óptico Olympus BX51 y fotografiadas con los objetivos de 100X.

4.2.6 Inmunofluorescencia

Se sembraron 20.000 células SH-SY5Y en placas de 24 pocillos con cubreobjetos tratados con poli-L-lisina. Para el ensayo de translocación nuclear se utilizó Leptomicina B (Sigma) por 6 h a una concentración final de 50 ng/ml, en células tratadas con los ligandos exógenos RGMA y Netrina-1 a la concentración de 200 ng/ml por 8 h. Por otro lado, para cuantificar la cantidad de Caspasa-3 activada, se utilizaron células transducidas establemente shSCR y shNTN4, en presencia de puromicina a una concentración final de 3 µg/ml y se les privó de suero por 24 h. Luego, a las 24 h de crecimiento, las células se lavaron con PBS y se fijaron con PFA al 4% (Merck) a 4°C, haciendo un recambio a los 15 min. Luego, las células se lavaron tres veces con PBS frío durante 5 min y el mismo procedimiento se realizó con PBS-Triton X 0,1%. Se bloqueó con solución de bloqueo durante 1 h a temperatura ambiente y se dejó incubando con el anticuerpo primario preparado en solución de bloqueo toda la noche

a 4°C. Se lavó tres veces con PBST durante 5 min y se incubó con el anticuerpo secundario 1 h a temperatura ambiente preparado en solución de bloqueo. Se lavó tres veces con PBST durante 5 min y se incubó con DAPI (Sigma) durante 3 min diluido en PBS, se lavó dos veces con PBS para finalmente proceder a montar los covers con reactivo GelMount. Se dejó secar toda la noche en oscuridad.

4.2.7 Generación de partículas lentivirales shRNA

La generación de las partículas lentivirales usadas para la transducción estable y silenciamiento de Netrina-4 en células SH-SY5Y se llevó a cabo en células empaquetadoras HEK293T. Para ello, se sembraron $1,5 \times 10^6$ células en DMEM con 10% de SFB sin antibióticos en placas de cultivo de 10 cm de diámetro tratadas previamente con poli-L-Lisina (Sigma Aldrich). Luego se transfectaron con los plásmidos VSVG (7 µg), CMVΔ8.91 (13 µg) y PGIPZ (13 µg); el cual contiene la secuencia target shNTN4 o shSCR en el caso control, además de la expresión reportera de la proteína TurboGFP, con el método de transfección con CaCl_2 (Sena-Esteves y cols, 2004). A las 48 h se recolectó el medio de placas transfectadas, el cual posee las partículas virales, y fueron centrifugadas a 500xg por 5 min a 4°C y filtrado con filtro de 0,4 µm y congelados a -80°C hasta su posterior uso. Un esquema resumen se puede observar en la Figura 8.

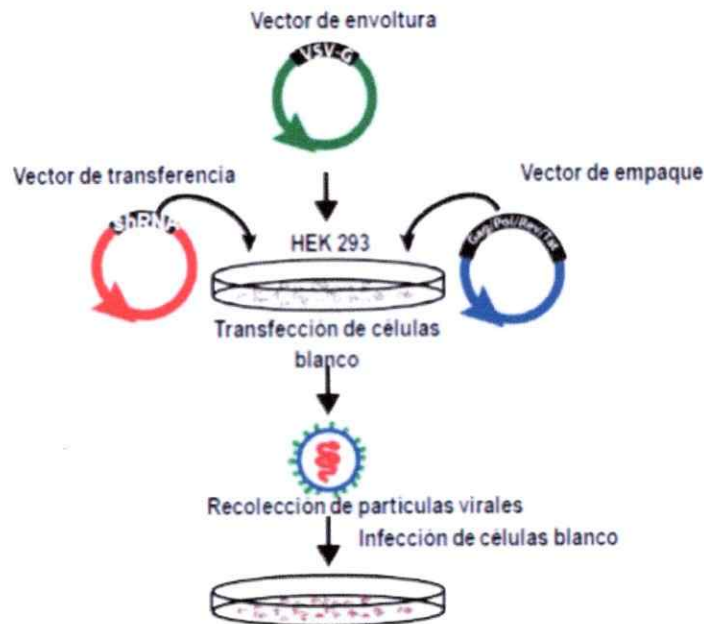


Figura 8. Obtención de partículas lentivirales shRNA. El proceso de producir lentivirus infeccioso transgénico, se resume en el esquema. Tres plásmidos son transfectados en la línea celular HEK293T: un vector de transferencia que codifica para el shNTN4 o shSCR (control), un vector de empaque y un vector que codifica para proteínas de la cubierta. Luego del cambio de medio y un breve período de incubación, el sobrenadante con el virus es recuperado, filtrado y almacenado a -80°C hasta su posterior uso.

4.2.8 Transducción y generación de una línea estable shNTN4 en células SH-SY5Y

A células SH-SY5Y, sembradas en placas p35, se les agregó en una proporción 1:1 medio con partículas lentivirales, las cuales contienen los shRNA (shNTN4 y shSCR) y medio DMEM 10% SFB con antibióticos. Pasadas 48 h se verificó por microscopía de epifluorescencia, la expresión de GFP (marcador de transducción). Si la transducción era superior al 10 %, a las células transducidas, se les cambió el medio por DMEM 10% SFB y se les agregó puromicina (marcador de selección del plásmido pGIPZ) a la concentración final de $3 \mu\text{g/ml}$ y se observó por 48 h para monitorear viabilidad. Luego, se lavaron las placas con PBS para remover las células muertas y se

les cambió de medio por DMEM 10% SFB con puromicina (concentración final 3µg/ml) y se mantuvieron hasta necesitarlas para los experimentos mostrados en este trabajo.

4.2.9 Viabilidad con Yoduro de Propidio

Células silenciadas para Netrina-4 (shNTN4) fueron sembradas junto a su control (shSCR) en placas P60, por 24 h, luego se les privó de suero por 12 h y se tripsinizaron y se colocaron 5×10^5 células por cada condición en tubos de citometría. Luego, se añadió Yoduro de Propidio (1 mg/ml) a los tubos y se midió por citometría de flujo en citómetro FACS CANTO II (Beckton Dickinson).

4.2.10 Fraccionamiento Celular

Se utilizaron células SH-SY5Y y células shNTN4 transducidas establemente, sembradas en placas P60 con $2 \cdot 10^6$ de células, sujetos a tratamientos con los ligandos RGMa o Netrina-1 exógeno por 8 h y el uso del inhibidor de proteosoma MG132 (Z-Leu-Leu-Leu-al, # C2211, Sigma Aldrich) a la concentración final de 1 µM por 10 h. Al pasar el tiempo de espera, las placas fueron dejadas en hielo por 10 min a lo menos y luego lavadas con PBS. Para soltar las células se rasparon con un *cell scraper* en presencia de PBS e inhibidores de proteasas. Para precipitar las células completas se centrifugó a 5000 rpm a 4°C. El pellet se resuspendió con 5 volúmenes de Buffer A (10mM Hepes, pH 7.8, 10mM KCl, 0,2mM EDTA, 1mM DTT), y luego se mantuvo en hielo por 10 min. En este proceso se lisan las células porque este es un buffer hiposmótico y la estructura nuclear permanece intacta. Para propiciar la lisis se homogenizó con un homogeneizador dounce aplicando 20 golpes. Para separar las distintas fracciones se centrifugó 15 min a 6000 rpm, (el sobrenadante tiene la fracción citoplasmática y el pellet contiene el núcleo); el sobrenadante se guardó a -80°C. Para evitar que la contaminación de la fracción citoplasmática a la nuclear se resuspendió el

pellet (núcleo) y se centrifugó 15 min a 6000 rpm por tres veces consecutivas para depletar de citoplasma. Luego, se resuspendió el pellet en un volumen de buffer C (20 mM Hepes pH 7.9, 420 mM NaCl, 1,5 mM MgCl₂, 0,2 mM EDTA, 25% glicerol, 1 mM DTT) con inhibidores de proteasas y se incubó por 60 min con rotación a 4°C. Al pasar este tiempo se centrifugó 15 min a 12000 rpm a 4°C y se guardó el sobrenadante que corresponde a las proteínas nucleares soluble a -80°C. Luego, estas fracciones pueden ser analizadas mediante Western Blot.

4.2.11 Análisis Estadístico

Todos los análisis estadísticos y los gráficos mostrados se hicieron con el programa GraphPad Prism 5. Para estudiar diferencias entre los grupos experimentales, se aplicó la prueba t-Student, considerando los resultados significativamente diferentes cuando $p < 0,05$, (*: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$). Para todos los casos, se graficó el promedio de los experimentos \pm la desviación estándar.

5. RESULTADOS

5.1 Caracterización de la expresión de Neogenina 1 y sus ligandos RGMa y Netrina-1 y -4 en las líneas celulares de neuroblastoma humano SH-SY5Y y SK-N-SH.

5.1.1 Neogenina 1 se expresa, en cambio DCC no se expresa en las líneas celulares de neuroblastoma humano.

Se investigó si las líneas de neuroblastoma humano SH-SY5Y y SK-N-SH expresan Neogenina 1. Para ello, se cultivaron células durante 48 h y se extrajo RNA total y proteínas. En la Figura 9A, se muestra la expresión de mRNA de *Neogenina 1* por medio de RT-PCR. Se observó que la expresión relativa de mRNA de *Neogenina 1* fue mayor en las células SH-SY5Y con respecto a las células de neuroblastoma SK-N-SH. La Figura 9B muestra los niveles de expresión de Neogenina 1 en líneas de neuroblastoma humano. En la línea celular SH-SY5Y, los niveles de Neogenina 1 son mayores con respecto a los encontrados en células SK-N-SH, corroborando lo observado en el RT-PCR. Finalmente, se evaluó la expresión de DCC en las SH-SY5Y, utilizando como control de expresión un cultivo primario de células precursoras granulares neuronales de cerebelo (GNP) de ratón en estadio postnatal P7 (Luis Solano, datos Laboratorio Verónica Palma), dado que se conoce que existe expresión de DCC en estas células (Alcántara y cols, 2000). Se observó que las células SH-SY5Y no expresan DCC, coincidentemente con lo presentado en la literatura (Glaß y cols, 2010).

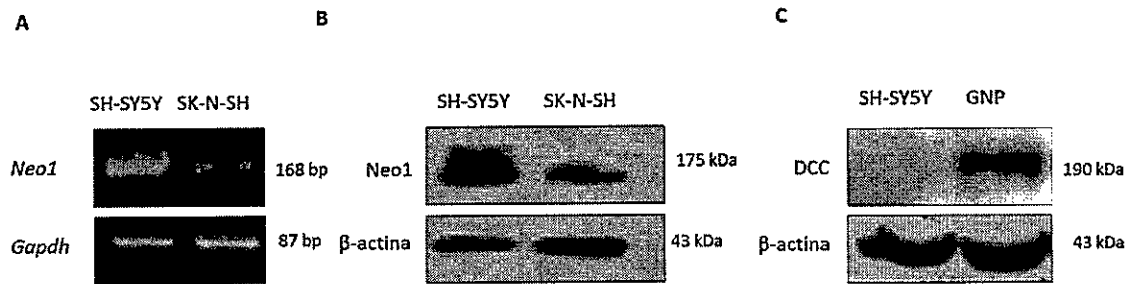


Figura 9: Expresión de Neogenina 1 y de DCC en líneas de neuroblastoma humano. **A** RT-PCR de *Neogenina 1* (*Neo1*) en las líneas celulares SH-SY5Y y SK-N-SH, *Gapdh* fue utilizado como control de carga. **B.** Western Blot de Neogenina 1 en las mismas líneas celulares utilizadas en el RT-PCR; se utilizó como control de carga β -actina cuyo peso molecular es de 43 kDa. El peso molecular de Neogenina 1 es de 175 kDa. Los niveles de Neogenina 1 se reducen aproximadamente a la mitad en la línea celular SK-N-SH. **C.** Western Blot de DCC en SH-SY5Y, cuyo peso molecular es de 190 kDa, utilizando como control de expresión, el cultivo primario de GNP (células precursoras granulares neuronales) de cerebelo de ratón en estadio P7.

5.1.2 Netrina-4 se expresa en las líneas celulares de neuroblastoma SH-SY5Y y SK-N-SH.

Con el objetivo de determinar que ligandos de Neogenina 1 expresan las líneas celulares de neuroblastoma, se extrajo RNA y proteínas de células cultivadas por 48 h y se midió la expresión de RGMA, Netrina-1 y Netrina-4 mediante RT-PCR y Western Blot, respectivamente. Como control de expresión, se utilizó un cultivo primario de células endoteliales de la vena de cordón umbilical humano (HUVEC), el cual expresa los ligandos de Neogenina 1: Netrina-1, Netrina-4 y RGMA (Carolina Ortíz, datos no publicados laboratorio Verónica Palma). La expresión de RGMA y Netrina-1, no se detectó en líneas celulares SH-SY5Y y SK-N-SH (Figura 10.A). Sin embargo, el mRNA de *Netrina-4* fue detectado en ambas líneas de neuroblastoma humano (Figura 10.A). Mediante Western Blot se corroboró la expresión de Netrina-4 y RMGA (Figura 10.B). La expresión de RGMA no es detectada en las líneas celulares SH-SY5Y y SK-N-SH, en tanto, la expresión de Netrina-4 se observa en ambas líneas celulares. Llama la

atención que la proteína migra a un tamaño distinto al que aparece reportado por el fabricante (90 kDa), el cual coincide con la banda a 70 kDa que se observa para el control de células HUVEC. Las distintas isoformas de Netrina-4 poseen un tamaño de 70 kDa aproximadamente, por lo que no podrían explicar el tamaño observado para Netrina-4. Sin embargo, Netrina-4 es una molécula altamente glicosilada (Patel y cols, 2012), lo que sugiere que el cambio en el peso molecular podría deberse a esta modificación tal como se ha reportado para Netrina-4 recombinante humana (Lambert y cols, 2011).

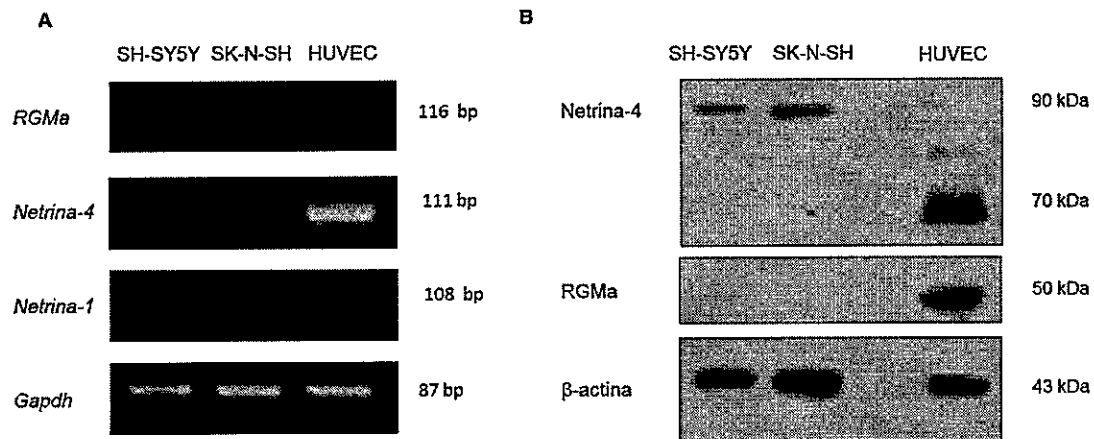


Figura 10: Expresión de los ligandos de Neogenina 1: RGMa, Netrina-1 y Netrina-4 en las líneas celulares de neuroblastoma humano. **A.** RT-PCR contra *RGMa*, *Netrina-4* y *Netrina-1*, indicando que las líneas celulares SH-SY5Y y SK-N-SH solamente expresan *Netrina-4*. El cultivo primario de células HUVEC fue utilizado como control de expresión de estos ligandos. **B.** Western Blot contra Netrina-4 y RGMa en las líneas celulares neuroblastoma SH-SY5Y y SK-N-SH. La expresión de Netrina-4 fue detectada en ambas líneas celulares a un tamaño distinto que el de células HUVEC (90 kDa). Además estas células de neuroblastoma humano no expresan RGMa.

5.2 Evaluación de la translocación nuclear del dominio intracelular de Neogenina 1, en respuesta a sus ligandos RGMA y Netrina-1, en células SH-SY5Y.

El segundo objetivo específico era determinar si el dominio intracelular de Neogenina 1 (Neo ICD) se transloca al núcleo, en condiciones basales y con tratamientos de ligandos RGMA y Netrina-1. Además, se observó si el tratamiento con ligandos exógenos modificaba la proporción de Neo ICD que se puede encontrar en el citoplasma y en el núcleo. La translocación de Neo ICD se analizó de esta forma, ya que se conoce que el Neo ICD se transloca dinámicamente al núcleo, pudiendo detectarse en el citoplasma (Goldschneider y cols, 2010). Para estos experimentos, se usó como modelo la línea celular de neuroblastoma humano SH-SY5Y, dado que ya se determinó que estas células expresan altos niveles de Neogenina 1, no expresan DCC y sólo expresan el ligando Netrina-4, constituyendo así un modelo ideal para este estudio.

5.2.1 El Neo ICD transloca constitutivamente al núcleo en la línea celular SH-SY5Y.

En primer lugar, se realizó una inmunocitoquímica contra Neogenina 1, utilizando un anticuerpo que reconoce su fragmento intracelular (Neo ICD). Previamente, las células SH-SY5Y fueron tratadas con 50 ng/ml de Leptomicina B (LMB) (un inhibidor de la exportación nuclear) por 6 h. Este inhibidor fue utilizado debido a que la translocación nuclear de Neo ICD es un proceso altamente dinámico, por lo que es necesaria su acumulación en el núcleo para su detección. La Figura 11.A es representativa de una inmunocitoquímica para Neogenina 1 (utilizando el anticuerpo específico para su porción intracelular) en presencia o ausencia de LMB. El conteo se realizó por triplicado contando 12 campos por condición en el microscopio óptico y

haciendo una relación con el total de células. En presencia de LMB se observó una acumulación de la marca de Neogenina 1 en el núcleo (indicado con flechas), a diferencia de la condición sin LMB, donde se observa una marca homogénea en el citoplasma. En la Figura 11.B se muestra la cuantificación de la inmunocitoquímica para Neogenina 1. Las células positivas para Neo ICD (que poseen una marca acumulada en núcleo) son significativamente mayores en presencia del inhibidor LMB que en ausencia de este. Por lo tanto, se puede observar que en células que expresan Neogenina 1 endógenamente, la translocación nuclear Neo ICD es constitutiva.

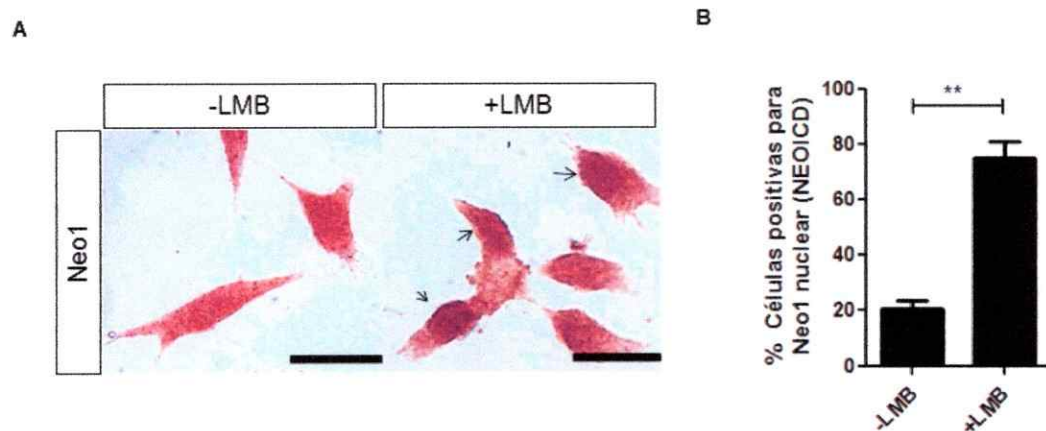


Figura 11: El dominio intracelular de Neogenina 1 (Neo ICD) transloca constitutivamente al núcleo en células SH-SY5Y. **A:** Inmunocitoquímica de Neogenina 1. Las células fueron tratadas con Leptomycin B (LMB) a la concentración final de 50 ng/ml por 6 h. Se puede observar que aumenta la marca de Neogenina 1 en el núcleo (indicado con flechas) cuando estas células se tratan con LMB, comparadas con su control, donde la marca se observa en toda la célula. **B.** Cuantificación de la inmunocitoquímica, en donde las células positivas para la marca de Neo ICD en el núcleo es significativamente mayor con el tratamiento de LMB. Barra: 50 μ m. **p <0,01; n=3

5.2.2 RGMa y Netrina-1 recombinante aumentan significativamente la translocación nuclear de Neo ICD en células SH-SY5Y.

Para poder determinar si los ligandos de Neogenina, RGMa o Netrina-1, tienen algún efecto en la tasa de translocación nuclear de Neo ICD, se realizó una doble inmunofluorescencia contra el fragmento intracelular de Neogenina 1 y Notch activado (como control positivo). Se ha reportado en la literatura que las células SH-SY5Y expresan constitutivamente Notch y que su fragmento intracelular se escinde y se transloca al núcleo (Hooper y cols, 2006). Las células fueron tratadas previamente con 200 ng/ml de RGMa y Netrina-1 (NTN1) durante 8 h (Goldschneider y cols, 2008) seguido del tratamiento con 50 ng/ml de LMB por 6 h. Además, se utilizó DAPI para marcar los núcleos y se cuantificó la co-distribución entre la marca de DAPI, Notch y Neogenina 1, utilizando el anticuerpo específico contra Neo ICD. En la Figura 12 se observan imágenes representativas de la inmunofluorescencia, en las cuales se visualizó que las células en presencia de LMB tratadas con RGMa poseen mayor marca nuclear para Neo ICD. Además, se cuantificaron las inmunofluorescencias y se calculó el porcentaje de células positivas para la marca nuclear de Neogenina 1 con respecto al número total de células, determinado por la marca de DAPI. Así, en presencia de RGMa, el porcentaje de células con marca nuclear para Neo ICD aumentó significativamente con respecto al control. Además, este aumento fue más pronunciado al usar RGMa, en vez de Netrina-1, sugiriendo que este efecto está favorecido con RGMa y podría indicar que la interacción de Netrina-1 con Neogenina 1 produciría otras respuestas, como por ejemplo la adhesión celular (Srinivasan y cols, 2003). Por otro lado, dado que la afinidad de RGMa con Neogenina 1 fue mayor que con la de Netrina-1 (Wilson y Key, 2006), es posible que esta diferencia en la afinidad

podría explicar que la translocación de Neo ICD en presencia de RGMa sea mayor que con Netrina-1.

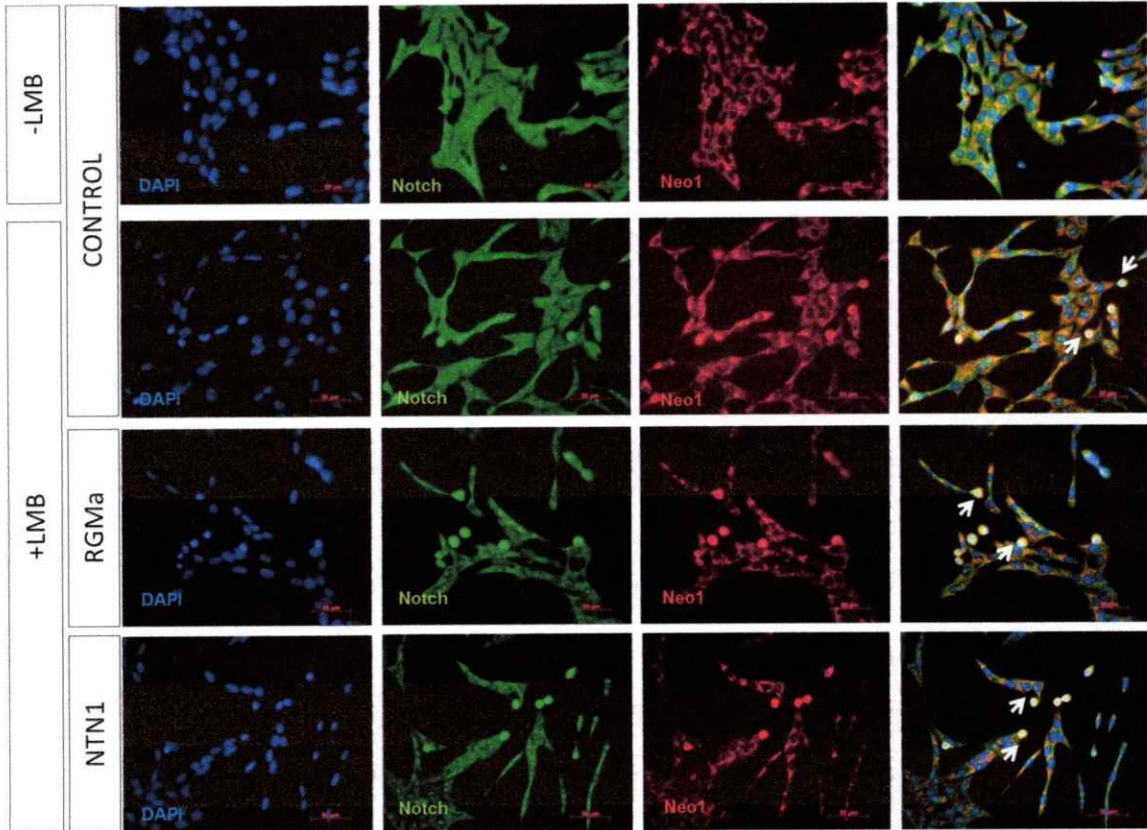


Figura 12: Efecto en la translocación nuclear de Neo ICD con los tratamientos con RGMa y Netrina-1 (NTN1) exógeno. Imágenes representativas de inmunofluorescencias de la línea celular SH-SY5Y, previamente tratada con los ligandos exógenos RGMa o Netrina-1 a la concentración final de 200 ng/ml por 8 h y con tratamiento con LMB a la concentración final de 50 ng/ml por 6 h. La inmunofluorescencia se realizó utilizando un anticuerpo específico contra el fragmento intracelular de Neogenina 1 (Neo ICD) (Rojo) y se utilizó como control Notch activado (Verde). Para marcar los núcleos se utilizó DAPI (azul) y se contó la co-distribución entre Neo ICD y DAPI (flechas blancas).

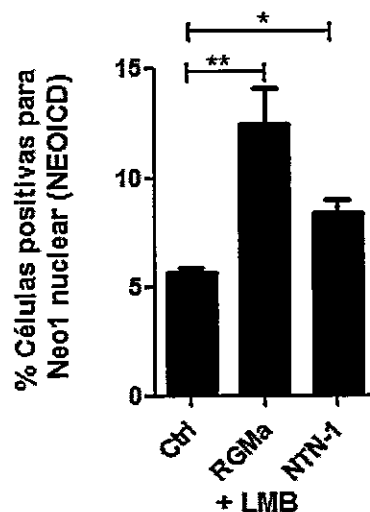


Figura 13: Cuantificación de los tratamientos con ligandos exógenos en presencia de LMB en la línea celular SH-SY5Y. La cuantificación se realizó contando la co-distribución entre Neo ICD y DAPI representada como un porcentaje con respecto conteo total de núcleos (DAPI). RGMa y NTN-1 aumentaron significativamente la translocación al núcleo del fragmento Neo ICD con respecto al control. En cambio el efecto fue mayor con RGMa que con Netrina-1 * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, $n = 3$.

5.2.3 Netrina-1 modifica la localización subcelular de Neo ICD en células SH-SY5Y

Mediante fraccionamiento subcelular, se estudió el efecto de los ligandos RGMa y Netrina-1 en la localización subcelular de Neo ICD en la línea SH-SY5Y. Para esto, las células fueron tratadas con MG132, un inhibidor de proteosoma, puesto que el procesamiento del fragmento Neo ICD es muy dinámico y se proteolisa rápidamente por el proteosoma, haciendo necesario el uso de este inhibidor a la concentración de 1 μM por 10 h (modificado de Goldschneider y cols, 2008). Posteriormente, las células fueron tratadas con los ligandos exógenos a la misma concentración indicada en el experimento anterior (Figura 12) en condiciones de bajo suero (0,5% SBF), ya que por resultados del laboratorio, se sabe que el suero contiene moléculas tipo Netrinas y RGMs que pudiesen interferir con el resultado (Datos no publicados laboratorio Verónica Palma). Mediante fraccionamiento celular se obtuvo fracciones enriquecidas

en núcleo y en citoplasma. En Figura 14, se observa un Western Blot representativo para Neo ICD (45 kDa) del fraccionamiento subcelular con los tratamientos de RGMa y Netrina-1 en presencia de MG132. Como control de la pureza de las fracciones se utilizó el anticuerpo anti TFIIB (38 kDa control nuclear) y el anticuerpo anti α -tubulina (55 kDa control de citoplasma). A partir de estos marcadores, se realizó la relación densitométrica para cuantificar la cantidad de Neo ICD en núcleo y en el citoplasma (Figura 15).

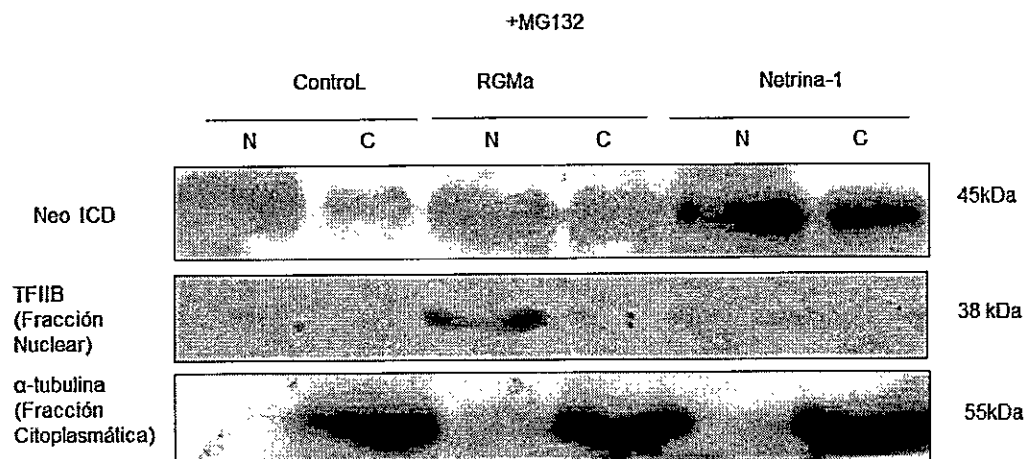


Figura 14: Fraccionamiento celular de la línea celular SH-SY5Y, con tratamientos con ligandos exógenos RGMa o Netrina-1. Tratamientos con ligandos exógenos RGMa o Netrina-1 a la concentración final de 200 ng/ml por 8 h, utilizando el inhibidor de proteosoma MG132, a la concentración final de 1 μ M por 10 h. El Western Blot del fraccionamiento se hizo contra Neo ICD y como control de la pureza de las fracciones se utilizó TFIIB para la fracción nuclear y α -tubulina para la fracción citoplasmática (n=2).

Se observó que la razón Neo ICD/TFIIB, aumentó, aunque no fue significativo, la cantidad de Neo ICD en el núcleo con el tratamiento con Netrina-1 (Figura 15^a). Sin embargo, RGMa no tuvo un efecto similar. Esto podría deberse a que por problemas técnicos en este set de experimentos, no se utilizó un inhibidor de la exportación nuclear como LMB. Debido a eso, el análisis del experimento fue distinto a la inmunofluorescencia de la Figura 13, ya que con la técnica actual no se puede

cuantificar la acumulación de Neo ICD en el núcleo, sino que solamente su cantidad relativa que estaba en el núcleo y/o citoplasma en el momento de realizar el fraccionamiento. Posteriormente, se analizó la cantidad de Neo ICD en el citoplasma en relación a α -tubulina, observándose que pese a que hay una tendencia al aumento de Neo ICD el citoplasma, no cambió en relación a los ligandos con respecto al control (Figura 15B). Estos resultados sugieren que los tratamientos con los ligandos exógenos no tienen un efecto en la localización subcelular de Neo ICD. Esto se podría explicar porque hay translocación constitutiva de Neo ICD al núcleo y permanencia en el citoplasma, producto de la interacción del ligando endógeno Netrina-4 con Neogenina 1. Por lo que se hace interesante conocer el efecto de los ligandos exógenos en la tasa de translocación de Neo ICD en un sistema carente en Netrina-4 y las diferencias en la tasa de translocación nuclear constitutiva cuando se reduce el ligando endógeno.

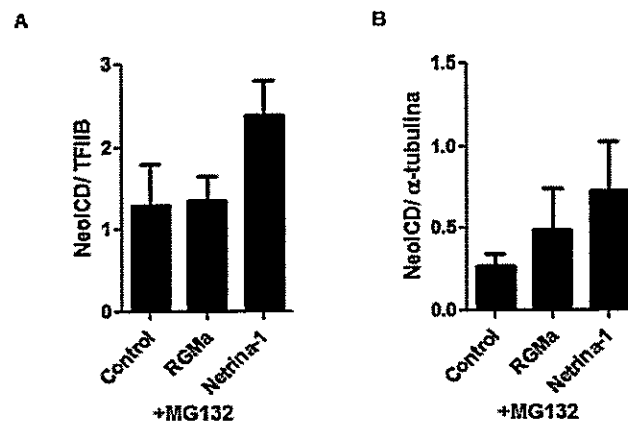


Figura 15: Cuantificación de la translocación de Neo ICD al núcleo y al citoplasma. Neo ICD se cuantifico con respecto a los controles de pureza de cada fracción. **A** densitometría de Neo ICD en el núcleo con respecto a TFIIB **B**. densitometría de Neo ICD en el citoplasma con respecto a α -tubulina n=2.

5.3 Evaluación de la translocación nuclear de Neo ICD en respuesta a sus ligandos RGMa y Netrina-1 en las células SH-SY5Y silenciadas para Netrina-4.

5.3.1 Generación de una línea estable de células SH-SY5Y silenciadas para Netrina-4.

Se generó una línea estable de células SH-SY5Y silenciadas para Netrina-4 mediante el uso de shRNA. Las células SH-SY5Y fueron transducidas con partículas lentivirales que contenían el shRNA para Netrina4 (shNTN4). Como control negativo del silenciamiento se utilizó un shRNA scramble (shSCR), el cual posee una secuencia control que no codifica para ninguna proteína conocida. Los shRNAs de Netrina-4 y scramble poseen un marcador de selección con puromicina y expresan GFP, por lo que las células transducidas son fácilmente reconocibles. La línea celular estable se generó utilizando como marcador de selección puromicina (3 µg/ml). En la Figura 16A, se muestran imágenes representativas de los cultivos luego de utilizar puromicina. Se observa que la mayoría de las células son GFP positivas. Mediante Western Blot se demostró que la expresión de Netrina-4 se redujo hasta no poder ser detectada en las células silenciada para Netrina-4(shNTN4), comparadas con células control (shSCR) (Fig. 16B). Posteriormente, se cuantificó la expresión de Netrina-4 observándose que pese a que hay una tendencia a la disminución de Netrina-4 por el uso del shRNA no hubo significancia estadística (Fig. 16C).

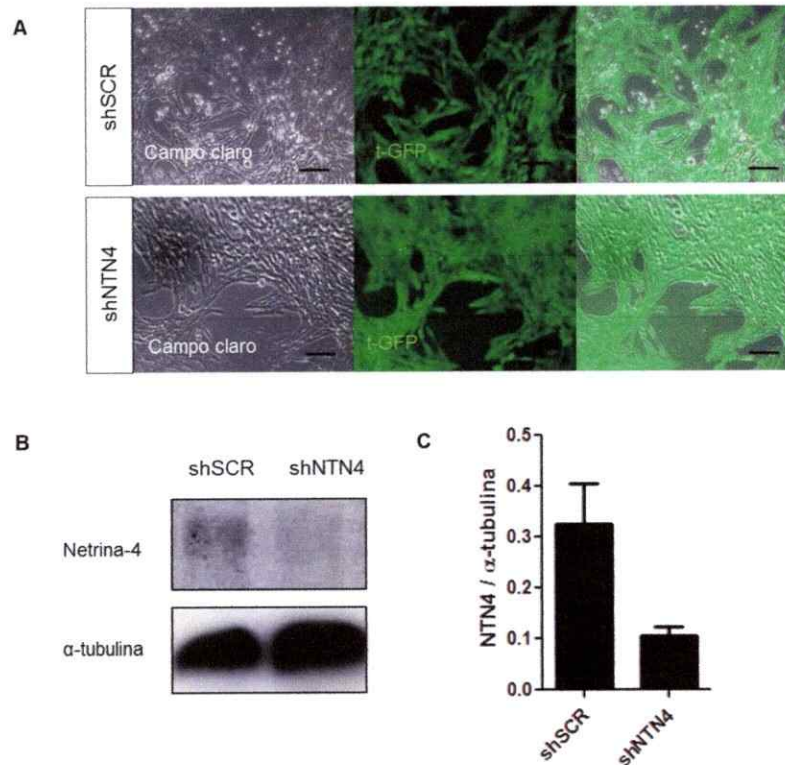


Figura 16: Silenciamiento de Netrina-4 en células SH-SY5Y utilizando shRNA mediante la transducción con lentivirales. **A.** Cultivo estable de células SH-SY5Y transducidas prácticamente al 100 % con el shRNA en presencia de puromicina. **B.** La expresión de Netrina-4 disminuyó en células silenciadas determinado mediante Western Blot, shScramble (shSCR) es el control del shRNA. **C.** Cuantificación de la densitometría del Western Blot contra Netrina-4 donde se observa una tendencia pronunciada a la baja con el shRNA, n=3.

5.3.2 RGMa exógeno aumenta la cantidad de Neo ICD en el núcleo, en células con Netrina-4 silenciada establemente.

Para reducir el posible efecto paracrino de Netrina-4 producido endógenamente sobre la localización subcelular de Neo ICD, se utilizó en el experimento de fraccionamiento subcelular con los ligandos exógenos RGMa o Netrina-1 la línea celular shNTN4 previamente establecida. En la Figura 17, se muestra un Western Blot representativo de Neo ICD del fraccionamiento celular. En presencia de ligandos

RGMa y Netrina-1 la localización nuclear de Neo ICD aumentó con respecto a los experimentos controles.

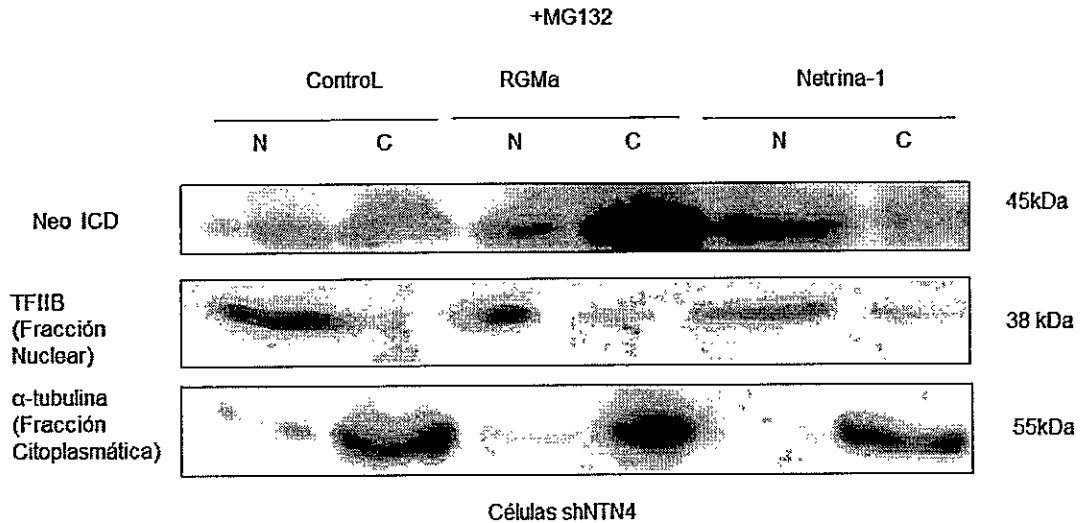


Figura 17: Fraccionamiento celular de células SH-SY5Y silenciada para Netrina-4 tratadas con ligandos exógenos RGMa y Netrina-1. Los ligandos (200 ng/ml) fueron incubados por 8 h en seguido de la incubación con MG132 (1 μ M) por 10 h. El Western Blot del fraccionamiento se hizo contra Neo ICD y como control de la pureza de las fracciones se utilizó TFIIB para la fracción nuclear y α -tubulina para la fracción citoplasmática. (n=3)

RGMa aumentó significativamente la translocación al núcleo de Neo ICD en un contexto donde la expresión endógena de Netrina-4 esta marcadamente reducida (Figura 18A). Por otro lado, el nivel de Neo ICD en el citoplasma no se ve alterado por el tratamiento de los ligandos exógenos (Figura 18B). En la figura 19 se comparó el efecto del ligando endógeno en el procesamiento y translocación de Neo ICD. Se muestra que la cantidad relativa de Neo ICD encontrada en el núcleo y en el citoplasma de células controles y shNTN4 en condiciones basales (sin ligandos exógenos). Esta comparación se realizó a partir de las cuantificaciones de las densitometrías de los Western Blot de fraccionamiento subcelular de células SH-SY5Y

controles (Figura 14) y células SH-SY5Y silenciadas para Netrina-4 (shNTN4) (Figura 17). Se observó una tendencia a la baja en la translocación de Neo ICD al núcleo en células silenciadas para Netrina-4. Al contrario se observó una tendencia al alza en la cantidad de Neo ICD en el citoplasma en ausencia de Netrina-4. Cabe señalar que este experimento solo fue realizado en duplicado. Estos resultados sugieren que otros ligandos, aún no descritos, podrían ejercer un efecto en la translocación de Neo ICD. Asimismo, estos resultados sugieren que la interacción entre Netrina-4 y Neogenina 1, propicia el procesamiento de Neogenina 1 en Neo ICD y su posterior translocación al núcleo, en células de SH-SY5Y.

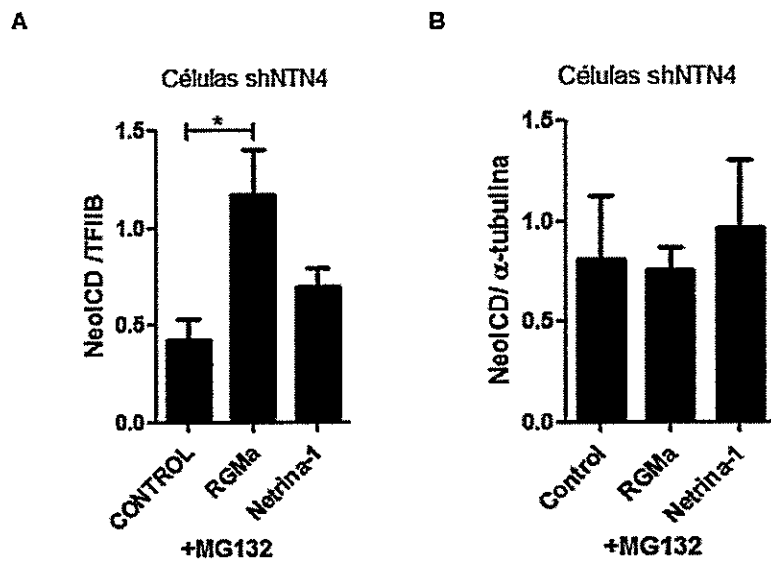


Figura 18: Cuantificación de la translocación de Neo ICD en células silenciadas para NTN4 en núcleo y citoplasma. Neo ICD se cuantificó con respecto a los controles de pureza de cada fracción. **A.** Densitometría de Neo ICD en el núcleo con respecto a TFIIIB, donde se puede observar que el tratamiento con RGMa exógeno aumenta significativamente la cantidad de Neo ICD presente en el núcleo. **B.** Densitometría de Neo ICD en el citoplasma con respecto a α -tubulina. * $p < 0,05$, $n = 3$.

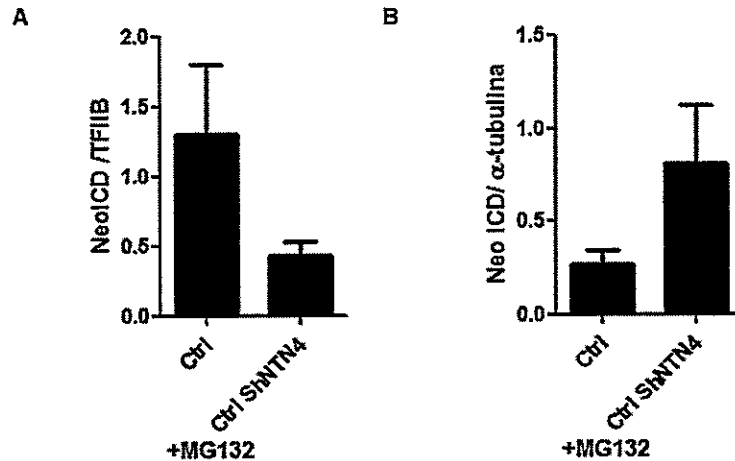


Figura 19: Comparación del efecto de los ligandos endógenos en la translocación de Neo ICD al núcleo en células shNTN4 comparadas con células controles. Los datos fueron obtenidos de la cuantificación de densitometría del Western Blot de fraccionamiento subcelular para células nativas y silenciadas para Netrina-4 (ShNTN4). Todo esto fue realizado en presencia de MG132. **A.** Densitometría de Neo ICD en el núcleo con respecto a TFIIIB. **B.** Densitometría de Neo ICD en el citoplasma con respecto a α -tubulina. Ctrl n=2, Ctrl shNTN4 n=3.

A raíz de estos resultados, se puede concluir que Netrina-4 unido a Neogenina 1 permite la translocación nuclear de Neo1, en un contexto carente de otros ligandos. Sin embargo, estas células son capaces de responder a RGMa, aumentando la translocación nuclear de Neo ICD, en un contexto donde no existe expresión competitiva del ligando endógeno (Netrina-4), que pudiese reducir este efecto mediante su unión a Neogenina 1. Netrina-1 también aumentó la translocación nuclear de Neo ICD, aunque el aumento no fue significativo con respecto al control. Lo que podría indicar que Netrina-1 unida a Neogenina 1 podría tener otras funciones celulares y la translocación al núcleo de Neo ICD podría no ser su función principal, sino que propiciar la acumulación de Neo ICD en el citoplasma.

5.4 Determinación de la función como receptor de dependencia de Neogenina 1 en respuesta a Netrina-4, en las células SH-SY5Y.

Con el objetivo de conocer cuál es la función de la unión de Netrina-4 a Neogenina 1, se evaluó la actividad pro-apoptótica de Neogenina 1, dependiendo de la disponibilidad de su ligando endógeno (Netrina-4) en situación de privación de suero. La muerte celular se evaluó mediante dos aproximaciones: 1) ensayo de viabilidad con yoduro de propidio mediante citometría de flujo y 2) medición de cantidad de células con marca positiva para Caspasa-3 activada mediante Inmunofluorescencia.

5.4.1 Las células SH-SY5Y silenciadas para Netrina-4 son menos viables en privación de suero que células control.

Mediante citometría de flujo, se realizó un ensayo de viabilidad con yoduro de propidio, el cual marca el DNA expuesto cuando las células mueren. Se utilizaron células transducidas establemente silenciadas para Netrina-4 y controles (shSCR). Para poder disminuir el efecto del ligando endógeno, las células fueron privadas de suero durante 12 h, ya que en el suero hay Netrinas y RGM que podrían interferir con la actividad pro-apoptótica de Neogenina 1 (datos no publicados Laboratorio Verónica Palma). Posteriormente, se añadió una solución de yoduro de propidio a las células y estas fueron pasadas por el citómetro de flujo. Se eligieron sólo las células GFP positivas (indicador de transducción positiva), a las cuales se les midió la marca de yoduro de propidio. Los resultados de la citometría se muestran en los gráficos de densidad para las células shSCR y shNTN4. El porcentaje de células shNTN4 positivas para yoduro de propidio fue 8%, más del doble que el de las células shSCR 3,8%, por lo que las células transducidas establemente para shNTN4 se mueren más que las controles por la carencia de Netrina-4 en un contexto de privación de suero.

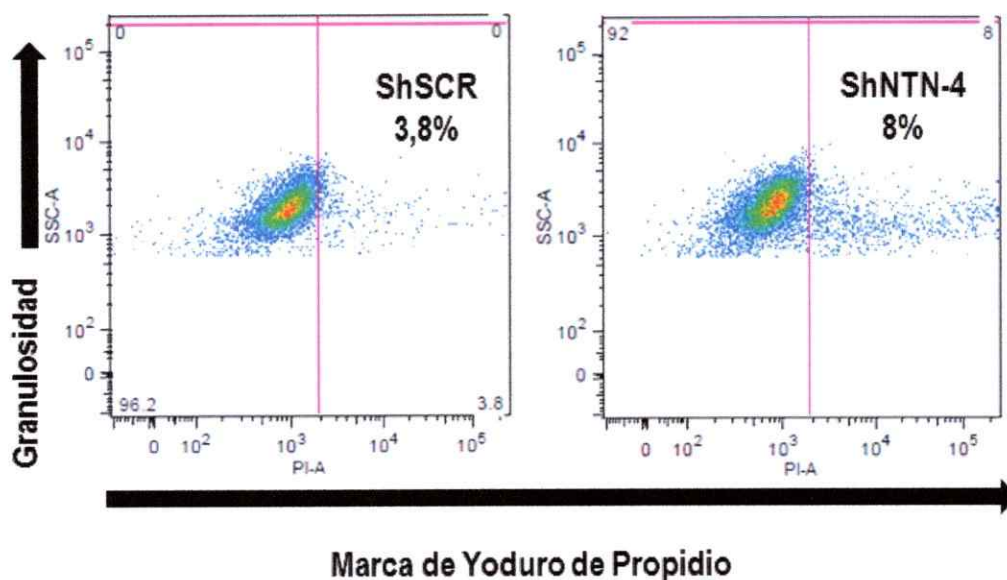


Figura 20: Ensayo de viabilidad de yoduro de propidio de células silenciadas para Netrina-4 privadas de suero por 12 h. Este experimento de viabilidad se hizo utilizando Yoduro de propidio para marcar las células apoptóticas utilizando citometría de flujo para cuantificarlas, primero seleccionando por expresión de GFP.

5.4.2 Células SH-SY5Y silenciadas para Netrina-4 poseen un aumento en la marca para Caspasa-3 activadas con respecto a las células control, en un contexto de privación de suero.

A continuación, se hizo un experimento en donde a células shNTN4 y shSCR se les privó de suero durante 24 h, para luego medir la cantidad de células Caspasa-3 activadas con respecto al total de células (medido con DAPI), mediante inmunofluorescencia. En la figura 21A, se muestra una imagen representativa de la inmunofluorescencia realizada contra Caspasa 3-activada (verde) y α -tubulina (rojo), donde se puede observar que la cantidad de células con marca positiva para Caspasa-3 activada fue mayor en las células silenciadas para Netrina-4 con respecto al control.

La figura 21.B muestra la cuantificación de este aumento. El porcentaje de células positivas para Caspasa-3 activada fue significativamente mayor en las células shNTN4 que en las células shSCR. Por tanto, estos resultados sugieren la ausencia de Netrina-4 endógeno aumenta la cantidad de Caspasa-3 activada en las células SH-SY5Y en condiciones de privación de suero. En cuanto a este objetivo, se puede concluir que Neogenina 1 actuaría como receptor de dependencia mediante su unión a Netrina-4. Además, la muerte producida por esta carencia de ligando es vía Caspasa-3, en línea con lo reportado previamente (Matsunaga y cols, 2004).

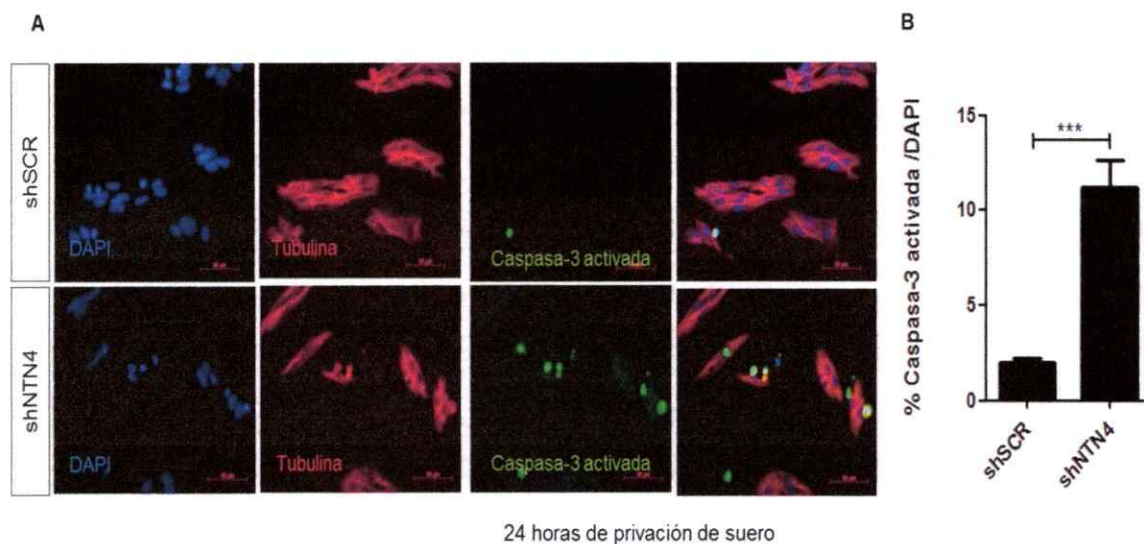


Figura 21: Las células shNTN4 tienen un aumento significativo de la apoptosis a las 24 h de privación de suero vía Caspasa-3 activada. **A.** Imagen representativa de la Inmunofluorescencia contra Caspasa-3 activada (verde), α -tubulina (rojo) de células silenciadas para Netrina-4 y controles DAPI en azul núcleos. **B.** Cuantificación del porcentaje de células positivas para Caspasa-3 activada versus DAPI. Se observa un aumento significativo en la cantidad de células positivas para Caspasa-3 activada en la condición experimental de silenciamiento para Netrina-4. *** $p < 0,001$; $n=3$.

6. DISCUSIÓN

Neogenina 1 ha sido clasificada como un receptor de dependencia. En un contexto de cáncer en tanto se le ha propuesto como supresor de tumores en analogía con su homólogo DCC. De esta forma, en ausencia de sus ligandos, Neogenina 1 induciría apoptosis celular y en tumores su expresión estaría disminuida. Sin embargo, debido a los múltiples ligandos de Neogenina 1 y su superposición de funciones, no es fácil dilucidar como este receptor ejercería su función como supresor de tumores. Por lo tanto, el mecanismo mediante el cual Neogenina 1 cumple su función es el tema de estudio de esta tesis. En primer lugar, se caracterizó el modelo celular a utilizar con respecto a la expresión de Neogenina 1 y sus ligandos. Luego se midió la translocación nuclear del fragmento intracelular Neo ICD en presencia de ligandos exógenos (Netrina-1 y RGMA) en la línea celular de neuroblastoma humano SH-SY5Y en condiciones nativas y silenciadas para Netrina-4. Finalmente, se midió la muerte celular mediada por Neogenina 1 a través de Netrina-4, silenciando este ligando y observando la muerte en condiciones de privación de suero.

6.1 Neogenina 1 y Netrina-4 son expresados en las líneas celulares de neuroblastoma SH-SY5Y y SK-N-SH.

Las líneas celulares de neuroblastoma humano SH-SY5Y y SK-N-SH, provienen de biopsias obtenidas de metástasis en médula ósea de paciente pediátrico con neuroblastoma. Según lo reportado, la expresión de Neogenina 1 se extiende a una variedad de tejidos durante el desarrollo embrionario, entre ellos, las células de la cresta neural y los DRG, tejidos a partir de los cuales se genera tempranamente el neuroblastoma (Guan y cols, 2003). Experimentos de pérdida de función de Neogenina 1, realizados en embriones de *Xenopus leavis*, entregan información acerca de la función fisiológica que Neogenina 1 podría estar ejerciendo en estos tejidos. Los

resultados muestran que la pérdida del receptor causa serios defectos en la migración de las células de la cresta neural y aberraciones en la formación del ojo (Gessert y cols, 2008). Sin embargo, no existen estudios previos acerca de la expresión de la proteína Neogenina 1 en las líneas celulares de neuroblastoma. Por lo tanto, se realizaron extracciones de RNA y proteínas de cultivos celulares cultivados en condiciones basales, confirmándose que ambas líneas celulares SH-SY5Y y SK-N-SH expresan el mRNA y la proteína Neogenina 1. Luego se estudió la expresión de sus ligandos y mediante RT-PCR, se determinó que solo *Netrina-4* es detectado en estas células. Para confirmar lo observado por RT-PCR, se realizó además un Western Blot contra *Netrina-4* y *RGMA* y se observó que las células estudiadas expresan solo *Netrina-4*. Sin embargo, el tamaño de la proteína detectada en las células SH-SY5Y difiere de la detectada en células HUVEC (control positivo), posiblemente debido a modificaciones postraduccionales. Se sabe que *Netrina-4* puede ser glicosilada (Lambert y cols, 2012), por lo que estas discrepancias podrían ser debido a ello. En apoyo a esta observación se reportó que la proteína recombinante *Netrina-4*, de R&D Systems, producido en células de mieloma murina, fue detectada cerca de 90kDa, lo cual es consistente con el resultado observado en este trabajo (Lambert y cols, 2012). Por otro lado, se confirmó que ni *RGMA* ni *DCC* son expresados en células SH-SY5Y. Entonces, esto nos permite sugerir que los cambios observados en la función de dependencia de Neogenina 1 serían dependientes únicamente de su unión con su ligando *Netrina-4*. Sin embargo, no se puede descartar el efecto de otros receptores tales como *UNC5H* (que también unen *Netrinas*), por lo que se hace necesario verificar su expresión en las células SH-SY5Y. En el año 2008, Lejmi y cols, mostraron que la unión de *UNC5B* a Neogenina 1 es mediada por la interacción de *Netrina-4* con Neogenina 1, formando así un heterodímero. Además, postularon que este ligando no

puede unirse directamente a UNC5B (Lejmi y cols, 2008). Cabe señalar, que estos ensayos fueron realizados en células HUVEC, es decir, en un contexto no canceroso. Por lo tanto, la interacción entre Neogenina y Netrina-4, detectada en mi tesis, no posee una función anti-angiogénica, similar a lo observado en el trabajo de Lejmi, sino más bien, demostramos que la función de esta interacción fue mediador de la apoptosis celular. Aunque es posible que en células SH-SY5Y se esté formando un heterodímero y que la función principal de Netrina-4 sea derivado de esta interacción. Por lo que será necesario evaluar si la interacción entre UNC5H y Neogenina 1 es mediada directamente por Netrina-4 realizando ensayos de co-inmunoprecipitación entre estas moléculas, por ejemplo.

6.2 Translocación nuclear del fragmento intracelular de Neogenina 1

Para dilucidar el posible mecanismo desencadenado por la unión a Neogenina 1 de Netrina-4, se evaluó la translocación nuclear de Neo ICD en condiciones basales y en presencia de ligandos exógenos RGMA y Netrina-1. Como control positivo se utilizó RGMA, ya que anteriormente se reportó que RGMA posee una función co-activadora de la transcripción de Neogenina 1 (Goldschneider y cols, 2008). Para estudiar la translocación de Neo ICD se utilizaron células SH-SY5Y, ya que éstas expresan altos niveles de Neo1 sin expresar DCC, lo que las convierte en un modelo ideal para el estudio de la función de Netrina-4. La translocación nuclear basal de Neo ICD se midió mediante inmunocitoquímica, usando tratamientos con LMB para inhibir la exportación nuclear. En condiciones basales, hubo translocación nuclear constitutiva de Neo ICD debido a la unión de Netrina-4 con Neogenina 1. Además, se observó la tasa de translocación nuclear de Neo ICD en presencia de los ligandos exógenos de Neogenina 1. Como control positivo se utilizó la translocación de Notch activado, ya que se sabe que Notch se expresa en altos niveles y que su translocación al núcleo es

constitutiva en células SH-Sy5Y (Ferrari-Toninelli y cols, 2010). Los resultados claramente demuestran la translocación nuclear de Notch activado, la cual se distribuye mayoritariamente junto a las células positivas para Neo ICD en el núcleo. Aunque hubo diferencias en la co-distribución de las marcas de Neo ICD (Rojo), como se mostró en la figura 12. Además, el tratamiento con ligandos exógenos, sobre todo Netrina-1, produjo un aumento de Notch activado en el núcleo. Interesantemente, se demostró que Netrina-1 activa a Notch formando un complejo con su ligando Jagged1 y generando la activación de Notch en células de glioblastoma (Ylivinkka y cols, 2013). Por otro lado, demostramos que el proceso de translocación nuclear es dinámico y se confirmó que estas células responden a RGMa. Así, RGMa aumentó la co-distribución de Neo ICD y Notch activado al núcleo (marcado con DAPI), lo cual sugiere que RGMa participa en este proceso de translocación nuclear. Interesantemente, el ligando endógeno Netrina-4 fue capaz de generar una translocación basal de Neo ICD al núcleo. Además, se confirmó que RGMa, como el ligando de excelencia en propiciar la translocación de Neo ICD al núcleo, lo cual no descarta que otros ligandos pudiesen compartir esta función. Netrina-4 no se asemeja estructuralmente a Netrina-1, ni a RGMa, por lo que la función que esta tiene en la translocación nuclear de Neo ICD, puede significar que existe un mecanismo básico de la función de Neogenina 1, independiente del ligando con el que interactúe.

Asimismo, mediante fraccionamiento subcelular se demostró la acumulación de NeoICD tanto en el citoplasma como en el núcleo. Se utilizó un inhibidor de proteosoma MG132, ya que el fragmento Neo ICD es proteolizado rápidamente vía el proteosoma. Un antecedente importante es la observación que Neogenina 1 es proteolizada por una α -secretasa en su porción extracelular y por una γ -secretasa, propiciando el corte de Neo ICD el cual tiene sitios de importación y exportación al

núcleo (Goldschneider y cols, 2008). Además, estos autores observaron que sólo la expresión de Neogenina 1 no aumentó los niveles de mRNA de *GRHL1* y *CCM2*, en cambio, tratamientos con RGMa gatilla un incremento de la expresión de ambos genes. Se observó, además, que este incremento depende del corte de Neo ICD mediado por la γ -secretasa. Ya que usando un inhibidor de esta enzima, no se observó este fenómeno. Sería interesante entonces determinar si en presencia de ligandos exógenos (incluyendo Netrina-4 exógena) es posible ver cambios en la expresión de los genes (*GRHL1* y *CCM2*) como una forma de determinar diferencias en la tasa de translocación nuclear de Neo ICD dependiente de los ligandos.

Funcionalmente, Neogenina 1 se asemeja a los receptores Notch o APP. Se sabe que el dominio intracelular de Notch se transloca al núcleo reclutando histonas acetiltransferasas y regulando transcripcionalmente varios genes (Goldschneider y cols, 2008). Por su parte, Neogenina 1 también interactúa con TIP60 una histona acetiltransferasa pero no se conoce con certeza cuál sería el rol de Neo ICD en el núcleo (Goldschneider y cols, 2008). Además, se observó que el corte por la γ -secretasa libera el fragmento Neo ICD, el cual contiene el sitio de corte por Caspasa-3, lo cual podría inactivar la actividad pro-apoptótica de Neogenina 1 (Wilson y Key, 2006). Por lo demás, no existen evidencias de la función que genera la interacción de Neogenina 1 con Netrina-4 a nivel celular y como esta interacción anula la respuesta de receptor de dependencia de Neogenina 1.

En el trabajo publicado por Goldschneider y cols, el año 2008, no hay cambios en el corte por γ -secretasa en presencia de RGMa, lo que podría indicar que el ligando actuaría en la importación nuclear de Neo ICD, lo cual es demostrado en este trabajo, mediante la observación de la cantidad de Neo ICD nuclear con los tratamientos con RGMa versus control. Por este mismo motivo, se realizaron experimentos de

fraccionamiento celular en células SH-SY5Y silenciadas para Netrina-4 y controles. Estos experimentos muestran diferencias significativas en la translocación nuclear en presencia del tratamiento con RGMa. Por lo tanto, efectivamente la translocación nuclear de Neo ICD es un proceso modulado por RGMa, pero la translocación nuclear efectivamente ocurre endógenamente en las células SH-SY5Y a través del ligando Netrina-4. Considerando este hecho, se realizaron experimentos de fraccionamiento subcelular sumando el nivel de Neo ICD en el citoplasma y en el núcleo, considerando al control como 1 para poder observar cambios en la translocación total de Neo ICD. Se puede observar que existe una tendencia al aumento de Neo ICD en células silenciadas para Netrina-4 en presencia de RGMa (Figura 22).

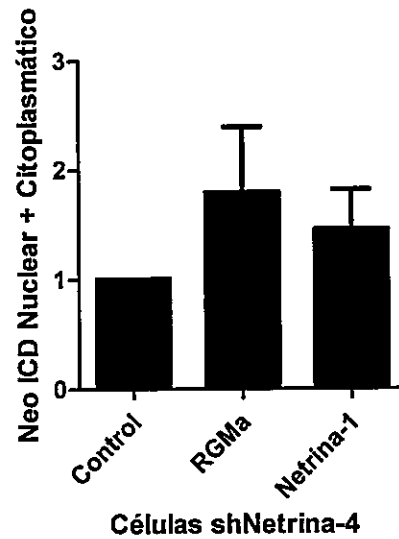


Figura 22: Suma relativa estandarizada con respecto al control de Neo ICD total dependiendo de los tratamientos con ligandos exógenos RGMa y Netrina-1 en células shNTN4.

En conjunto, estos resultados sugieren que Neo ICD se transloca constitutivamente al núcleo, mediante su ligando endógeno Netrina-4 y esto se ve potenciado por el tratamiento exógeno con RGMA. Por lo tanto, la translocación de Neogenina 1 puede ser denominado un mecanismo básico de Neogenina 1, es decir, que la unión de cualquier ligando de los usados en este trabajo propiciaría el corte del dominio intracelular de Neogenina 1 y su posterior translocación, pero las funciones asociadas a la internalización de Neo ICD y la tasa de translocación de este, serían particular para cada ligando. Además, RGMA sería el ligando principal que propiciaría la translocación nuclear de Neo ICD. Esto se puede observar a partir de las diferencias en la cantidad de Neo ICD en el núcleo y el citoplasma, en las células shNTN4, con respecto a los tratamientos con los ligandos exógenos (Figura 18). Neo ICD en presencia de RGMA se encontraba mayoritariamente en el núcleo, mientras que con Netrina-1 se observa mayormente en el citoplasma lo que sugiere una distribución diferencial de Neo ICD posiblemente asociado a distintas funciones que este tiene en la célula. A partir de esto, se hace necesario conocer las moléculas asociadas al dominio intracelular de Neogenina 1 y si su unión diferencial a estas depende del ligando que se encuentre en ese contexto celular. El corte de Neo ICD puede ser considerado un mecanismo de supervivencia celular, ya que la proteólisis del fragmento esconde el dominio pro-apoptótico de Neogenina 1, bloqueando su corte por Caspasa-3 activada. Considerando que, en este contexto celular, solo se expresa Netrina-4, surge la interrogante si: ¿Netrina-4 es acaso un factor de dependencia para Neogenina 1 en células SH-SY5Y?

6.3 Neogenina 1 como receptor de dependencia actuando a través de Netrina-4

La respuesta opuesta de Neogenina 1 con Netrina-1 o RGMA, en el contexto de apoptosis, indica que la señalización de Neogenina 1 es compleja y está sujeto a una fina regulación espacio temporal (Wilson y Key, 2006). Existe evidencia de que Neogenina 1 actúa como receptor de dependencia en contexto del desarrollo del tubo neural de pollo mediante su ligando RGMA (Matsunaga et al., 2004). También, se reportó que Neogenina 1 interactúa con DAPK. Esta actividad se ve abolida en presencia de RGMA o bloqueando la función de DAPK. Asimismo, se reportó que en contexto del crecimiento del tubo neural de pollo, la co-expresión de un mutante dominante negativo o un siRNA de DAPK atenúan la actividad pro-apoptótica. Sin embargo, la muerte celular no fue inducida en la ausencia de RGMA en GNPs (Fujita y cols, 2008). Neogenina 1 y RGMA tampoco están involucrados en muerte celular en células de los DRG y en la línea celular PC12, ya que se analizó la viabilidad de ambos tipos celulares por la adición de RGMA (durante 24 h) y no se observaron diferencias en la viabilidad mediante detección de Caspasa-3 activada y en ensayos de TUNEL (Conrad y cols 2007). Todos estos antecedentes indican que efectivamente Netrina-4 podría actuar como ligando de dependencia y existe importante evidencia que avala esta observación dado que tanto Netrina-4 como Netrina-1 actuarían como ligandos de dependencia de Neogenina 1 en células MIN6 (Yang y cols., 2011).

Efectivamente, se observó un aumento de la muerte celular en células silenciadas para Netrina-4 mediante el ensayo de viabilidad con yoduro de propidio. El silenciamiento de Netrina-4 fue necesario, ya que, en el primer objetivo, se demostró que este es el ligando endógeno para Neogenina 1 en estas células. Se reportó además que la muerte celular en células de los DRG no se rescatan por su ligando RGMA (Conrad y cols, 2007). Aunque en un contexto cancerígeno Netrina-4 podría ser

capaz de tener esa función. Por lo tanto, sería interesante determinar si en el contexto normal del desarrollo de los DRG se comparte este proceso.

En experimentos de rescate, en los cuales las células silenciadas para Netrina-4, se les adicionó distintas concentraciones de Netrina-4 exógeno al medio de cultivo, se observó una disminución de la apoptosis medida por inmunofluorescencia de Caspasa-3 activada (datos no publicados, en marcha). Esta disminución fue de forma dosis dependiente, llegando a condiciones basales en privación de suero. Esto indicaría, que Netrina-4 efectivamente rescata de la apoptosis a las células SH-SY5Y y sugiere que Netrina-4 es el ligando de dependencia de Neogenina 1 en células SH-SY5Y de neuroblastoma humano. Aunque sería necesario investigar si durante la sobreexpresión de Neogenina 1, Netrina-4 sería capaz de restituir la tasa de apoptosis a condiciones basales en privación de suero.

Neogenina 1 en su tallo citoplasmático, contiene un sitio consenso de corte en Asp1323 (secuencia aminoacídica CCTD) para Caspasa-3. Cuando es cortado en este sitio, la porción N-terminal de Neogenina 1 (la que permanece anclada a la membrana), exhibe una actividad pro-apoptótica induciendo la activación de Caspasa-3 y la subsecuente muerte celular (Wilson y Key, 2006). Cuando Neogenina 1 se une a su ligando RGMa, el corte inicial mediado por Caspasa-3 activa es inhibido permitiendo la supervivencia celular. A partir de esto, se cuantificó el número de células positivas para Caspasa-3 activada en células silenciadas establemente para Netrina-4 y se observó un aumento significativo en las células silenciadas con respecto a las células control en condiciones de privación de suero por 24 h. Sin embargo, aún es necesario descartar la posibilidad de que Netrina-4 esté formando un complejo con Neogenina 1 y UNC5H o que se esté uniendo a cada uno por separado y que el efecto antes visto es producto

de la unión a UNC5H. Para esto, se pueden realizar ensayos con el dominante negativo de Neogenina 1 (que tengan mutado el sitio de corte a Caspasa-3) en células que tengan silenciada la expresión a Netrina-4 y evaluar la disminución en la apoptosis. Además, si se confirma la expresión de UNC5H en células SH-SY5Y, sería interesante hacer este mismo experimento, con el dominante negativo para Neogenina 1 y medir apoptosis. Por otro lado, se ha reportado que Netrina-4 interactúa con la integrina $\beta 4$, promoviendo proliferación y migración de células de glioblastoma (Yizhou y cols., 2012), sugiriendo que este ligando podría tener un rol en la capacidad tumorigénica de estas células. También sería necesario descartar que el efecto del aumento de la muerte por privación de suero en células silenciadas para Netrina-4, sea producto de la pérdida de interacción con integrinas, siendo necesario estudiar dicha relación. Por otro lado, la muerte en ausencia de ligando endógeno puede ser producto de defectos en la adhesión de estas células mediada por Neogenina 1, ya que se ha visto que Netrina-1 participa en la adhesión de epitelio de la glándula mamaria y que la pérdida de expresión de Neogenina 1 provoca un desprendimiento de estas células en el desarrollo de la glándula (Srinivasan y cols. 2003). Debido a esto, se hace necesario observar diferencias en la capacidad adhesiva de las células nativas y silenciadas, tanto para Netrina-4 como para Neogenina 1, utilizando marcadores de adhesión como integrinas, faloidina, etc. Sería muy interesante dilucidar, además, si Neogenina 1 interactúa con elementos de adhesión celular, a través de su interacción con Netrina-4 y que posiblemente, la muerte celular sea producto de la pérdida de la adhesión, lo que podría cambiar el estado conformacional de Neogenina 1 y así permitir la activación de DAPK y el corte proteolítico por Caspasa-3 activada para amplificar la señal apoptótica. En este sentido, relacionando estos ensayos posteriores con un contexto más ligado al cáncer, es que se propone realizar ensayos *in vivo* mediante el ensayo de CAM

(membrana corioalantoidea) en embriones de pollo utilizando células silenciadas para el receptor Neogenina 1 y para Netrina-4 y midiendo migración a otros tejidos (metástasis) y muerte en el tumor primario que podrían formarse sobre esta membrana. Finalmente, los resultados de este trabajo indican que el proceso de muerte celular debido a la privación de suero en ausencia de ligando endógeno es mediada por Neogenina 1, tomando en consideración que el homólogo DCC no se expresa en estas células y que es producto de la ausencia de Netrina-4.

6.4 Neogenina 1 y Cáncer

Existen diferentes reportes en las que se estudian alteraciones en la expresión de la proteína Neogenina 1 en tumores respecto a su tejido sano. Por ejemplo, se sabe que en cáncer esofágico hay un aumento en la expresión de la proteína Neogenina 1 comparado con su tejido epitelial normal (Hu y cols., 2001), mientras que en cáncer de mama (Lee y cols., 2005) y cáncer de colon (Li y cols., 2009) hay una disminución en la expresión de Neogenina 1. Sin embargo, no existen antecedentes que reporten alteraciones de la expresión Neogenina 1 en el contexto de neuroblastoma, por lo que sería muy interesante realizar un estudio al respecto. Recientemente, se publicó un trabajo en donde se estudia la expresión de Neogenina 1 en glioma (Wu y cols., 2012). En este trabajo, se observó una baja progresiva en la expresión de la proteína Neogenina 1 en las etapas avanzadas del tumor, proponiendo entonces que las alteraciones en la expresión de la proteína Neogenina 1 son una herramienta útil para un posible biomarcador de progresión tumoral en glioma. Probablemente, esta progresiva baja en la expresión de Neogenina 1 relativa al desarrollo de glioma, esté relacionada con su función de factor de dependencia. Se ha visto que, Neogenina 1 en ausencia de su ligando RGM, desencadena muerte celular por apoptosis (Matsunaga y cols., 2004). Por lo tanto, esta baja en la expresión de Neogenina 1 podría deberse a

un mecanismo de evasión de muerte celular y mayor sobrevivencia por parte del tumor (Mehlen y cols., 2011), proponiendo a Neogenina 1 no sólo como un biomarcador de progresión tumoral, sino que además como un posible blanco terapéutico anticancerígeno para el caso de glioma. Por el contrario, en resultados obtenidos por nuestro laboratorio, en un modelo murino de meduloblastoma, se verificó un aumento significativo en la expresión de Neogenina 1 en las células proliferativas granulares que conforman las etapas más avanzadas del meduloblastoma, respecto del tejido normal. Además, se ha visto que en un modelo celular humano de meduloblastoma, el silenciamiento transcrito de Neogenina 1 produce un arresto del ciclo celular en G2/M, lo que podría significar que Neogenina 1 tiene un importante papel regulatorio de la progresión del ciclo celular en una línea celular de meduloblastoma (Milla y cols., 2013). De todas maneras, es claro que existen alteraciones en la expresión de Neogenina 1 en diferentes tipos tumorales y que la función de Neogenina 1 podría estar desempeñándose, al parecer, en base a su dependencia del contexto tumoral y por tanto actualmente es materia de estudio.

Finalmente, se propone un modelo (Figura 23) en el cual se explica el papel de Netrina-4 mediando la translocación nuclear de Neo ICD como mecanismo de supervivencia celular, ya que en ausencia del ligando, aumenta la apoptosis en las células de neuroblastoma humano. En conclusión, en este trabajo se demostró que la función de receptor de dependencia Neogenina 1 está inactivada en una línea de neuroblastoma humano en respuesta al ligando Netrina-4.

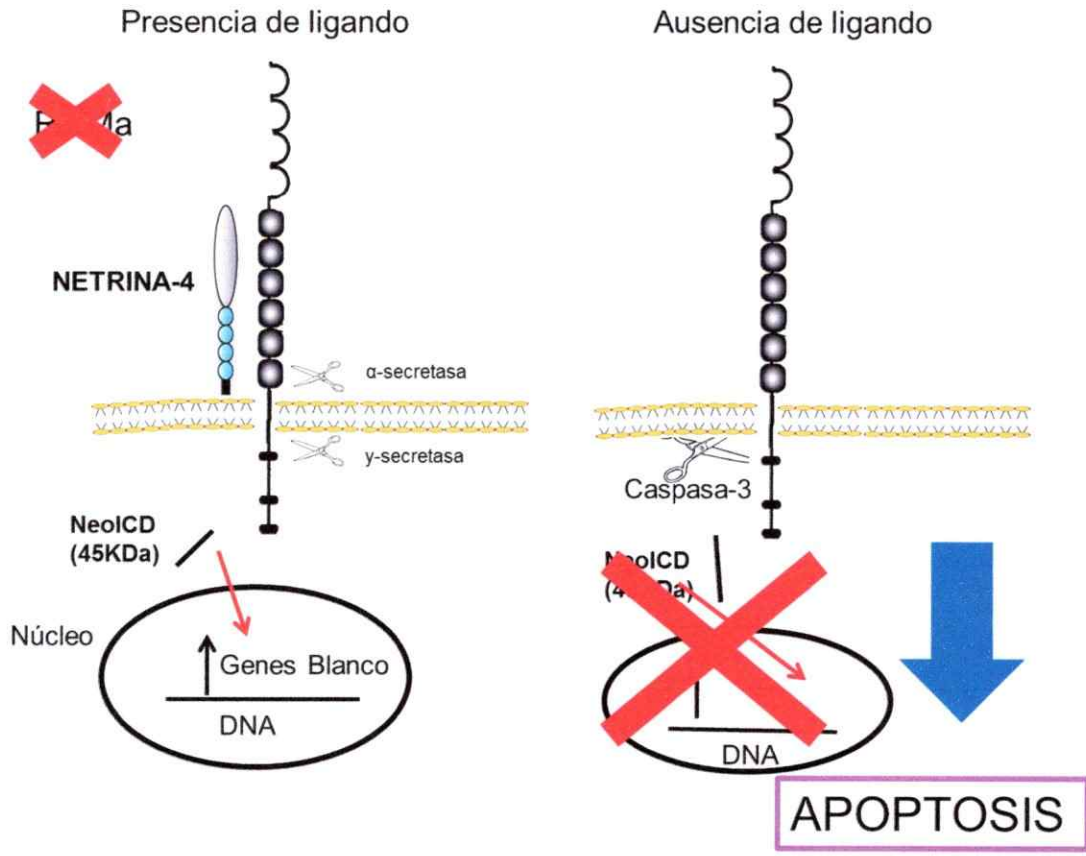


Figura 23: Modelo propuesto a partir de los resultados de este trabajo. La unión de Netrina-4 a Neogenina 1 facilita la proteólisis del fragmento intracelular y su posterior translocación al núcleo. Con esto, se bloquea el sitio de corte para Caspasa-3 activada de Neogenina 1 y por lo tanto se anula la función pro-apoptótica de esta proteína. Por lo tanto, en ausencia de Netrina-4, Neogenina 1 funciona de manera pro-apoptótica, conduciendo a las células a muerte celular.

7. RESUMEN DE RESULTADOS

- Neogenina 1 y Netrina-4 son expresadas por las líneas celulares de neuroblastoma SH-SY5Y y SK-N-SH.
- Las células SH-SY5Y no expresan DCC.
- Neo ICD se transloca al núcleo constitutivamente en las células SH-SY5Y mediada por la unión de Netrina-4 a Neogenina 1.
- RGMA exógeno aumenta la translocación nuclear de Neo ICD en células SH-SY5Y silenciadas para Netrina-4.
- Netrina-4 actúa como factor de dependencia, donde su unión a Neogenina 1 inhibe su actividad pro-apoptótica.

8. CONCLUSIONES:

Neogenina 1 funciona como receptor de dependencia a través de su unión con Netrina-4, lo cual es relevante, ya que a la fecha sólo se conocía a RGMA como ligando que produce esa función con Neogenina 1. Esto, sumado a la evidencia de que RGMA en ciertos contextos celulares no rescata a las células de la apoptosis mediada por Neogenina 1, hace inferir que tanto las Netrinas como RGMA pueden anular esta función dependiendo del contexto, el cual depende de la expresión y concentración diferencial de los ligandos que estén expresándose en los tejidos en que Neogenina 1 esté funcionando como receptor de dependencia. Además, Neogenina 1 sufre el procesamiento y escisión de Neo ICD, producto de su interacción con sus ligandos, lo cual hace suponer que dicho evento podría ser de forma constitutiva a la unión con sus ligandos. Lo anterior, puede determinar muchas de las funciones distintivas de Neogenina 1 con sus ligandos en un contexto fisiológico, ya que Neo ICD puede localizarse preferentemente en el núcleo con RGMA o tener una localización citoplasmática y nuclear con Netrina-1. En un contexto tumoral, donde exista más de un ligando que sea capaz de inhibir la actividad pro-apoptótica de Neogenina 1, puede ser visto como un mecanismo de supervivencia tumoral dependiente del contexto celular de donde provenga el tumor.

En conclusión, Netrina-4 anula la función pro-apoptótica de Neogenina 1, en células de neuroblastoma humano SH-SY5Y.

8. BIBLIOGRAFÍA:

Alcántara, S.; Ruiz, M.; De Castro, F.; Soriano, E.; Sotelo, C. 2000. Netrin 1 acts as an attractive or as a repulsive cue for distinct migrating neurons during the development of the cerebellar system. *Development* **127(7)**: 1359–72.

Carmen, D.; Rosti6n, G.; Jáuregui L.; Broussain, V.; Gac, K.; Mariana, I.; y Cortez, D.; 2005. neuroblastoma: Forma de presentación y probabilidad de resección quirúrgica. *Revista Pediatría Electrónica*, **2(2)**: 16–20.

Choudhury, R.; Karmakar, S.; Banik, N.; Ray, S. 2012. Targeting angiogenesis for controlling neuroblastoma. *Journal of oncology*, **2012**: 1-14.

Cole, S. J.; Bradford, D.; y Cooper, H. M. 2007. Neogenin: A multi-functional receptor regulating diverse developmental processes. *The international journal of biochemistry & cell biology*, **39(9)**: 1569–1575.

Conrad, S.; Genth, H.; Hofmann, F.; Just, I.; Skutella, T. 2007. Neogenin-RGMA signaling at the growth cone is bone morphogenetic protein-independent and involves RhoA, ROCK, and PKC. *The Journal of biological chemistry*, **282(22)**: 16423–16433.

De Vries, M. y Cooper, H. M. 2008. Emerging roles for neogenin and its ligands in CNS development. *Journal of neurochemistry*, **106(4)**: 1483–1492.

Delloye-Bourgeois, C.; Fitamant, J.; Paradisi, A.; Cappellen, D.; Douc-Rasy, S.; Raquin, M.; Stupack, D. 2009. Netrin-1 acts as a survival factor for aggressive neuroblastoma. *The Journal of experimental medicine*, **206(4)**: 833–847.

Delloye-Bourgeois, C.; Goldschneider, D.; Paradisi, A.; Therizols, G.; Belin, S.; Hacot, S.; Rosa-Calatrava, M. 2012. Nucleolar localization of a netrin-1 isoform enhances tumor cell proliferation. *Science signaling*, **5(236)**: ra57.

Eveno, C.; Contreres, J.; Hainaud, P.; Nemeth, J.; Dupuy, E.; Pocard, M. 2013. Netrin-4 overexpression suppresses primary and metastatic colorectal tumor progression. *Oncology Reports*, **1**: 73–78.

Eveno, C.; Broqueres-You, D.; Feron, J.; Rampanou, A.; Tijeras-Raballand, A.; Ropert, S.; Leconte, L. 2011. Netrin-4 delays colorectal cancer carcinomatosis by inhibiting tumor angiogenesis. *The American journal of pathology*, **178(4)**: 1861–1869.

Ferrari-Toninelli, G.; Bonini, S.; Uberti, D.; Buizza, L.; Bettinsoli, P.; Poliani, P.; Facchetti, F.; Memo, M. 2010. Targeting Notch pathway induces growth inhibition and differentiation of neuroblastoma cells. *Neuro-oncology* **12(12)**: 1231–1243.

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

- Fitzgerald D.P.; Seaman, C.; Cooper H. M. 2006. Localization of Neogenin protein during morphogenesis in the mouse embryo. *Developmental Dynamics*. **235**: 1720-1725.
- Forcet, C.; Ye, X.; Granger, L.; Corset, V.; Shin, H.; Bredesen, D. E.; Mehlen, P. 2001. The dependence receptor DCC (deleted in colorectal cancer) defines an alternative mechanism for caspase activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **98(6)**: 3416–3421.
- Fujita, Y.; Taniguchi, J.; Uchikawa, M.; Endo, M.; Hata, K.; Kubo, T.; Mueller, B. K. 2008. Neogenin regulates neuronal survival through DAP kinase. *Cell Death and Differentiation* **15(10)**: 1593–1608.
- Gessert, S.; Maurus, D.; Kühl M. 2008. Repulsive guidance molecule A (RGM A) and its receptor neogenin during neural and neural crest cell development of *Xenopus laevis*. *Biology of the Cell*. **100**: 659-673.
- Glaß, M.; Jahnke, H.; Robitzki, A. 2010. Reverse Transcription PCR Screening of different neuronal guiding cues and their receptors in human staurosporine differentiated SH-SY5Y cells. *IFMBE Proceedings* **25(10)**: 98-101.
- Goldschneider, D.; Rama, N.; Guix, C.; Mehlen, P. 2008. The neogenin intracellular domain regulates gene transcription via nuclear translocation. *Molecular and cellular biology*, **28(12)**: 4068–4079.
- Goldschneider, D. y Mehlen, P. 2010. Dependence receptors: a new paradigm in cell signaling and cancer therapy. *Oncogene*, **29(13)**: 1865–1882.
- Guan W. y Condic M. L. 2003. Characterization of Netrin-1, Neogenin and cUNC-5H3 expression during chick dorsal root ganglia development. *Gene Expression Patterns*. **3**: 369-373.
- Hooper, C.; Tavassoli, M.; Chapple, J. P.; Uwanogho, D.; Goodyear, R.; Melino, G.; Lovestone, S. 2006. TAp73 isoforms antagonize Notch signalling in SH-SY5Y neuroblastomas and in primary neurones. *Journal of neurochemistry*, **99(3)**: 989–999.
- Hu, Y. C.; Lam, K. Y.; Law, S. 2001. Identification of Differentially Expressed Genes in Esophageal Squamous Cell Carcinoma (ESCC) by cDNA Expression Array: Advances in Brief Identification of Differentially Expressed Genes in Esophageal Squamous Cell Carcinoma (ESCC) by cDNA Expression. *Clin Cancer Res*, **7**: 2213–2221.
- Hu, Y.; Ylivinkka, I.; Chen, P.; LiLi; Hautaniemi, S.; Nyman, T.A. 2012. Netrin-4 Promotes Glioblastoma Cell Proliferation through Integrin $\beta 4$ Signaling. *Neoplasia*, **14(3)**: 219–227.
- Lambert, E. ; Coissieux, M. ; Laudet, V. ; Mehlen, P. 2012. Netrin-4 acts as a pro-angiogenic factor during zebrafish development. *The Journal of biological chemistry*, **287(6)**: 3987–3999.

- Lee, J. E.; Kim, H. J.; Bae, J. Y.; Kim, S. W.; Park, J.-S.; Shin, H. J., Han, W. 2005. Neogenin expression may be inversely correlated to the tumorigenicity of human breast cancer. *BMC cancer*, **5**: 154.
- Lejmi, E. ; Leconte, L. ; Pédrón-Mazoyer, S. ; Ropert, S. ; Raoul, W. ; Lavalette, S. ; Bouras, I. 2008. Netrin-4 inhibits angiogenesis via binding to neogenin and recruitment of Unc5B. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **105(34)**: 12491–12496.
- Li, V. S. W.; Yuen, S. T.; Chan, T. L.; Yan, H. H. N.; Law, W. L.; Yeung, B. H. Y.; Chan, A. S. Y. 2009. Frequent inactivation of axon guidance molecule RGMA in human colon cancer through genetic and epigenetic mechanisms. *Gastroenterology*, **137(1)**: 176–187.
- Matsunaga, E.; Nakamura, H.; Chédotal, A. 2006. Repulsive guidance molecule plays multiple roles in neuronal differentiation and axon guidance. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, **26(22)**: 6082–6088.
- Matsunaga, E.; Tauszig-Delamasure, S.; Monnier, P. P.; Mueller, B. K.; Strittmatter, S. M.; Mehlen, P.; Chédotal, A. 2004. RGM and its receptor neogenin regulate neuronal survival. *Nature cell biology*, **6(8)**: 749–755.
- Mehlen, P.; Delloye-Bourgeois, C.; Chédotal, A. 2011. Novel roles for Slits and netrins: axon guidance cues as anticancer targets? *Nature reviews. Cancer*, **11(3)**: 188–197.
- Meyerhardt, J. A.; Look, A. T.; Bigner, S. H.; Fearon, E. R. 1997. Identification and characterization of neogenin, a DCC-related gene. *Oncogene*, **14**: 1129-1136.
- Meyerhardt, J.; Caca, K.; Eckstrand, B. C.; Hu, G.; Lengauer, C.; Banavali, S.; Look, A. T. 1999. Netrin-1: interaction with deleted in colorectal cancer (DCC) and alterations in brain tumors and neuroblastomas. *Cell growth & differentiation: the molecular biology journal of the American Association for Cancer Research*, **10(1)**: 35-42.
- Milla, L. A.; Arros, A.; Espinoza, N.; Remke, Marc; Kool, M; Taylor ,M. D.; Pfister, S. M.; Wainwright, B.J, and Palma, V. 2013. Neogenin1 is a sonic hedgehog target in medulloblastoma and is necessary for cell cycle progression. *International journal of cancer*. **00**: 1–11.
- O'Donnell, M.; Chance, R. K.; Bashaw, G. J. 2009. Axon growth and guidance: receptor regulation and signal transduction. *Annual Review of Neuroscience*, **32(1)**: 383–412.
- Okamura, Y.; Kohmura, E.; Yamashita, T. 2011. TACE cleaves neogenin to desensitize cortical neurons to the repulsive guidance molecule. *Neuroscience research*, **71(1)**: 63–70.
- Patel, T. R.; Reuten, R.; Xiong, S.; Meier, M.; Winzor, D. J.; Koch, M.; Stetefeld, J. 2012. Determination of a molecular shape for netrin-4 from hydrodynamic and small angle X-ray scattering measurements. *Matrix biology: journal of the International Society for Matrix Biology*, **31(2)**: 135–140.

- Rajagopalan, S.; Deitinghoff, L., Davis, D., Conrad, S., Skutella, T., Chedotal, A., Mueller, B. K., et al. 2004. Neogenin mediates the action of repulsive guidance molecule. *Nature cell biology*, **6(8)**: 756–762.
- Schaffar, G.; Taniguchi, J.; Brodbeck, T.; Meyer, A. H.; Schmidt, M.; Yamashita, T.; Mueller, B. K. 2008. LIM-only protein 4 interacts directly with the repulsive guidance molecule A receptor Neogenin. *Journal of neurochemistry*, **107(2)**: 418–431.
- Sena-Esteves, M.; Tebbets, J.C.; Steffens, S.; Crombleholme, T.; Flake, A.W. 2004. Optimized large-scale production of high titer lentivirus vector pseudotypes . *Journal of Virological Methods*, **122(2)**: 131-139
- Srinivasan, K.; Strickland, P.; Valdes, A.; Shin, G. C.; Hinck, L. 2003. Netrin-1/neogenin interaction stabilizes multipotent progenitor cap cells during mammary gland morphogenesis. *Developmental cell*, **4(3)**: 371–382.
- Thiele C.J. 1998. neuroblastoma. *En J. Masters* (ed), Human Cell Culture, Vol 1. pp 21-53. Kluwer Academic Publishers, Lancaster, UK.
- Wilson, N. H. y Key, B. 2007. Neogenin: one receptor, many functions. *The international journal of biochemistry & cell biology*, **39(5)**: 874–878.
- Wu, X.; Li, Y.; Wan, X.; Kayira, T. M.; Cao, R.; Ju, X.; Zhu, X. 2012. Down-regulation of neogenin accelerated glioma progression through promoter Methylation and its overexpression in SHG-44 Induced Apoptosis. *PLoS one*, **7(5)**: 1-12.
- Yang, F.; West, A. P.; Allendorph, G. P.; Choe, S.; Bjorkman, P. J. 2008. Neogenin interacts with hemojuvelin through its two membrane-proximal fibronectin type III domains. *Biochemistry*, **47(14)**: 4237–4245.
- Yang, Y. H. C.; Szabat, M.; Bragagnini, C.; Kott, K.; Helgason, C. D.; Hoffman, B. G.; Johnson, J. D. 2011. Paracrine signalling loops in adult human and mouse pancreatic islets: netrins modulate beta cell apoptosis signalling via dependence receptors. *Diabetologia*, **54(4)**: 828–842.
- Yin, Y.; Sanes, J. R.; Miner, J. H. 2000. Identification and expression of mouse netrin-4. *Mechanisms of development*, **96(1)**: 115–119.
- Ylivinkka, I.; Hu, Y.; Chen, P.; Rantanen, V.; Hautaniemi, S.; Nyman, T.; Keski-Oja, J.; Hyytiäinen, M. 2013. Netrin-1-induced activation of Notch signaling mediates glioblastoma cell invasion. *Journal of cell science*. **126(11)**: 2459–69.
- Zhou, Z.; Xie, J.; Lee, D.; Liu, Y.; Jung, J.; Zhou, L.; Xiong, S. 2011. Neogenin regulation of BMP-induced canonical Smad signaling and endochondral bone formation. *Developmental cell*, **19(1)**: 706–721