

UCH-FC
DOC-BMCM
S684
C.1



**Adquisición de nuevas funciones y mecanismos de expresión asociados a
la vía Hedgehog en los miembros de vertebrados de la familia
NEO1/DCC/fra.**

**Tesis entregada a la
Universidad de Chile
en cumplimiento parcial de los requisitos
para optar al grado de**

**Doctor en Ciencias con mención en Biología Molecular, Celular y
Neurociencias**

Facultad de ciencias
por

Luis Marco Antonio Solano Román

Junio, 2017

Director de Tesis: Dra Verónica Palma A.
Co-Director de Tesis: Dr. Álvaro Glavic M.

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

Se informa a la escuela de postgrado de la Facultad de Ciencias que la
Tesis de Doctorado presentado por el candidato

Luis Marco Antonio Solano Román

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

25 ENE 2017

Director de tesis

Dra. Verónica Palma Alvarado



Co-Director de tesis

Dr. Álvaro Glavic Maurer

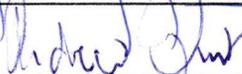


Comisión de Evaluación de tesis

Dra. María Rosa Bono (presidente)



Dr. Andrew Quest



Dr. Ricardo Cabrera



Dr. Patricio Olguín



BIOGRAFÍA



Luis Solano Román nació el 9 de mayo de 1986 en la ciudad de Melipilla en la región Metropolitana de Chile. Comenzó su carrera universitaria en el año 2004 en la Universidad de Santiago de Chile, ingresando a la carrera de Bioquímica y titulándose el año 2010. Al año siguiente, ingresó al programa de Doctorado en Ciencias con mención en Biología Molecular, Celular y Neurociencias en la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile. Actualmente se encuentra trabajando como profesor del curso Bases Biológicas y neurociencias en la Universidad Católica Silva Henríquez y pertenece al grupo de trabajo del laboratorio de Biología Molecular y Celular de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile.

AGRADECIMIENTOS

Me parece que los procesos más importantes de la vida son aquellos que te hacen cambiar en algún aspecto y para mi este periodo me hizo reconocer e incorporar múltiples aspectos de mi vida que probablemente nunca hubiese obtenido sin el Doctorado.

Mucho de lo adquirido se lo debo a mis tutores, Verónica y Álvaro, ellos con su infinita paciencia me han guiado durante todo este proceso. Pasamos buenos y malos momentos, pero de todos ellos saqué una lección importante. Gracias por su confianza, tiempo, por sus ganas de querer sacar este proyecto adelante y por enseñarme a manejar una tesis que parecía no tener dirección.

Quiero agradecer a mi comisión de tesis, por sus valiosos aportes durante los distintos exámenes rendidos. Además, agradecer a todos los que han colaborado con algún reactivo, con manos para realizar algún experimento o bien con sus aportes en el análisis de mis resultados, particularmente al laboratorio de Células Troncales y Biología del Desarrollo y al laboratorio de Biología del Desarrollo que dirigen mis tutores.

Fundamental en todo esto proceso y en mi vida en general es mi Madre, ella se ha esforzado mucho por vernos surgir a mis hermanos y a mí y por ello, todos los buenos frutos de esto van dedicados a ella. Quiero agradecer a mis hermanos, Marina y José Luis, quienes me han apoyado en esta y en todas mis locuras. A mi cuñado Sady, quien en conjunto con mi hermana me regalaron uno de los más grandes tesoros de mi vida, mi ahijado Augusto. A mi madrina, que está conmigo de manera incondicional. A Mario, que le ha dado a mi madre un gran soporte en estos últimos años y por finalmente a la familia que me mira desde alguna parte, mi Padre, mi Padrino y mis abuelos.

Quiero agradecer a mis amigos, ellos son los que me escuchan, dan consejos, me retan y me han mantenido con una sonrisa en la cara. A los del colegio, Daniela, Ingrid y Cristian, que aun después de tantos años siguen firmes conmigo. A Yohanna, con quien vivimos 5 años y nos volvimos como hermanos. A los amigos del laboratorio, los que ya son parte importante de mi vida y no habría hecho nada sin ellos, Emiliano, Bárbara, Andrea, Fernanda, Salomé, Jorge, Consuelo A., Catalina y Loren, a todos ellos infinitas gracias por ser parte de esto y por querer verme bien a toda costa. También muchas gracias a Pablo Lois, por sus interesantes conversaciones y por verme como un buen elemento.

Finalmente, quiero dar las gracias a mis grandes amigos de Wing Chun, Johann, Juan Carlos, Fernando, Diego y Felipe con quienes bajaba mis niveles de estrés, ya sea a golpes o con una buena conversación. Quiero agradecer también a mi maestro Rodrigo, por interesarme en algo que se volvió imprescindible para mí y también a Cristóbal a quien afortunadamente me lo topé en el camino y con quien todos los días aprendo algo nuevo.

Debo decir que me cuesta dar una mirada hacia atrás y ver con cariño y nostalgia un proceso donde nada fue fácil, pero tengo la convicción que la perspectiva del tiempo me ayudará a ver mis aciertos y errores en estos años, como una de las grandes y mejores experiencias de mi vida.

INDICE DE CONTENIDOS

BIOGRAFÍA	iii
AGRADECIMIENTOS	iv
INDICE DE CONTENIDOS	v
INDICE DE TABLAS	viii
INDICE DE FIGURAS	viii
LISTA DE SIGLAS Y ABREVIATURAS	x
1.- RESUMEN	1
2.- ABSTRACT	3
3.- INTRODUCCIÓN	5
1.- Familia de morfógenos Hedgehog.....	5
2.- SHH en el desarrollo del sistema nervioso de mamíferos.....	7
3.- Transducción de señales de la familia Hedgehog.....	10
4.- Neogenina 1, un posible <i>loop</i> de auto-regulación negativo de la vía HH.....	13
5.- Neogenina, DCC y frazzled.....	18
6.- Relación entre la señalización HH, DCC y fra.....	21
4.- HIPÓTESIS	23
5.- OBJETIVO GENERAL	23
6.- OBJETIVOS ESPECÍFICOS	23
7.- MATERIALES Y MÉTODOS	24
1.- Reactivos e insumos.....	24
2.- Anticuerpos.....	25
3.- Cultivo celular.....	26

3.1.- Cultivo primario de precursores granulares cerebelares (CGNPs)	26
3.2.- Líneas celulares.....	27
4.- Tratamientos farmacológicos en CGNPs.....	27
5.- Extracción de ARN, síntesis de cDNA y PCR cuantitativo en tiempo real (qPCR).....	27
6.- Western Blot.....	29
7.- Análisis <i>in silico</i>	30
8.- Inmunoprecipitación de la cromatina.....	31
9.- Ensayo reportero Luciferasa.....	34
10.- Detección de fosfatasa alcalina en células C3H10T1/2.....	37
11.- Sistema Gal4/UAS.....	38
12.- MARCM (Mosaic Analysis with a Repressible Cell Marker).....	40
13.- Inmunofluorescencia de discos imaginales de ala-tórax.....	41
14.- Montaje de alas adultas de <i>D. melanogaster</i>	41
8.- RESULTADOS.....	43
1.- <i>Dcc</i> posee GBS funcionales en su región promotora y dentro del primer intrón.....	43
2.-SHH no sería suficiente para inducir la expresión de <i>Dcc</i> en CGNPs.....	48
3.- La señalización HH no regula la expresión de <i>fra</i>	51
4.- Neo1 y <i>Dcc</i> no conservan el mecanismo de regulación negativo sobre la vía HH.....	56
5.- Frazzled no induce cambios en la actividad de la vía HH.....	61
9.- DISCUSIÓN.....	69
1.- La activación de la expresión de <i>Dcc</i> requeriría de vías adicionales a SHH...69	

2.- Fra no conserva los mecanismos de expresión de <i>Neo1</i> y <i>Dcc</i>	76
3.- Neo1 detiene la diferenciación inducida por SHH, mientras que Dcc no es capaz de regular esta vía de señalización.....	78
4.- Frazzled no regula la vía HH en <i>D. melanogaster</i>	80
10.- CONCLUSIONES.....	84
11.- REFERENCIAS.....	85

INDICE DE TABLAS

Tabla1. Listado de partidores usados en la presente de tesis.....	34
Tabla2. tesis Diseño experimental del ensayo reportero lucifera36	36
Tabla 3. Cepas de <i>D. melanogaster</i> usadas en esta tesis.....	42

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Gradiente de Hedgehog en sistemas modelo <i>D. melanogaster</i> y de mamíferos.....	9
Figura 2. Modelo hipotético de auto-regulación negativa de HH, mediado por NEO1.....	17
Figura 3. Análisis de secuencias entre las proteínas de la familia Fra/NEO1/DCC.....	20
Figura 4. Representación esquemática del sistema Gal4/UAS en <i>D. melanogaster</i>	39
Figura 5. Descripción del sistema Mosaic Analysis with a repressible Marker (MARCM).....	40
Figura 6. <i>Dcc</i> posee GBS en sus secuencias regulatorias	46
Figura 7. Los GBS1 y GBS2 de <i>Dcc</i> activan la expresión del reportero lucifera en respuesta a GLI1	48
Figura 8. Influencia de la vía de señalización HH sobre la expresión de <i>Dcc</i> en ratón	51
Figura 9. La expresión endógena de Fra no es similar al patrón de expresión de los blancos de HH, Ptc y Ci.....	54
Figura 10. HH no induce cambios en la expresión de Fra.....	56

Figura 11. Sólo Neo1 y no Dcc detiene la diferenciación inducida por SHH.....	60
Figura 12. Cambios en la expresión de Fra inducen fenotipos no autónomos en ala adulta de <i>D. melanogaster</i>	64
Figura 13. La pérdida de función de Fra no produce cambios en la expresión de Ptc.....	65
Figura 14. La pérdida función total de Fra no induce cambios en la expresión de Ptc y Ci.....	66
Figura 15. La ganancia de función de Fra promueve una desorganización de los tejidos, sin afectar la expresión de Ptc.....	69
Figura 16. El aumento en la expresión de Fra induce muerte celular por apoptosis en regiones de baja actividad de HH.....	70

LISTA DE SIGLAS Y ABREVIATURAS

cDNA	DNA copia
Tris-HCL	hidrocloruro tris-hydroximetil-aminometano
TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletil-N-diamina
HEPES	4-(2-Hidroxietil)-piperazin-1-ácido etanosulfónico
KCl	Cloruro de potasio
NaCl	Cloruro de sodio
NBT	Cloruro de 4-nitro azul tetrazolium ⁻
BCIP	5-bromo-4-cloro-3-indol fosfato
HRP	Horseshoe peroxidase (Peroxidasa de rabanito)
dNTPs	Desoxiribonucleotidos trifosfato
Dpp	Descapentaplegic

1. Resumen

La señalización Hedgehog (HH) es importante durante el desarrollo de invertebrados y vertebrados. Es altamente conservada entre especies y su grado de activación dependerá de su disponibilidad en los tejidos competentes. Uno de sus blancos transcripcionales en vertebrados es Neogenina 1 (Neo1), un receptor de membrana involucrado en múltiples procesos durante el desarrollo pre y post-natal. En este contexto, se ha observado que el fenotipo de ratones mutantes de *Neo1* es similar a los encontrados en ratones mutantes de *Gli3*, un regulador negativo de la vía HH, indicando que Neo1 también podría cumplir con este papel.

Neo1 posee homólogos en todo el reino animal, siendo fra de *D. melanogaster* uno de sus ortólogos más lejanos, mientras que en vertebrados, Neo1 tiene paralogía con Dcc. Estas tres proteínas conservan estructura, ligandos y algunas funciones, pero a la fecha no se ha descrito si Dcc y fra también podrían formar parte de la vía HH al igual que Neo1. Por lo tanto, en este trabajo se evaluó la conservación funcional de estas proteínas como blancos transcripcionales y como moduladores negativos de la vía HH, tanto en modelo murino como en *D. melanogaster*.

Los resultados mostraron que en precursores neuronales cerebelares murino, *Dcc* no reduce su expresión luego de reprimir la vía Shh. A pesar de ello, los sitios de unión a Gli (GBS) sí tienen capacidad de inducir la expresión del reportero luciferasa en presencia de Gli1, indicando que Shh no sería suficiente

para inducir la expresión de este gen. Por otra parte, fra no muestra cambios en su expresión luego de sobre-activar o reprimir la vía hh, por lo que su expresión no estaría modulada por este morfógeno.

Por otra parte, al evaluar la función como reguladores negativos de la vía HH, sólo Neo1 la regularía negativamente, ya que su sobre-expresión limitaría o reprimiría la diferenciación a linaje osteogénico inducida por Shh en células C3H10T1/2.

Según estos resultados, Dcc y fra no conservarían las funciones asociadas a HH observadas en Neo1, por lo tanto, el modelo evolutivo de esta familia de receptores, plantearía que el mecanismo de auto-regulación negativo de HH habría aparecido luego del evento de duplicación génica que dio origen a Neo1 y Dcc y que este sólo fue co-optado por Neo1.

2.- Abstract

Hedgehog signaling (HH) is important during the development of invertebrates and vertebrates. It is highly conserved between species and its degree of activation will depend on its availability in the competent tissues. One of its transcriptional targets in vertebrates is Neogenin 1 (Neo1), a membrane receptor involved in multiple processes during pre and post natal development. In this context, it has been observed that the *Neo1* mutant mice phenotype is similar to those found in mutant mice of *Gli3*, a negative regulator of the HH pathway, indicating that Neo1 could also fulfill this role.

Neo1 has homologs throughout the animal kingdom, being fra in *D. melanogaster* one of its orthologs more distant, whereas in vertebrates, Neo1 has paralogy with Dcc. These three proteins retain structure, ligands and some functions, but to date it has not been described whether Dcc and fra could also form part of the HH pathway as well as Neo1. Therefore, the functional conservation of these proteins as transcriptional targets and as negative modulators of the HH pathway in both murine and *D. melanogaster* models were evaluated in this study.

The results showed that in murine cerebellar neuronal precursors, Dcc does not reduce its expression after repressing the Shh pathway. However, Gli binding sites (GBS) do have the ability to induce the expression of the luciferase reporter in the presence of Gli1, indicating that Shh would not be sufficient to

induce the expression of this gene. On the other hand, *fra* shows no changes in its expression after over-activating or repressing the hh pathway, so its expression would not be modulated by this morphogen.

On the other hand, when evaluating the function as negative regulators of the HH pathway, only *Neo1* would regulate it negatively, since its overexpression would limit or repress the differentiation to Shh-induced osteogenic lineage in C3H10T1 / 2 cells.

According to these results, *Dcc* and *fra* would not retain the HH-associated functions observed in *Neo1*, therefore, the evolutionary model of this family of receptors would suggest that the mechanism of negative self-regulation of HH would have appeared after the event of gene duplication which gave rise to *Neo1* and *Dcc* and that this was only co-opted by *Neo1*

3.- Introducción

3.1.- Familia de morfógenos Hedgehog

El desarrollo embrionario de invertebrados y vertebrados es un proceso finamente regulado, que requiere de múltiples factores intrínsecos y extrínsecos actuando coordinadamente para asegurar la correcta organización de los tejidos. Por ello, resulta fundamental la existencia de una estrecha comunicación entre las células indiferenciadas del embrión para que puedan iniciar su proceso de diferenciación hacia un linaje particular. Esta comunicación es realizada por múltiples moléculas secretadas, llamadas morfógenos¹, las que son liberadas desde una fuente celular productora y difunden en gradiente hacia los diferentes tejidos indiferenciados, los cuales son competentes a estas señales de manera tiempo y concentración dependiente, interpretándolas como una señal de posicionamiento espacial, que activa la expresión de planes transcripcionales específicos que determinarán su destino^{1,2}.

La familia de morfógenos Hedgehog (HH) participa en el desarrollo embrionario de la mayoría de los metazoos y promueve diversas respuestas celulares, tales como proliferación, diferenciación, migración y crecimiento³. Asimismo, en vertebrados adultos HH es fundamental en la mantención de los diferentes nichos troncales, induciendo la auto-renovación y diferenciación de las células troncales⁴.

Según se ha descrito, *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) es uno de los pocos organismos invertebrados que no tiene homólogos de esta familia⁵, sin

embargo, se ha descrito que posee expresión de algunos homólogos de las proteínas asociadas con la vía de transducción de señales, tal es el caso del receptor de Hedgehog, llamado *patched* (*ptc*)⁵. Por otro lado, *Drosophila melanogaster* (*D. melanogaster*) presenta sólo un homólogo de esta familia, llamado Hedgehog (*hh*) y participa, entre otros procesos, en la especificación de identidad de células durante el periodo larvario. Ejemplo de ello, es lo que ocurre en el disco imaginal de ala-tórax (tejido epitelial embrionario indiferenciado que en el adulto dará origen al ala y tórax de *D. melanogaster*), allí *hh* es expresado por las células del compartimento posterior y difunde en gradiente hacia las células del compartimento anterior en un diámetro aproximado de 10 células, especificando el área central del ala adulta de *D. melanogaster*, es decir el área comprendida entre las venas 3 y 4^{6,7} (Figura 1 A-D).

Los mamíferos como *Mus musculus* (*M. musculus*) y *Homo sapiens* (*H. sapiens*) poseen 3 homólogos de esta familia, denominados Indian Hedgehog (IHH), Desert Hedgehog (DHH) y Sonic Hedgehog (SHH), los que están codificados en cromosomas y genes independientes⁸. SHH es el miembro más estudiado de esta familia por ser crucial durante el desarrollo del sistema nervioso⁹, en la determinación del número dígitos¹⁰ y en la mantención de los nichos troncales en el adulto⁴. Algunas mutaciones en componentes de la vía SHH, pueden provocar deficiencias en su señalización, ya sea por problemas de secreción, recepción o transducción de la señal, produciendo fenotipos como holoprocencefalía, espina bífida o letalidad embrionaria¹¹. Asimismo, mutaciones

que sobre-activen la vía SHH puede producir extremidades con un mayor número de dígitos (polidactilia), o bien inducir la generación de algunos tipos de cáncer como carcinoma baso celular o meduloblastoma^{10,12,13}.

3.2.- SHH en el desarrollo del sistema nervioso de mamíferos

En etapas tempranas del desarrollo del sistema nervioso de mamíferos, SHH es expresado y secretado por la notocorda, un cordón mesodérmico que se encuentra ubicado ventral al tubo neural¹⁴. Desde allí, SHH difunde en gradiente hacia la llamada "placa del piso" donde induce la expresión de altas cantidades de SHH, las que difunden hacia las regiones dorsales del tubo, siendo reconocidas e interpretadas por las células progenitoras neurales, determinando su diferenciación hacia un linaje neuronal¹⁵. Esta gradiente de SHH es antagónica a la de las proteínas Wnt y proteína morfogénica ósea (BMP, del inglés **Bone Morphogenetic Protein**) secretadas por la epidermis y amplificada por la "Placa del techo" del tubo neural². La combinación de las diferentes concentraciones de estas proteínas es leída e interpretada por las células del tubo, entregándoles un valor posicional que está definido por la expresión de diferentes factores de transcripción tales como Nkx2.2 y Olig2 entre otros¹⁶ (Figura 1 E-F).

En etapas posteriores del desarrollo de mamíferos, particularmente en el desarrollo del sistema nervioso dorsal, SHH cumple un papel mitogénico. Durante la formación del cerebelo, SHH es secretado por las células de Purkinje y corresponde al principal mitógeno de los precursores neuronales granulares cerebelares (CGNP, **Cereberal Granular Neural Precursor**)¹⁷. Estas células se

encuentran en la capa más externa del cerebelo (EGL, **External Granular Layer**) donde reconocen a SHH, activando múltiples oleadas de proliferación, que en *M. musculus* ocurren principalmente entre los días postnatales 5 y 8 (P5-P8)¹⁷. Luego, las CGNPs comienzan a migrar hacia la Glia de Bergman, la cual utilizan como guía para llegar a su destino en la capa interna del cerebelo (IGL, **Internal Granular Layer**), donde terminan su proceso de diferenciación¹⁷ (Figura 1G-H). Ratones mutantes con pérdida de función de *Shh* producen cerebelos más pequeños, mientras que el aumento en la actividad de SHH, producida principalmente por mutaciones en componentes de la vía de transducción de señales, conlleva a que las CGNPs sigan proliferando, propiciando la formación de cáncer cerebelar (Meduloblastoma)^{18,19}.

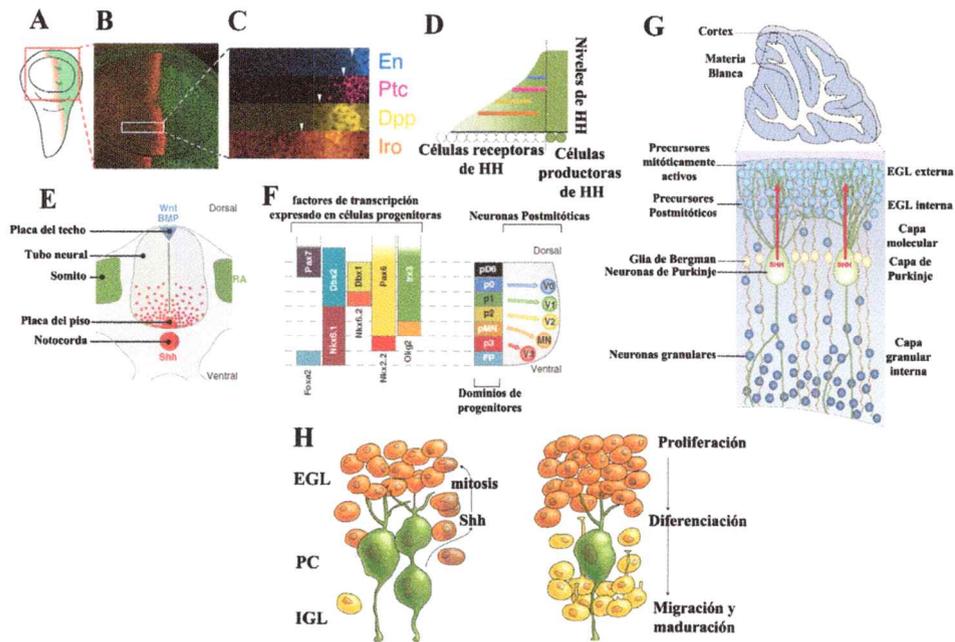


Figura 1. Gradiente de Hedgehog en sistemas modelo *D. melanogaster* y de mamíferos

A.- Representación esquemática de un disco imaginal de ala-tórax. En rojo se muestra la expresión del receptor *ptc* y en verde la región de expresión de *hh*. **B.-** Acercamiento de una inmunofluorescencia de la región central del disco imaginal. Las células productoras de *hh* se muestran en verde, mientras que en rojo se aprecia la expresión de *ptc*. **C.-** Límites de expresión de algunos genes blanco de *hh* en la región anterior del disco. En la región más anterior se muestran los blancos que necesitan de altas concentraciones de *hh* para poder expresarse, como es el caso de engrailed (*en*, en azul) y patched (*ptc*, en violeta). *decapentaplegic* (*dpp*, en amarillo), requiere de concentraciones intermedias de *hh*, mientras que *iroquos* (*iro*, en naranja) necesita de bajas concentraciones de *hh*. **D.-** Representación esquemática de la gradiente de *hh* en el disco imaginal de ala-tórax de *D. melanogaster*, en verde se muestra la difusión de *hh*. Las líneas coloreadas representan los límites de expresión de los distintos genes blanco de *hh* en respuesta a la gradiente. La línea vertical punteada corresponde a la división entre los compartimentos anterior y posterior. **E.-** Representación esquemática transversal del tubo neural en vertebrados, donde se muestran las diferentes señales que actúan sobre las células del tubo neural. En la región dorsal, específicamente en la placa del techo, se muestran las señalizaciones Wnt y BMP (azul). Los somitos (verde) que secretan ácido retinoico (RA). En la región ventral se observa la placa del piso y la notocorda, desde donde se produce SHH (rojo), el que difunde de ventral hacia dorsal. **F.-** Representación esquemática de la mitad ventral del tubo, donde la gradiente del morfógeno controla la posición e identidad de las células del tubo neural, a través de la regulación de la expresión de diferentes factores de transcripción. *Pax7*, *Pax6* e *Irx*, genes dorsales, ven reprimida su expresión en presencia de SHH, mientras que *Dbx1*, *Dbx2*, *Nkx6.1*, *Olig2*, *Nkx2.2* y *Foxa2* aumentan su expresión en respuesta al morfógeno. La respuesta diferencial de expresión de estos genes a las diferentes concentraciones

de SHH, Wnt y BMP define distintos límites de expresión y su combinatoria determinará el destino de los distintos progenitores (p) presentes en el tubo, los que pueden ser neuronas ventrales (V0 a V3) o motoneuronas (MN). G.- Representación esquemática del cerebelo de ratón en la primera semana postnatal. El corte muestra la posición de las células granulares (CGNPs), Neuronas de Purkinje y Glia de Bergman. Las células granulares postmitóticas migran desde la capa granular externa a través de las capas de células de Purkinje y molecular hasta la capa granular interna. Las CGNPs que aún no entran en diferenciación, se mantienen proliferando en la región más externa de la capa granular, debido a la presencia de SHH secretado por las neuronas de Purkinje. H.- Esquema representativo del rol de SHH como mitógeno en el cerebelo de mamíferos. SHH es expresado por las células de Purkinje y difunde hacia las capas más externas del cerebelo donde induce la proliferación de las CGNPs, las que posteriormente comienzan a diferenciarse y migrar hacia las capas más internas del cerebelo. EGL (External Granular Layer); PC (Purkinje Cells); IGL (Internal Granular Layer) (Esquema de elaboración propia modificado desde^{20,21,22,23}).

3.3.- Transducción de señales de la familia Hedgehog

La transducción de señales de HH es altamente conservada entre especies y su grado de activación dependerá de la disponibilidad de ligando. En *D. melanogaster*, la ausencia de hh permite que su receptor, patched (ptc), reprima la actividad de su correceptor smoothened (smo), facilitando la formación de un complejo citoplasmático compuesto por fused (fu) y costal 2 (cos2), que recluta al factor de transcripción cubitus interruptus (ci) y a 3 proteínas quinasas (caseína quinasa I, glicógeno sintasa quinasa III y proteína quinasa A). Las quinasas activadas fosforilan a ci, dejándolo como blanco del proteasoma, el cual lo procesa hasta su forma represora de la transcripción (ci^R). Esta última, se transloca al núcleo donde reconoce y se une a secuencias de ADN específicas denominadas cubitus interruptus Binding Sites (ciBS), inhibiendo la transcripción de los genes blanco de hh¹¹.

En presencia de hh, ptc deja de reprimir a smo, el cual secuestra a fu y cos2, evitando la formación del complejo de quinasas y por lo tanto, se acumula

la forma no procesada y activadora de la transcripción de ci (ci^A), la que una vez en el núcleo desplaza por afinidad a ci^R desde los $ciBS$, activando la transcripción de los genes blanco de hh , como ci y ptc ¹¹.

En vertebrados se han descritos tres proteínas homólogas a ci , los llamados factores de transcripción Gli (Gli1, Gli2 y Gli3). Gli1 sólo tiene el dominio de activación de la transcripción, mientras que Gli2 y Gli3, tienen acción dual como represores y activadores de la transcripción¹¹. En general, se establece que Gli2 es activador de la transcripción, Gli1 es un potenciador de la señal de Gli2 y Gli3 es principalmente represor¹¹. El modelo actual apoya un código combinatorio, que es dependiente del contexto celular, donde la sumatoria de factores Gli activadores y represores, guiarán la respuesta celular mediada por la familia HH en vertebrados²⁴.

Adicionalmente, se ha observado que el reconocimiento y recepción del ligando HH requiere de la presencia de diversos co-receptores de Ptc. En *D. melanogaster*, estos co-receptores son *ihog* y *boi*, quienes tienen estructura y función homólogas²⁵. Ellos reconocen y ayudan en el anclaje del ligando hh a su receptor en la superficie de la célula y su ausencia propicia deficiencias en la activación de la vía hh ²⁶. En mamíferos, esta función es llevada a cabo por CDO y BOC, quienes son homólogos *ihog* y *boi* respectivamente, y adicionalmente por Gas, proteína que se encuentra sólo en mamíferos y no posee una estructura común con los co-receptores ya mencionados. Durante el desarrollo del tubo neural de *M. musculus*, Cdo, Boc y Gas, a pesar de tener funciones redundantes,

no comparten sus territorios de expresión. Cdo se expresa muy ventralmente en la notocorda y la placa del piso, Boc se expresa en regiones mediales y dorsales y Gas lo hace en regiones dorsales²⁷. Ratones mutantes, con falta de función de cualquiera de estos 3 co-receptores exhiben fenotipos de falta de función de Hh²⁷.

Una importante característica de la vía HH es su capacidad de establecer distintos mecanismos de auto-regulación positivos y negativos, los que potencian o reprimen la vía, respectivamente. En *D. melanogaster*, *ci* además de ser el factor de transcripción efector de la señalización hh, es uno de sus blancos transcripcionales, por lo que altas concentración del morfógeno producen alta acumulación de *ci*^A, potenciado la señalización²⁸. De manera similar, la activación de la vía HH en mamíferos permite la acumulación de Gli2 activador, induciendo la expresión de Gli1, estableciendo un mecanismo de auto-regulación positivo similar al de *D. melanogaster*²⁹. Por otro lado, la activación de la vía HH en *D. melanogaster* y en mamíferos promueve la expresión de Ptc, reprimiendo la actividad de la vía a través de dos mecanismos. El primero consiste en el secuestro del ligando HH, para enviarlo a degradación lisosomal y el segundo, es a través de la inhibición de Smo³⁰. Similarmente, Hip es un receptor de HH, que está presente sólo en mamíferos, y participa en el apagamiento de la señalización de manera similar a Ptc ya que, también es un blanco transcripcional y su expresión en la membrana permite el secuestro del ligando para su degradación lisosomal³¹. Estos mecanismos de auto-regulación positivos y

negativos, son claves para controlar posibles eventos de sobre-activación o reducción de la señalización HH, evitando así la generación de enfermedades³².

3.4.- Neogenina 1, un posible *loop* de auto-regulación negativo de la vía Hedgehog

Neogenina 1 (NEO1) es un receptor de membrana involucrado en múltiples procesos pre y post natales³³. Fue descrita inicialmente durante el desarrollo del sistema nervioso embrionario de pollo, como una de las principales proteínas participantes del proceso de guía axonal, expresándose en la punta de los conos de los axones en crecimiento, para reconocer gradientes de sus ligandos de la familia de las Netrininas (NTN) o RGM (del inglés, **R**epulsive **G**uidance **M**olecules), provocando un efecto de atracción o repulsión respectivamente³⁴. Actualmente, se sabe que NEO1 participa de otros múltiples procesos y respuestas celulares. Al respecto, NEO1 tiene un rol en angiogénesis, actuando de forma similar a la descrita en el desarrollo del sistema nervioso, ya que se expresa en la punta de crecimiento de las células endoteliales, donde reconoce a sus ligandos para guiar a las células hacia su posición de destino³⁵. Otros estudios, sugieren que NEO1 también podría actuar como un regulador transcripcional, ya que en determinados contextos celulares y en presencia de su ligando RGMa, el fragmento intracelular de NEO1 sería cortado por una γ -Secretasa y luego se translocaría al núcleo para regular la transcripción de determinados genes, como Smad5 y Raptor, en un mecanismo similar al utilizado por la señalización Notch-Delta³⁶. Adicionalmente, NEO1 también es importante

durante el desarrollo del cerebelo, promoviendo el ciclo celular de las CGNCPs, ya que ratones mutantes con pérdida de función de *Neo1* muestran una detención del ciclo celular en la transición de las fases G2 a M³⁷.

Además, se ha postulado que NEO1 pertenece a la familia de los receptores de dependencia³⁸. Este tipo de receptores, en presencia de sus ligandos, inducen respuestas celulares que se asocian principalmente con proliferación; diferenciación o crecimiento, mientras que en la ausencia del ligando desencadenan muerte celular por apoptosis³⁸. Dentro de los ligandos de NEO1, asociados con esta función, se encuentra la familia de las Netrinas (NTN), la que está compuesta por proteínas relacionadas estructuralmente a las lamininas y actúan como señales quimiotrópicas para células migratorias y axones en crecimiento durante el desarrollo neural³⁹. Esta familia de proteínas tiene múltiples roles, como influenciar la organogénesis del sistema nervioso central (SNC), dirigiendo la migración celular y mediando la adhesión celular en el pulmón, páncreas, glándula mamaria, red vascular y musculatura⁴⁰. En mamíferos, la familia de las NTN está compuesta por cinco miembros, tres de ellas secretadas (Netrina 1, 3 y 4) y dos ancladas a la membrana mediante un tallo GPI (Glicosilfosfatidilinositol); Netrina-G1 y Netrina-G2. Estas proteínas son capaces además de unirse a DCC y proteínas de la familia UNC5³⁹. Por otro lado, la familia de proteínas RGM también pertenece al grupo de ligandos de NEO1 y está compuesta por RGMa, RGMb y RGMc en mamíferos⁴¹. Estas proteínas pueden encontrarse en forma soluble o ancladas a la membrana a través de un tallo GPI y cada miembro se expresa en distintos tejidos y podrían estar

involucradas en distintos procesos, como el metabolismo del hierro, la regulación de la guía axonal y la supervivencia neuronal en el desarrollo del SNC⁴¹.

En nuestro laboratorio, se determinó mediante aproximaciones *in vitro* e *in vivo* que *Neo1* es un blanco transcripcional de SHH en vertebrados⁴². Tratamientos farmacológicos con el agonista de la vía HH (Purmorfamina) realizados en cultivos primarios de CGNPs, aumentan la expresión de *Neo1*, así como de los blancos transcripcionales clásicos, *Ptc1* y *Gli1*³⁷. Estos resultados se validaron en experimentos con ratones mutantes condicionales para *Ptc1*, con consecuente sobre-activación de la vía Shh a nivel de los progenitores cerebelares. Además, muestras de pacientes con meduloblastoma desmoplástico causado por sobre-activación de la vía SHH, mostraban un incremento en los niveles de mRNA de *NEO1*³⁷. Asimismo, hibridaciones *in situ* de peces mutantes con pérdida de función de *smo* o *gli1*, o tratados farmacológicamente con inhibidores para la señalización hh, muestran una marcada reducción en los niveles del mRNA de *neo1*⁴³. Adicionalmente, se describió la existencia de un sitio de unión funcional para los factores Gli (GBS, del inglés **G**li **B**inding **S**ite) dentro del primer intrón del gen de *NEO1* humano, similar al encontrado dentro de la región promotora del gen *Neo1* en ratón^{37,43}. Todos estos antecedentes indican que *Neo1* es un blanco transcripcional en organismos vertebrados.

Por otro lado, Krauss y colaboradores propusieron que *Neo1* podría regular negativamente la vía de señalización Shh en el contexto del desarrollo de

los primordios de extremidad de ratón⁴⁴. Mediante hibridación *in situ* se observó que ratones mutantes para *Neo1* exhiben expresión ectópica de *Ptc1* y *Gli1*, junto con una expansión del territorio de expresión de *Shh*⁴⁴. Además, estos ratones mutantes exhiben un fenotipo de polidactilia de baja penetrancia, similar a los fenotipos que se observan en ratones con falta de función de *Gli3*, un represor de la señalización Shh^{44,45}. Los autores indican que esta posible regulación negativa no sería a través del secuestro del ligando Shh por parte de *Neo1*⁴⁴. Sin embargo, en otro de sus trabajos, mostraron en el contexto del desarrollo de miotubos de ratón, que *Neo1* es capaz de interactuar con *Cdo*, uno de los co-receptores que actúan positivamente sobre la señalización Shh⁴⁶.

Según estos antecedentes, *NEO1* sería un nuevo componente de la vía de señalización HH en mamíferos, formando parte de un nuevo mecanismo de auto-regulación negativo. Como se muestra en la Figura 2, la presencia del morfógeno HH estimula la expresión de *NEO1* y una vez que el receptor se encuentra anclado en la membrana plasmática, podría reprimir la señalización, posiblemente a través del secuestro de alguno de los co-receptores positivos de *PTC1*.

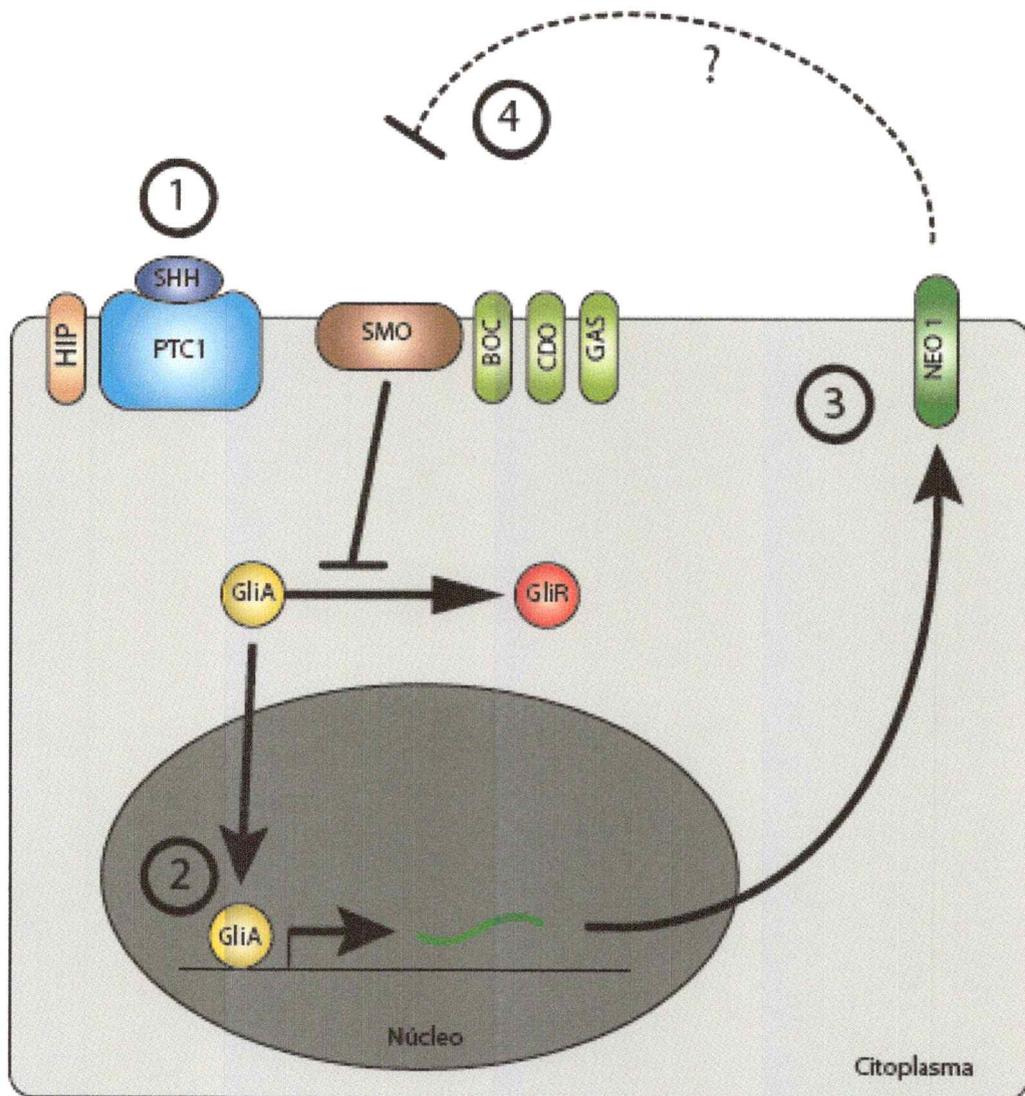


Figura 2. Modelo hipotético de auto-regulación negativa de HH mediado por NEO1. El morfógeno SHH, induce a la acumulación de Gli activadores (GliA), los cuales se translocan al núcleo (Paso 1). Allí, Gli^A promueve la expresión de *NEO1*, el cual se traduce en el citoplasma (Paso 2) y luego se expresaría en la membrana plasmática (paso 3), donde una vez anclado estaría mediando la regulación negativa, posiblemente mediante la interacción y secuestro de alguno de los correceptores positivos de esta vía de señalización (Paso 4).

3.5.- Neogenina 1, DCC y frazzled

La filogenia de NEO1 muestra que es una proteína con homólogos distribuidos en todo el reino animal, siendo frazzled (fra) de *D. melanogaster* uno de sus homólogos más lejanos. Además, NEO1 presenta paralogía en cordados con la proteína DCC (del inglés, Deleted in Colorectal Cancer)⁴⁷.

El análisis comparativo muestra que estas proteínas conservan una estructura común, compuesta por una porción extracelular con cuatro dominios tipo inmunoglobulina y seis dominios tipo fibronectina III, donde se reconocen y unen sus ligandos. Poseen un único paso a través de la membrana plasmática y su tallo intracelular está compuesto por los dominios P1, P2 y P3, los cuales son altamente conservados y fundamentales para llevar a cabo las respuestas celulares de estas proteínas^{33,48,49}.

Durante el desarrollo del sistema nervioso, NEO1, DCC y fra conservan el reconocimiento de los ligandos de la familia de las NTN, donde NEO1 une a NTN1 y NTN4, DCC sólo reconoce a NTN1 y fra reconoce los ligandos netA y netB, homólogos de NTN1⁵⁰. Adicionalmente, NEO1 puede unir a la familia de ligandos RGM⁵¹ y durante el desarrollo del sistema nervioso de invertebrados y vertebrados, NEO1 también participaría como un receptor de BMP^{52,53}.

El análisis comparativo entre las secuencias primarias de las proteínas humanas NEO1 y DCC, así como entre las secuencias de ratón, alcanza un 50% de identidad. Mientras que las parejas NEO1-fra y DCC-fra presentan un 33 y 31% de identidad de secuencia, respectivamente. Valores similares se obtienen

31% de identidad de secuencia, respectivamente. Valores similares se obtienen al realizar la comparación entre las secuencias de ratón y *D. melanogaster* (Figura 3A). La comparación por dominios entre las proteínas NEO1 y DCC con su homólogo en *D. melanogaster*, muestra que existe alta identidad en los dominios tipo fibronectina, específicamente en el tercer y quinto dominio (Figura 3B). Esto es interesante, porque se ha demostrado que estos receptores han co-evolucionado positivamente con su ligando NTN1, conservando las funciones ancestrales durante el desarrollo del sistema nervioso de invertebrados y vertebrados⁴⁷. Para que la señalización inducida por NEO1, DCC o fra tenga lugar, es necesaria la dimerización de dos moléculas de receptor más el anclaje de dos moléculas del ligando NTN. Uno de los ligandos NTN se une por uno de sus extremos al tercer dominio fibronectina de uno de los receptores y el otro extremo se une al quinto dominio fibronectina del segundo receptor. La segunda molécula de NTN realiza el mismo tipo de unión cruzada que el primero, lo que activa la señalización intracelular⁵⁴.

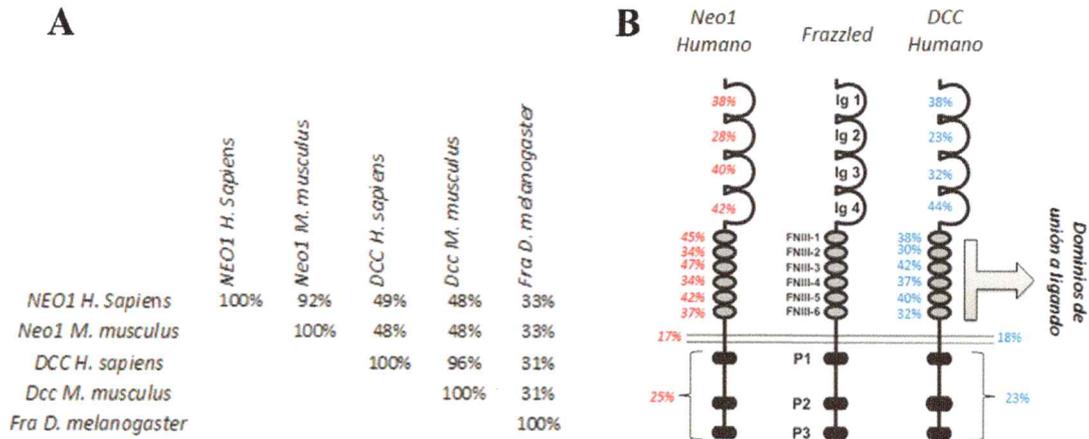


Figura 3. Análisis de secuencias entre las proteínas de la familia fra/NEO1/DCC.
A.- Tabla comparativa de los porcentajes de identidades de secuencias entre las secuencias de fra, DCC y NEO1 en *D. melanogaster*, *M. musculus* y *H. sapiens*. **B.-** Representación esquemática de los porcentajes de identidad de secuencia para los distintos dominios de fra comparado con NEO1 humano (Rojo) y Fra comparado con DCC humano (azul). Los porcentajes se obtuvieron mediante la utilización de CLUSTAL omega (datos no publicados, Luis Solano R.).

En términos funcionales, NEO1, DCC y fra comparten su participación en diversos procesos durante el desarrollo pre y post-natal. Las tres proteínas participan en guía axonal, localizándose en la punta del cono axonal en crecimiento, guiando al axón hacia la fuente productora de NTN^{55,34,56}. Recientemente también se confirmó que fra también podría actuar como regulador transcripcional, similar a lo que ya se había descrito para NEO1 y DCC^{57,36,58}. Por otra parte, NEO1 y DCC pertenecen a la familia de los receptores de dependencia^{59,60}, función que aún no ha sido completamente descrita para fra, aunque se ha observado que la falta de función de netA produce apoptosis de los axones comisurales⁶¹.

3.6.- Relación entre la señalización HH, DCC y fra

Si bien *NEO1* es un blanco transcripcional de la vía HH en pez cebra, ratón y humano, poco se conoce sobre los mecanismos que regulan la transcripción de *DCC* y *fra*. La expresión de *DCC*, no ha sido ligada a la vía de señalización HH, aunque al observar sus territorios de expresión durante el desarrollo embrionario del sistema nervioso, *DCC* se expresa tanto en regiones dorsales como ventrales del tubo neural⁶², lo que indicaría que su expresión podría estar comandada por un factor de transcripción presente en todo el tubo neural o bien por señales tanto dorsales como ventrales. En nuestro laboratorio contamos con los primeros antecedentes que indican que la señalización HH podría controlar la expresión de *DCC*, ya que muestras humanas de pacientes con meduloblastoma desmoplástico, tienen aumentada la expresión de este gen respecto de expresión observada en meduloblastomas con origen distinto a SHH (datos no publicados, laboratorio Dra. Verónica Palma A.).

Por su parte, y al igual que *DCC*, *fra* no posee antecedentes publicados que indiquen que su expresión está mediada por la vía HH. No obstante, *midline* (*mid*), un factor de transcripción que participa en el desarrollo del sistema nervioso de *D. melanogaster*, controla la expresión de *fra* y sus ligandos durante la guía de los axones comisurales⁶³. Además, la expresión de *fra* ha sido ligada al factor de transcripción *engrailed*⁶⁴, quien al igual que *hh*, participa del establecimiento de la polaridad de segmentos, entregando identidad a los compartimentos posteriores de *D. melanogaster*. En el disco imaginal de ala-tórax, *engrailed* se expresa en el compartimento posterior y comanda la

expresión del morfógeno hh e inhibe la expresión de ptc, haciendo que este compartimento sea refractario a la señalización hh. Una vez activada la expresión de hh, se produce una segunda expresión de engrailed, pero esta vez en la parte anterior del límite que divide ambos compartimentos y que es inducida por hh⁶⁵.

En resumen, los antecedentes publicados a la fecha indican que *NEO1* es un blanco transcripcional directo de la señal HH y además sería un posible regulador negativo de esta misma vía en vertebrados. Por otra parte, aunque *NEO1*, *DCC* y *fra* conservan estructura y algunas funciones, no existen estudios que permitan afirmar que *DCC* y *fra* conserven los mecanismos de expresión y acción como regulador negativo de HH observados en *NEO1*. Por lo tanto, la presente tesis propone la siguiente hipótesis:

4.- Hipótesis

“DCC y Frazzled, al igual que NEO1, son blancos transcripcionales directos de la vía de señalización HH formando parte de una red de retroalimentación negativa”

5.- Objetivo general

Determinar si *Dcc* y *fra* son blancos transcripcionales directos de la señalización HH y si *Neo1*, *Dcc* y *fra* regulan negativamente esta vía.

6.- Objetivos específicos

6.1.- Establecer si la expresión de *Dcc* en células de ratón y *fra* en *D. melanogaster*, es regulada de forma directa por la señalización HH.

6.2.- Determinar si *Neo1* y *Dcc* en células C3H10T1/2 de origen murino y *fra* en disco imaginal de ala-tórax, modulan negativamente la vía de señalización HH.

7.- Materiales y Métodos

7.1.-Reactivos e Insumos

DMEM-F12 (Dulbecco's Modified Eagle Medium F-12) (GIBCO #11320-033); Poli-lisina (Sigma-Aldrich #P4707); Poli-ornitina (Sigma-Aldrich #P4957); N2 (Thermo-Fisher Technologies #17502048); DNasa I (Worthington #LS002060); HBSS (Hank's Balanced Salt Solution) (GIBCO #14025-092); DMEM alta glucosa (GIBCO #12800-017); Suero Fetal Bobino (SFB) (Hyclone SH30071.03); Penicilina/streptomicina (GIBCO #15140-122); Tripsina (GIBCO #154400-054); Ciclopamina (Infinity #APH-05011); RNA-solv (OMEGA Bio-tek #R6830-02); Cloroformo (MERCK #1.02445); Etanol (MERCK #1.00983); Isopropanol (MERCK #1.09634); Agua DEPC (INVITROGEN #46-2224); KIT de síntesis de cDNA (Promega # A3500); Sybr-green (Agilent #600828-51); PBS (Corning #43-013-CM); Inhibidor de proteasas (Thermo-Fisher Technologies #88666); Kit de cuantificación de proteínas (Bio-rad, reactivo A (#500-0113), Reactivo B (#500-0114), Reactivo S (#500-0115)); Albumina de suero Bobino (Merck, #12659); Dodecil Sulfato de Sodio (SDS) (Calbiochem #428015); Glicerol (Winkler #BM-0800); Tris base (Amresco #0826); Tris-HCL (Omnipur #9310); β -mercaptoetanol (Sigma-Aldrich #M-6250); Acrilamida (Winkler #BM-0100); per-Sulfato de amonio (PSA) (Amresco, #0486); TEMED (Amresco, #0761); Glicina (MERCK #3570); Membranas de PVDF (Millipore #ISEQ00010); Metanol (Winkler #101360); Rojo Ponceau (Sigma-Aldrich #P3504); Ácido acético (MERCK #1.00063); Leche descremada (Svelty); Tween-20 (Omnipur

#US19480); supersignal West pico quimioluminescent (Thermo-Scientific #OL197472); Supersignal West femto quimioluminescent (Thermo-Scientific #PA195647); Placas Auto-radiográficas (Fujifilm #4741012961); Formaldehído (BioWorld # 30450000-1); Glicina (Merck #3570); HEPES (Gibco #15630); MgCl₂ (Winkler #BM0980); KCl (Merck #1:04936); Nonidet-40 (Winkler #BM-1225); NaCl (Merck #1:06404); Triton X-100 (Sigma-Aldrich #T8787); Deoxilato de sodio (Winkler #BM-0035); Buffer de carga de DNA (Thermo-Scientific #R0611); Agarosa (Omnipur #US12125); Estándar de peso molecular de ADN 100 pb (Thermo-scientific #15628019); Estándar de peso molecular de proteínas (Thermo-scientific #26619); Proteína A (Santa Cruz #sc-2001); EDTA (Winkler #BM0690); Fenol: Cloroformo: Alcohol isoamílico (25:24:1) (Invitrogen #15593-031); Cloroformo: Alcohol isoamílico (24:1) (Winkler #BM0640); Acetato de sodio (Sigma-Aldrich #S-2889); kit de reportero luciferasa *Dual-luciferase reporter assay* (Promega #E1960); Turbofect (Thermo-Fisher Scientific, R0531); proteína recombinante SHH de ratón (R y D system 461-SH); para-formaldehído (Merck #1.04005); NBT (Roche #11383213001); BCIP (Roche #10760994001); Nuclear red (Sigma-aldrich #N8002); Entellán (Merck #1.07961); TOPRO3 (Thermo-fisher #T3605); Vectashield (Vector #H1200).

7.2.-Anticuerpos

Anti-DCC hecho en cabra (Santa cruz Biotechnology #A-20); Anti-Neogenina 1 hecho en cabra (Santa Cruz Biotechnology #C-20); Anti-Tubulina hecho en ratón (Sigma-Aldrich #T9026); Anti- Patched hecho en ratón (Hybridoma Bank #Apa1); Anti-Ci hecho en ratón (Hybridoma Bank #2A1); anti-

Fra hecho en conejo (Donado gentilmente por el Dr. Yuh Nung Jan, Universidad de California, Estados Unidos); Anti-Caspasa 3 hecha en conejo (Sigma-aldrich #C8487); Anti-IgG de cabra conjugado a HRP hecho en burro (Santa Cruz #SC2020); Anti-IgG de ratón conjugado a HRP hecho en burro (Santa Cruz #SC2096); Anti-IgG de conejo conjugado a Alexa Fluor 488 hecho en cabra (Invitrogen #A11008); Anti-IgG de ratón conjugado a Alexa Fluor 594 hecho en cabra (Invitrogen #R37117); Anti-Gli2 hecho en conejo (Abcam #ab2606); Anti-Gli3 hecho en conejo (Santa Cruz #SC20688); Anti-Histona H3 hecho en conejo (Abcam #Ab1791); IgG normal de conejo (Santa cruz #SC2027).

7.3.-Cultivo celular

7.3.1.-Cultivos primarios de precursores neuronales granulares cerebelares (CGNPs)

Para cada cultivo se utilizaron camadas de ratones neonatos en día postnatal 7 (P7) de la cepa C57BL/6. Los neonatos (6 individuos en promedio por camada), fueron decapitados para diseccionar sus cerebelos, los que fueron incubados durante 10 minutos en una solución de tripsina 1X disuelta en tampón HBSS más 200 unidades de DNAsa I. La incubación se realizó a 37°C, agitando por inversión cada 2 minutos. Luego se adicionó 1 mL de suero fetal bovino (SFB), para detener el efecto de la tripsina. Se eliminó el líquido y se agregó 1mL de HBSS fresco, suplementado con glucosa al 0,6% (p/v). Mediante disgregación mecánica se resuspendió las células del cerebelo y se incubaron a temperatura ambiente durante 2 minutos. Se centrifugó a 1000 rpm por 5 minutos y el pellet se resuspendió en 2 mL de medio DMEM F-12 suplementado con 10% de SFB,

1% de N-2 y Penicilina/Streptomicina (50 U/mL y 50 µg/mL respectivamente). Las células fueron incubadas en placas previamente tratada con poli-Lysina 0,1% v/v y se mantuvieron a 37°C con 5% de CO₂ durante 45 minutos. Con un pequeño golpe a la placa, las CGNPs fueron desprendidas del fondo para quedar en suspensión, desde donde fueron recuperadas y centrifugadas durante 5 minutos a 1000 rpm. En placas de 6 pocillos se sembraron 3 millones de células por pocillo (previamente fueron tratadas con poli-ornitina 0,01% v/v).

7.3.2.-Líneas celulares

Las líneas celulares C3H10T1/2 (ATCC CCL-226) y HEK293 (ATCC CRL-1573) fueron crecidas en medio DMEM alta glucosa y suplementado con 10% de SFB más Penicilina/Streptomicina (50 U/mL y 50 µg/mL respectivamente). Para cada tratamiento las células fueron utilizadas en un 70-80% de confluencia aproximadamente.

7.4.- Tratamientos farmacológicos en CGNPs

Luego de 24 horas de la extracción, las CGNPs fueron incubadas en condiciones control o en presencia de 5 µM de ciclopamina. Para qPCR, las CGNPs fueron incubadas durante 24h, mientras que para western blot las células fueron incubadas durante 48h con el fármaco.

7.5.- Extracción de ARN, síntesis de cDNA y PCR cuantitativo en tiempo real (qPCR)

Posterior al tratamiento, las placas fueron dispuestas en hielo donde se eliminó el medio de cultivo y se lavó una vez con PBS1X frío. Por pocillo, se adicionaron 600 µL de RNA-Solv y mediante sucesivos pipeteos las células

fueron rescatadas de la placa. Se incubó por 5 minutos a temperatura ambiente y se adicionó 120 μL de cloroformo, se agitó en vortex por 15 segundos y se incubó por 10 minutos a temperatura ambiente. Luego, se centrifugó durante 15 minutos a 12000G a temperatura ambiente y a la fase acuosa se adicionó 1 volumen de isopropanol frío, se agitó por inversión y se incubó durante 20 minutos a -20°C . Las muestras fueron centrifugadas por 10 minutos a 12000G a temperatura ambiente y el precipitado fue lavado con 300 μL de etanol al 80% frío. Se centrifugó 5 minutos a 7500G a temperatura ambiente y el precipitado fue secado por 20 minutos a temperatura ambiente. Cada muestra fue resuspendida en 30 μL de agua DEPC y luego se cuantificó su concentración, la calidad del ARN fue evaluada mediante visualización en geles de agarosa al 1%.

Para la síntesis de cDNA, se trató 1 μg de RNA con DNAsa I durante 30 minutos a 35°C , la reacción se detuvo incubando por 10 min con 1 μL de DNAsa Stop a 65°C . Para la transcripción reversa se adicionó una mezcla de random primers, transcriptasa reversa, buffer de reacción, dNTPs y RNAsin, según las instrucciones del kit de transcripción reversa Promega. La mezcla se incubó durante 1 hora a 42°C y la reacción se detuvo incubando 10 minutos a 72°C , el cDNA resultante fue cuantificado y diluido a una concentración de 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ en agua DEPC.

Previo a la realización de los qPCR, se determinó mediante curvas de calibración la concentración de partidores necesaria para alcanzar una eficiencia entre el 90 y 110% a 60°C , valor utilizado como temperatura de *annealing*. Para

determinar la expresión de cada gen, se llevó a cabo la reacción de qPCR utilizando el Kit Sybr de Promega y la cuantificación de la expresión de cada gen fue normalizada y graficada respecto del valor de expresión de *Gapdh*. Los gráficos y análisis estadísticos se realizaron utilizando el programa GraphPad Prism 6.

7.6.- Western Blot

Finalizado el tratamiento, las placas fueron dispuestas en hielo donde se eliminó el medio de cultivo y se lavó con PBS 1X frío una vez. Se adicionó buffer de extracción de proteínas (2% p/v SDS; 10% p/v glicerol; 50 mM Tris-HCl pH 6,8) con inhibidor de proteasas. Con la utilización de un rastrillo, las muestras se rescataron y se sonicaron en baño de agua durante 3 minutos al 50% de intensidad. Se centrifugó a 10000 rpm durante 10 minutos y el sobrenadante fue cuantificado utilizando el Kit comercial *DCTM protein assay*. La cuantificación de las muestras fue realizada extrapolando los valores de absorbancia en una curva de calibración estándar de BSA (Bovine Serum Albumine). Cada muestra de proteínas fue preparada con 60 µg de proteínas en tampón Laemmli (SDS 2% P/V; Glicerol 10% p/v; Tris-HCl 62,5 mM pH 6,8, β-Mercaptoetanol 5% v/v; azul de Bromofenol 0,01% p/v). Las muestras fueron denaturadas a 60°C durante 30 minutos y luego separadas por electroforesis en geles denaturantes de poliacrilamida al 8% en buffer de corrida (Glicina 0,23M; Tris 25mM; SDS 0,1% p/v) durante 2 horas y media aproximadamente a 110 volts. Finalizada la separación, las proteínas fueron electrotransferidas a membranas de PVDF

mediante transferencia semi-húmeda en buffer de Towbin (Glicina 0,23M; Tris 25mM; Metanol 20% v/v). Para corroborar la transferencia de las proteínas, las membranas se tiñeron con una solución de rojo Ponceau (Ponceau 0,3% p/v en ácido acético al 0,5% v/v). El bloqueo de las membranas se realizó con una solución de leche descremada al 5% p/v en TBS-Tween-20 al 0,1% v/v (TBS-T) durante 1 hora a temperatura ambiente (25°C) en agitación constante. Posteriormente se incubó con el anticuerpo primario correspondiente, diluido en solución de bloqueo durante toda la noche (16 horas aproximadamente) a 4°C en agitación constante (anti-NEO1 1:300, Anti-DCC 1:300, anti-tubulina 1:1000). Al día siguiente, las membranas se lavaron 3 veces a temperatura ambiente con TBS-T durante 10 minutos cada vez y luego se incubó por 2 horas con anticuerpo secundario preparado en solución de bloqueo (anti IgG de cabra conjugado a HRP dilución 1:1000, anti- IgG de ratón conjugado a HRP dilución 1:1000) en agitación constante y a temperatura ambiente. Se lavó 3 veces durante 10 minutos cada vez con TBS-T y luego se reveló utilizando el sustrato Super signal west Pico quimioluminiscente o Super signal west femto quimioluminiscente. La señal fue capturada en placas autoradiográficas y el análisis de pixeles se realizó con la ayuda del programa ImageJ, disponible en internet (<http://rsbweb.nih.gov/ij/download.html>). Los gráficos y análisis estadísticos se realizaron utilizando el programa GraphPad Prism 6.

7.7.- Análisis in silico

Para evaluar la existencia de sitios de unión para los factores Gli en las secuencias regulatorias del gen *Dcc*, se utilizó la herramienta informática disponible en internet MotifMap, proporcionada por la Universidad de California de Estados Unidos⁶⁶. La búsqueda abarcó 10000 pb río arriba y 10000 pb de base río abajo del inicio de la transcripción del gen. Los sitios encontrados fueron detectados en el genoma y se diseñaron partidores capaces de reconocer tanto al sitio de interés como su contexto genómico, es decir 150 pb río arriba y 150 pb río abajo del GBS aproximadamente (tabla 1).

7.8.- Inmunoprecipitación de la cromatina (CHIP)

Para este ensayo se utilizaron aproximadamente 18 millones de CGNPs, las que fueron incubadas en condiciones control durante 24 horas. Luego, fueron dispuestas en hielo y lavadas dos veces con PBS1X frío. Se adicionó una solución de formaldehído al 1% v/v en PBS y se incubó por 10 minutos en agitación constante a temperatura ambiente. Para detener la reacción, se adicionó un volumen de glicina 1,25 M y se incubó en agitación durante 5 minutos. Se lavó dos veces con PBS 1X frío y las células fueron colectadas en 5 mL de PBS1X con inhibidor de proteasas. Se centrifugó a 1800 rpm por 5 minutos a 4°C y el precipitado se resuspendió en 1mL de buffer de lisis (50 mM Hepes pH7.8; 3 mM MgCl₂; 20 mM KCl; 0,1% v/v Nonidep-40) con inhibidor de proteasas y se incubó en hielo por 10 minutos. Con un homogeneizador Dounce se golpeó la muestra 20 veces y se centrifugó a 1800 rpm por 5 minutos a 4°C. El precipitado se resuspendió en 300 µL de buffer de sonicación (50 mM Hepes pH7.9; 140 mM

NaCl; 1mM EDTA; 1% v/v Tritón X-100; 0,1% p/v Deoxicolato de sodio; 0,1% p/v SDS) con inhibidor de proteasas y se sonicó en baño de agua frío durante 5 minutos a una intensidad de 50%, luego se centrifugó por 15 minutos a 14000 rpm a 4°C y se recuperó el sobrenadante con la cromatina sonicada.

Para evaluar la distribución del tamaño de la cromatina, se tomaron 10 µL del sobrenadante y se diluyeron con 10 µL de agua libre de nucleasas más 1 µL de RNAsa A. La mezcla se incubó durante 2h a 95°C y se adicionó 1µL de proteinasa K, posteriormente se incubó a 95°C por 1h y se adicionaron 4µL de buffer de carga 6X para ADN. La muestra fue sometida a electroforesis en gel de agarosa al 1% p/v durante 1h a 80 volts. Como estándar de peso molecular se utilizó el estándar 100 pb y se dejó un registro fotográfico utilizando un transiluminador adaptado para estos fines.

Para cada punto de Inmunoprecipitación se tomaron 25 µg de cromatina sonicada y se completaron a un volumen de 450 µL con buffer de sonicación, excepto el INPUT que se guardó a -80°C. Para pre-aclarar las muestras, se incubó por 2h con 40µL de proteína A y 2µg de normal rabbit IgG en agitación constante a 4°C. Luego se centrifugó a 4000 rpm por 5 minutos a 4°C, recuperando el sobrenadante al que se adicionaron los anticuerpos, 4µg de IgG (control negativo de inespecificidad); 2 µg de anti-Histona H3 (Control positivo); 4 µg de anti-Gli2 o 4 µg de anti-Gli3. La incubación se llevó a cabo en agitación a 4°C durante toda la noche (16hrs aproximadamente).

Al día siguiente, se adicionó 40 μ L de proteína A por cada tubo y se agitó por 3h a 4°C, luego se centrifugó a 4000 rpm por 5 minutos a 4°C y el precipitado se resuspendió en 500 μ L de buffer de sonicación, se agitó durante 5 minutos a 4°C y se centrifugó a 4000 rpm por 5 minutos a 4°C. Este procedimiento se repitió dos veces más con buffer de sonicación, una vez con buffer de inmunoprecipitación (1% v/v triton X-100; 2mM EDTA pH8; 20 mM tris-HCL pH8; 150 mM NaCl) y una vez con buffer TE (Tris-HCL 10mM pH 8.0; EDTA 1 mM pH8.0). Finalmente, los precipitados fueron resuspendidos en 100 μ L de buffer de elusión (1% p/v SDS, 100mM NaHCO₃) y el INPUT se ajustó a un volumen de 100 μ L con buffer de elusión.

Las muestras se incubaron a 65°C en baño termoregulado durante 15 minutos, agitando de vez en cuando para resuspender la proteína A. Se centrifugó durante 1 minuto a máxima velocidad y al sobrenadante se adicionaron 1 μ L de RNasa A y 4 μ L de NaCl 5M. La solución se incubó en baño termoregulado a 65°C toda la noche y al día siguiente, se adicionó 1 μ L de Proteinasa K por 2 horas a 65°C. Luego se adicionaron 200 μ L de Buffer TE y 1 volumen de Fenol (Básico): Cloroformo: alcohol isoamílico (25:24:1), se agitó en vortex a potencia media durante 15 segundos y se centrifugó a 12000 rpm a temperatura ambiente por 5 minutos. Se rescató la fase acuosa y se agregó 1 volumen de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1), se centrifugó por 5 minutos a 12000 rpm a temperatura ambiente y a la fase acuosa se adicionaron 2.5 volúmenes de etanol al 100%, 1 μ L de Glicógeno y 0,1 volúmenes de acetato de

sodio 3M pH7. La solución resultante, se incubó durante toda la noche a -20°C y al día siguiente se centrifugó 1 hora a 14000 rpm a 4°C, se eliminó el sobrenadante y al precipitado se adicionó 1 mL de etanol 70% v/v frío y se centrifugó 10 minutos a 14000 rpm a 4°C. El pellet se secó durante 15 minutos a temperatura ambiente y finalmente cada muestra fue resuspendida en 50 µL de agua libre de nucleasas, excepto el INPUT que fue resuspendido en 100µL. La cuantificación de cada muestra se llevó a cabo mediante PCR cuantitativo donde se utilizaron 3µL de cada punto de inmunoprecipitación o 1 µL de INPUT. Los análisis se cuantificaron y graficaron en relación al porcentaje del INPUT. Los gráficos y análisis estadísticos se realizaron utilizando el programa GraphPad Prism6

<i>Partidor</i>	<i>Forward</i>	<i>Reverse</i>
<i>GBS1-Dcc</i>	5'ATCAGGGAAAGACTCCACGCAATG3'	5'CCACTTGCCCTATGTGAAACACCT3'
<i>GBS2-Dcc</i>	5'CCCCTCGGCATTGTCAGTTTAAAG3'	5'TTACCCTCACCTCAGTTCAGTTG3'
<i>GBS-Gli1</i>	5'GAGCGGGAAGAGCCGT3'	5'CCTGGCCCCCAGCCCT3'
<i>Ptc1</i>	5'GCTAGGCTAATCGTGGTTCAGTCA3'	5'AGCCCAACACCTGGTTCAAAGA3'
<i>Neo1</i>	5'ACAGAAAGCTCTGGCAGGTT3'	5'AGGTGGCACTTGACAGTAA3'
<i>Dcc</i>	5'GGTGTGGCAGTCCTTATGCTGAA3'	5'TAATCAACGGGGTCAGTGGGATCT3'
<i>Gapdh</i>	5'ACTTGAAGGGTGGAGCCAAA3'	5'AGCCCTTCCACAATGCCAAA3'

Tabla 1. Se indican las secuencias de todos los partidores utilizados durante el desarrollo de esta tesis. Los partidores *GBS1-Dcc*, *GBS2-Dcc* y *GBS-Gli1*, fueron utilizados en el análisis de Chip. Los partidores que detectan a *Ptc1*, *Neo1*, *Dcc* y *Gapdh*, fueron utilizados en los análisis de qPCR.

7.9.-Ensayo reportero Luciferasa

Con la utilización de los partidores diseñados en el análisis *in silico*, las secuencias GBS fueron levantadas desde el genoma y clonadas por separado en el vector pGL3 basic, río arriba de la secuencia del gen luciferasa. Luego, mediante mutación sitio dirigida se realizó el intercambio de una base de la parte central del sitio de unión. Posteriormente, utilizando el reactivo Turbofect, se transfectó células HEK 293 que se encontraban a un 70% de confluencia de acuerdo al esquema experimental presentado en la tabla N°1. Los vectores utilizados fueron pGL3-GBS1-Dcc (GBS1 del gen de ratón *Dcc*); pGL3-GBS1mut-Dcc (versión mutada del GBS del gen de ratón *Dcc*); pGL3-GBS2-Dcc (GBS1 del gen de ratón *Dcc*); pGL3-GBS2mut-Dcc (versión mutada del GBS 2 del gen de ratón *Dcc*); pGL3-GBS8X (Secuencia del GBS de *Ptc* humano repetida 8 veces en tándem); pcDNA3 (vector vacío de Gli1); pcDNA3-Gli1 (secuencia de Gli1); pGL3-Renilla-SV40 (secuencia de luciferasa Renilla); pBSK (vector vacío, utilizado para completar la cantidad ADN en cada condición).

	pGL3-GBS1-mDCC (ng)	pGL3-GBS1mut-mDCC (ng)	pGL3-GBS2-mDCC (ng)	pGL3-GBS2mut-mDCC (ng)	pGL3-GBS8X (ng)	pcDNA3 (ng)	pcDNA3-Gli1 (ng)	p-GAcc (ng)	p-GACC-Gli3High (ng)	p-SV40-renilla (ng)	pBSK (ng)
C1	350					300				10	50
C2	350						150			10	200
C3	350						300			10	50
C4	350							300		10	50
C5	350								150	10	200
C6	350								300	10	50
C7		350				300				10	50
C8		350					300			10	200
C9		350						300		10	50
C10		350							300	10	50
C11			350			300				10	200
C12			350				150			10	50
C13			350				300			10	50
C14			350					300		10	50
C15			350						150	10	50
C16			350						300	10	50
C17				350		300				10	50
C18				350			300			10	50
C19				350				300		10	50
C20				350					300	10	50
C21					350	300				10	50
C22					350		300			10	50
C23					350			300		10	50
C24					350				300	10	50

Tabla2: Diseño experimental del ensayo reportero lucifera. Células HEK293 fueron transfectadas con las mezclas de plásmidos correspondientes a cada condición (C1, C2, C3, etc.). Los números representan la cantidad de nanogramos utilizados.

Luego de la transfección, las células fueron incubadas en medio de cultivo DMEM suplementado con 2,5% de SFB y Penicilina /Streptomocina (50 U/mL y 50 µg/mL respectivamente) a 37°C y 5% de CO₂. La detección de la actividad luciferasa se realizó mediante la utilización del kit luciferasa *Dual-Luciferase Reporter Assay System*. Las mediciones se realizaron en luminómetro, facilitado por el laboratorio del Dr. Martín Montecinos de la Universidad Nacional Andrés Bello de Santiago de Chile. Los gráficos y análisis estadísticos se realizaron utilizando el programa GraphPad Prism 6.

7.10.-Detección de fosfatasa alcalina en células C3H10T1/2

Células murinas C3H10T1/2 fueron sembradas en medio DMEM 10% SFB en placas de 24 pocillos sobre cubre-objetos redondos de vidrio de 12 mm de diámetro no colagenizados a una densidad de 10.000 células por pocillo. Luego de obtener cerca de un 60% de confluencia, se disminuyó el porcentaje de suero fetal bobino a 0,5% v/v. Este porcentaje mantiene las células vivas y reduce la cantidad de componentes que podrían inducir la diferenciación de las células y que se podrían encontrar en el suero. En estas condiciones, las células fueron transfectadas utilizando el reactivo de transfección Turbofect con los vectores pcDNA3-Ptc1-Full lenght (Ptc1); pEGFP-NEO1-Full lenght (NEO1 humana fusionada a GFP); pEGFP-NEO1-ICD (Fragmento intracelular de NEO1 humana fusionado a GFP); pCMV-DCC-HA (DCC humano fusionado a un tag HA); pCDNA3-DCC-ICD-Myr (Fragmento intracelular de DCC humano fusionado a un tag Myristil); peGFP (Proteína Fluorescente Verde). Luego de 48 horas de

transfección, se incubó las células en condiciones Control, con mrSHH 20mM o mrBMP2 100ng/mL por 48 horas. Posteriormente, se fijó utilizando PFA 4% p/v en PBS1X durante 10 minutos y se lavó con PBS1X por 5 minutos. Se incubó con una solución de NBT/BCIP en buffer AP (Tris-HCL pH 9.5 100 mM; NaCl 100 mM; MgCl₂ 50mM; Tween-20 0,1% v/v) durante 16h a 4°C. Luego, cada pocillo fue incubado por 2 horas con nuclear-red y se fijó nuevamente con PFA al 4% p/v en PBS1X. Las células se deshidrataron con concentraciones crecientes de etanol y finalmente los cubreobjetos fueron montados en Entellán. Por cada cubreobjeto se tomaron 6 fotografías mediante microscopia de luz con 100 veces de aumento. La adquisición de las imágenes se realizó utilizando el programa MOTIC images plus 2.0. Sobre cada fotografía se cuantificó la coloración azul con el software ImageJ y este valor fue normalizado por el número de células correspondiente a cada fotografía (Índice de diferenciación). Los gráficos y análisis estadísticos se realizaron utilizando el programa GraphPad Prism 6.

7.11.- Sistema GAL4/UAS

El organismo *D. melanogaster* es un modelo de estudio con el potencial de combinar múltiples aproximaciones genéticas y moleculares para responder preguntas acerca de la función de genes, biología celular y biología molecular. Dentro de las ventajas de su uso se encuentran su corto ciclo de vida, el bajo costo de mantención, alto número de prole, su genoma se encuentra secuenciado y muy bien anotado. Adicionalmente, la mayoría de los genes de *D. melanogaster* se encuentran en vertebrados y posee muy poca redundancia

funcional entre proteínas. Además, este modelo tiene la posibilidad de generar transgénicos y mutantes con alta facilidad, los que se pueden combinar con herramientas genéticas. Dentro de estos sistemas, se encuentra el sistema GAL4/UAS el cual fue adaptado desde levaduras, donde el activador transcripcional Gal4 se encuentra bajo el control de secuencias promotoras tejido o tiempo específico. La expresión de Gal4 permite la activación en *trans*, de un gen blanco específico que está puesto bajo el control de un promotor basal asociado a una secuencia UAS (*Upstream Activating Sequence*) (Figura 4).

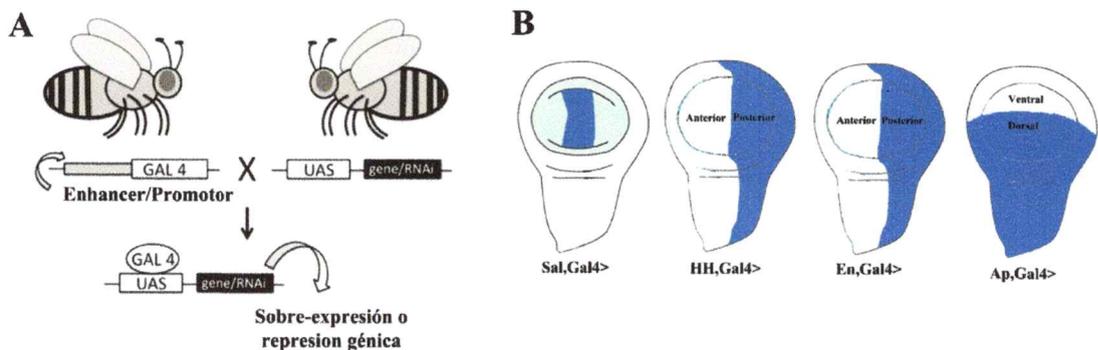


Figura 4. Representación esquemática del sistema Gal4/UAS en *D. melanogaster*. A.- Moscas transgénicas que contienen la secuencia del activador transcripcional Gal4, son cruzadas con moscas transgénicas que contienen la secuencia del gen o RNA interferente de interés y que está bajo el control del promotor UAS. En la progenie se expresa Gal4, el que reconoce la secuencia UAS para promover la sobre-expresión del gen o RNA interferente. B.- Diagramas representativos de las regiones de expresión en el disco imaginal de ala-tórax de los promotores tejido específicos utilizados en el desarrollo de esta tesis. El promotor *sal* aumenta la expresión de proteínas en la región central del disco imaginal de ala-tórax, *Pouch*. El promotor *hedgehog* (*hh*) lo hace en los compartimentos posteriores del disco, similar al promotor *engrailed* (*en*). Mientras que el promotor *apterous* (*ap*) lo hace en la región dorsal del disco. (Modificado de <http://www.suggest-keywords.com/Z2FsNCBzZXF1ZW5jZQ/>)

7.12.- MARCM (Mosaic Analysis with a Repressible Cell Marker)

Esta herramienta utiliza una recombinasa inducible por calor, para generar la pérdida alélica en homocigosis de un gen en particular, a través de la recombinación mitótica de sitios FRT (Figura 5). La pérdida del gen y por ende de la proteína se induce en una célula y en toda su descendencia, generando parches o clones de células sin función de la proteína, fra en este caso. Los clones son fácilmente identificables por la expresión del marcador GFP. La inducción de la Flipasa se realizó exponiendo embriones de 36h a una temperatura de 37°C durante 45 min en baño termoregulado y la evaluación de los clones se realizó en larvas de estadio III del desarrollo.

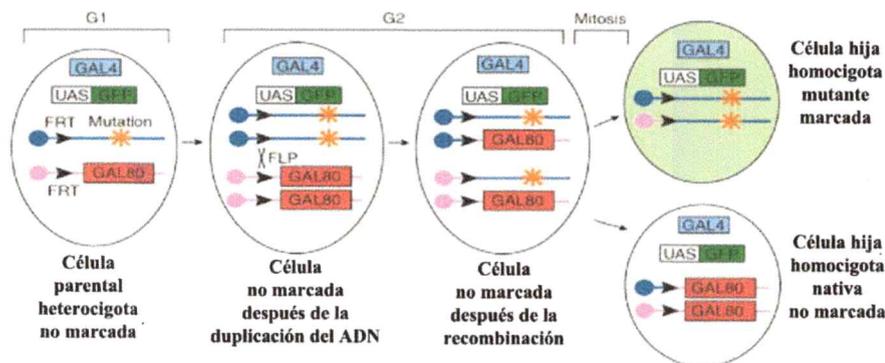


Figura 5. Descripción del sistema Mosaic Analysis with a Repressible Marker (MARCM). Esquema representativo de la técnica MARCM, donde la célula parental en la fase G1 del ciclo celular contiene en su núcleo las secuencias GAL4 y el marcador GFP bajo el control del promotor UAS. Además, tiene la secuencia mutada del gen de interés río debajo de un sitio FRT en alguno de los brazos de sus cromosomas, mientras que en el cromosoma homólogo, río abajo del FRT se encuentra la secuencia del represor de los sitios UAS, Gal80. En la fase G2 del ciclo celular, una vez ocurrida la duplicación génica, tiene lugar la recombinación de los sitios FRT por acción de una flipasa inducida por calor, de tal forma que cuando ocurra la segregación de los cromosomas, una de las células hija queda con ambas copias del gen mutado y con expresión de GFP, mientras que la otra célula hija queda con copias nativas en homocigosis del gen de interés y con las dos copias del represor Gal80, evitando la expresión del marcador (Modificado de Wu y Luo, 2007⁶⁷).

7.13.- Inmunofluorescencia de discos imaginales de ala-tórax

Larvas en estadio III de crecimiento fueron diseccionadas y limpiadas, de tal forma de exponer los discos imaginales, los que fueron fijados con PFA 4% p/v en PBS1X durante 30 minutos. Luego se lavó con una solución de PBS-Tritón al 0,3% v/v (PBT) 3 veces durante 15 minutos. El bloqueo de las muestras se realizó con una solución de BSA al 1% p/v en PBT durante 1 hora a temperatura ambiente y la incubación con el anticuerpo primario (Anti-fra 1:1000; Anti-ptc 1:10; Anti-ci 1:5) se realizó en solución de bloqueo durante toda la noche (16 h aproximadamente) a 4°C y en agitación constante. Al día siguiente, se lavó 4 veces con PBT durante 20 minutos cada vez y se bloqueó con BSA 1% p/v en PBT durante 1 hora temperatura ambiente. La incubación con el anticuerpo secundario se realizó durante 2 horas a temperatura ambiente y cada anticuerpo secundario fue preparado a una concentración de 1:200 en solución de bloqueo. Luego se adicionó TOPRO a una concentración de 1:200 por 5 minutos y se lavó 3 veces con PBT durante 15 minutos cada vez. Los discos imaginales fueron montados en Vectashield y la adquisición de imágenes se realizó mediante microscopia confocal en el microscopio Zeiss LSM 510.

7.14.- Montaje de alas adultas de *D. melanogaster*

Mediante el sistema Gal4/UAS se indujo la sobre-expresión de fra utilizando los promotores Engrailed y Hedgehog. La Sobre-expresión de los RNA interferentes se realizó utilizando el promotor Hedgehog a 25 y 29°C. Desde moscas adultas, se seleccionó a las hembras y se diseccionó el ala derecha, las

que fueron montadas en una solución de ácido láctico. La adquisición de imágenes se realizó en microscopia de luz utilizando el programa MOTIC images Plus 2.0. La cuantificación del área comprendida entre las venas 1-2 y 3-4, se realizó utilizando el programa Adobe Photoshop Cs5. Luego se dividió el valor obtenido para las venas 3 y 4 con el valor obtenido en el ala respectiva para las venas 1 y 2. Estos resultados fueron graficados y analizados utilizando el programa estadístico GraphPad Prism 6.

<i>Nombre</i>	<i>Aplicación</i>
<i>Sal-Gal4, GFPnuc/Cyo (Sal-Gal4)</i>	Expresión de Gal4 y GFP en el núcleo de las células de la región central del <i>pouch</i> del disco imaginal de ala-tórax
<i>Hedgehog-Gal4 (HH-Gal4)</i>	Expresión de Gal4 en el compartimento posterior del disco imaginal de ala-tórax
<i>Engrailed-Gal4 (en-Gal4)</i>	Expresión de Gal4 en el compartimento posterior del disco imaginal de ala-tórax.
<i>Ap-Gal4-mCD8::GFP</i>	Expresión de Gal4 y GFP de membrana en la región dorsal del disco imaginal de ala-tórax.
<i>UAS-fra/Cyo</i>	Utilizado para la sobre-expresión de frazzled.
<i>UAS-IRfra/TM6B</i>	Utilizado para la sobre-expresión del RNA interferente de frazzled.
<i>UAS-Hh::GFP/Cyo</i>	Utilizado para la sobreexpresión de la proteína de fusión HH::GFP
<i>UAS-SmoRNAi (2x)/ Cyo, Wee-P.pho</i>	Utilizado para la sobre-expresión del RNA interferente de Smoothened.
<i>fra⁴FRTG13/Cyo; Tub-Gal4, UAS-GFP/MKRS</i>	Cepa generada en el laboratorio utilizada como parental en el ensayo MARCM.
<i>Ey FLP; Tub-Gal80 FRTG13</i>	Cepa generada en el laboratorio utilizada como parental en el ensayo MARCM.

Tabla 3.- Cepas de *D. melanogaster* utilizadas en el desarrollo de esta tesis. Se muestran las distintas cepas de *D. melanogaster* y su aplicación en cada experimento.

8.- Resultados

8.1.- Dcc posee GBS funcionales en su región promotora y dentro del primer intrón

Los antecedentes indican que la expresión de *NEO1* es controlada en vertebrados por la señalización SHH y que su producto proteico tiene alta homología funcional y de secuencia con DCC. Por esta razón, se decidió evaluar si la expresión de *Dcc* también estaría regulada de forma directa por la vía SHH en mamíferos. Para ello, se realizó la búsqueda *in silico* de posibles sitios de unión para los factores Gli (GBS) en las regiones regulatorias del gen *Dcc* de ratón y se evaluó la capacidad de estos sitios para unir a los factores de transcripción Gli2 y Gli3 mediante CHIP y adicionalmente la de inducir la transcripción mediante el ensayo de reportero luciferasa.

Para realizar el análisis *in silico*, se utilizó la plataforma *on line* MotifMap (<http://motifmap.ics.uci.edu/>), que reúne múltiples matrices de logos de distintos factores de transcripción y que pueden ser alineadas en un rango de 10 kb río arriba y 10 kb río abajo del inicio de la transcripción del gen de interés⁶⁶. A partir de esta búsqueda se encontraron 2 sitios de unión consenso para los factores Gli en el gen *Dcc*. El primero se encontró dentro de la región promotora, a -210 pb río arriba del inicio de la transcripción del gen (GBS1) y el segundo sitio se ubicó a 2200 pb río abajo del inicio de la transcripción, dentro del primer intrón (GBS2) (Figura 6A). Ambos sitios son interesantes de analizar, debido a que el gen *NEO1*

en humano tiene su GBS funcional dentro del primer intrón, mientras que en ratón el GBS funcional de *Neo1* en ratón se encuentra dentro de la región promotora³⁷.

Para cada sitio se diseñaron partidores que reconocen tanto al GBS como su contexto en el genoma, es decir 150 pb río arriba y 150 pb río abajo del putativo sitio de unión (Figura 6B). Con ellos, se avaluó la capacidad de reconocimiento de los factores de transcripción Gli2 y Gli3 a los sitios de interés en el ensayo de inmunoprecipitación de la cromatina (CHIP), utilizando como modelo CGNPs. Como primer control, se analizó la calidad de la cromatina utilizada, la cual debe concentrarse en un tamaño aproximado de 100 a 400 pb de tal forma de evitar el reconocimiento de falsos positivos. Según se observa en la figura 6C, el tiempo e intensidad de sonicación utilizado es el adecuado, ya que los fragmentos se encuentran en los tamaños esperados. Un segundo control corresponde al análisis de la inmunoprecipitación contra la histona H3, la cual es parte de los nucleosomas y permanece constantemente adherida al ADN. Como se observa en la figura 6D, esta inmunoprecipitación muestra una tendencia de unión mayor a los sitios de interés, comparado con la inmunoprecipitación realizada utilizando el control de inespecificidad IgG.

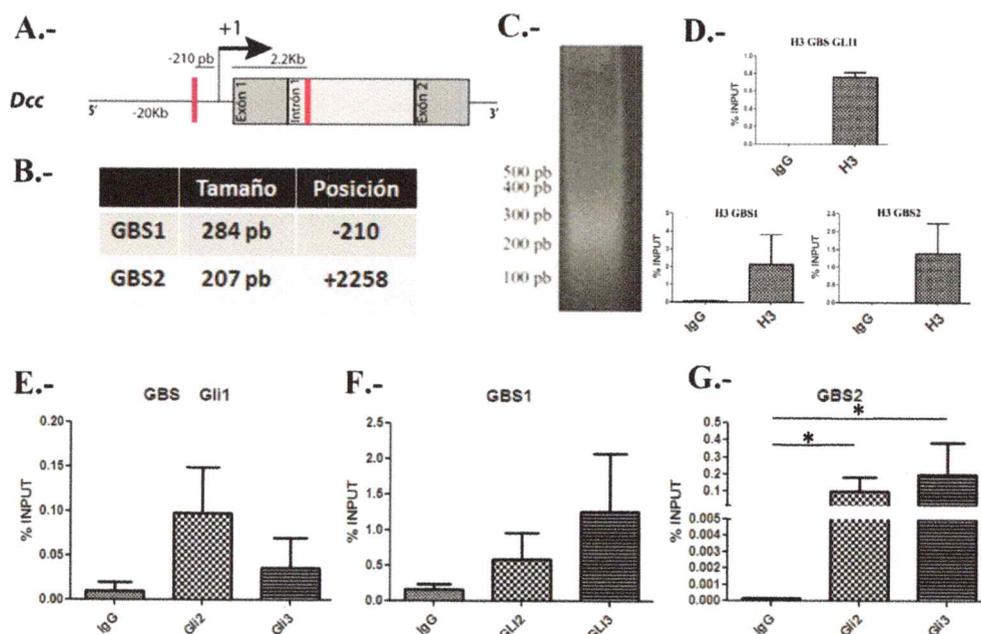


Figura 6. *Dcc* posee GBS en sus secuencias regulatorias. A.- Esquema representativo de la ubicación de los GBS encontrados en las zonas regulatorias del gen *Dcc* B.- Tabla que identifica a los GBS encontrados en el gen *Dcc*, se observa el tamaño del amplicón y la posición de los GBS respecto del inicio de la transcripción del gen, medido en pares de bases (pb). C.- Electroforesis en gel de agarosa de un sonicado representativo realizado a partir de CGNPs y que luego fue utilizado para las inmunoprecipitaciones. D.- Inmunoprecipitación contra Histona 3 (H3) y el control negativo IgG. Los gráficos muestran la cuantificación por qPCR utilizando los partidores contra el GBS1, GBS2 y el GBS de Gli1, utilizado como control positivo. E.- Identificación del GBS de Gli1 luego de realizar la inmunoprecipitación contra el control negativo IgG, Gli2 y Gli3, los datos se encuentran graficados en función del porcentaje del INPUT (N=4). F y G.- Identificación del GBS1 (F) o GBS2 (G) luego de realizar inmunoprecipitaciones contra IgG, Gli2 o Gli3. (N=4) P<0,05 Test Man Whitney.

Luego se llevó a cabo la inmunoprecipitación contra los factores de transcripción Gli2 y Gli3 utilizando como control positivo la detección del GBS de *Gli1*, el cual es un blanco transcripcional de *Shh*. El resultado muestra una mayor tendencia de unión para Gli2 respecto de Gli3, aunque estas tendencias no son significativas (Figura 6E). Asimismo, los resultados del análisis del GBS1 tampoco muestran una significancia, a pesar de ello, las tendencias observadas

indicarían que este sitio tendría mayor afinidad para Gli3 respecto de GLI2 (Figura 6F). Por su parte, el GBS2 muestra tendencias significativas para la unión de ambos factores de transcripción respecto de IgG (Figura 6G). Sin embargo, la falta de valores significativos en el experimento control, incluso luego de 4 experimentos independientes, no permite establecer con total certeza si los sitios son o no capaces de unir a los factores de transcripción. Por esta razón, es importante analizar la capacidad de activar la transcripción que tendrían ambos sitios. Para ello, se utilizó el ensayo de reportero luciferasa, donde se clonó ambos sitios por separado en el vector PGL3 basic, río arriba del inicio de la transcripción del gen reportero luciferasa. Estos vectores se co-transfectaron en células HEK293 con el vector que contiene la secuencia del factor de transcripción GLI1 humano, el cual activa la transcripción a través del reconocimiento de sitios GBS funcionales. Como control positivo se utilizó el vector que contiene la secuencia del GBS de *PTC1* humano repetida 8 veces en tándem (GBS8X). Los valores de activación obtenidos para los GBS de interés se compararon con los obtenidos al co-transfectar los mismos GBS con el vector vacío de GLI1. Adicionalmente, todos los valores se normalizaron respecto de la actividad de renilla sv-40, una luciferasa que indica actividad basal. Los resultados mostraron que el GBS8X, en presencia de GLI1, activa la expresión del reportero luciferasa de manera significativamente mayor que en la ausencia del factor de transcripción (Figura 7A). Por otra parte, los GBS1 y GBS2 de *Dcc* también producen un efecto de activación de la transcripción del reportero luciferasa, la cual ocurre de manera dosis dependiente, ya que al transfectar con

concentraciones crecientes del factor de transcripción GLI1, también aumenta la expresión del reportero (Figura 7B y 7C). Por otro lado, cuando los sitios se encuentran mutados se observa una reducción significativa en la activación de la expresión del reportero, respecto de los valores obtenidos en ausencia de GLI1 (Figura 7B y 7C). Según estos resultados, los GBS encontrados en el análisis *in silico*, son funcionales en respuesta a la activación inducida por GLI1, validando en alguna medida las tendencias observadas en el CHIP.

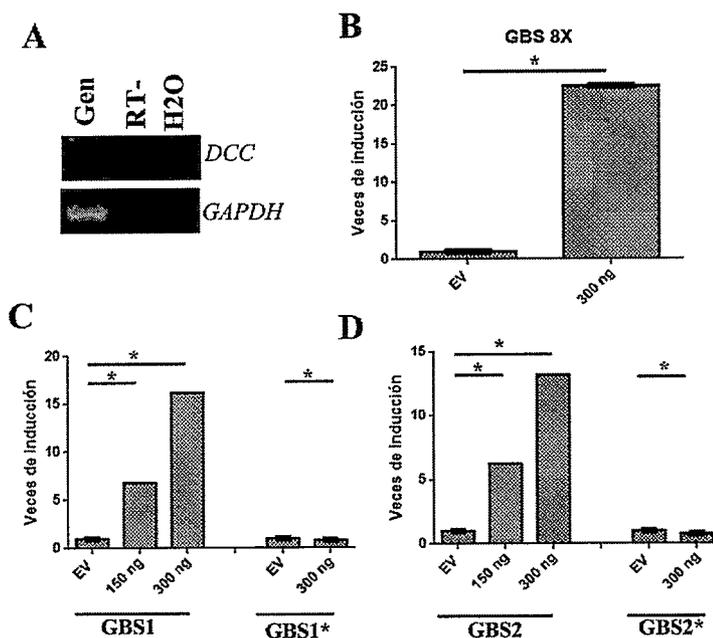


Figura 7.- Los GBS1 y GBS2 de *Dcc* activan la expresión del reportero luciferasa en respuesta a GLI1. Los vectores PGL3 basic que contienen las secuencias GBS1, GBS1 mutada (GBS1 mut), GBS2, GBS2 mutada (GBS2 mut) o GBS 8X (GBS de PTC1 repetido en tándem 8 veces), fueron co-transfectados con el vector que contiene la secuencia del factor de transcripción GLI1 en células HEK293. En cada gráfico se muestra la relación entre los valores obtenidos a partir de la inducción de la actividad luciferasa respecto de la actividad basal de Renilla SV-40, normalizado al control. **A.-** RT-PCR de *DCC* en células HEK293. **B.-** Actividad del reportero luciferasa inducido por el GBS 8X en presencia de Gli1 comparado con la actividad inducida por el vector vacío (*Empty vector*, EV). **C.-** Actividad del reportero luciferasa inducida por el GBS1 de *Dcc* en presencia de dos dosis crecientes del vector de Gli1 (150 y 300 ng), adicionalmente

se muestra la actividad del reportero luciferasa inducida por el GBS1 mutado en presencia de 300 ng de Gli1. D.- Actividad del reportero luciferasa inducida por el GBS2 de *Dcc* en presencia de dos dosis crecientes del vector de Gli1 (150 y 300 ng), adicionalmente se muestra la actividad del reportero luciferasa inducida por el GBS2 mutado en presencia de 300 ng de Gli1. (N=3) *Test de comparación múltiple Dunn's $p < 0,05$.

8.2.- SHH no sería suficiente para inducir la expresión de *Dcc* en CGNPs

Para determinar si la transcripción inducida por los GBS en el ensayo de reportero luciferasa se traduce en la activación de la expresión de *Dcc*, se utilizaron cultivos primarios de CGNPs en día postnatal 7 (P7), los cuales fueron incubados con ciclopamina, fármaco que inhibe la actividad de la vía Shh a través de la inhibición del co-receptor Smo. Luego de 24 o 48h de tratamiento, se analizó mediante qPCR y western blot, respectivamente, si los niveles de expresión de *Dcc* sufrían algún cambio. Las CGNPs en esta etapa del desarrollo dependen de Shh para proliferar⁶⁸ y poseen niveles detectables de expresión tanto de *Dcc*, como de los controles positivos *Gli1*, *Ptc1* y *Neo1*.

Para el análisis mediante qPCR, se utilizaron CGNPs provenientes de 5 cultivos de camadas independientes, las que fueron mantenidas durante 24h en condiciones control y posteriormente se incubaron con una concentración de 5 μ M de ciclopamina durante otras 24h. Los resultados mostraron que luego del tratamiento hubo disminución en la actividad de la vía, ya que se redujeron de manera significativa los niveles de expresión de los blancos transcripcionales *Gli1*, *Ptc1* y *Neo1* (Figura 8 A-C). Por otro lado, para la expresión de *Dcc* no se observaron cambios significativos luego del tratamiento con el fármaco (Figura

8D). Para confirmar estos resultados a nivel de la expresión de proteínas, se realizaron tratamientos con 5 μM de ciclopamina en cultivos de 5 capas independientes y luego de 48 h de incubación se analizó el grado de expresión de Dcc y de Neo1 mediante Western blot. Similar a lo observado en qPCR, los niveles de expresión de Dcc no presentan cambios luego del tratamiento con ciclopamina (Figura 8F). Asimismo, la expresión de Neo1 tampoco se vio afectada luego de la exposición al fármaco (Figura 8E), a pesar de ello, resultados publicados por nuestro laboratorio indican que la reducción en los niveles de expresión de Neo1, son observables de manera significativa sólo cuando las células son tratadas con el doble de la concentración utilizada en estos experimentos, es decir 10 μM de ciclopamina³⁷. Al intentar utilizar esta concentración, la viabilidad de las CGNPs se reducía al mínimo, imposibilitando la obtención de muestras confiables.

Todos estos resultados indicarían que el gen *Dcc* posee sitios de unión para los factores Gli, los que si bien son capaces de inducir la expresión del reportero luciferasa (Figura 7), no serían suficientes para inducir la expresión de *Dcc*, ya que al modular farmacológicamente la vía con Ciclopamina no se observan cambios en la expresión de Dcc a nivel de transcripción y de traducción (Figura 8).

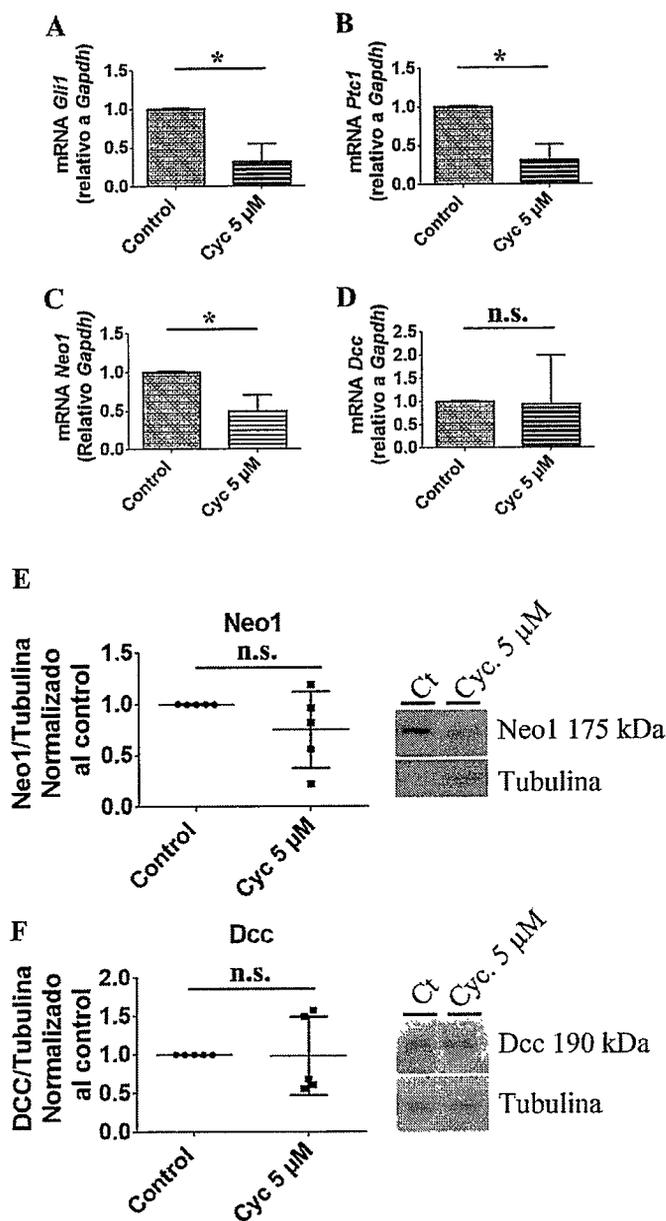


Figura 8. Influencia de la vía de señalización HH sobre la expresión de Dcc en ratón. Análisis de la expresión de Dcc en muestras de CGNPs tratadas con 5 μ M del fármaco inhibidor de la vía HH, ciclopamina. **A, B, C y D.**- Análisis por qPCR de la expresión de genes en CGNPs control y tratadas durante 24h con 5 μ M de ciclopamina. Los gráficos muestran la cuantificación de transcritos para *Gli1* (**A**); *Ptc1* (**B**); *Neo1* (**C**) y *Dcc* (**D**). Test Mann Whitney $p < 0,05$ $N = 5$. **E y F.**- Análisis mediante Western blot de muestras de CGNPs tratadas durante 48h con 5 μ M de ciclopamina. Los gráficos muestran la cuantificación de la expresión de Neo1 (**E**) y de Dcc (**F**). En cada gráfico se muestra la

fotografía de un Western blot representativo utilizado para cuantificación. Test Man Whitney $p < 0,05$ $N = 5$.

8.3.- La señalización HH no regula la expresión de *fra*

frazzled (fra) de *D. melanogaster* es el homólogo funcional y estructural de NEO1 y DCC. Su expresión ha sido ligada a las vías de señalización *midline* y *engrailed*, pero no existen antecedentes que lo asocien a la vía de señalización HH. Por ello, se propuso analizar si *fra* sería un gen regulado por la familia HH durante el desarrollo embrionario de *D. melanogaster*. Los análisis se realizaron en discos imaginales de ala-tórax, donde *hh* se expresa en el compartimento posterior y difunde en gradiente hacia el compartimento anterior para comandar la expresión de sus blancos transcripcionales, entre los que se cuentan *ptc* y *ci*. Estas proteínas tienen un patrón de expresión muy característico, ya que se expresan diferencialmente en función de la gradiente de actividad de *hh* y que puede ser detectado a través de inmunofluorescencia.

Los resultados mostraron que *ptc* y *ci* se expresan de manera similar, teniendo fuerte expresión en la parte anterior del límite que divide ambos compartimentos y decae hacia las regiones más anteriores (Figura 9A y 9B), coincidiendo con lo ya reportado en la literatura²¹. Al comparar estas expresiones con el patrón de expresión endógeno de *fra*, se determinó que no existe conservación, ya que nuestra proteína de interés se expresa uniformemente en el disco y sin observarse una similitud con la gradiente de actividad de *hh*, como sí es el caso de *ptc* y *ci* (Figura 9C). En un análisis más detallado, se puede observar que la expresión de *fra* está principalmente asociada a la membrana de

las células del disco (Figura 9D), lo cual a la fecha de este análisis no estaba descrito en la literatura.

Contrario a lo anterior, otros blancos transcripcionales de la vía HH como *ihog* y *boi* también se expresan uniformemente en el disco de ala⁶⁹. Debido a esto, se decidió evaluar si altas concentraciones del morfógeno *hh* lograban inducir la expresión de *fra*. Utilizando el sistema Gal4/UAS se sobre-expresó la proteína de fusión *hh::GFP* en la región central del *pouch* del disco imaginal (que en adulto dará origen al ala de *D. melanogaster*) y se determinó mediante inmunofluorescencia los niveles de expresión del control positivo *ptc1* y de *fra*. Al respecto, la sobre-expresión de *hh* indujo una mayor expresión de *ptc*, pero sólo fue observable en el compartimento anterior, ya que el compartimento posterior es refractario a esta señalización (Figura 10A). Por otro lado, *fra* no muestra aumentar y tampoco disminuir su expresión en las regiones donde hay alta actividad de la vía, manteniendo los niveles de expresión vistos en los discos imaginales control (Figura 10B). Por otro lado, al llevar a cabo la pérdida de función de la vía *hh* a través de la sobre-expresión del RNA interferente (RNAi) de *smo* en la región dorsal, utilizando el promotor específico *apterous*, se aprecia que la expresión de *ptc* disminuye consistentemente en las regiones de menor expresión de *smo*, medido a través de inmunofluorescencia (Figura 10C). Por el contrario, la expresión de *fra* no presentó cambios aparentes, permaneciendo constante y similar a los niveles control observados en la figura 9C.

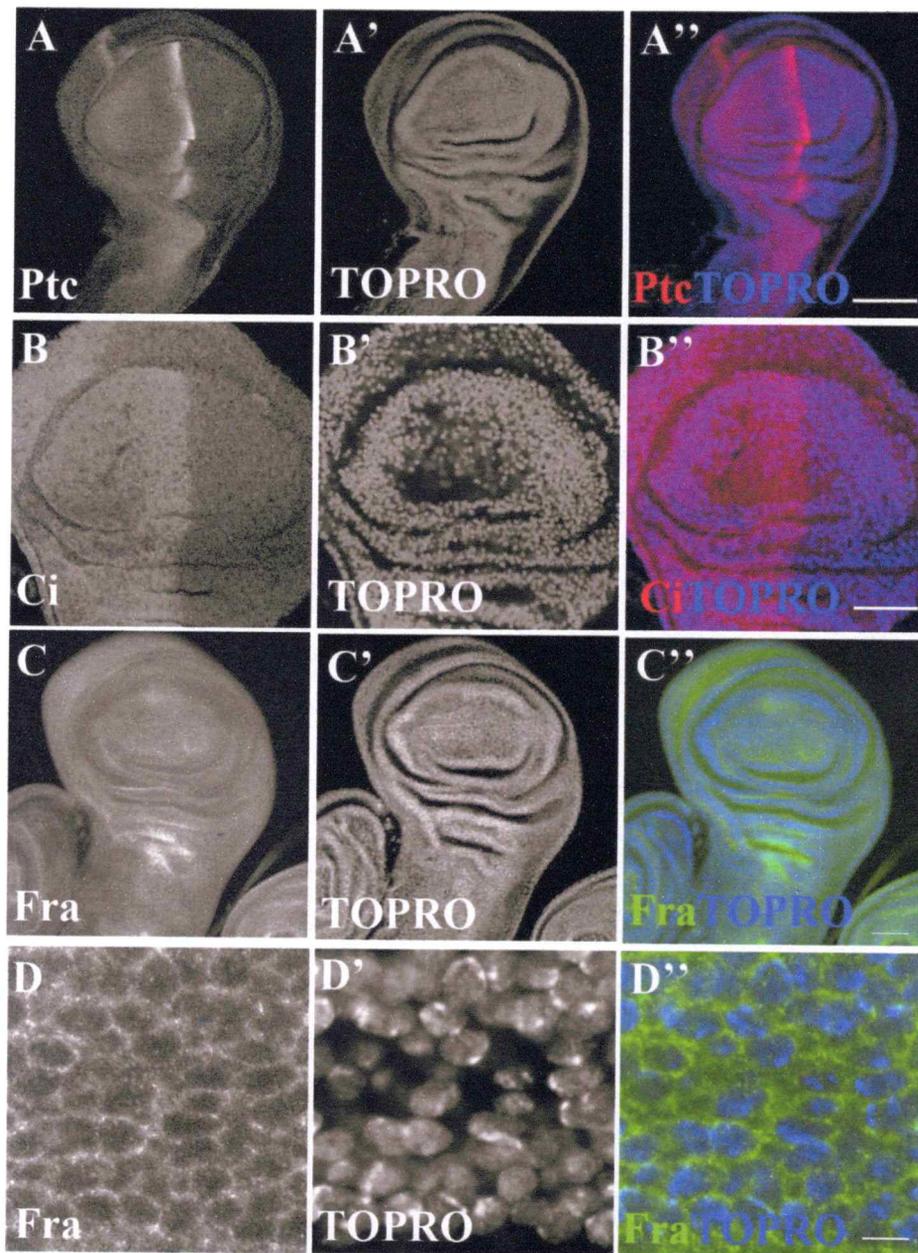


Figura 9. La expresión endógena de fra no es similar al patrón de expresión de los blancos de hh, ptc y ci. Mediante inmunofluorescencia se analizó en discos imaginales de ala-tórax, la expresión endógena de ptc, ci y fra. A.- Expresión de ptc en rojo, A'.- TOPRO en azul, A''.- Co-distribución. B.- Expresión de ci en rojo, B'.- TOPRO en azul, B''.- Co-distribución. C.- Expresión de fra en verde, C'.- TOPRO en azul, C''.- Co-distribución. D-D'' Acercamiento de lo observado en C. Barra de tamaño en A, B y C corresponde a 50 μ m, D corresponde a 5 μ m.

Según estos resultados, *fra* no se comportaría como un blanco transcripcional de la vía *hh* en el disco imaginal de ala-tórax. No obstante, estos resultados no descartan la posibilidad de que en otros contextos sí exista esta regulación. Por ello, se realizó la búsqueda *in silico* de posibles sitios de unión para *ci* en las regiones regulatorias del gen *fra*. Utilizando una matriz de logos diseñada a partir de sitios de unión para *ci* ubicados en distintos blancos transcripcionales de *hh*⁷⁰. La matriz se alineó 10Kb río arriba y 10 kb río abajo del inicio de la transcripción del gen, encontrándose dos posibles sitios de unión para *ci* dentro del primer intrón, similar a lo observado en *Neo1* y *Dcc*. Sobre estos sitios se diseñaron partidores (tabla 2) que detectaran tanto al sitio como su contexto genómico y con ellos se levantó la secuencia desde el genoma de *D. melanogaster* y se clonó en el vector pH-Stinger, río arriba del promotor HSP-70 que comanda la expresión de GFP. Por separado, ambos sitios fueron inyectados en *D. melanogaster* de la cepa Yellow-White y luego por selección del color de ojos se identificaron 9 stocks para el sitio de unión 1 y 7 para el sitio de unión 2. Sobre cada stock se realizó un análisis de los discos imaginales, evaluando si en los contextos donde hay alta actividad de *hh* existía expresión de GFP, lo cual no fue posible de observar en ninguno de los Stocks de *D. melanogaster* mencionados, descartando la posibilidad de que la expresión de *fra* tenga dependencia con la vía *hh* en *D. melanogaster* (Datos no mostrados).

Estos resultados muestran que la vía *hh* no modula la expresión de *fra*, como si lo hace con *Neo1* y eventualmente con *Dcc*, de tal forma que esta

regulación surgió como una ventaja evolutiva en organismo vertebrados, para controlar procesos que requieren de una fina modulación en organismos complejos.

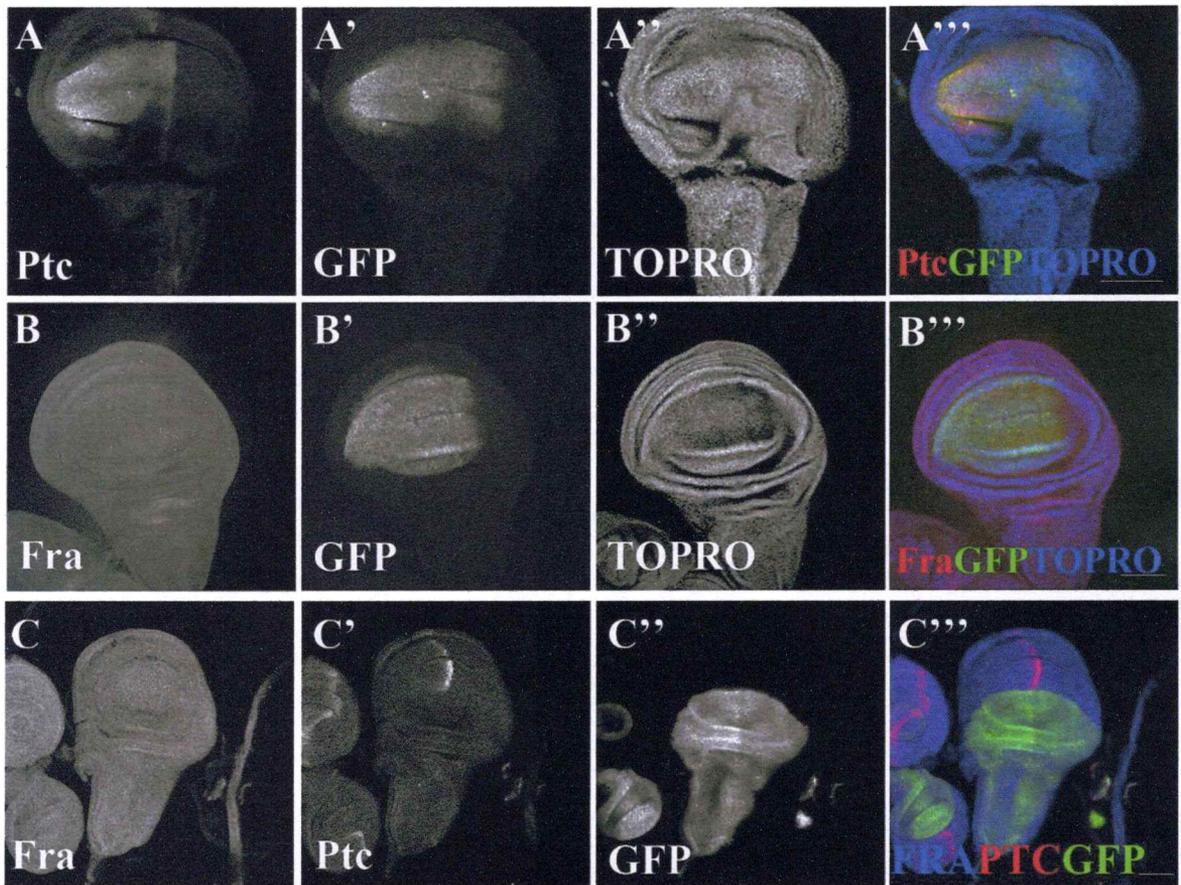


Figura 10. hh no induce cambios en la expresión de ra. Mediante el sistema Gal4/UAS se indujo ganancia de función de la vía HH, a través de la sobre-expresión de la proteína de fusión hh::GFP en la región central del *pouch* del disco imaginal de alatórax de *D. melanogaster*, utilizando el promotor *Sal*. **A.-** Expresión de *ptc* (Rojo), **A'.**- GFP (Verde), **A''.**- TOPRO (azul), **A'''.**- Co-distribución. **B.-** Expresión de *fra* (Rojo). **B'.**- GFP (Verde). **B''.**- TOPRO (azul). **B'''.**- Co-distribución. **C.-** Expresión de *fra* (Azul). **C'.**- Expresión de *ptc* (Rojo). **C''.**- GFP (Verde). **C'''.**- Co-distribución. Barra de tamaño 50µm.

8.4.- Neo1 y Dcc no conservan el mecanismo de regulación negativo sobre la vía HH

Antecedentes postulan que Neo1 es capaz de regular negativamente la vía de señalización Shh, ya que ratones mutantes para *Neo1* muestran expresión ectópica de *Ptc1* y *Gli1* en la región anterior de los primordios de extremidad⁴⁴. Para evaluar esta hipótesis y determinar si esta función se conserva en Dcc, se evaluó la diferenciación inducida por Shh en la línea celular murina C3H10T1/2 cuando se sobreexpresa NEO1 o DCC. Estas células son de origen mesenquimático y se diferencian a linaje osteogénico en respuesta a Shh. Durante este proceso, las células expresan fosfatasa alcalina que puede ser medida y cuantificada a través de métodos colorimétricos, lo que se corresponde con el proceso de diferenciación y a su vez es una medida indirecta de la actividad de la vía Shh²⁹.

Antecedentes demuestran que la familia de morfógenos BMP también puede inducir diferenciación osteogénica en este tipo celular, de manera similar a lo que ocurre con Shh⁷¹, donde BMP2 y BMP7 inducen de manera secuencial la condrogénesis y osteogénesis, respectivamente, procesos que son dependientes de la concentración y del tiempo de exposición a estos morfógenos⁷². Este antecedente resulta interesante, ya que también se ha propuesto que Neo1 en mamíferos, así como su homólogo Unc40 en *C. elegans* son receptores de BMP en el contexto del desarrollo del sistema nervioso⁵³,

sugiriendo que Neo1 no sólo podría reducir la actividad de la vía SHH, sino que además podría tener un efecto sobre la vía BMP.

Por estos motivos, se sobre-expresó NEO1 o DCC en células C3H10T1/2 y luego de 48h post-transfección se incubó con Shh o Bmp2 durante otras 48h. Al cabo de este tiempo, se cuantificó la actividad de fosfatasa alcalina mediante la formación de un precipitado de color azul (NBT/BCIP) y se evaluó el grado de diferenciación inducido por ambos morfógenos. Para descartar que los valores de diferenciación se debiesen a un posible aumento en el número de células, o bien que la sobreexpresión de NEO1 o DCC hayan inducido apoptosis, se graficó el número de células en cada condición, cuantificadas a partir del conteo de núcleos teñidos con nuclear red. Al respecto, no se observaron cambios significativos en el número de células inducida por ambos morfógenos, indicando que las diferencias observadas en el índice de diferenciación se deben principalmente a la sobre-expresión de las proteínas señaladas (Anexo1).

El grado de diferenciación se evaluó realizando la cuantificación de la coloración azul, mediante el software ImageJ y dividiendo este valor por el número de células en cada fotografía (índice de diferenciación). Esto permite evaluar de manera indirecta la expresión y actividad de fosfatasa alcalina y por ende la capacidad de diferenciación de las células C3H10T1/2. Los resultados mostraron que sólo el tratamiento con Shh produce un incremento en el índice de diferenciación, mientras que las células tratadas con Bmp mantienen valores similares a las células no tratadas (Figura 11 G, Barra Negra). Como se

mencionó, estudios muestran que ambos morfógenos son capaces de inducir la diferenciación ósea, pero en este caso fue sólo Shh y no Bmp el capaz de inducirla. Algunos antecedentes plantean que para que ocurra diferenciación ósea, debe existir una acción temporal entre Shh y Bmp, donde Shh se necesitaría primero y Bmp se requeriría para terminar el proceso⁷³, indicando que los efectos que podría tener Bmp sobre la diferenciación se observarían sólo después del tratamiento con Shh.

Como control positivo de regulación negativa se utilizó la sobre-expresión de PTC1, la cual no tuvo el efecto esperado, ya que el nivel de diferenciación inducido por Shh es significativamente mayor al valor obtenido en las células control sin PTC1. Por otro lado, las células tratadas con Bmp se comportan similar al control (Figura 11G, Barra Blanca). Si bien en este experimento PTC1 no muestra actuar como regulador negativo, por experimentos previos del laboratorio, realizados por el Magister Pablo Lois Silva, PTC1 reduciría el porcentaje de células fosfatasa alcalina luego de 48h post-transfección (Anexo II). De acuerdo a esto y según nuestro diseño experimental en el momento en que se evaluó la diferenciación (96h después de la transfección) no se habría alcanzado a observar el mecanismo de acción de PTC1.

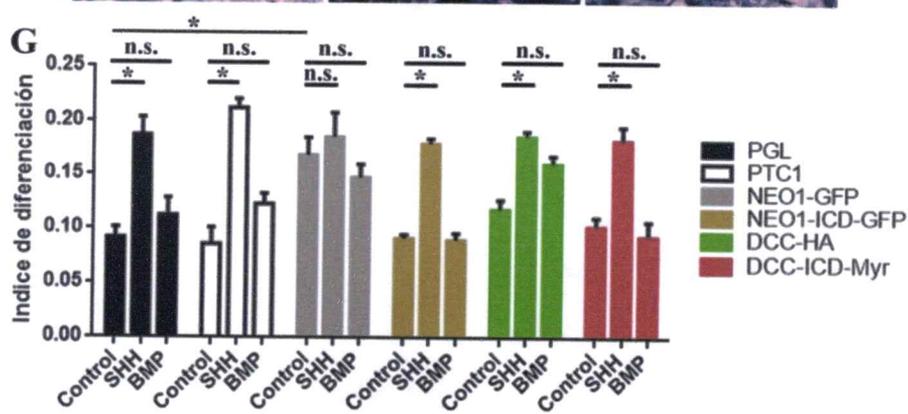
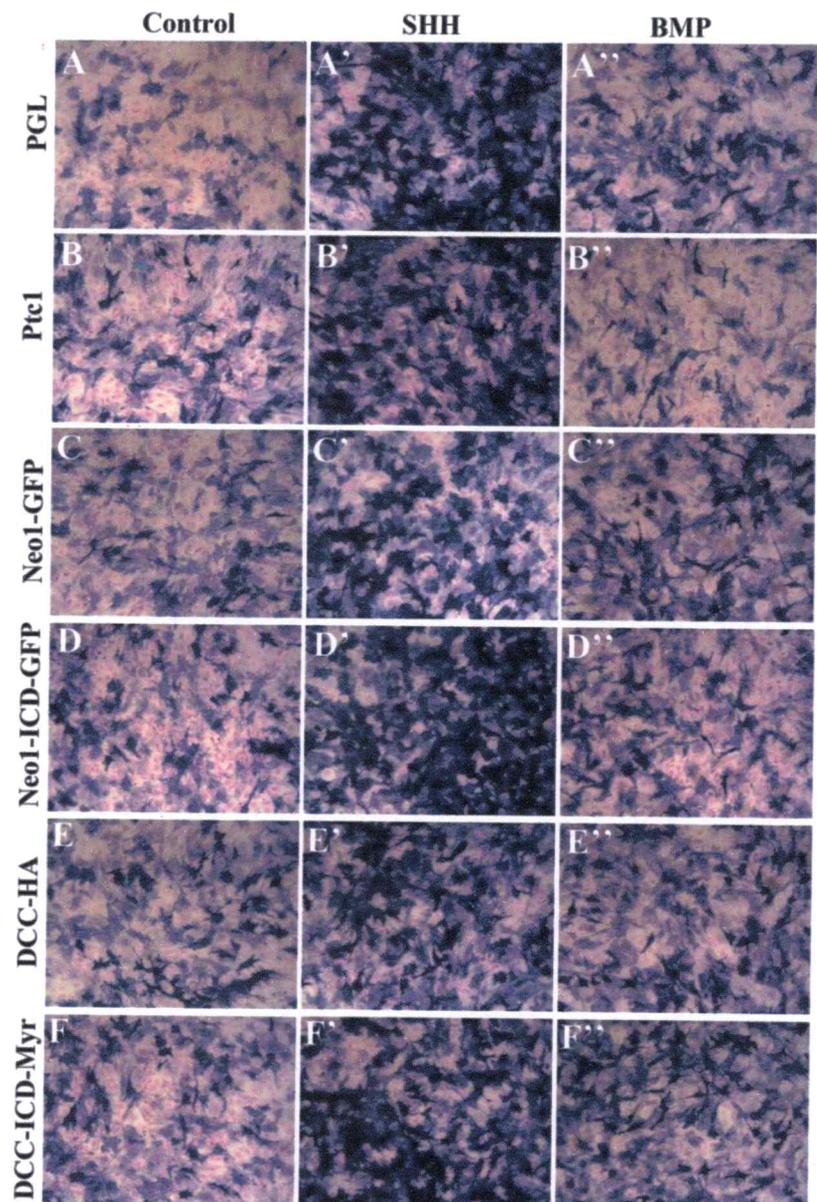


Figura 11. Sólo Neo1 y no Dcc detiene la diferenciación inducida por SHH. Células C3H10T1/2 fueron transfectadas con los vectores que contienen las secuencias de PGL (A), Ptc1 (B), Neo1 (C), Neo1-ICD (D), Dcc (E) o Dcc-ICD (F). Luego de 48h post-transfección fueron incubadas con una única dosis de SHH (10 µg/mL) o BMP2 (100 ng/mL) durante 48h. Posteriormente, se evaluó la diferenciación de las células mediante la detección de la actividad de fosfatasa alcalina a través de la formación de un precipitado azul (NBT/BCIP). A.- Control, A'.- SHH, A''.- BMP; B'.- Control, B'.- SHH, B''.- BMP, C.- Control, C'.- SHH, C''.- BMP, D.- Control, D'.- SHH, D''.- BMP, E.- Control, E'.- SHH, E''.- BMP, F.- Control, F'.- SHH, F''.- BMP. G.- Índice de diferenciación calculado a partir de la medición de la intensidad del canal azul dividido por el número de células de cada fotografía. n=6. Test de comparación múltiple Dunn's $p < 0,05$.

Por otra parte, la transfección con Neo1 produce por si sola un aumento en el índice de diferenciación, ya que este valor es significativamente más alto que el observado en las células control sin transfección (Figura 11, Comparar barra ploma con barra negra). Adicionalmente, se observa que el tratamiento con SHH no potencia la diferenciación observada en las células transfectadas con Neo1. Esto podría indicar que la diferenciación inducida por Neo1 sería independiente de SHH o bien que la sobre-expresión de Neo1 estaría saturando el sistema, de tal forma que aunque se adicionen grandes cantidades del morfógeno no se observará una mayor diferenciación. Otro posible escenario indicaría que la mayor expresión de Neo1 detendría el efecto de SHH, posiblemente a través de un mecanismo de regulación negativo, como el secuestro de los co-receptores positivos de esta vía (Figura 11G, Barra Gris). A partir de esta figura también se puede observar que se requiere del fragmento extracelular de Neo1 para inducir el efecto observado con SHH, ya que cuando las células son transfectadas sólo con el fragmento intracelular de Neo1, SHH sí

produce un aumento significativo en la diferenciación respecto de las células control (Figura 11G, Barra Café claro).

A diferencia de Neo1, Dcc no pareciera afectar la diferenciación inducida por SHH ya que su sobre-expresión no produce efectos sobre el índice de diferenciación (Figura 11G, Barra Verde). No obstante, cuando se sobre-expresa Dcc en presencia de Bmp existe una tendencia al aumento en el índice de diferenciación, respecto de las células no tratadas. Sin embargo, se requieren de experimentos adicionales para confirmar esta tendencia (Figura 11G, Barra Roja). Esta relación entre Dcc y Bmp sería interesante de analizar, ya que no se ha descrito que Dcc se comporte como sus homólogos Neo1 y unc40, los cuales sí reconocen a esta familia de morfógenos. Según estos resultados, sólo Neo1 podría estar regulando negativamente la diferenciación inducida por SHH.

8.5.- Frazzled no induce cambios en la actividad de la vía HH

Según los resultados obtenidos, sólo Neo1 tendría influencia negativa sobre la señalización SHH, a diferencia de Dcc que no tendría tal efecto. Para determinar si esta característica se adquirió en invertebrados y se perdió en Dcc, o bien que fue una regulación adquirida por Neo1 en vertebrados, se evaluó si fra también sería un regulador negativo de la vía hh en *D. melanogaster*. Para ello, se utilizó como primera aproximación la sobre-expresión de fra en los compartimentos posteriores utilizando el promotor engrailed y luego se determinó si existía alguna restricción en el avance del morfógeno. Esto se evaluó a través de la cuantificación del área comprendida entre las venas 3 y 4, que se encuentra

en la región anterior y es controlada por la señalización hh⁶. Como se observa en la figura 12, la sobre-expresión de *fra* produce fenotipos no-autónomos como la pérdida de la vena cruzada anterior y una reducción significativa en el área entre las venas 3 y 4 (figura 12C y 12G), la cual fue normalizada respecto del área comprendida entre las venas 1 y 2 (que no tienen influencia de hh). Al realizar este mismo experimento utilizando el promotor *hedgehog*, también se observa la pérdida de la vena cruzada anterior y además se aprecia la formación de pequeños globos en el ala, lo que indicaría pérdida de adhesión celular (Figura 12E). Por el contrario, al realizar la pérdida de función de *fra* mediante la sobre-expresión de su ARN interferente en la región posterior utilizando el promotor *hedgehog*, se observó el aumento en el tamaño del área comprendida entre las venas 3 y 4 (Figura 12D, F y G). Según estos resultados, *fra* podría estar mediando el movimiento de la gradiente de hh en los discos imaginales de alatorax, lo que se traduciría en un cambio en el área controlada por hh. Sin embargo, una publicación reciente propuso que *fra* es fundamental en el desarrollo del ala, específicamente en el proceso de migración celular que ocurre desde el ala hacia el cuerpo de *D. melanogaster* durante la eversión desde el disco⁷⁴, lo cual indica que los fenotipos observados en el ala se pueden deber a cambios en la migración celular y no a una regulación sobre la gradiente de hh.

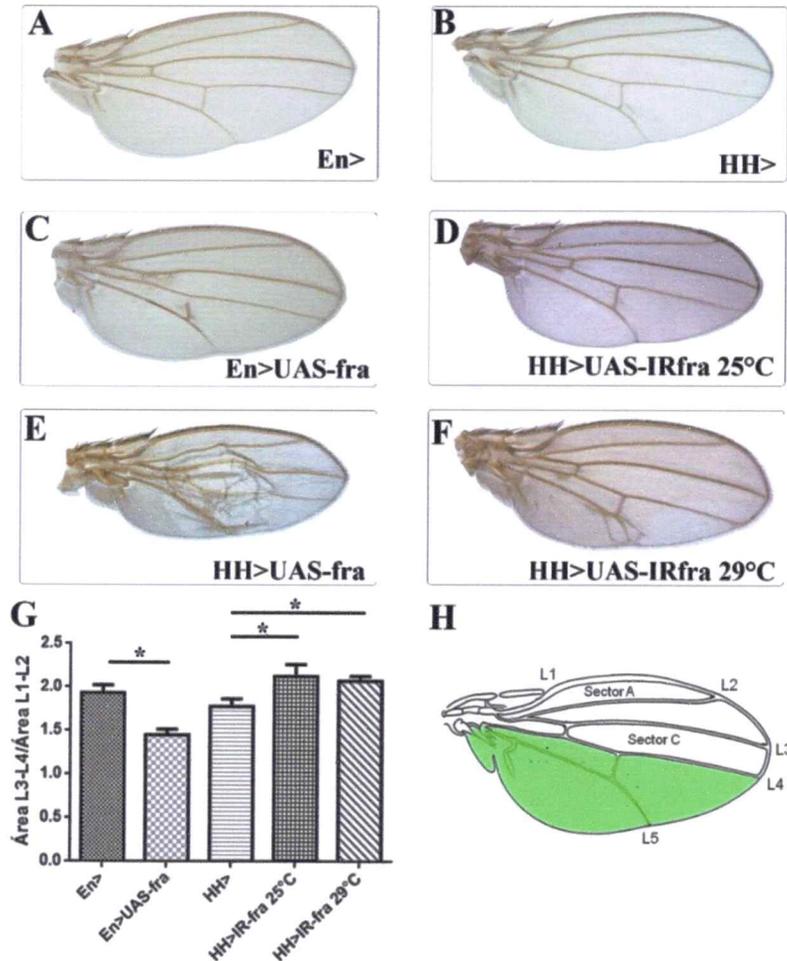
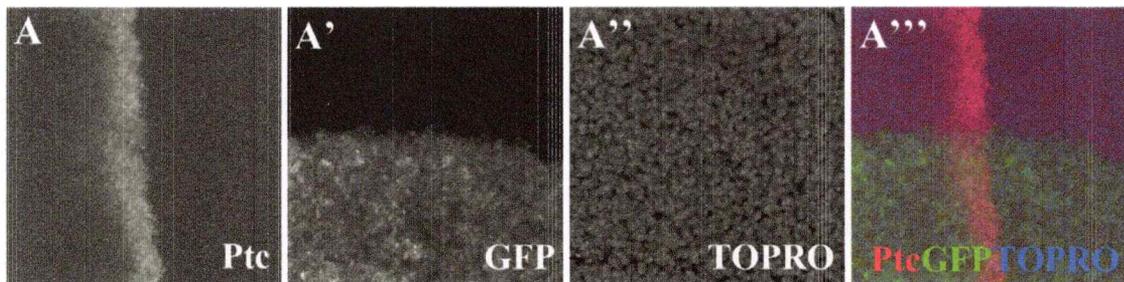


Figura 12. Cambios en la expresión de fra inducen fenotipos no autónomos en ala adulta de *D. melanogaster*. Mediante el sistema Gal4/UAS se indujo la ganancia de función de fra utilizando el promotor *engrailed* y el promotor *hedgehog*. Asimismo, se indujo la pérdida de función a través de la sobre-expresión de su RNA interferente utilizando el promotor *hedgehog*. Luego se graficó la relación existente entre las áreas de las venas 3 y 4, respecto del área comprendida entre las venas 1 y 2. **A.-** Ala control *engrailed*-Gal4. **B.-** Ala control *hedgehog*-Gal4. **C.-** Ala con sobre-expresión de fra en la región posterior inducida por el promotor *engrailed*. **D.-** Ala con sobre-expresión del RNA interferente de fra inducida por el promotor *hedgehog* a 25°C. **E.-** Ala con sobre-expresión de fra en la región posterior inducida por el promotor *hedgehog*. **F.-** Ala con sobre-expresión del RNA interferente de fra inducida por el promotor *hedgehog* a 29°C. **G.-** Gráfico donde se muestra la relación existente entre las áreas de las venas 3 y 4 y el área de las venas 1 y 2. $P < 0,05$ Test Turkey de comparación múltiple $N = 15$. **H.-** Esquema de un ala adulta de *D. melanogaster* donde en verde se aprecia la región posterior y en blanco la región anterior. Además, se aprecia la posición y numeración de las venas y las áreas cuantificadas, el sector A corresponde al área entre las venas 1 y 2, mientras que el sector C corresponde al área entre las venas 3 y 4.



Ap-Gal4>UAS-mCD8GFP;UAS-IRFra

Figura 13. La pérdida de función de fra no produce cambios en la expresión de ptc. Mediante el sistema Gal4/UAS se sobre-expresó el RNA interferente de *fra* en la región dorsal del disco imaginal de ala tórax utilizando el promotor *apterous* y a través de inmunofluorescencia se analizó la expresión de *ptc*. **A.-** Expresión de *ptc* (Rojo). **A'.-** GFP (Verde). **A''.-** TOPRO (Azul). **A'''.-** Codistribución.

Para analizar si los fenotipos observados se corresponden con el aumento en la expresión de *ptc* y *ci* o bien se deben a un mal plegamiento por un defecto de la función migratoria de las células, es que se realizó la pérdida de función de *fra* mediante la sobre-expresión de su RNAi en la región dorsal del disco y se evaluó el posible corrimiento o aumento del patrón de expresión de *ptc* en el compartimento anterior. Como se muestra en la figura 13, la disminución en la expresión de *fra* no produce cambios en la expresión de *ptc*. Un resultado similar es el que se obtiene al realizar la pérdida alélica de *fra* mediante MARCM, ya que los clones analizados en la región anterior del disco imaginal de ala-tórax no muestran un aumento en los niveles de expresión de *ptc* o *ci* (Figura14). Estos resultados indicarían que *fra* no regularía negativamente la vía hh.

Por otra parte, los resultados observados en las células C3H10T1/2 indican que la ganancia de función de NEO1 induce un aumento en la diferenciación o bien un arresto de la diferenciación inducida por Shh. Por este

motivo, se decidió analizar si la ganancia de función de *fra* produce algún cambio en la expresión de *ptc* o *ci* en los discos imaginales de ala tórax.

Utilizando el promotor *sal*, se sobre-expresó *fra* en la región central del *pouch* del disco imaginal y luego se evaluó si *ptc* disminuía su expresión. Los resultados mostraron que este nivel de sobre-expresión no produce cambios en la expresión de *ptc* (Figura 14B). Por ello, se realizó el mismo análisis, pero esta vez utilizando el promotor *apterous*, el cual induce una sobre-expresión mayor a la del promotor *sal*. A partir de los resultados de este experimento, tampoco fue posible observar cambios en el patrón de expresión de *ptc* (Figura 14D). Sin embargo, en algunos discos imaginales fue posible observar el desprendimiento de algunas células del disco hacia la región ventral (figura 14E'), lo cual sería indicativo de células que se encuentran en apoptosis⁷⁵. Esta observación es interesante, ya que NEO1 y DCC pertenecen a la familia de los receptores de dependencia, función que hasta la fecha no ha sido descrita a cabalidad para *fra*. Por este motivo, se decidió analizar si existía un aumento de la muerte celular mediada por *capasa3* activada en discos imaginales con ganancia de función de *fra*. Para ello, utilizando el sistema GAL4/UAS se sobre-expresó nuevamente *fra* utilizando el promotor *sal* y luego, a través de inmunofluorescencia, se determinó el marcaje de *caspa3* activa. Los resultados mostraron que existe marca de esta proteína en las regiones de sobreexpresión de *fra*, las que están delimitadas por la marca de GFP. Por lo tanto, *fra* se comportaría como receptor de dependencia en *D. melanogaster*, confirmando la hipótesis de que esta función

es ancestral en esta familia de receptores. De manera interesante, el marcaje de caspasa3 se encuentra mayoritariamente en la región anterior del disco y alejado de la zona donde hay alta actividad de la vía HH, la cual está delimitada por la marca de *ptc*, indicando que altas concentraciones del morfógeno podrían reprimir la muerte celular (Figura 16).

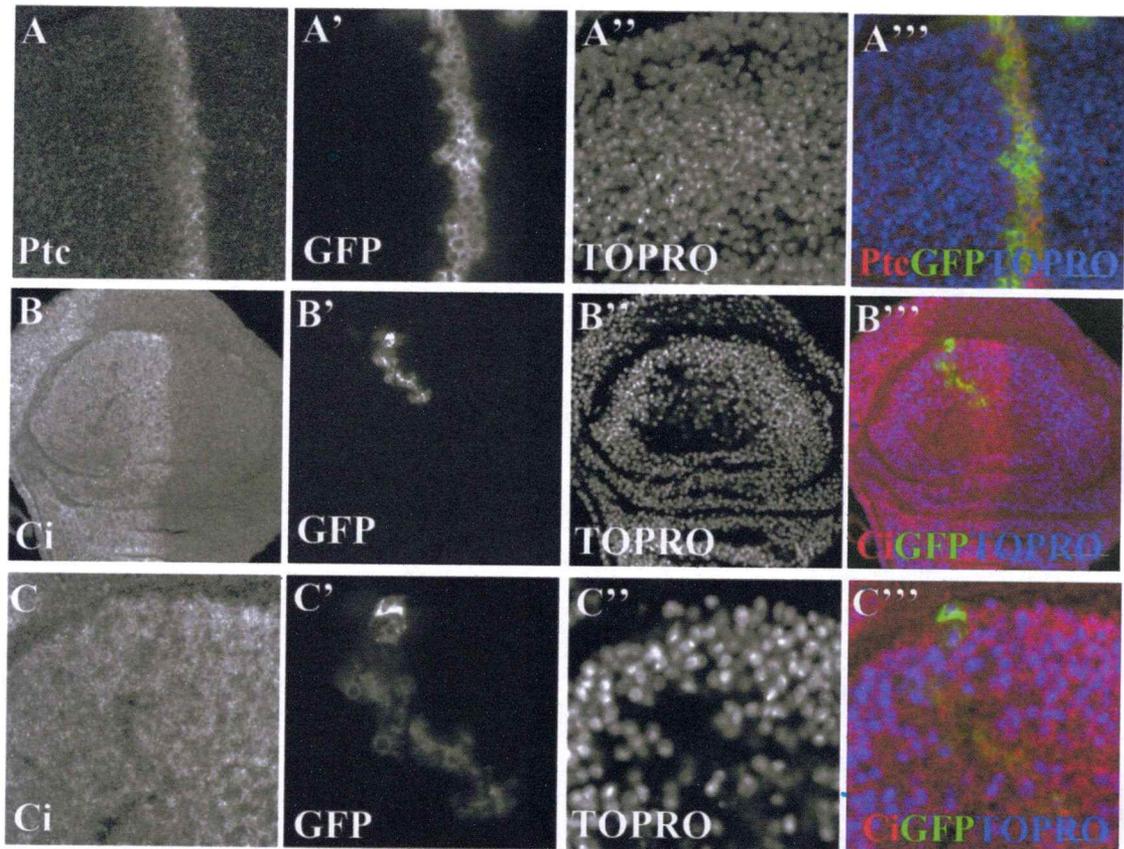
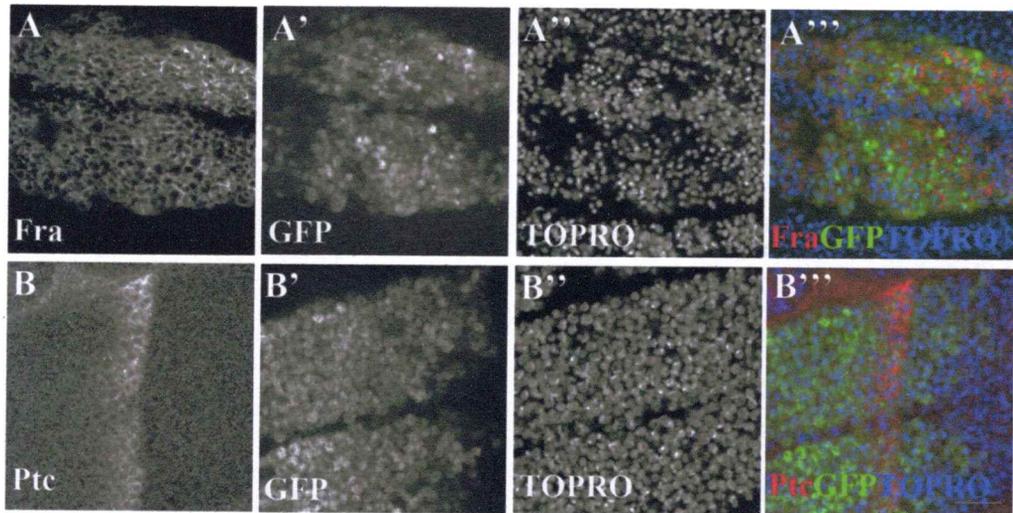
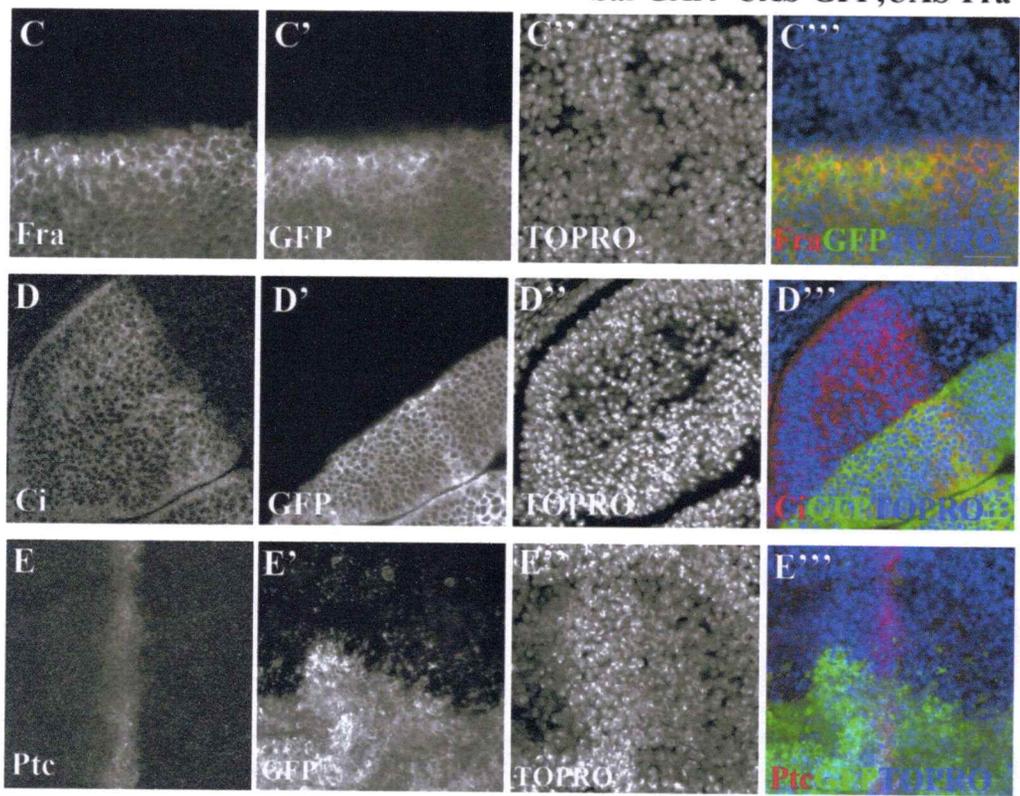


Figura 14. La pérdida función alélica de *fra* no induce cambios en la expresión de *ptc* y *ci*. Mediante MARCM se indujo la pérdida alélica de *fra* y luego mediante inmunofluorescencia se analizó la expresión de *ptc* y *ci*. **A.-** *ptc* (Rojo), **A'.- GFP** (Verde), **A''.- TOPRO** (Azul), **A'''.- Co-distribución**. **B.- ci** (Rojo), **B'.- GFP** (Verde), **B''.- TOPRO** (Azul), **B'''.- Co-distribución**. **C.- C'''.- Acercamiento de lo observado en B.** barra de tamaño A-B''' 50 μm ; C-C'''.- 10 μm .



Sal-Gal4>UAS-GFP;UAS-Fra



Ap-Gal4>UAS-GFP;UAS-Fra

Figura 15. La ganancia de función de fra promueve una desorganización de los tejidos, sin afectar la expresión de ptc. Mediante el sistema Gal4/UAS se realizó la ganancia de función de fra en tejidos imaginales de ala-tórax y luego se analizó a través de inmunofluorescencia la expresión de ptc. **A y B.**- Sobre-expresión de fra utilizando el promotor *sal*. **A.**- Inmunofluorescencia de fra en la región de sobre-expresión (Rojo), **A'**- GFP (Verde), **A''**- TOPRO (Azul), **A'''**- Co-distribución. **B.**- Inmunofluorescencia de ptc (Rojo), **B'**- GFP (Verde), **B''**- TOPRO (Azul), **B'''**- Co-distribución. **C-E'''**.- Ganancia de función de fra utilizando el promotor *apterous*. **C.**- Inmunofluorescencia de fra (Rojo), **C'**- GFP (Verde), **C''**- TOPRO, **C'''**- Co-Distribución. **D.**- Inmunofluorescencia de ci (Rojo), **D'**- GFP (Verde), **D''**- TOPRO (Azul), **D'''**- Co-distribución. **E.**- Inmunofluorescencia de ptc (Rojo), **E'**- GFP (Verde), **E''**- TOPRO (Azul), **E'''**- Co-distribución. Barra de tamaño 20µm.

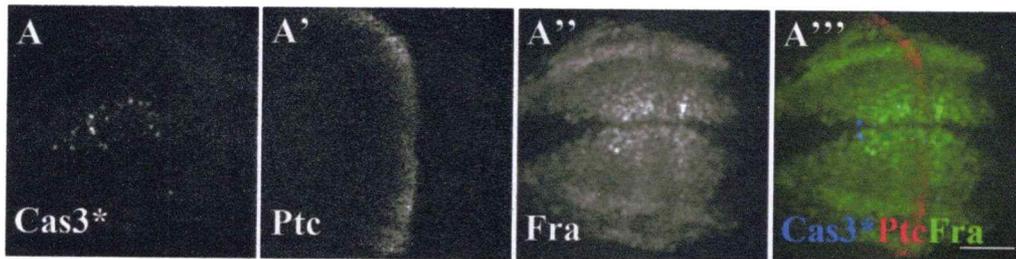


Figura16. El aumento en la expresión de fra induce muerte celular por apoptosis en regiones de baja actividad de hh. Mediante el sistema Gal4/UAS se indujo la ganancia de función de fra utilizando el promotor *sal* y luego, a través de inmunofluorescencia se realizó el marcaje de caspasa 3 activada. **A.**- Inmunofluorescencia de caspasa 3 activada (Azul), **A'**- Inmunofluorescencia de ptc (Rojo), **A''**- frazzled (Verde), **A'''**- Co-distribución. Barra de tamaño 20µm.

9.- Discusión

9.1.- La activación de la expresión de *Dcc* requeriría de vías adicionales a SHH

La señalización de la familia de morfógenos HH participa del desarrollo embrionario de vertebrados e invertebrados, modulando procesos tan variados como proliferación, diferenciación y migración⁷⁶. En mamíferos, SHH es el miembro más estudiado de esta familia, por ser uno de los principales controladores del desarrollo del sistema nervioso, participando, entre otras cosas, de la diferenciación de las células del tubo neural¹⁵ y como el principal mitógeno de los precursores granulares neuronales del cerebelo¹⁷. Además, SHH es clave para la mantención de los nichos troncales neurogénicos en los cerebros adultos⁴ y también se ha observado como una molécula atrayente de axones en el proceso de guía axonal^{22,77}.

Las células competentes a SHH lo detectan de manera tiempo y concentración dependiente, promoviendo la expresión de múltiples genes, entre los que se encuentra *NEO1*³⁷. Este gen codifica para una proteína receptora de membrana que posee paralogía en cordados con *DCC*⁴⁷, conservando una estructura común con alta identidad de secuencia (Figura 1). Además, conservan el reconocimiento de la misma familia de ligandos NTN^{34,78}. Por otra parte, también se ha descrito que conservan un rol como reguladores transcripcionales y como receptores de dependencia^{51,38,79}. Durante el desarrollo embrionario de

ratón, estas dos proteínas tienen territorios de expresión diferentes, NEO1 se expresa en múltiples tejidos mesodermales y ectodermales, mientras que DCC restringe su expresión principalmente al sistema nervioso⁸⁰. A la fecha, no se han estudiado los mecanismos que operan sobre la expresión de *DCC* en vertebrados, pero dada la homología que posee con *NEO1* es que se propuso evaluar si la expresión de *Dcc* en modelo murino, también sería controlada por esta vía de señalización.

El análisis *in silico* de las secuencias regulatorias del gen *Dcc*, indicó la existencia de dos posibles sitios de unión para los factores Gli. El primero de ellos se ubicó en la región promotora del gen, mientras que el segundo sitio se encontró dentro del primer intrón (Figura 6). Para ambos sitios se evaluó su capacidad de unir a los factores de transcripción Gli, mediante CHIP, y si es que ambos podían inducir la transcripción, a través del ensayo reportero luciferasa.

Los resultados mostraron la existencia de tendencias significativas de unión para Gli2 y Gli3 sólo en el GBS2, sin embargo, estos datos deben ser confirmados con un mayor número de experimentos, ya que los resultados obtenidos en el control positivo no arrojaron datos significativos, incluso luego de realizar 4 veces este experimento. Sin embargo, sí fue posible observar que estos sitios en presencia de Gli1 promovían la transcripción a través del ensayo reportero luciferasa (Figura 7). Estos resultados, indicarían que la vía SHH sí tendría influencia sobre la transcripción de *Dcc* y que según las tendencias

observadas en el CHIP, sería el GBS2 el sitio encargado de unir a los factores Gli para promover su expresión.

Para confirmar lo anterior, se evaluó si la represión de la vía Shh, a través del fármaco ciclopamina, tenía un efecto directo sobre la expresión del gen *Dcc* a nivel de ARN mensajero y de proteínas. Se observó que ciclopamina sólo reduce la expresión de los blancos transcripcionales *Ptc1*, *Gli1* y *Neo1*, mientras que *Dcc* mantiene los niveles de expresión vistos en el control. Algo similar se observó mediante la técnica de Western Blot, ya que la expresión de *Dcc* no varía después de 48 horas de tratamiento con el fármaco. Si bien el control positivo no muestra una disminución significativa en su expresión, resultados publicados por nuestro laboratorio indicaron que la disminución de la expresión de *Neo1* es posible de observar sólo con 10 μ M de ciclopamina, lo cual corresponde al doble de concentración utilizada en estos experimentos³⁷. Al respecto, al intentar reproducir estos experimentos con 10 μ M de ciclopamina, las células tendían a morir, por lo que se decidió no utilizar estos datos para el análisis. Según estos resultados, *Dcc* no requeriría de Shh para promover su expresión, lo cual es distinto a lo observado en el ensayo luciferasa y en las tendencias observadas en el CHIP. Todos estos resultados sumados, apuntan a que la expresión de *Dcc* requeriría de Shh, pero no sería suficiente, ya que los sitios de unión a Gli encontrados podrían ser de baja afinidad, haciéndolos poco eficientes para unir a los factores Gli. A pesar de ello, en altas concentraciones del factor Gli1 sí son capaces de inducir la transcripción, indicando que sólo en altos niveles de

inducción se observarían resultados positivos, impidiendo observar una disminución significativa de la expresión de Dcc luego del tratamiento con el fármaco.

De lo anterior, algunos autores han propuesto que cuando la expresión de un gen es controlada por más de una señal, las regiones regulatorias de este gen deben contener una combinatoria de sitios, los que podrían ser de baja y/o alta afinidad². Esto explicaría cómo las distintas concentraciones de un morfógeno entregan una expresión diferencial de genes en distintos territorios. Briscoe²⁰, utiliza como ejemplo para explicar esto, lo que ocurriría con la expresión de genes blanco de la vía Shh en el tubo neural. Para ello, primero considera la existencia de señales ubicuas en el tubo, distintas a Shh, y que tendrían sitios de alta afinidad en los genes blanco¹⁵. Además, indica que la región ventral posee una alta concentración de factores Gli activadores, mientras que en la región dorsal existe una alta concentración de Gli represores. De acuerdo a esto, en las regiones de alta actividad de Shh, los genes blancos poseerían pocos sitios para unión a Gli, pero estos serían de baja afinidad. En regiones más dorsales, los blancos de Shh también tendrían pocos sitios de unión a Gli, pero estos serían de mayor afinidad. Por último, en regiones aún más dorsales los genes blancos de Shh, tendrían múltiples sitios de unión de alta afinidad para Gli. Por lo tanto, para que un gen sea controlado por más de una señal se requiere de la existencia de sitios de unión para factores de transcripción ubicuos y de sitios de unión con distintas afinidades para un mismo factor de transcripción¹⁵.

Muy poco es lo que se conoce acerca de cuáles factores de transcripción podrían estar regulando la expresión de *Dcc* en ratón, pero una publicación realizada en el contexto del desarrollo de hueso, describió que la expresión de *Dcc* estaría siendo controlada por los factores de transcripción AP2 y Sox9, los cuales tendrían múltiples sitios de unión en la región promotora de este gen⁸¹. Lamentablemente, no se logró ubicar en la región promotora publicada, el sitio de unión a Gli encontrado en el análisis *in silico*, probablemente porque para ambas búsquedas se utilizaron versiones distintas del genoma de ratón. A pesar de ello, ambos factores de transcripción juegan un importante rol durante el desarrollo del sistema nervioso, específicamente en las células derivadas de la cresta neural. Ratones mutantes para AP2 muestran defectos importantes en el desarrollo cráneo-facial⁸², mientras que la sobre-expresión de Sox9 en células de la cresta neural induce a estas células a seleccionar el linaje que dará origen a las células del tubo neural⁸³.

Por otro lado, durante el desarrollo cerebelar de ratón, Shh es expresado y secretado por las células de purkinje, difundiendo hacia la capa granular externa, donde las CGNPs residentes, reconocen e interpretan esta señal como un agente mitogénico que induce múltiples oleadas de proliferación que tienen lugar entre los días P5 y P14¹⁸. La capa granular externa a su vez puede subdividirse en tres diferentes territorios, una capa externa llamada outer-EGL (o-EGL), una capa media llamada medium-EGL (m-EGL) y una capa interna llamada internal-EGL (i-EGL). Las CGNPs a medida que van proliferando,

comienzan a movilizarse hacia las capas más internas de la EGL, donde una vez terminado el proceso proliferativo, entran en una etapa de migración que las llevará a terminar su diferenciación en la capa granular interna⁸⁴. Un trabajo publicado por el laboratorio, muestra que Neo1 tiene mayor expresión en o-EGL y que además su presencia sería importante para el control del ciclo celular de las CGNPs⁴². La expresión de Dcc no ha sido reportada en este tipo celular, pero colaboradores australianos determinaron que la expresión de Dcc se restringe mayoritariamente a la m-EGL e i-EGL (Figura Anexa III). Según estos datos Neo1 sería una proteína requerida principalmente para la proliferación de las CGNPs, mientras que Dcc se requeriría principalmente para los procesos de migración y diferenciación. En P7, las CGNPs se encuentran en activa proliferación, por lo que la señal mayoritaria que reconocen estas células es la de Shh y de acuerdo a los resultados obtenidos, Shh no sería la principal señal inductora de la expresión de *Dcc*, por lo que es esperable que la modulación de esta vía no promueva cambios en la expresión de este gen en este contexto y que sólo se verá favorecida en presencia de la señal que induzca el cambio desde un estado proliferativo a un estado de diferenciación. Al respecto se ha propuesto que BMP2 sería la señal que induce este cambio⁸⁵, pero a partir de los datos obtenidos del análisis *in silico* no fue posible encontrar sitios para de unión para las proteínas Smad, es decir los factores de transcripción efectores de la señalización BMP (datos no mostrados). A pesar de lo anterior, se podría llevar a cabo experimentos en los cuales las CGNPs se traten con diversas concentraciones de BMP y analizar si es que ocurre algún cambio en la expresión de *Dcc*.

Si bien Neo1 y Dcc son proteínas homólogas, no es inusual que ambas proteínas hayan adquirido funciones divergentes. En este sentido, Neo1 adquirió la capacidad de unir una mayor cantidad de ligandos, como por ejemplo a miembros de la familia de los RGM, para repeler axones durante la guía axonal³⁴. También puede unir a miembros de la familia de ligandos BMP, particularmente Bmp2, activando esta señalización a través de la inducción de la proteína Smad5⁸⁶. Adicionalmente, también se ha observado que Neo1 al unir a su ligando Ntn4 tendría un potencial anti-angiogénico³⁵. Por otro lado, se ha descrito que en cáncer Dcc puede funcionar como un supresor de tumores, por lo que en múltiples tipos de cáncer ocurre un fenómeno en el cual se escinde desde el cromosoma 18 un locus en el cual se encuentra la secuencia de *Dcc* y adicionalmente la de otros supresor de tumores, como el factor de transcripción Smad5⁸⁷. Por su parte Neo1 no tiene una función definida en cáncer, ya que se ha observado que su expresión aumenta o disminuye dependiendo del tipo de tejido^{88,89}. Por ejemplo, en trabajos no publicados por nuestro laboratorio, la expresión de *NEO1* en meduloblastoma desmoplástico, aumenta y junto con ello aumentan los niveles de su ligando NTN1, esto con el fin de inhibir la muerte celular debido a la acción como receptor de dependencia de NEO1 (Tesis de doctorado, Dra. Paulina Falcón U.). Por otro lado, en explantes de BCC, la expresión de NEO1 también aumenta, pero a diferencia del meduloblastoma, no existe una preferencia de sobre-expresión de ligando (Tesis de Magister, MG. Bárbara Casas A).

9.2.- fra no conserva los mecanismos de expresión de Neo1 y Dcc

fra es el homólogo funcional y estructural de Neo1 y Dcc en *D. melanogaster*, las tres proteínas conservan su estructura y funciones en guía axonal⁵⁵ y recientemente se ha confirmado que conservan un potencial rol como regulador de la transcripción⁵⁷. fra une a los miembros de la familia de ligandos NTN, netA y netB, los que son homólogos de NTN1⁹⁰. Durante el desarrollo embrionario, la expresión de fra ha sido ligada a los factores de transcripción midline y engrailed, los que regulan el desarrollo del sistema nervioso y la polaridad de segmentos, respectivamente^{63,64}. Sin embargo, al igual que con Dcc, la expresión de fra no se ha ligado a la familia de morfógenos hh, es por ello que se propuso evaluar si esta proteína tiene un comportamiento similar al observado en Neo1.

Para ello, se analizaron los patrones de expresión de fra en el disco imaginal de ala-tórax y se compararon con los patrones de expresión de ptc y ci, observándose que la expresión de fra es ubicua en el disco y no muestra similitud con los patrones de expresión de los blancos transcripcionales de hh. A pesar de ello, otros blancos transcripcionales como ihog y boi también presentan expresión ubicua en el disco⁶⁹. A partir de lo anterior, se decidió analizar si la sobreactivación de la vía hh o su represión tenía algún efecto en la expresión de fra. Los resultados mostraron que ambos tipos de modulación no producen efecto en la expresión de fra, pero sí en el control positivo ptc, el cual aumenta su expresión en las regiones de alta actividad de hh y se reduce cuando la vía hh se

encuentra inhibida (figura 10). Con estos resultados, es posible decir que la expresión de *fra* en el disco imaginal de ala-tórax no es regulada de forma directa por la vía de señalización hh.

Para determinar si este fenómeno se repetía en otros contextos celulares, se buscó en las regiones regulatorias del gen *fra* la presencia sitios de unión para *ci*, los que fueron clonados y utilizados para un ensayo de reportero, a partir del cual se pudo determinar que ninguno de los dos sitios era un inductor de la transcripción, descartando la posibilidad de que en contextos diferentes al de ala-tórax exista regulación mediada por hh.

Todos estos resultados indicarían que *Neo1* se comporta como un gen clásico de la vía HH, variando su expresión en el mismo sentido que lo harían componentes de la vía HH. *Dcc* requeriría de Shh para expresarse, pero además necesitaría de señales adicionales y *fra* no se modularía por la vía HH. Esto implicaría que durante la evolución de la familia NEO1/DCC/*fra* se adquirieron distintos mecanismos de expresión para estos tres genes, donde *fra* al ser el gen más primitivo mantuvo su regulación asociada hacia los factores de transcripción *midline* y *engrailed*. Mientras que los parálogos *Dcc* y *Neo1*, adquirieron nuevos mecanismos de regulación, asociados a la señalización Shh, que tienen relación con el contexto celular, el tiempo en el desarrollo y la concentración del morfógeno en el tejido.

9.3-Neo1 detiene la diferenciación inducida por Shh, mientras que Dcc no es capaz de regular esta vía de señalización

La vía de señalización Shh controla múltiples procesos que son vitales durante el desarrollo embrionario, es por ello que se requiere de una fina regulación que puede ocurrir a diferentes niveles, a través de factores externos a la señalización o bien mediante mecanismos de auto-regulación, los que pueden ser de carácter positivo o negativo³². Antecedentes proponen, que Neo1 sería un nuevo componente de la vía Shh en mamíferos, específicamente en ratón, actuando como un mecanismo de auto-regulación negativo, ya que su expresión es inducida por la vía de señalización Shh⁴² y adicionalmente tendría la capacidad de regular negativamente esta vía en los primordios de extremidad de ratón⁴⁴, donde su falta de función produce fenotipos similares a los observados en la falta de función del represor Gli3⁹¹. Por este motivo se decidió analizar más en detalle estas observaciones y si esta función se conservaba en el homólogo Dcc.

Para ello utilizamos la línea celular murina C3H10T1/2, la cual es utilizada como modelo de estudio para evaluar la diferenciación mediada por Shh²⁹. En estas células se sobreexpresó PTC1, NEO1 y DCC, así como los fragmentos intracelulares de NEO1 y DCC. Luego, se evaluó la respuesta de diferenciación inducida por la proteína recombinante de ratón Shh, a través de la actividad de fosfatasa alcalina. Los resultados mostraron que NEO1 induce por sí sólo la diferenciación y que esta no se ve potenciada por la presencia de Shh. Otra

posibilidad para este resultado es que la mayor expresión de NEO1 inhiba la acción de Shh y por este motivo no se observe una mayor diferenciación. En este sentido, se sabe que Neo1 no es un receptor de Shh⁴⁴, por lo que la regulación negativa que ejerce NEO1 sobre Shh, debe ocurrir a través del secuestro de alguno de los componentes de membrana de esta vía de señalización, como podría ser el caso de Cdo, el cual se conoce que interactúa con Neo1 durante el desarrollo de miotubos de ratón⁹².

Si bien estos resultados sugieren que Neo1 regula negativamente la señalización Shh, sería interesante para completar estos ensayos, evaluar que ocurre con la diferenciación celular inducida por Shh cuando las células no presentan expresión de Neo1, ya que si esta ejerce un efecto negativo sobre Shh se debiese esperar una respuesta similar a la que se observó al transfectar con el fragmento intracelular de Neo1. Adicionalmente, se requeriría de un control positivo adicional a Ptc1, ya que como se observó en los resultados, la sobreexpresión de este receptor no disminuye los niveles de activación inducidos por Shh, debido a que la temporalidad de expresión de Ptc1 es más temprana que la de Neo1⁴³, por lo que su mecanismo de acción no se alcanza a observar en los tiempos planteados por nuestro experimento. Esto, también puede dar cuenta que la vía de señalización posee mecanismo de auto-regulación negativos tempranos y tardíos, ya que Ptc1 al ser un gen de repuesta temprana puede reducir la actividad de la vía cuando esta se encuentra en alta actividad, mientras

que Neo1 podría ser un regulador negativo más tardío, de tal forma que pueda detener la acción residual de SHH.

DCC por su parte, al ser sobreexpresado en estas células no induce arresto ni represión de la actividad de la vía SHH, ya que cuando las células son transfectadas, los niveles de diferenciación son significativamente mayores cuando las células son tratadas con SHH en estas condiciones. De acuerdo a esto resultados, Neo1 y Dcc divergen en esta función como regulador negativo, donde Neo1 adquirió esta nueva función, posiblemente por su mayor rango de acción en una mayor cantidad de tejidos y por ende esta proteína sería utilizada como una proteína clave en el funcionamiento de múltiples vías de señalización. Por el contrario, Dcc al poseer menor territorio de expresión, las funciones que habría adquirido serían menores y más restringidas a las observadas en Neo1.

9.4.- frazzled no regula la vía hh en *D. melanogaster*

Neo1 y Dcc divergen en su acción como moduladores de la vía de señalización SHH, con lo cual se vuelve interesante analizar que ocurre con el homólogo fra. Para resolver este objetivo, se realizó la ganancia de función de fra en el compartimento posterior del disco imaginal de ala-tórax y luego se analizó en el ala adulta si es que existían fenotipos no-autónomos en la región anterior. Con este análisis se pretendía determinar si fra tenía alguna influencia sobre la gradiente de señalización hh, la cual controla el área comprendida entre las venas 3 y 4. El análisis mostró que la ganancia de función de fra induce la disminución del área antes mencionada, indicando que fra podría estar

restringiendo el avance de la gradiente. Asimismo, al realizar la pérdida de función, se pudo observar el aumento del área entre las venas 3 y 4, coincidiendo con la hipótesis de que *fra* ejercería un rol negativo sobre la vía hh a través de una represión del movimiento de la gradiente (Figura 12). Sin embargo, durante el desarrollo de este trabajo de tesis, un artículo publicado en la revista *Nature* demostró que *fra* era fundamental en el proceso migratorio de las células del disco durante la eversión del ala⁷⁴. Por ende, los fenotipos observados más que a un efecto sobre la vía HH se pueden deber a un defecto en la migración celular.

No obstante, se decidió analizar a nivel molecular si es que *fra* tenía influencia sobre la vía HH, para ello se indujo la pérdida de función de *fra* en la región dorsal del disco imaginal y se observó si en la región anterior había algún aumento en la expresión de *ptc*. Los resultados mostraron que no había cambios luego de la pérdida de función y similarmente, a través de MARCM, tampoco fue posible observar cambios con la pérdida de función alélica de *fra*, ya que ninguno de los clones analizados, presentaba cambios en la expresión de *ptc* o *ci*.

De igual forma, la ganancia de función de *fra* en la región dorsal del disco imaginal tampoco produce cambios en la expresión de *ptc* o *ci*. Sin embargo, se puede observar que luego de inducir la ganancia de función de *fra*, algunas células de la región dorsal se desprendían y se ubicaban en la región ventral, lo cual es interesante ya que en el disco imaginal, las células sólo son desprendidas del tejido cuando se encuentran en apoptosis⁷⁵. NEO1 y DCC pertenecen a la familia de los receptores de dependencia, donde en la ausencia del ligando se

induce muerte celular mediante apoptosis. Por este motivo se decidió analizar si es que la ganancia de función de fra produce apoptosis en las células del disco. Para ello, se indujo la ganancia de función de fra en la región central del *pouch* y luego mediante inmunofluorescencia se analizó si es que había marca de caspasa3 activada. Los resultados mostraron que la marca de caspasa se distribuía mayoritariamente en regiones anteriores, donde la concentración de hh es menor, lo cual indica que las células que están expuestas a altas concentraciones de hh son capaces de evadir la apoptosis.

Los resultados de esta tesis muestran que la familia de proteínas NEO1/DCC/fra son proteínas homólogas, que conservan una estructura común, así como una amplia variedad de funciones. Sin embargo, los mecanismos de regulación que controlan la expresión de estas proteínas difieren en cada una de ellas. Neo1 es un blanco transcripcional de la vía HH, Dcc pareciera estar controlado por más de una familia de morfógenos y fra no tiene regulación mediada por HH. Por este motivo se plantea un modelo en el cual, durante el desarrollo del sistema nervioso, la expresión de fra estaba controlada principalmente por midline y luego del evento de duplicación génica que dio origen a NEO1 y DCC, se adquirieron nuevos mecanismos regulatorios para su expresión, debido a una divergencia en sus funciones y territorios de expresión, donde NEO1 es expresado en función de la gradiente de HH y DCC sería expresado en función de un equilibrio entre SHH y alguna otra vía de señalización. A su vez, Neo1 fue quien adquirió nuevos roles a los observados

en Dcc y Fra, ya que éstos últimos parecieran no tener influencia sobre la vía HH, en cambio Neo1 sería un regulador negativo de esta señalización.

Asimismo, fra también conservaría la función de receptor de dependencia observada en Neo1 y Dcc, lo cual implica que esta función sería ancestral y conservada entre organismos invertebrados y vertebrados.

Si bien se conocía que estas proteínas son homólogas, muy pocos estudios se han encargado de realizar un análisis comparativo de las funciones conservadas de esta familia. En este trabajo se describió que los mecanismos de regulación son diferentes para tres miembros de esta familia de proteínas, que existe divergencia en la función como reguladores negativos sobre la vía HH y además se plantea que existiría otra función conservada que corresponde a la de receptores de dependencia. Con esto, se pueden proyectar nuevas interrogantes como ¿qué otras señales podrían intervenir en la regulación de la expresión de Dcc durante el desarrollo del cerebelo?, ¿Cuál es el mecanismo por el cual Neo1 podría estar inhibiendo la vía HH?, ¿Dcc podría estar participando de la vía BMP? Y otras que podrán ser analizadas en futuros estudios.

10.- Conclusiones

Este trabajo explica como la vía HH actúa sobre la expresión de los miembros de la familia *Neo1/Dcc/fra* y además como estas proteínas podrían regular negativamente a esta misma vía de señalización. A partir de los resultados obtenidos, se puede establecer que la vía HH controlaría directamente sólo la expresión de *Neo1*. Mientras que la expresión de *Dcc*, estaría controlada por más de un factor de transcripción, a diferencia de lo que ocurre con *fra* el cual no se afecta por modulaciones en la vía. Por lo tanto, los mecanismos de expresión de esta familia de proteínas son distintos y dependerán tanto de sus territorios de expresión como de las diferentes funciones que lleven a cabo.

Por otra parte, no fue posible observar que la función de regulador negativo de la vía HH este conservada entre *Neo1*, *Dcc* y *Fra*. En relación a esto, sólo *Neo1* tendría esta función y no así sus homólogos *Dcc* y *Fra*. Por ende, *Neo1* adquirió esta nueva función, para controlar diferentes procesos en los que se requiera la vía HH.

11.- Referencias

1. Rogers, K. W. & Schier, A. F. Morphogen Gradients: From Generation to Interpretation. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **27**, 377–407 (2011).
2. Briscoe, J. & Small, S. Morphogen rules: design principles of gradient-mediated embryo patterning. *Development* **142**, 3996–4009 (2015).
3. Ingham, P. W. & McMahon, a P. Hedgehog signaling in animal development: paradigms and principles. *Genes Dev.* **15**, 3059–87 (2001).
4. Palma, V. *et al.* Sonic hedgehog controls stem cell behavior in the postnatal and adult brain. *Development* **132**, 335–344 (2005).
5. Bürglin, T. R. & Kuwabara, P. E. Homologs of the Hh signalling network in *C. elegans*. *WormBook* 1–14 (2006). doi:10.1895/wormbook.1.76.1
6. Vervoort, M. Hedgehog and wing development in *Drosophila*: A morphogen at work? *BioEssays* **22**, 460–468 (2000).
7. Blair, S. S. Wing vein patterning in *Drosophila* and the analysis of intercellular signaling. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **23**, 293–319 (2007).
8. Bürglin, T. R. The Hedgehog protein family. *Genome Biol.* **9**, 241 (2008).
9. Patten, I. & Placzek, M. The role of Sonic hedgehog in neural tube patterning. *Cell. Mol. Life Sci.* **57**, 1695–708 (2000).
10. Bouldin, C. M., Gritli-Linde, A., Ahn, S. & Harfe, B. D. Shh pathway activation is present and required within the vertebrate limb bud apical ectodermal ridge for normal autopod patterning. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 5489–94 (2010).
11. Hui, C.-C. & Angers, S. Gli proteins in development and disease. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **27**, 513–37 (2011).
12. Athar, M. *et al.* Hedgehog signalling in skin development and cancer. *Exp. Dermatol.* 667–677 (2006). doi:10.1111/j.0906-6705.2006.00473.x
13. Behesti, H. & Marino, S. Cerebellar granule cells: insights into proliferation, differentiation, and role in medulloblastoma pathogenesis. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **41**, 435–45 (2009).

14. Sadler, T. W. Embryology of neural tube development. *Am. J. Med. Genet. C. Semin. Med. Genet.* **135C**, 2–8 (2005).
15. Dessaud, E., McMahon, A. P. & Briscoe, J. Pattern formation in the vertebrate neural tube: a sonic hedgehog morphogen-regulated transcriptional network. *Development* **135**, 2489–2503 (2008).
16. Traiffort, E., Angot, E. & Ruat, M. Sonic Hedgehog signaling in the mammalian brain. *J. Neurochem.* **113**, 576–90 (2010).
17. Vaillant, C. & Monard, D. SHH pathway and cerebellar development. *Cerebellum* **8**, 291–301 (2009).
18. Lewis, P. M., Gritli-Linde, A., Smeyne, R., Kottmann, A. & McMahon, A. P. Sonic hedgehog signaling is required for expansion of granule neuron precursors and patterning of the mouse cerebellum. *Dev. Biol.* **270**, 393–410 (2004).
19. Noguchi, K. K. *et al.* Hedgehog regulates cerebellar progenitor cell and medulloblastoma apoptosis. *Neurobiol. Dis.* **83**, 35–43 (2015).
20. Dessaud, E., McMahon, A. P. & Briscoe, J. Pattern formation in the vertebrate neural tube: a sonic hedgehog morphogen-regulated transcriptional network. *Development* **135**, 2489–503 (2008).
21. Torroja, C., Gorfinkiel, N. & Guerrero, I. Mechanisms of Hedgehog gradient formation and interpretation. *J. Neurobiol.* **64**, 334–56 (2005).
22. Ruiz i Altaba, A., Palma, V. & Dahmane, N. Hedgehog-Gli signalling and the growth of the brain. *Nat. Rev. Neurosci.* **3**, 24–33 (2002).
23. Marzban, H. *et al.* Cellular commitment in the developing cerebellum. *Front. Cell. Neurosci.* **8**, 450 (2014).
24. Ruiz i Altaba, A., Mas, C. & Stecca, B. The Gli code: an information nexus regulating cell fate, stemness and cancer. *Trends Cell Biol.* **17**, 438–47 (2007).
25. Beachy, P. a., Hymowitz, S. G., Lazarus, R. a., Leahy, D. J. & Siebold, C. Interactions between Hedgehog proteins and their binding partners come into view. *Genes Dev.* **24**, 2001–2012 (2010).

26. Camp, D., Currie, K., Labbé, A., van Meyel, D. J. & Charron, F. Ihog and Boi are essential for Hedgehog signaling in *Drosophila*. *Neural Dev.* **5**, 28 (2010).
27. Allen, B. L. *et al.* Overlapping roles and collective requirement for the coreceptors GAS1, CDO, and BOC in SHH pathway function. *Dev. Cell* **20**, 775–87 (2011).
28. Alexandre, C., Jacinto, A. & Ingham, P. W. Transcriptional activation of hedgehog target genes in *Drosophila* is mediated directly by the Cubitus interruptus protein, a member of the GLI family of zinc finger DNA-binding proteins. *Genes Dev.* **10**, 2003–2013 (1996).
29. Ruiz i Altaba, a. Gli proteins encode context-dependent positive and negative functions: implications for development and disease. *Development* **126**, 3205–3216 (1999).
30. Torroja, C., Gorfinkiel, N. & Guerrero, I. Patched controls the Hedgehog gradient by endocytosis in a dynamin-dependent manner, but this internalization does not play a major role in signal transduction. *Development* **131**, 2395–408 (2004).
31. Holtz, A. M. *et al.* Essential role for ligand-dependent feedback antagonism of vertebrate hedgehog signaling by PTCH1, PTCH2 and HHIP1 during neural patterning. *Development* **140**, 3423–34 (2013).
32. Ribes, V. & Briscoe, J. Establishing and interpreting graded Sonic Hedgehog signaling during vertebrate neural tube patterning: the role of negative feedback. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **1**, a002014 (2009).
33. Wilson, N. H. & Key, B. Neogenin: one receptor, many functions. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **39**, 874–8 (2007).
34. Wilson, N. H. & Key, B. Neogenin interacts with RGMa and netrin-1 to guide axons within the embryonic vertebrate forebrain. *Dev. Biol.* **296**, 485–98 (2006).
35. Lejmi, E. *et al.* Netrin-4 inhibits angiogenesis via binding to neogenin and recruitment of Unc5B. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 12491–6 (2008).
36. Goldschneider, D., Rama, N., Guix, C. & Mehlen, P. The neogenin intracellular domain regulates gene transcription via nuclear translocation. *Mol. Cell. Biol.* **28**, 4068–79 (2008).

37. Milla, L. a *et al.* Neogenin1 is a Sonic Hedgehog target in medulloblastoma and is necessary for cell cycle progression. *Int. J. Cancer* **134**, 21–31 (2014).
38. Matsunaga, E. *et al.* RGM and its receptor neogenin regulate neuronal survival. *Group* **6**, 749–756 (2004).
39. Barallobre, M. J., Pascual, M., Del Río, J. a. & Soriano, E. The Netrin family of guidance factors: Emphasis on Netrin-1 signalling. *Brain Res. Rev.* **49**, 22–47 (2005).
40. Lai Wing Sun, K., Correia, J. P. & Kennedy, T. E. Netrins: versatile extracellular cues with diverse functions. *Development* **138**, 2153–69 (2011).
41. Jorge, E. C., Ahmed, M. U., Bothe, I., Coutinho, L. L. & Dietrich, S. RGMa and RGMb expression pattern during chicken development suggest unexpected roles for these repulsive guidance molecules in notochord formation, somitogenesis, and myogenesis. *Dev. Dyn.* **241**, 1886–1900 (2012).
42. Milla, L. a *et al.* Neogenin1 is a Sonic Hedgehog target in medulloblastoma and is necessary for cell cycle progression. *Int. J. Cancer* 1–11 (2013). doi:10.1002/ijc.28330
43. Milla, L. a *et al.* Yeast-based assay identifies novel Shh/Gli target genes in vertebrate development. *BMC Genomics* **13**, 2 (2012).
44. Hong, M., Schachter, K. a, Jiang, G. & Krauss, R. S. Neogenin regulates Sonic Hedgehog pathway activity during digit patterning. *Dev. Dyn.* **241**, 627–37 (2012).
45. Wang, C., Pan, Y. & Wang, B. A hypermorphic mouse Gli3 allele results in a polydactylous limb phenotype. *Dev. Dyn.* **236**, 769–776 (2007).
46. Kang, J. *et al.* JCB : ARTICLE Netrins and neogenin promote myotube formation. *Cell* **167**, 493–504 (2004).
47. Huang, L., Zhao, X., Yu, Q., Cui, W. Z. & Liu, Q. X. Evidence for the coevolution of axon guidance molecule Netrin and its receptor Frazzled. *Gene* **544**, 25–31 (2014).

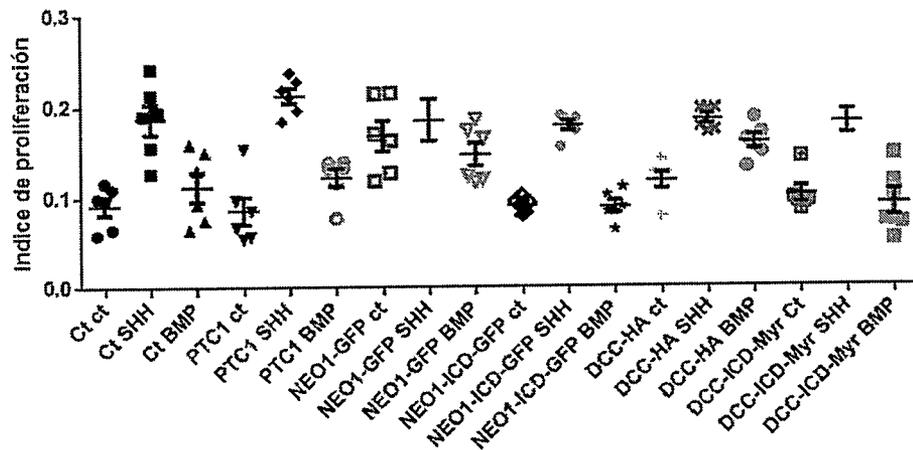
48. Dorsten, J. N. & VanBerkum, M. F. a. Frazzled cytoplasmic P-motifs are differentially required for axon pathway formation in the *Drosophila* embryonic CNS. *Int. J. Dev. Neurosci.* **26**, 753–61 (2008).
49. De Vries, M. & Cooper, H. M. Emerging roles for neogenin and its ligands in CNS development. *J. Neurochem.* **106**, 1483–92 (2008).
50. Moore, S. W., Tessier-lavigne, M. & Kennedy, T. E. Netrins and Their Receptors. *Neurobiology* (2007).
51. Moore, S. W., Tessier-lavigne, M. & Kennedy, T. E. CHAPTER 2 Netrins and Their Receptors. (2007).
52. Hagihara, M. *et al.* Neogenin, a receptor for bone morphogenetic proteins. *J. Biol. Chem.* **286**, 5157–65 (2011).
53. Tian, C. *et al.* The neogenin/DCC homolog UNC-40 promotes BMP signaling via the RGM protein DRAG-1 in *C. elegans*. *Development* **140**, 4070–80 (2013).
54. Xu, K. *et al.* Structures of Netrin-1 Bound to two Receptors Provide Insight into its Axon Guidance Mechanism. *Science* (80-.). **344**, 1275–1279 (2014).
55. Kolodziej, P. a *et al.* frazzled encodes a *Drosophila* member of the DCC immunoglobulin subfamily and is required for CNS and motor axon guidance. *Cell* **87**, 197–204 (1996).
56. De Castro, F. Chemotropic molecules: guides for axonal pathfinding and cell migration during CNS development. *News Physiol. Sci.* **18**, 130–6 (2003).
57. Neuhaus-Follini, A. & Bashaw, G. J. The Intracellular Domain of the Frazzled/DCC Receptor Is a Transcription Factor Required for Commissural Axon Guidance. *Neuron* **87**, 751–763 (2015).
58. Taniguchi, Y., Kim, S. H. & Sisodia, S. S. Presenilin-dependent '??-secretase' processing of deleted in colorectal cancer (DCC). *J. Biol. Chem.* **278**, 30425–30428 (2003).
59. Fujita, Y. *et al.* Neogenin regulates neuronal survival through DAP kinase. *Cell Death Differ.* **15**, 1593–608 (2008).

60. Chen, Y. Q. *et al.* Induction of apoptosis and G2/M cell cycle arrest by DCC. *Oncogene* **18**, 2747–54 (1999).
61. Newquist, G. *et al.* Report Blocking Apoptotic Signaling Rescues Axon Guidance in Netrin Mutants. 595–606 (2013).
62. Gad, J. M., Keeling, S. L., Wilks, a F., Tan, S. S. & Cooper, H. M. The expression patterns of guidance receptors, DCC and Neogenin, are spatially and temporally distinct throughout mouse embryogenesis. *Dev. Biol.* **192**, 258–73 (1997).
63. Liu, Q.-X. *et al.* Midline governs axon pathfinding by coordinating expression of two major guidance systems. *Genes Dev.* **23**, 1165–70 (2009).
64. Joly, W., Mugat, B. & Maschat, F. Engrailed controls the organization of the ventral nerve cord through frazzled regulation. **301**, 542–554 (2007).
65. Guillén, I. *et al.* The function of engrailed and the specification of Drosophila wing pattern. *Development* **121**, 3447–56 (1995).
66. Daily, K., Patel, V. R., Rigor, P., Xie, X. & Baldi, P. MotifMap: integrative genome-wide maps of regulatory motif sites for model species. *BMC Bioinformatics* **12**, 495 (2011).
67. Wu, J. S. & Luo, L. A protocol for mosaic analysis with a repressible cell marker (MARCM) in Drosophila. *Nat. Protoc.* **1**, 2583–9 (2006).
68. De Luca, A. *et al.* Sonic hedgehog patterning during cerebellar development. *Cell. Mol. Life Sci.* **73**, 291–303 (2016).
69. Camp, D. *et al.* Ihog and Boi elicit Hh signaling via Ptc but do not aid Ptc in sequestering the Hh ligand. *Development* **141**, 3879–88 (2014).
70. Biehs, B., Kechris, K., Liu, S. & Kornberg, T. B. Hedgehog targets in the Drosophila embryo and the mechanisms that generate tissue-specific outputs of Hedgehog signaling. *Development* **137**, 3887–98 (2010).
71. Rawadi, G., Vayssière, B., Dunn, F., Baron, R. & Roman-Roman, S. BMP-2 controls alkaline phosphatase expression and osteoblast mineralization by a Wnt autocrine loop. *J. Bone Miner. Res.* **18**, 1842–1853 (2003).
72. Knippenberg, M., Helder, M. N., Zandieh Doulabi, B., Wuisman, P. I. J. M. & Klein-Nulend, J. Osteogenesis versus chondrogenesis by BMP-2 and

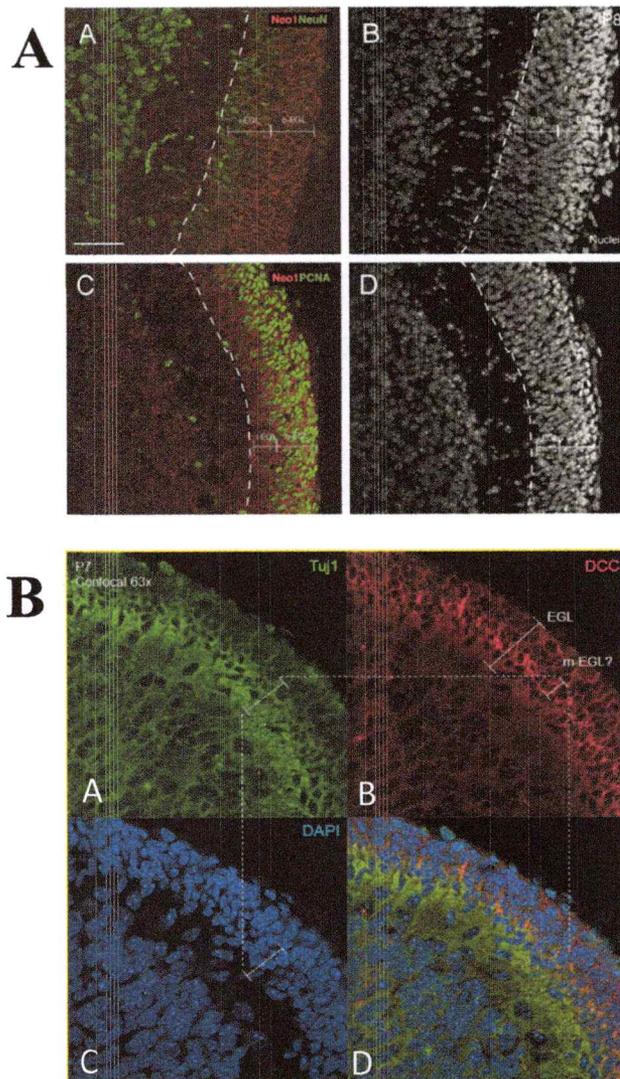
- BMP-7 in adipose stem cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **342**, 902–908 (2006).
73. Yuasa, T. *et al.* Sonic hedgehog is involved in osteoblast differentiation by cooperating with BMP-2. *J. Cell. Physiol.* **193**, 225–232 (2002).
 74. Manhire-Heath, R., Golenkina, S., Saint, R. & Murray, M. J. Netrin-dependent downregulation of Frazzled/DCC is required for the dissociation of the peripodial epithelium in *Drosophila*. *Nat. Commun.* **4**, 2790 (2013).
 75. Neufeld, T. P., de la Cruz, a F., Johnston, L. a & Edgar, B. a. Coordination of growth and cell division in the *Drosophila* wing. *Cell* **93**, 1183–1193 (1998).
 76. Varjosalo, M. & Taipale, J. Hedgehog: functions and mechanisms. *Genes Dev.* **22**, 2454–72 (2008).
 77. Charron, F., Stein, E., Jeong, J., McMahon, A. P. & Tessier-Lavigne, M. The morphogen sonic hedgehog is an axonal chemoattractant that collaborates with netrin-1 in midline axon guidance. *Cell* **113**, 11–23 (2003).
 78. O'Donnell, M., Chance, R. K. & Bashaw, G. J. Axon growth and guidance: receptor regulation and signal transduction. *Annu. Rev. Neurosci.* **32**, 383–412 (2009).
 79. Forcet, C. *et al.* The dependence receptor DCC (deleted in colorectal cancer) defines an alternative mechanism for caspase activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 3416–21 (2001).
 80. Fazeli, a *et al.* Phenotype of mice lacking functional Deleted in colorectal cancer (*Dcc*) gene. *Nature* **386**, 796–804 (1997).
 81. Schubert, T., Kaufmann, S., Wenke, A.-K., Grässel, S. & Bosserhoff, A.-K. Role of deleted in colon carcinoma in osteoarthritis and in chondrocyte migration. *Rheumatology (Oxford)*. **48**, 1435–41 (2009).
 82. Eckert, D., Buhl, S., Weber, S., Jäger, R. & Schorle, H. The AP-2 family of transcription factors. *Genome Biol.* **6**, 246 (2005).
 83. Cheung, M. Neural crest development is regulated by the transcription factor *Sox9*. *Development* **130**, 5681–5693 (2003).
 84. Millen, K. J. & Gleeson, J. G. Cerebellar development and disease. *Curr. Opin. Neurobiol.* **18**, 12–9 (2008).

85. Rios, I., Alvarez-Rodríguez, R., Martí, E. & Pons, S. Bmp2 antagonizes sonic hedgehog-mediated proliferation of cerebellar granule neurones through Smad5 signalling. *Development* **131**, 3159–68 (2004).
86. Tian, C. & Liu, J. Repulsive guidance molecules (RGMs) and neogenin in bone morphogenetic protein (BMP) signaling. *Mol. Reprod. Dev.* **80**, 700–717 (2013).
87. Nighat P. Khan. PLoss of heterozygosity (LOH) of deleted in colorectal cancer (DCC) gene and predisposition to colorectal cancer: Significant association in colorectal cancer patients of Kashmir. *J. Cancer Res. Exp. Oncol.* **3**, 88–94 (2011).
88. Xing, W., Li, Q., Cao, R. & Xu, Z. Neogenin expression is inversely associated with breast cancer grade in ex vivo. *World J Surg Oncol* **12**, 352 (2014).
89. Kim, S.-J. *et al.* Up-regulation of neogenin-1 increases cell proliferation and motility in gastric cancer. *Oncotarget* **5**, 3386–98 (2014).
90. Macabenta, F. D., Jensen, A. G., Cheng, Y. S., Kramer, J. J. & Kramer, S. G. Frazzled/DCC facilitates cardiac cell outgrowth and attachment during *Drosophila* dorsal vessel formation. *Dev. Biol.* **380**, 233–242 (2013).
91. Moribe, H., Takagi, T., Kondoh, H. & Higashi, Y. Suppression of polydactyly of the Gli3 mutant (extra toes) by Δ EF1 homozygous mutation. *Dev. Growth Differ.* **42**, 367–376 (2000).
92. Kang, J.-S. *et al.* Netrins and neogenin promote myotube formation. *J. Cell Biol.* **167**, 493–504 (2004).

ANEXO I: Índice de proliferación. Células C3H10T1/2 fueron transfectadas con los distintos vectores control (Ct); Secuencia de Ptc1; Neo1-GFP; Neo1-ICD-GFP; DCC-HA; DCC-ICD-Myr y luego fueron tratadas en condiciones control o con 3,3mM de SHH o 10 µg/mL de BMP-2. Finalizado el tratamiento, las células fueron fijadas y se reveló la actividad de fosfatasa alcalina. Posteriormente se marcó con la tinción nuclear "nuclear red". Para cada fotografía se contó el número de células teñidas con Nuclear red y luego se normalizó respecto del área de cada fotografía.



Anexo II: Expresión de Neo1 y Dcc en cortes de cerebelos de ratón en P7-P8. Cada fotografía muestra un corte sagital del cerebelo de ratón en día P8. **A.-** (A) Expresión de Neo1 (rojo) y NeuN (verde). (B) Tinción nuclear de (A) (TOPRO3). (C) Expresión de Neo1 (rojo) y PCNA (verde). (D) Tinción nuclear de (C) (TOPRO3). Las líneas punteadas indican el límite de la capa granular externa. Las líneas horizontales representan la división entre la o-EGL y la i-EGL. (Modificado de Milla y cols 2013). **B.-** Expresión de DCC en corte sagital de cerebelo en P7. (A) Expresión de Tuj1 (verde). (B) Expresión de Dcc (rojo). (C) DAPI (azul). (D) Co-distribución. Las líneas diagonales, representan las distintas capas de la EGL, mientras que la línea punteada indican la correspondencia de cada zona analizada en cada fotografía (Datos no publicados laboratorio Dra. Verónica Palma A.).



Anexo III. La Sobre-expresión de PTCH1 disminuye la diferenciación en la línea celular C3H10T1/0. Gráfico del porcentaje de células Fosfatasa alcalina (FA) positivas en las diversas condiciones de transfección. No se observan diferencias entre los controles cultivados con Optimem y Lipofectamina ("Control Lipo") respecto a controles sin ellos, ya sea en 10% o 0,5% de suero. Las condiciones de transfección con pGL y PTCH1 y el cultivo con Purmorfamina se hicieron en presencia de 0,5% de suero. El cultivo en presencia de Ciclopamina se realizó en 10% de suero. $p < 0,05$ test ANOVA.

