

TRABAJO DE FIN DE GRADO

INTERACCIÓN ENTRE LAS VÍAS EMBRIONARIAS HEDGEHOG Y NOTCH EN EL RABDOMIOSARCOMA



Patricia Zarzosa Martínez

Grado en Biotecnología

Director: Josep Roma Castanyer

Tutor: Jordi Planes Cuchi

Vic, Septiembre de 2015

ÍNDICE

1. RESUMEN	3
2. SUMMARY	4
3. INTRODUCCIÓN	5
3.1. RABDOMIOSARCOMA	5
3.2. VÍA HEDGEHOG.....	6
3.3. VÍA NOTCH	9
3.4. INTERACCIÓN HEDGEHOG Y NOTCH.....	12
4. HIPÓTESIS	13
5. OBJETIVOS	14
6. MATERIALES Y MÉTODOS	14
6.1. CULTIVOS CELULARES	14
6.1.1. <i>Tripsinización (Subcultivo)</i>	14
6.1.2. <i>Criopreservación (Congelación)</i>	15
6.1.3. <i>Recuento celular</i>	15
6.1.4. <i>Tratamientos farmacológicos</i>	16
6.2. SILENCIAMIENTO GÉNICO MEDIADO POR SHRNAS.....	16
6.2.1. <i>Transformación y amplificación de plásmidos en DH5alpha</i>	20
6.2.2. <i>Transfección e infección</i>	21
6.3. ENSAYO DE PROLIFERACIÓN.....	22
6.4. EXTRACCIÓN Y ANÁLISIS DE ARN	22
6.5. EXTRACCIÓN Y ANÁLISIS DE PROTEÍNA	24
6.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	26
7. RESULTADOS	27
7.1. LOS shRNAS MÁS EFECTIVOS SON shGLI49 Y shHes72	27
7.2. LA INHIBICIÓN DE LAS VÍAS HEDGEHOG Y NOTCH REDUCE LA PROLIFERACIÓN CELULAR	29
7.3. LA INHIBICIÓN SIMULTÁNEA DE LAS VÍAS SUGIERE UN EFECTO FUNCIONAL ADITIVO....	30
7.3. EXISTEN MECANISMOS COMPENSATORIOS ENTRE AMBAS VÍAS.....	31
8. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	33
9. CONCLUSIONES	36
10. AGRADECIMIENTOS	37
11. BIBLIOGRAFÍA	38

1. RESUMEN

Título: Interacción entre las vías embrionarias Hedgehog y Notch en el Rabdomiosarcoma.

Palabras clave: Tumor de partes blandas, Sarcoma, Rabdomiosarcoma, Hedgehog, Notch, Hes, Gli.

Autora: Patricia Zarzosa Martínez

Dirección: Josep Roma Castanyer (VHIR) y Jordi Planas Cuchi (UVIC)

Fecha: Septiembre de 2015

El Rabdomiosarcoma (RMS) es el sarcoma de partes blandas más común en niños y adolescentes. Los componentes celulares que regulan la proliferación, la invasividad y la metástasis en RMS siguen siendo en gran medida desconocidos, por lo que el primer paso necesario para el desarrollo de nuevas terapias específicas, es la identificación de las moléculas responsables de estos procesos.

La activación de las vías embrionarias Hedgehog y Notch en el RMS está ampliamente aceptada. El objetivo de este trabajo es determinar si existe una interacción entre ambas vías que dificulte su utilización como terapias contra el RMS. Para ello se ha optimizado la técnica del silenciamiento génico mediante shRNA. Se han estudiado los efectos de la inhibición génica y farmacológica de cada vía por separado y de la inhibición simultánea de ambas.

En conclusión, este proyecto proporciona resultados que sugieren la existencia de un mecanismo compensatorio entre ambas vías y plantea nuevas líneas en la investigación para el desarrollo de terapias dirigidas contra el RMS.

2. SUMMARY

Title: Interaction between the embryonic pathways Hedgehog and Notch in Rhabdomyosarcoma.

Keywords: Soft tissue tumors, Sarcoma, Rhabdomyosarcoma, Hedgehog, Notch, Hes, Gli.

Author: Patricia Zarzosa Martínez

Tutors: Josep Roma Castanyer (VHIR) and Jordi Planas Cuchi (UVIC)

Date: September 2015

Rhabdomyosarcoma (RMS) is the most common soft tissue sarcoma in children and adolescents. The cellular components that control proliferation, invasiveness and metastasis in RMS remain largely unknown, so the first step necessary for the development of new targeted therapies is identifying the molecules responsible for these processes.

The activation of the embryonic pathways Hedgehog and Notch in RMS is widely accepted. The aim of this study is to determine whether there is any interaction between the two pathways, which hinder their use as RMS's therapies. For this purpose, gene silencing techniques using shRNA have been optimized and the effects of genetic and pharmacological inhibition of both pathways separately were compared with the effects of simultaneous inhibition.

In conclusion, this project provides results that suggest the existence of a compensatory mechanism between the two pathways and raises new research lines for the development of new targeted therapies for RMS.

3. INTRODUCCIÓN

3.1. RABDOMIOSARCOMA

El rhabdomyosarcoma (RMS) es el sarcoma de partes blandas más común en la infancia, supone el 5% del total de tumores pediátricos y es una de las principales causas de muerte infantil por cáncer (The Institute of Cancer Research (ICR)). Es un tumor maligno de origen músculo-esquelético, originado como consecuencia de una disrupción en la regulación del crecimiento y diferenciación de las células precursoras de la miogénesis (Hettmer S, 2010); proceso de formación del tejido muscular, que sucede originalmente en el embrión y es recordado en el músculo esquelético maduro para su mantenimiento y reparación (Aldana JA, 2002). Basándose en las características histológicas, se distinguen dos subgrupos de RMS principales: alveolar (RMSa) y embrionario (RMSe) (Figura 1). El 80-85% de los casos de RMSa poseen una traslocación característica entre el brazo largo del cromosoma 2 o el brazo corto del cromosoma 1 y el brazo largo del cromosoma 13: $t(2;13)(q35;q14)$ o $t(1;13)(p36;q14)$. Estas traslocaciones generan la fusión de los genes *PAX3* o *PAX7*, ambos reguladores transcripcionales del desarrollo muscular, con *FOXO1*, un factor de transcripción Forkhead/HNF-3. La proteína de fusión resultante conserva el dominio de unión al ADN de los genes *PAX* y el dominio transactivador de *FOXO1*. La potencia transactivadora de *FOXO1* resulta excesiva y provoca una activación constitutiva, que da lugar a un fenotipo oncogénico (Barr, 1993; Davis, 1994; De Alava, 1998). Sin embargo, no se han descrito traslocaciones en el subtipo embrionario, RMSe, el cual supone aproximadamente dos tercios de los casos diagnosticados y generalmente se caracteriza por la pérdida de heterocigosis en el brazo corto del cromosoma 11 (11p15.5) (Loh, 1992) y por ganancias en los cromosomas 2, 7, 8, 11, 12, 13 y 17 (Bridge, 2000). Normalmente, el subtipo embrionario tiene mejor pronóstico que el alveolar. Concretamente, la traslocación *PAX3-FOXO1* suele asociarse a tumores de alto grado y por tanto, peor pronóstico, mientras que la traslocación *PAX7-FOXO1* suele asociarse a una mejor supervivencia. (Sorensen PH, 2002; Kelly KM, 1997).

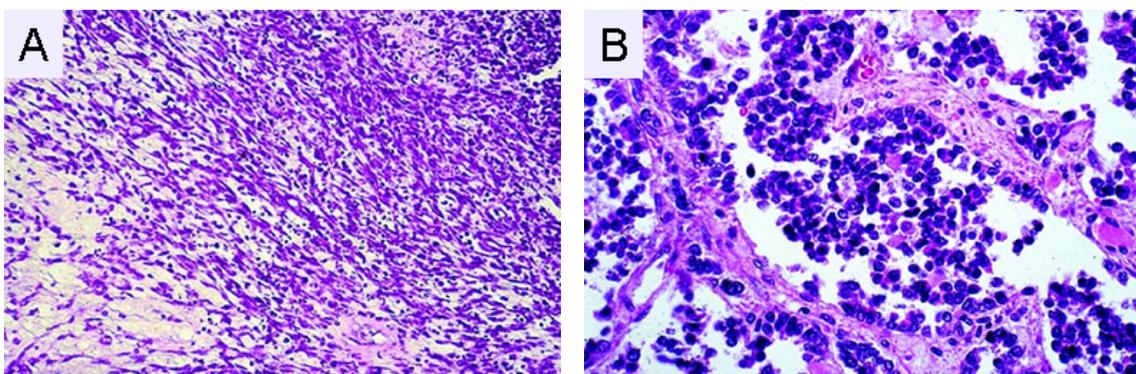


Figura 1. Anatomía microscópica de los dos subtipos principales de RMS. A| El RMSe es un tumor de células fusiformes de apariencia menos densa que el RMSa. **B|** Las células de

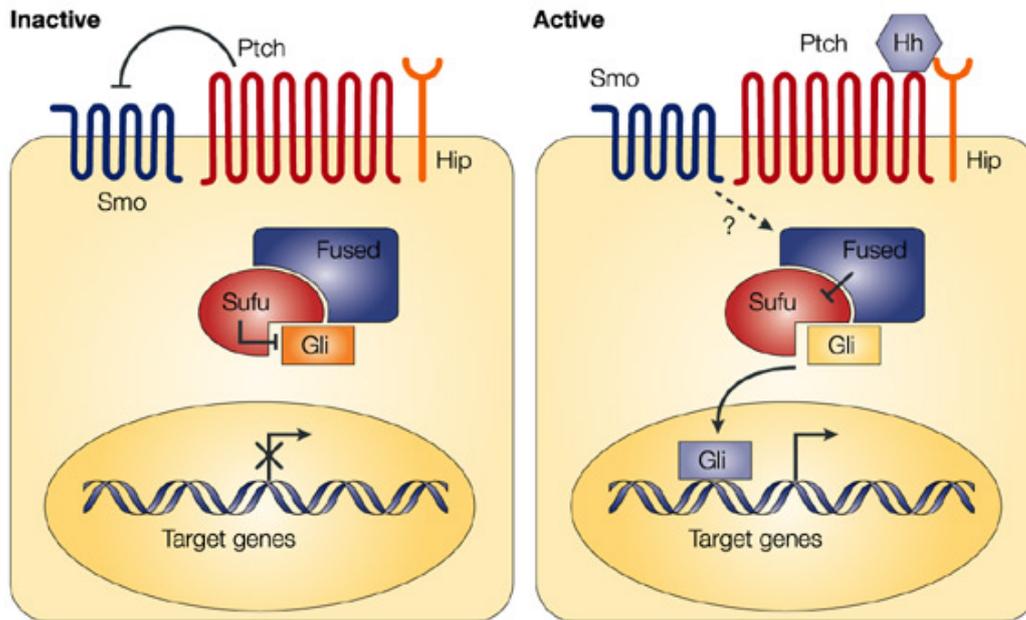
RMSa son típicamente pequeñas y redondas y proporcionan una apariencia celular densa al tumor. Figura adaptada de *Atlas of Genetics and Cytogenetics Oncology and Haematology* (<http://atlasgeneticsoncology.org>).

La supervivencia general del RMS ronda el 80-60%. Las variaciones se deben a la localización del tumor y al tipo de RMS. El RMSa tiene muy mal pronóstico, especialmente, cuando es metastásico (<20% de supervivencia tras 5 años). Los pacientes con RMSe experimentan resultados más favorables, pero el fracaso del tratamiento y la toxicidad siguen siendo considerables. En el caso de los pacientes con RMSe metastásico, la supervivencia ronda el 40% (Breneman JC, 2003).

Los componentes celulares que regulan la proliferación, la invasividad y la metástasis en el RMS siguen siendo en gran medida desconocidos, por lo que el primer paso necesario para el desarrollo de nuevas terapias específicas es la identificación de las moléculas responsables de estos procesos. En este estudio nos centramos en dos vías de señalización que se encuentran notablemente activadas en el RMS: Hedgehog y Notch.

3.2. VÍA HEDGEHOG

La vía Hedgehog (Hh) es considerada esencial en la regulación del desarrollo de organismos pluricelulares durante la embriogénesis, siendo crucial en procesos tan importantes como la especificación de los distintos tipos celulares, la proliferación y la diferenciación. Sin embargo, también desarrolla un papel importante en organismos adultos, controlando procesos como el mantenimiento de células madre o la reparación y regeneración de tejidos. Los mamíferos presentan 3 proteínas de la familia Hh, llamadas: Sonic (SHH), Indian (IHH) y Desert (DHH). Éstas necesitan un proceso de maduración para alcanzar su forma activa, lo cual implica cortes autocatalíticos de la proteína para liberar su péptido N-terminal activo, con una consiguiente N-palmitoilación y la formación de un aducto de colesterol en el C-terminal (Heretsch, 2010). Una vez activas, estas proteínas funcionan como ligandos de los receptores Patched (Ptch1 y Ptch2). Cuando se encuentran unidas a los receptores se produce la activación de Smoothened (Smo). La activación de Smo en la membrana citoplasmática evita la degradación proteosómica de la familia de proteínas *zinc-finger* de Gli (Gli1, Gli2 y Gli3), las cuales son trasladadas al núcleo, donde activan la transcripción de sus genes diana, entre ellos genes propios de la vía como GLI, PTCH y HHIP (Hedgehog interacting protein) (Rohatgi, 2007). Gli1 y Gli2 son activadores transcripcionales, mientras que Gli3 actúa como represor (Afroz Abidi, 2014).



Nature Reviews | Cancer

Figura 2. Mecanismo molecular de la vía Hedgehog (Hh). En ausencia de los ligandos Hh, la señalización de la vía está inactiva (izquierda). En este caso, el receptor Patched (Ptch1) inhibe la proteína de membrana Smoothened (Smo) y bloquea la cascada de transducción *downstream* de la vía; El factor de transcripción Gli, se encuentra unido a un complejo proteico formado, entre otros por Fused y Sufu (Supresor of fused), que impiden la entrada de Gli en el núcleo y en consecuencia, la activación transcripcional de los genes diana de Hh. La activación de la vía (derecha) se produce cuando uno de los ligandos Hh se une a Ptch1, evitando la inhibición de Smo. Smo activa la cascada de señalización, permitiendo la translocación de Gli al núcleo, donde promueve la expresión de los genes diana de la vía, incluyendo PTCH, HIP y el propio GLI. Figura adaptada de Pasca di Magliano, 2003.

Se ha demostrado que la señalización de Hedgehog está alterada en muchos cánceres, bien sea por mutación o por desregulación de la vía, en los que se cree que puede promover la progresión del tumor, la metástasis y la resistencia terapéutica (Teglund, 2010). La relación entre la señalización de Hedgehog anómala y el RMS fue descrita por primera vez en el ratón *knockout* para la proteína Patched (PTCH) por Hahn et al. en 1998, el cual reportó que los ratones heterocigotos para PTCH1 no sólo desarrollan características compatibles con el síndrome de Gorlin, sino que también tienen una alta incidencia de RMS (Hahn H, 1998). Actualmente, una activación persistente de la vía está bien establecida y ampliamente aceptada en RMS, aunque con mayor grado de activación en RMSe y RMSa sin translocación que en RMSa con translocación. La activación de la vía confiere un peor pronóstico y se ha correlacionado inversamente con la diferenciación muscular (Zibat A, 2010).

El mecanismo que impulsa la activación de la vía en RMS no está claro y existe bastante controversia. Por un lado, algunos estudios reportan que no parece que existan mutaciones en PTCH ni en SMO implicadas en esta activación anómala (Calzada-Wack J, 2002; Pressey, 2011). Mientras que, por otro lado, también hay autores que aseguran pérdidas en la región 9q22 de PTCH en un tercio de los RMSe y pérdida de SUFU en un 18% de los RMSe (Tostar, 2006; Bridge, 2000 y 2002). Adicionalmente, también ha sido identificada una amplificación genómica de la región cromosomal 12q13-15 que contiene GLI1 en varios tumores RMSa (Bridge, 2002; Pressey, 2011). En los estudios que negaban la existencia de mutaciones en PTCH y SMO, se ha estudiado la importancia relativa de los 3 ligandos Hedgehog (Sonic, Desert e Indian). Pressey et al. informaron de niveles indetectables de Sonic (SHH) en tumores y líneas celulares con la vía HH activada, lo que sugiere un mecanismo de activación de la vía independiente de la expresión autocrina de SHH. De momento, la implicación de Desert o Indian en la patogénesis del RMS aún no ha sido descrita (Pressey, 2011).

La vía HH es considerada una diana molecular potencial para nuevas estrategias de tratamiento, pues aunque su inhibición no alcance la remisión total del tumor, si consigue una reducción significativa del crecimiento. De hecho, actualmente existen varios medicamentos dirigidos contra la vía HH en fase clínica I y II (Lin, 2012).

El primer inhibidor de la vía descubierto fue la ciclopamina, un producto natural aislado del lírio de maíz (*Veratrum californicum*), que se une a SMO, inhibiendo su actividad. (Chen, James K., 2002). Sin embargo, debido a su limitada potencia y a la baja solubilidad oral que presenta, no es adecuado para el desarrollo clínico. (AmakyeD, 2013). Recientemente se han identificado derivados más potentes de la ciclopamina y moléculas pequeñas antagonistas de SMO. Uno de ellos, el Vismodegib ya ha sido aprobado para el carcinoma avanzado de células basales (Dubey AK, 2013) y también se está testando en ensayos clínicos de pacientes adultos con RMS.

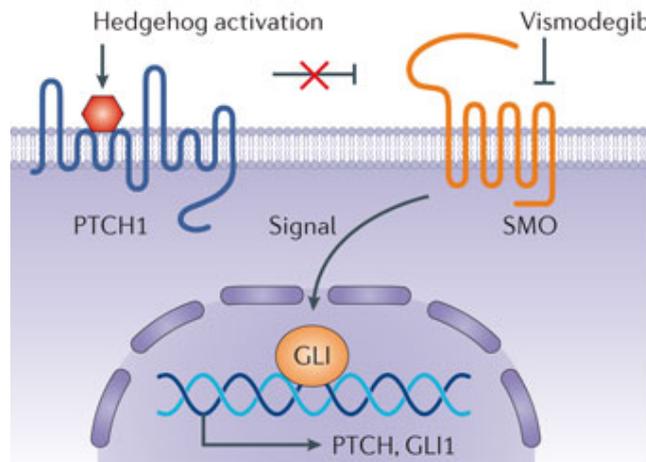


Figura 3. Señalización de Hedgehog y Vismodegib. La unión de un ligando HH con PTCH1 impide la inhibición que ejerce PTCH1 en SMO, permitiendo la activación de la familia de factores de transcripción GLI. Vismodegib inhibe la vía uniéndose a SMO e impidiendo su activación. Imagen adaptada de Dlugosz, 2012.

3.3. VÍA NOTCH

La señalización de Notch es una vía conservada evolutivamente, crítica para la morfogénesis de tejidos durante el desarrollo, pero que a su vez, también está involucrada en el mantenimiento y reparación de tejidos en el adulto. En el músculo esquelético, la regulación de la señalización de Notch está implicada en el propio desarrollo del músculo y en la proliferación y determinación del destino celular de células madre musculares, también llamadas “células satélite”, durante la regeneración. A lo largo de estos procesos, el control espacial y temporal de la vía es esencial para la correcta formación del tejido (Luo D, 2005).

Los genes NOTCH en mamíferos codifican para cuatro receptores transmembrana altamente conservados (Notch1-4) de aproximadamente 300 kDa que constan de una subunidad extracelular, una región transmembrana y un dominio intracelular (NICD, del inglés *Notch intracellular domain*) (Fleming RJ, 1998). Los receptores Notch son sintetizados como péptidos inmaduros en el retículo endoplasmático y posteriormente son procesados por enzimas *furine-like* en el aparato de Golgi. Este procesamiento conduce a la formación de un receptor heterodimérico de Notch, que continua siendo procesado de manera dependiente de ligando mediante la proteólisis mediada por alfa- y gamma-secretasas. La escisión de alfa-secretasa se produce en la zona extracelular, mientras que la escisión de gamma-secretasa se produce en el dominio transmembrana y conlleva a la liberación del NICD (Santos L, 2006; Sanchez-Irizarry C, 2004). Los receptores Notch1 y Notch2 son los más similares entre sí y son necesarios para la supervivencia. Notch3 presenta una organización estructural ligeramente diferente a la de Notch1 y Notch2 y se caracteriza por un dominio transactivador menos activo. Notch4 participa

en la morfogénesis vascular embrionaria, pero es prescindible para el desarrollo, ya que sus funciones se solapan con las de Notch1 (Zanotti S, 2010).

Con la unión de los ligandos, Delta y Jagged en vertebrados, se activa la vía de señalización canónica de Notch. Primero se produce la escisión enzimática del receptor explicada anteriormente, que libera la forma activa de la proteína, el NICD, al citoplasma. Una vez liberado, el NICD es traslocado al núcleo, donde se une a los represores transcripcionales CSL (CBF1-Su(H)-LAG1) y a las proteínas *Mastermind-Like* (MAML), formando un complejo activador de la transcripción. Los genes diana de la vía de Notch son los *Hairy Enhancer of Split* (HES) y los *Hes-related with YRPF motif* (HEY). Los genes HES y HEY son dos familias de factores de transcripción *helix-loop-helix* (bHLH) evolutivamente conservadas. La familia de HES comprende 7 miembros (HES1-7). Todos ellos, a excepción de HES2 y HES3, han sido establecidos como dianas de la señalización canónica de Notch. Hes1, -3 y -5 se encargan de mantener células precursoras en un estado indiferenciado durante el desarrollo y en varios tejidos durante la vida adulta. Generalmente, las proteínas Hes y Hey actúan como represores transcripcionales (Zanotti S, 2010).

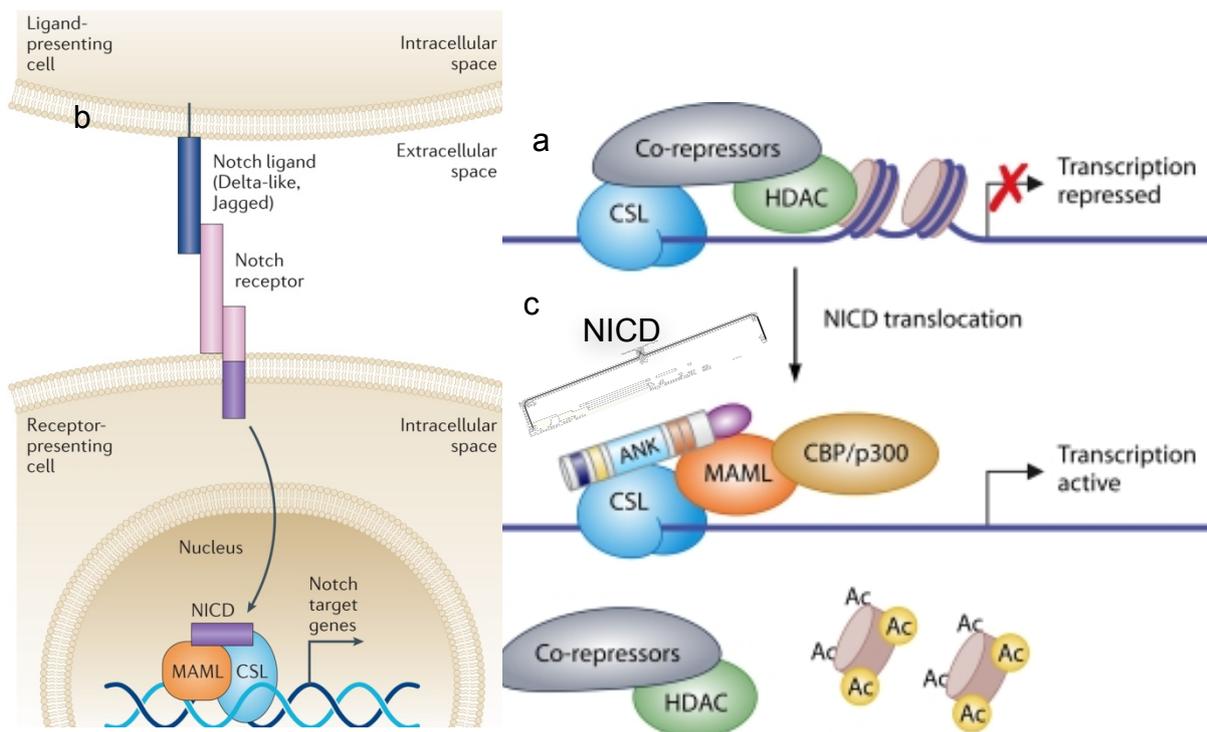


Figura 4. Mecanismo molecular de la vía de Notch. a) En ausencia de NICD, CSL se encuentra unido al ADN y proteínas correpressoras que atraen histonas deacetilasas (HDAC) para bloquear la transcripción. b) Cuando se produce la activación de la vía mediante la unión del ligando Delta-like o Jagged al receptor Notch, el NICD es traslocado al núcleo. c) Una vez en el núcleo, el NICD se encarga de desplazar los correpresores unidos a CSL y forma un complejo ternario con CSL y MAML, que actúa como activador transcripcional, induciendo la expresión de los genes diana. Las figuras a y c han sido adaptadas de Zanotti S, 2010. La figura b ha sido extraída de Andersson Emma R, 2014.

El potencial oncogénico de la vía Notch fue descrito por primera vez en la leucemia linfoblástica de células T (T-ALL) en 1980 (Radtke F, 1999). Posteriormente, también se ha descrito una regulación anómala de la vía en más cánceres como el de ovario (Park JT, 2006) y el de pulmón (Glahan D, 1997). Con respecto a los cánceres pediátricos, la señalización de Notch parece contribuir a la proliferación (Tanaka M, 2009) y metástasis (Zhang P, 2008) en osteosarcoma, la supervivencia de células madre cancerosas en meduloblastoma (Fan X, 2006) y la angiogénesis en neuroblastoma (Funahashi Y, 2008).

Actualmente, la vía Notch se ha convertido en una diana potencial en el desarrollo de nuevas terapias contra el cáncer, no solo por su efecto oncogénico, sino por sus numerosas interacciones con otros oncogenes, que sugieren que la inhibición de la vía afectaría numerosas vías relacionadas. Por el momento, los únicos inhibidores de Notch en ensayo clínico son los inhibidores gamma-secretasa (GSIs), los cuales bloquean la escisión del NICD, impidiendo de esta manera su activación. (Purow B, 2012).

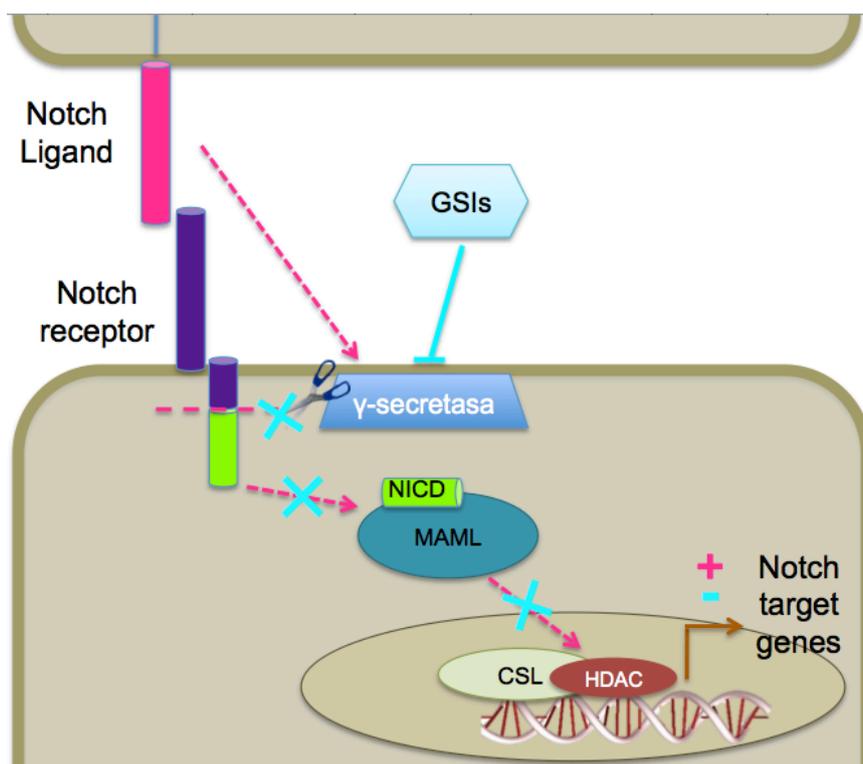


Figura 5. Señalización Notch e inhibidores γ -secretasa. El NICD, liberado gracias a la acción de γ -secretasa, se dirige al núcleo y activa la expresión de los genes diana de Notch. El tratamiento con inhibidores γ -secretasa impide la escisión del NICD y por lo tanto la transcripción de los genes diana. Imágen propia.

En el 2011, Roma et al. evidenciaron una expresión y activación de la vía Notch en RMS. Comprobaron la presencia citoplásmica y nuclear del efector de la vía, Hes1 y destacaron un

incremento en los niveles de expresión de Notch2, Notch3, Hes1 y Hey1 en la mayoría de líneas celulares de RMS. También demostraron que las líneas celulares de RMS con una mayor expresión de los efectores (Hes1 y Hey1) eran las que presentaban una mayor invasividad *in vitro*. Finalmente, verificaron esta correlación entre la activación de la vía y el fenotipo invasivo de las células de RMS, demostrando una reducción significativa en la movilidad e invasividad tras la inhibición de la vía mediante el tratamiento con inhibidores de gamma-secretasa (GSIs). Sin embargo, a pesar de la significación de los efectos conseguidos, los GSIs no consiguen una inhibición total de la vía en RMS (Josep Roma, 2011).

La amplitud de genes reclutados por Notch, la interrelación de la vía con otras vías de señalización y la gran cantidad de elementos reguladores de ésta, hacen muy difícil clarificar cuáles son los mecanismos responsables del origen y/o mantenimiento de esta activación aberrante, responsable, en parte, del fenotipo maligno de las células neoplásicas (Merlino G, 2007).

3.4. INTERACCIÓN HEDGEHOG Y NOTCH

Existen varios estudios que han descrito interacciones entre las vías Hedgehog y Notch. Ingram WJ. y colaboradores demostraron que en células mesodérmicas y neuronales la transcripción de HES1 podía ser activada mediante los ligandos de Hh, a través de un mecanismo independientemente de la vía de Notch (Ingram Wj, 2008). En glioblastoma, se ha demostrado que Hes1 es capaz de unirse al promotor de Gli1 y actuar como repressor transcripcional (Schreck K.C, 2010). La señalización de Hedgehog parece inducir la expresión del ligando de Notch, Jagged2 (M. Katoh, 2007).

Todas estas interacciones sugieren que la vía Hh es capaz de activar la vía Notch y ésta última, a su vez, de inhibir Hedgehog. (Figura 6). Siguiendo esta idea, la inhibición de Notch podría desencadenar un incremento compensatorio en los niveles de Gli1, provocando la sobre-activación de la vía Hh y por consiguiente, la supervivencia del tumor.

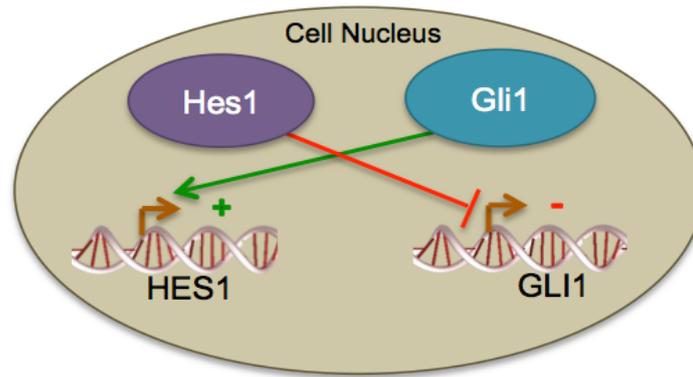


Figura 6. Esquema de interacciones descritas entre los efectores de Notch (morado) y Hedgehog (azul). Las flechas verdes indican interacciones activadoras y las líneas rojas indican interacciones inhibitoras. Imagen propia.

Además de probar la existencia de interacciones entre ambas vías, también existen estudios preclínicos de la combinación de inhibidores de SMO e inhibidores de Notch, que sugieren efectos aditivos o sinérgicos. En líneas celulares de leucemia se ha descrito una supresión aditiva del crecimiento (Okuhashi et al. 2011). En Glioblastoma, la inhibición combinada mediante MRK-003 (Notch) y ciclopamina (Hedgehog), disminuyó el crecimiento celular, aumentó la apoptosis y disminuyó la formación de colonias (Schreck K.C, 2010) En cáncer de páncreas, se produjo una inhibición sinérgica del tumor (Ristorcelli E, 2010).

4. HIPÓTESIS

El Dr. Roma y su equipo han estudiado el papel de las vías Notch (Roma et al. 2011) y Hedgehog (resultados aún no publicados) en RMS. Han confirmado la activación de ambas vías en muestras de RMS y la relación directa entre la expresión de las vías y fenotipos oncogénicos (invasión, movilidad, proliferación). Con el fin de desarrollar nuevas terapias moleculares específicas para RMS, han probado los efectos funcionales de la inhibición farmacológica de cada una de las vías. La inhibición farmacológica de Hedgehog en estudios *in vivo* con ratones ha sido efectiva, provocando la disminución del número y el tamaño de los tumores, así como la metástasis. Aunque no se consigue la remisión total del tumor, la reducción significativa del crecimiento sugiere que la señalización HH juega un papel fundamental en la oncogenicidad del RMS y que la vía puede considerarse una diana molecular potencial para nuevas estrategias de tratamiento en esta neoplasia. Sin embargo, los tratamientos inhibidores de la vía Notch en modelos murinos no han resultado demasiado efectivos.

Ante la imposibilidad de alcanzar los efectos funcionales de la inhibición farmacológica de la vía Notch y con el respaldo de estudios que sugieren el elevado grado de interacción entre ambas vías embrionarias en otros tumores, la hipótesis planteada es la existencia de mecanismos *cross-talking*

compensatorios, que evaden las dianas de los inhibidores específicos de las vías (Roma et al. 2012). Más concretamente, sugerimos que la inhibición farmacológica de Notch bloquea la activación transcripcional de sus genes efectores, pero estos mantienen su expresión a través de un mecanismo alternativo, dependiente de la vía Hedgehog.

5. OBJETIVOS

El objetivo principal de este trabajo es:

- Determinar si existe un efecto compensatorio entre las vías embrionarias Hedgehog y Notch, para el desarrollo de nuevas terapias moleculares específicas contra el RMS.

Los objetivos secundarios planteados a lo largo del estudio son:

1. Optimizar la inhibición genética mediante shRNA de los efectores de ambas vías.
2. Estudiar los efectos funcionales y moleculares de la inhibición de cada vía por separado.
3. Comparar los efectos en la oncogenicidad entre la inhibición farmacológica y el silenciamiento génico.
4. Estudiar los efectos funcionales y moleculares de la inhibición simultánea de ambas vías.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. CULTIVOS CELULARES

La línea celular de RMS utilizada para el estudio fue la RD (ATCC CCL-136), proporcionada por la *American Type Culture Collection* (ATCC). Se trata de una línea procedente de células de músculo tumorales de una niña caucásica de 7 años con rhabdomyosarcoma embrionario (RMSe). Las células fueron cultivadas adheridas en frascos con un área de cultivo de 25, 75 o 175 cm² en medio *Modified Eagle's Medium* (MEM) de Biowest, suplementado con un 10% de suero fetal bovino (FBS) de Biowest, un 1% de Glutamina Estable 100x 200mM de Biowest, un 1% de Piruvato sódico 100mM de Biowest, un 1% de aminoácidos no esenciales MEM 100x de PAA Laboratories y un 1% Penicilina-Streptomina de Biowest a una temperatura de 37°C en un incubador con chaqueta de agua al 5% de CO₂.

6.1.1. Tripsinización (Subcultivo)

Para evitar la inhibición del crecimiento celular por contacto se realizaron subcultivos cuando la confluencia celular alcanzaba el 70-80%.

Se aspiró el medio del frasco de cultivo, se realizó un lavado con PBS, se añadió Tripsina-EDTA (0'5mg/ml Tripsina, 0'22mg/ml EDTA) de Capricorn Scientific y se incubó a 37°C hasta que todas las células estuvieron disgregadas y separadas de la superficie de cultivo. A

continuación, se añadió medio MEM completo para inhibir el efecto de la tripsina y se centrifugó a 15000 r.p.m. durante 5 minutos. Finalmente, se aspiró el sobrenadante y se resuspendió el pellet para resembrar el volumen deseado en un nuevo frasco de cultivo.

6.1.2. Criopreservación (Congelación)

La conservación de las líneas celulares se realizó por congelación progresiva. Para ello, se llevó a cabo el protocolo de subcultivo explicado previamente, hasta la obtención del pellet. En este caso, el pellet fue resuspendido con medio MEM completo al 10% de dimetilsulfóxido (DMSO) y repartido en crioviales de 1ml. Seguidamente, los crioviales fueron introducidos en un contenedor de congelación, Mr.Frosty de Thermo Scientific, con propanol, para asegurar el descenso progresivo de 1°C/minuto, en un congelador a -80°C. Posteriormente, las células fueron introducidas en un tanque de nitrógeno líquido a -196°C para su conservación a largo plazo.

6.1.3. Recuento celular

El recuento celular se realizó mediante una cámara de Neubauer doble de Marienfeld-Superior. El pellet obtenido mediante el procedimiento de tripsinización explicado anteriormente, fue resuspendido en un volumen variable en función de la cantidad de células totales, respetando el rango de concentraciones que permiten un recuento fiable, entre 250.000 y 2'5 millones de células por mililitro. Se introdujo una alícuota de 11µl de la suspensión celular en las dos zonas de conteo del hematocitómetro, para contar la muestra por duplicado y asegurar una mayor fiabilidad en el recuento.

Una vez obtenido el número de células de las dos zonas de conteo, se realizó la media entre ambos y se aplicaron las conversiones necesarias para el cálculo de la concentración celular (ver Ecuación 1). El $n^{\circ} células_{promedio}$ corresponde a la media del recuento de las dos réplicas, el 10^4 es el factor de dilución de la cámara y los $ml_{totales}$ son los ml en los que se resuspendió el pellet.

Ecuación 1. Cálculo del número total de células en la suspensión celular.

$$n^{\circ} células_{Total} = n^{\circ} células_{promedio} \times 10^4 \times ml_{totales}$$

A partir del número de células totales se calculó el volumen necesario para la siembra del número de células deseadas (ver Ecuación 2).

Ecuación 2. Cálculo del volumen necesario para sembrar las células deseadas.

$$ml_{necesarios} = n^{\circ} células_{necesarias} \frac{ml_{totales}}{n^{\circ} células_{totales}}$$

6.1.4. Tratamientos farmacológicos

Los fármacos utilizados fueron DAPT y Vismodegib de Selleckchem. Para su administración primero fueron diluidos en DMSO y posteriormente añadidos al medio de cultivo a la concentración deseada. Las células fueron cultivadas durante 5 a concentraciones de 10, 25 y 50 μ M de DAPT y 1, 10 y 50 μ M de Vismodegib. Las células control, fueron tratadas con un volumen equivalente de DMSO de Sigma-Aldrich.

6.2. SILENCIAMIENTO GÉNICO MEDIADO POR shRNAs

En este estudio se ha elegido el uso de shRNAs para conseguir la inhibición estable a largo plazo de los genes de interés. Los shRNAs del inglés, *short hairpin RNAs*, son moléculas artificiales de ARN creadas para suprimir la expresión de genes específicos, mediante el mecanismo de interferencia por ARN (ARNi) (Figura 10).

El ARNi es un proceso biológico en el que se usa ARN para inhibir la expresión de un gen. Se basa en la creación de moléculas pequeñas de ARN complementarias al ARN mensajero (ARNm) del gen diana, que una vez introducidas en las células, se unen al ARNm provocando su inactivación funcional o su degradación. Las moléculas de ARN utilizadas son: el ARN pequeño de interferencia (siRNA, por sus siglas en inglés *Small interfering RNA*) y el shRNA. La diferencia entre ambas es que el shRNA puede ser incorporado a través de vectores e insertado en el núcleo de la célula, obteniendo una expresión estable. Mientras que el siRNA es introducido en la célula de manera transitoria y es degradado por mecanismos celulares.

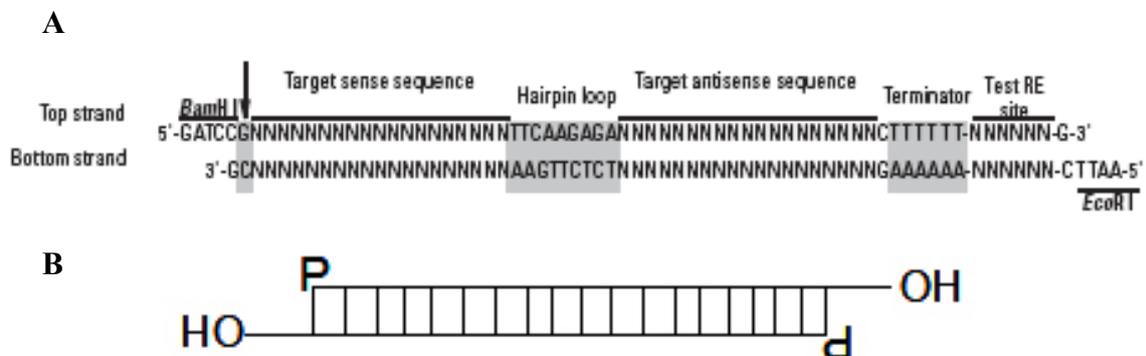


Figura 7. Estructura de shRNA y siRNA. A| Los shRNAs son moléculas de ARN bicatenario con una longitud típica de 80 pares de bases y contienen una región interna de hibridación (Hairpin loop) que crea una estructura de horquilla. B| Los siRNA son moléculas de ARN de doble cadena con una longitud típica de entre 20 y 25 nucleótidos. La imagen A ha sido extraída de Clontech y la imagen B de Wikipedia.

Uno de los métodos más eficaces para la expresión estable de moléculas efectoras como el shRNA en células de mamíferos, es el dependiente de partículas lentivirales. Los vectores lentivirales han sido desarrollados a partir del VIH. Para disminuir los riesgos de la utilización de este virus, se han eliminado la mayoría de los genes víricos y los necesarios han sido separados de las secuencias activadoras en diferentes plásmidos:

- Un vector de transferencia que contiene el *cassette* del shRNA y las señales activadoras del virus.
- Un plásmido que contiene las proteínas necesarias para la formación de la envoltura vírica.
- Un plásmido con las proteínas necesarias para el empaquetamiento.

Para la formación de los pseudolentivirus con el shRNA de interés, es necesaria la co-transfección de los plásmidos anteriores en una célula productora, que al expresar todos los plásmidos, es capaz de formar los virus y secretarlos al medio. Estos pseudovirus son capaces de integrar el material genético aportado por el vector de transferencia, en el genoma de la célula diana.

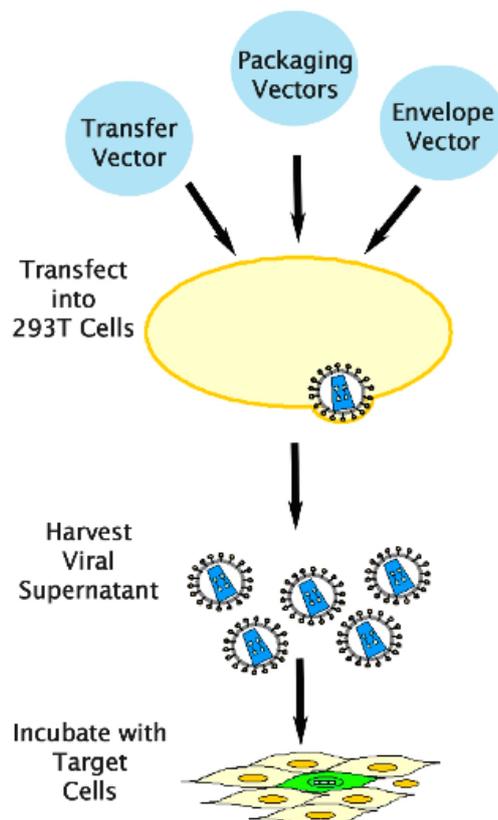


Figura 8. Formación de "pseudo-lentivirus". La co-transfección en la célula productora permite la generación de los "pseudo-lentivirus" con la información genética del *Envelope Vector* y la capacidad de infectar e integrarse en el genoma de la célula diana.

El vector de transferencia, utilizado es el pGIPZ (Figura 9).

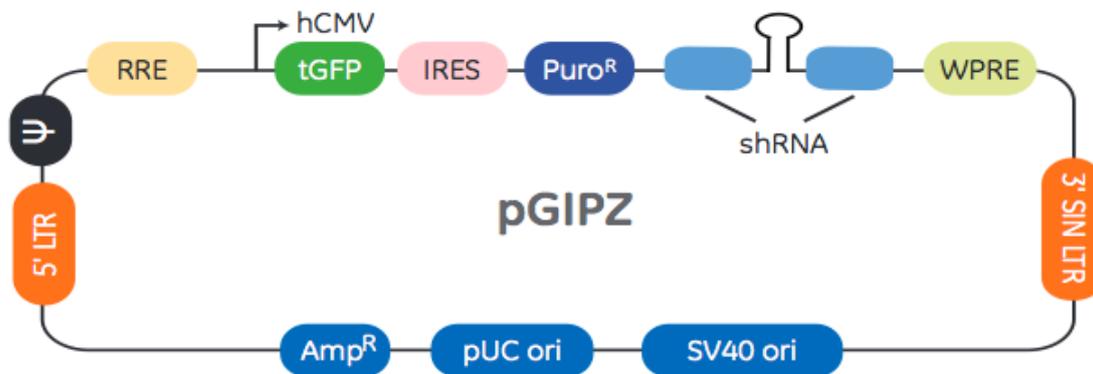


Figura 9. Características del vector pGIPZ. El *Human cytomegalovirus promoter* (hCMV) permite una gran expresión de transgenes. El turbo GFP (tGFP) es un gen *reporter* que permite la comprobación visual de la transducción y expresión del vector. La resistencia a la Puromicina (Puro^R), permite la selección de las células que han integrado establemente el vector. El *Internal ribosomal entry site* (IRES) permite la expresión de los genes del tGFP y Puro^R en un solo transcrito. La 5'LTR es una de las secuencias *Long terminal repeats*, usadas por los virus para insertar el material genético en los genomas huéspedes. La 3'SIN LTR, del inglés *3' self-inactivating long terminal repeat* corresponde a la secuencia 3'LTR inactiva, para aumentar la seguridad del vector lentiviral. La *Psi packaging sequence* (Ψ) permite el empaquetamiento del genoma viral. Los *Rev response element* (RRE), mejora la titulación incrementando la eficiencia del empaquetamiento de genomas virales grandes. Woodchuck hepatitis posttranscriptional regulatory element (WPRE) mejora la expresión de los transgenes en las células diana. Imagen adaptada de Dharmacon.

Los vectores con las proteínas víricas necesarias para la formación de los virus utilizados son el pMD2G y el psPAX2, ambos cedidos por Didier Trono (Addgene plasmid # 12259 # 12260 respectivamente). El pMD2G contiene el gen VSV-G de la envoltura vírica, mientras que el psPAX2 contiene genes necesarios para el empaquetamiento como Gag, Pol, Rev y Tat.

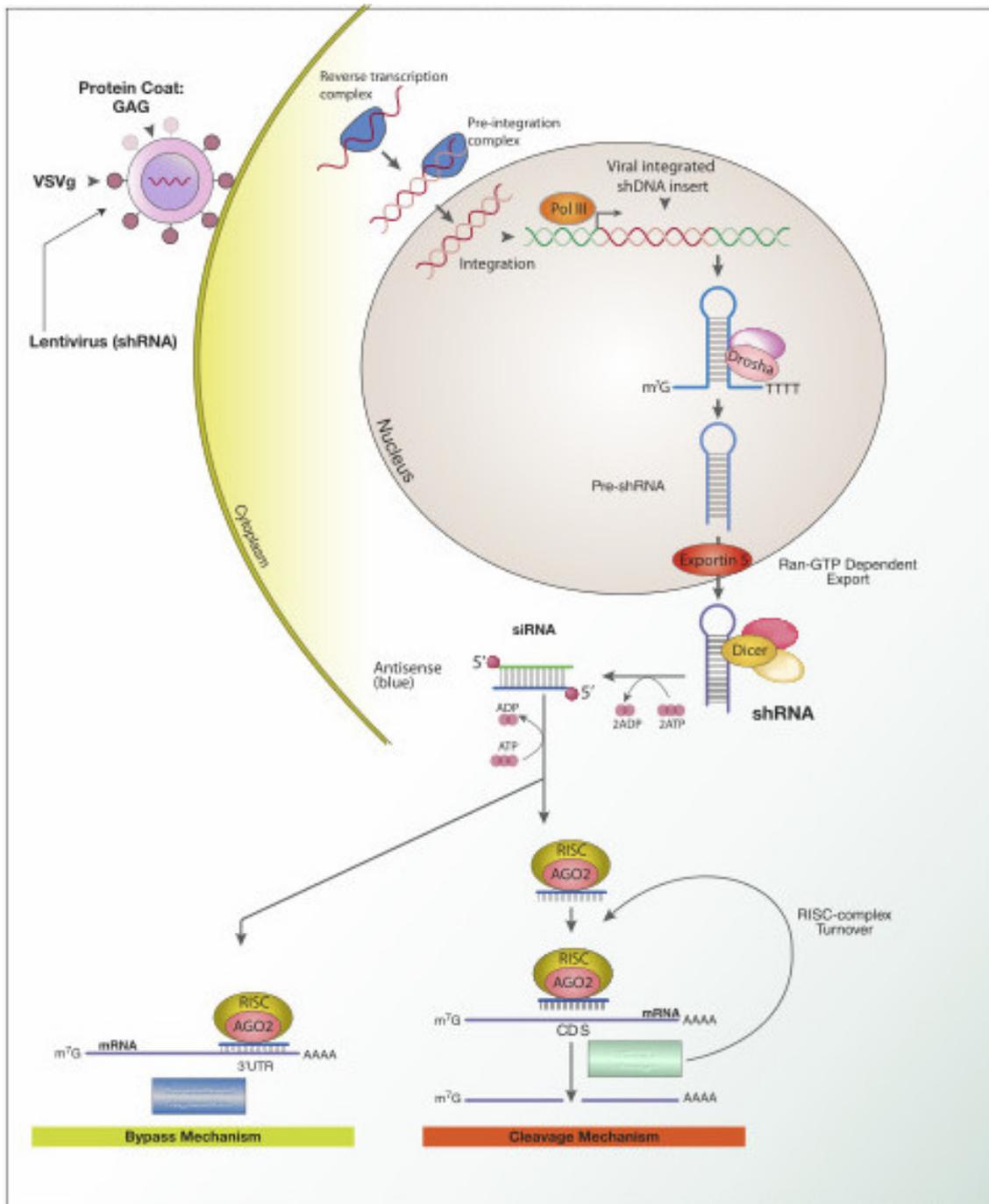


Figura 10. Inserción lentiviral de shRNA y mecanismo de interferencia de ARN (ARNi). La inserción lentiviral del shRNA permite una expresión estable y una inhibición permanente del gen diana. Una vez introducido y expresado en la célula, el shRNA es exportado del núcleo por Exportin 5 y posteriormente procesado por la ribonucleasa Dicer, quien produce siRNAs mediante la fragmentación del shRNA y la eliminación de la “horquilla”. Los siRNA formados se unen al complejo de silenciamiento inducido por ARN (RISC, por sus siglas en inglés RNA-induced silencing complex), el cual degrada la hebra codificante (5’-3’) y usa la cadena antisentido (3’-5’) como molde para la detección del ARNm diana. Al producirse la unión por homología entre el siRNA y el ARNm, el complejo RISC inactiva funcionalmente el ARNm mediante el bloqueo de la traducción o directamente mediante la degradación de la molécula. Imagen de Dan Cojocari, 2010.

Se adquirió una librería de vectores lentivirales *GIPZ Human Lentiviral shRNA Individual Clone* de Thermo Scientific con diferentes shRNAs para cada uno de nuestros genes diana (Tabla 1).

Tabla 1. Resumen de la batería de shRNAs utilizada.

NOMBRE GEN	ACCESO RefSeq	NOMBRE shRNA	CLONE ID
GLI1	NM_005269	shGli49	V3LHS_262249
		shGli71	V3LHS_387771
		shGli72	V3LHS_387772
		shGli73	V3LHS_387773
HES1	NM_005524	shHes27	V2LHS_63727
		shHes31	V2LHS_383231
		shHes32	V2LHS_383232
		shHes33	V2LHS_383233
		shHes34	V2LHS_383234
		shHes72	V2LHS_249972

6.2.1. Transformación y amplificación de plásmidos en DH5alpha

El objetivo de este procedimiento es introducir los plásmidos deseados en una célula hospedadora capaz de mantener el plásmido de forma estable, con el fin de obtener una alta cantidad de copias del plásmido purificado.

DH5alpha es una cepa de E.coli competente de Invitrogen, con una eficiencia de transformación de 10^9 . Los vectores víricos amplificados fueron pMD2G y psPAX2. Además, también realizamos el mismo protocolo para amplificar los vectores con los shRNA de Hes1 y Gli1.

El protocolo de transformación consistió en descongelar las células DH5alpha en hielo. A continuación se les añadió 1µl del vector deseado y se dejó reposar durante 30 minutos en hielo. Posteriormente se realizó un choque térmico de 45 segundos a 42°C seguido de otros 2 minutos en hielo. Se añadieron 500µl de medio de cultivo LB de Sigma-Aldrich y se incubaron a 37°C en agitación durante 1 hora. Se centrifugaron a 3000 rpm durante 3 minutos, se descartó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 100µl de LB. Finalmente, se sembró en placas con ampicilina (30µl de ampicilina / placa) y se dejó incubar toda la noche en una estufa a 37°C. Se escogió una colonia aislada y se picó en un tubo con 3ml de LB y ampicilina se incubó en una estufa a 37°C *overnight*. Finalmente se realizó un último subcultivo sembrando en un erlenmeyer con una relación de 1µl de cultivo por ml de LB con ampicilina y se cultivó en agitación a 200 rpm y 37°C.

Para la obtención del vector purificado se llevó a cabo el protocolo del Kit comercial *Genopure Plasmid Maxi Kit (High Copy Number Plasmids)*. Finalmente, se midió la concentración con el espectrofotómetro NanoDrop 2000 de Thermo Scientific y se almacenó a -20°C.

6.2.2. Transfección e infección

La transfección celular es un método de introducción de ADN plasmídico en células eucariotas. El experimento se llevó a cabo mediante el uso del kit de transfección Lipofectamine 3000 de Invitrogen, basado en nanopartículas lipídicas, capaces de atravesar la membrana celular, que recubren la molécula de ADN.

La línea celular HEK 293T (ATCC CRL-3216), proporcionada por la *American Type Culture Collection* (ATCC), es una línea derivada de células humanas de riñón embrionario (HEK 293), altamente transfectable, que contiene el antígeno T del SV40. Es una línea competente para la replicación de vectores con la región de replicación SV40. Por ello fue utilizada para la producción de retrovirus con los shRNAs de interés, con los que posteriormente infectamos las células diana (RD) consiguiendo la integración estable del ADN de los shRNAs.

El protocolo a seguir consistió en la siembra de $4 \cdot 10^6$ células HEK 293T en placas de cultivo p100 con medio DMEM (Dulbecco's modified eagle's medium) de Biowest, suplementado con Glutamina Estable 100x 200mM de Biowest. Con el fin de mejorar la adhesión celular, previamente a la siembra se realizó un coating de gelatina al 0'1%.

La transfección con lipofectamina se llevó a cabo 24 horas después de la siembra, cuando la confluencia de la placa alcanzó el 70%. Se preparó una *master mix* de ADN para cada shRNA diluyendo 8µg del plásmido psPAX2, 4µg del plásmido pMD2G y 12µg del vector con el shRNA en medio Opti-MEM (1X) de Gibco con volumen total de 1ml. Posteriormente, se diluyeron 30µl de Lipofectamina en 1ml de medio Opti-MEM y se añadió a la master mix de ADN. Se incubaron a temperatura ambiente durante 20 minutos para permitir la formación de los liposomas. A continuación se aspiró el medio DMEM de las placas de cultivo de las HEK 293T, se añadieron los liposomas formados, 7ml de medio Opti-MEM al 5% de FBS y se incubaron a 37°C. Tras 4 horas se realizó un cambio de medio con MEM completo sin antibiótico (Penicilina-Streptomicina) y se volvió a incubar a 37°C para la formación de los virus.

A las 24 horas de la transfección se sembraron 200.000 células diana (RD) en placas p60, para alcanzar una confluencia celular del 40% en el momento de la infección. 48 horas después de la transfección se recogió el primer sobrenadante de las HEK 293T, se centrifugó 5 minutos a 1200 r.p.m. y se filtró en 0'45µm para purificar los virus. A continuación se aspiró el medio de las RD sembradas y se infectaron con una relación 1:1 de virus y medio MEM sin antibiótico en 2'5ml totales. Los virus sobrantes fueron conservados en un congelador a -80°C. 24 horas después de la infección se aspiró el medio con los virus y se añadió medio MEM sin antibiótico de nuevo. A las 72 horas se realizó la selección con puromicina (resistencia aportada por el

vector) para asegurar la supervivencia únicamente de las células que habían integrado y expresado el vector a una concentración de 1µg de puomicina por cada ml de medio MEM completo.

Para verificar la eficiencia de transfección e infección a lo largo del experimento, se comprobó la fluorescencia de las células aportada por el GFP (*Green fluorescent protein*) del vector, en un microscopio invertido de epifluorescencia Nikon eclipse TE2000-S utilizando la longitud de onda de la luz azul para la activación de su pico de excitación a 475nm y provocando la emisión a 509nm, de luz verde.

6.3. ENSAYO DE PROLIFERACIÓN

El estudio de la proliferación celular es un factor importante para evaluar las respuestas de una población celular ante factores externos. En nuestro caso, los factores externos son las distintas condiciones de inhibición génica y química.

Se sembraron triplicados de cada condición, con 25.000 células por pocillo, en placas de 6 pozos. Se mantuvieron en cultivo durante 5 días y se realizaron fotos con el microscopio invertido y la cámara digital DXM1200P de Nikon a 10 aumentos los días 0, 3, 5 posteriores a la siembra. Para que las fotos fueran representativas de todo el pocillo, se tomaron fotos de 5 campos distintos, por lo que finalmente se obtuvieron 15 fotos de cada condición.

El parámetro usado para comparar la proliferación entre las distintas condiciones, fue el número de células vivas presentes en las fotos de cada condición, obtenido mediante el programa Image J. Finalmente, se comprobó si los resultados eran significativos (6.6. Análisis Estadístico).

6.4. EXTRACCIÓN Y ANÁLISIS DE ARN

EXTRACCIÓN

Se aisló el ARN total de las células en cultivo mediante el *Quick-prep micro RNA isolation Kit* de Quiagen, siguiendo el procedimiento del *Kit*. La concentración del ARN extraído se analizó mediante el espectrofotómetro NanoDrop 2000 de Thermo Scientific.

RETROTRANSCRIPCIÓN (RT-PCR)

La retrotranscripción o transcripción inversa (RT-PCR) permite obtener ADN complementario (ADNc) a partir de ARNm.

Se mezclaron 2µg de las muestras de ARN extraído con *DEPC-Treated Water* de Invitrogen, en un volumen final de 12µl. A continuación, las muestras fueron incubadas con 0'5 µg de *Random Primers* de Invitrogen durante 5 minutos a 70°C en el termociclador *2720 Thermal Cycler* de Applied Biosystems. Tras la incubación se colocaron en hielo durante 2 minutos. Posteriormente, se añadieron 5µl de *M-MLV Reverse Transcriptase Buffer* de Promega, 1'25µl

de dNTPs Mix de Invitrogen y 1µl de la retrotranscriptasa *Moloney murine leucemia virus (M-MLV)* de Promega. La mezcla se incubó en el termociclador a 37°C durante 1 hora.

ANÁLISIS DE ARN_m POR PCR CUANTITATIVA EN TIEMPO REAL (qRT-PCR)

La técnica qRT-PCR es capaz de determinar la cantidad de producto generado en cada ciclo de amplificación mediante el uso de sondas específicas para cada ADNc, marcadas con un fluorocromo. Cada sonda tiene un fluorocromo emisor (*reporter*) en el extremo 5' y un fluorocromo receptor (*quencher*) que reduce la fluorescencia emitida por el *reporter*. Cuando la sonda se hibrida al ADNc, Durante la fase de extensión de la PCR, la sonda se fragmenta por la actividad 5'nucleasa de la Taq Polimerasa. Esta fragmentación causa la separación de los fluorocromos *reporter* y *quencher*, aumentando la emisión de fluorescencia. Esta fluorescencia es proporcional al número de copias del gen diana de la sonda utilizada. La cantidad inicial de ADNc se puede cuantificar a través del número de ciclos necesarios para que se produzca un aumento de fluorescencia significativo con respecto a la señal de base, llamado ciclo umbral (Ct). El Ct es inversamente proporcional a la cantidad inicial de moléculas de ADNc.

La qRT-PCR se realizó según el protocolo de TaqMan Assay de Applied Biosystems, en el termociclador 7000SDS de Applied Biosystems. Las condiciones aplicadas fueron: 2 min. a 50°C, 10 min. a 95°C, 40 ciclos de 15 seg. A 95°C y 1 min. a 60°C. El gen endógeno usado como referencia de expresión fue el TBP (TATA binding protein). Los genes diana y las respectivas sondas de Applied Biosystems usadas fueron: Hes1 (Hs00172878_m1), Gli1 (Hs01110766_m1) y TBP (Hs00172424_m1). El *reporter* de las sondas es FAM y el quencher NFQ. Las muestras analizadas fueron las células RD con los shRNAs integrados, por lo que el valor de referencia interno es el pGIPZ.

Al finalizar la RT-qPCR, se obtuvieron los valores de Ct gracias al 7000 System software de Applied Biosystems. La cuantificación de los niveles relativos de cada ARNm se realizó mediante las siguientes fórmulas (Livak KJ, 2001):

$$\Delta Ct = Ct(gen) - Ct(TBP)$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct - Ct(pGIPZ)$$

$$FC = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

El *fold change* (FC) es la expresión relativa del gen en función del control pGIPZ. Si es negativo, hay menos cantidad de ARNm en esa condición que en la condición control y si es positivo, la cantidad de ARNm es mayor en esa condición.

6.5. EXTRACCIÓN Y ANÁLISIS DE PROTEÍNA

EXTRACCIÓN

Cuando las células en cultivo alcanzaron la confluencia deseada (70-80%), se procedió a la extracción de proteína. Se extrajeron los frascos de cultivo del incubador y se pusieron en hielo para evitar la degradación de las proteínas. Se aspiró el medio y se realizó un lavado con PBS 1X de Thermo Scientific. A continuación se añadió el buffer de lisis RIPA de Thermo Scientific con los inhibidores de proteasas *Complete Tablets, Mini EASYpack* de Roche (una pastilla por cada 10 mL de RIPA) y se rascó la superficie de cultivo del frasco con un scraper. Se recogió el volumen total del frasco en un eppendorf, se calentó en el termoblock a 95°C durante 2 minutos con el fin de desnaturalizar el DNA e inactivar las proteasas. A continuación, se pasó por una jeringuilla varias veces para homogeneizar la muestra y reducir la viscosidad. Finalmente, se centrifugó durante 10 minutos a 4°C y 13'3 rpm y se recogió el sobrenadante con el extracto proteico total, descartando los restos celulares en el pellet.

CUANTIFICACIÓN

Para la cuantificación de proteína se utilizó el kit DCTM Protein Assay de Bio-Rad, basado en el método de Lowry. Primero se preparó un banco de diluciones de BSA (Bovine serum albúmina) de concentraciones conocidas 2, 1, 0'5, 0'25, 0'125 y 0 mg/mL, para obtener una relación entre absorbancia y concentración de proteína. Paralelamente se realizó una dilución 1:10 de la proteína total extraída, se homogeneizaron por vórtex y se incubaron en el termoblock a 95°C durante 3 minutos.

En una placa de 96 pocillos se rellenaron 3 pocillos de cada muestra y de cada concentración del banco de diluciones de BSA, con 5 µL en cada uno. A continuación se añadieron 25 µL por pozo, de una mezcla de los reactivos A y S del Kit, en relación 100:2 y 200 µL del reactivo B. Se dejó incubar durante 20 minutos a oscuras y a temperatura ambiente. Finalmente, se leyó la absorbancia a 750 nm mediante el espectrofotómetro con lector de microplacas Gems Reader MF de LavSystems.

Para la determinación final de la concentración proteica se obtuvo una recta patrón de correlación entre absorbancia y concentración celular mediante el promedio de dos de las tres réplicas del banco de dilución de BSA, con una $r^2 \geq 0'9$.

WESTERN BLOT

El SDS-PAGE es un tipo de electroforesis que emplea geles de poliacrilamida en presencia de detergente aniónico dodecilsulfato sódico (SDS) para la separación proteica. El SDS tiene la propiedad de unirse a las cadenas polipeptídicas en una proporción constante de 1'4g SDS/ g de proteína, de modo que cambia la carga original de la proteína, aportándole una carga proporcional a su tamaño. El Western blot es una técnica analítica de detección específica de

proteínas mediante el uso de anticuerpos que permite determinar la cantidad relativa de la proteína en la muestra. Se utiliza un anticuerpo primario específico que reconoce la proteína de interés y un anticuerpo secundario marcado que reconoce una región constante del anticuerpo primario.

Se prepararon geles de 1'5 mm de grosor con el sistema Mini-Protean III de Bio Rad, con un porcentaje variable de acrilamida en el gel separador, en función de las proteínas a analizar (Tabla 2).

Tabla 2. Cantidades de los componentes usados en la preparación de gel separador y concentrador según el porcentaje de acrilamida para un volumen de dos geles.

Gel Separador 20 ml				Gel Concentrador 10 ml
% poliacrilamida	8%	10%	12%	4%
H ₂ O	9'3 ml	7'9 ml	6'6 ml	6'8 ml
Bis-Acrilamida (30%)	5'3 ml	6'7 ml	8'0 ml	1'7 ml
Tris-HCL 1'5 M pH 8'8	5'0 ml	5'0 ml	5'0 ml	-
Tris-HCL 1 M pH 6'8	-	-	-	1'25 ml
SDS (10%)	0'2 ml	0'2 ml	0'2 ml	0'1 ml
APS (10%)	0'2 ml	0'2 ml	0'2 ml	0'1 ml
TEMED	0'012 ml	0'08 ml	0'008 ml	0'01 ml

Los geles polimerizados se introdujeron en una cubeta del sistema *Mini-Protean III de Bio Rad* y se cubrieron con *Running Buffer*.

Se prepararon muestras de cada condición con la misma cantidad de proteína, según los volúmenes calculados en la determinación proteica, añadiendo cantidades proporcionales de buffer (H₂O) y de tampón de carga (Laemmli al 10% de DTT) y se cargó el mismo volumen en cada pocillo del gel. También se cargó un carril con 10 µL del marcador molecular *Precision Plus Protein Dual Color Standards* de Bio Rad, para relacionar las bandas del gel con su peso molecular. El voltaje aplicado fue de 35 Amperios por gel.

Una vez concluida la electroforesis, las proteínas se transfirieron a una membrana de PVDF (*polyvinylidene fluoride*) mediante el sistema *Mini Trans Blot-Cell* de Bio Rad siguiendo el orden de colocación que indica la figura 11. Se introdujo en la cubeta con Buffer de transferencia al 1X y se aplicó un voltaje de 400 Amperios durante 2 horas en la cámara fría (4°C).

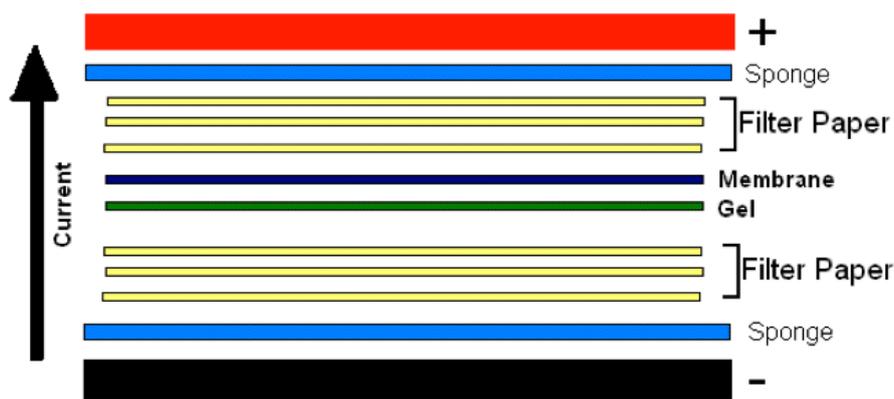


Figura 11. Montaje de la transferencia. En la figura se detalla el orden de colocación de los elementos necesarios para llevar a cabo la transferencia. Las proteínas migrarán del polo negativo al polo positivo, transfiriéndose del gel a la membrana. Imagen adaptada de abcam

A continuación se bloqueó la membrana con TBS-T (*Tris-Buffered Saline and Tween 20*) al 5% de BSA (*Bovine serum albumine*) durante 1 hora en agitación. Se incubó con el anticuerpo primario durante la noche en la cámara fría. Los restos del anticuerpo primario se eliminaron con 3 lavados de 10 minutos con TBST en agitación y se incubó con el anticuerpo secundario correspondiente durante 1 hora en agitación. En este caso, los anticuerpos secundarios estaban conjugados con peroxidada de rábano (HRP, del inglés *Horseradish peroxidase*), enzima que reacciona ante sustratos quimioluminiscentes, produciendo una señal detectable mediante el revelado. De nuevo se realizaron 3 lavados con TBST. La proteína endógena usada como control de carga fue la actina.

Tabla 3. Diluciones Anticuerpos.

Proteína	Anticuerpo 1°	Anticuerpo 2°
Hes1	Millipore (10:2.000)	Rabbit (1:10.000)
Gli1	Millipore (1:250)	Rabbit (1:10.000)
Actina	Santa Cruz Biotech (1:10.000)	Goat (1:2.000)

Por último, añadió el sustrato de la HRP: Solution A (*Luminol enhancer solution*) y Solution B (*Peroxid solution*) de GE Healthcare a la membrana durante 3 minutos y se reveló la señal producida mediante la reveladora AGFA Curix 60.

6.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

En las comparaciones entre dos muestras, las diferencias significativas fueron analizadas mediante el *Student's t-test*. Los resultados se consideraron significativos cuando $p < 0,05$.

7. RESULTADOS

7.1. LOS shRNAs MÁS EFECTIVOS SON shGLI49 Y shHES72

Para determinar qué shRNAs conseguían una mayor inhibición de GLI1 y HES1, primero se integraron los shRNAs en la línea celular de RMSe, RD. Una vez comprobada la expresión del vector en las células (Figura 12), verificamos el silenciamiento de los genes diana a nivel de ARNm (qRT-PCR) y de proteína (WB).

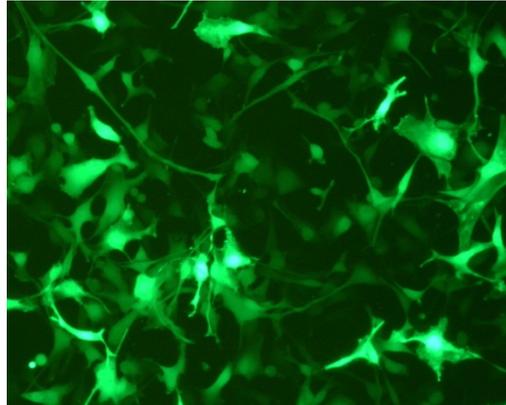


Figura 12. Expresión del gen GFP en las células infectadas con pGIPZ. La imagen fue tomada en el microscopio invertido de epifluorescencia Nikon eclipse TE2000-S utilizando la longitud de onda de la luz azul para excitar y provocar la emisión de luz del GFP.

Por un lado, se compararon los niveles de expresión de ARNm de Gli1 entre las células infectadas con los 4 shRNAs de GLI1 y las células con el vector pGIPZ vacío (control). Los resultados mostraron una reducción significativa en las células con los shRNA denominados shGli49, shGli70 y shGli73. No se apreciaron diferencias significativas en shGli72 (Figura 13.A). Respecto a los niveles de proteína, aunque no se consiguió una inhibición total de Gli1, sí se obtuvo una reducción significativa en Gli49 (Figura 13.B).

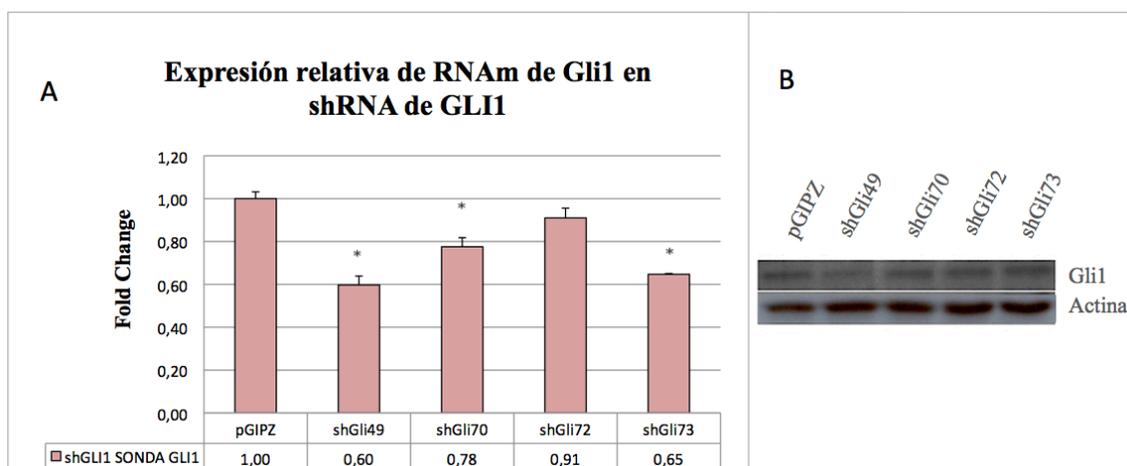


Figura 13. Efectos de los distintos clones de shRNA de Gli1. A) Efectos de los shRNA en la expresión de ARNm de GLI1 expresada respecto el control (línea celular infectada con el vector pGIPZ vacío). Los niveles de expresión se normalizaron con el gen de referencia TBP. La significación estadística de las

diferencias con respecto al control: *, $p < 0,05$. Todas las medidas de ARN se realizaron por triplicado. Las barras muestran la desviación estándar de las réplicas. **B**| WB que muestra los efectos de los shRNAs en los niveles de proteína Gli1 (21 μg de proteína por pocillo). Se utilizó la Actina como control de carga.

Por otro lado, se comparó la expresión de ARNm de Hes1 entre las células infectadas con los 6 shRNAs de HES1 y las células infectadas con el vector pGIPZ vacío (control). Los resultados mostraron una reducción significativa en los niveles de Hes1 con los shRNA denominados shHes27, shHes32 y shHes34. En shHes31 y shHes33 no se apreciaron diferencias significativas, mientras que shHes72 provocó un aumento significativo en los niveles de ARNm (Figura 14.A). En este caso, los resultados de la RT-PCRq no son concluyentes por sí solos, ya que los shRNAs pueden bloquear el ARNm de dos maneras: mediante su degradación, provocando la disminución de los niveles de ARNm y mediante el bloqueo de la traducción, provocando una acumulación del ARNm. En cuanto a los niveles de proteína, se produjo una reducción en shHes27, shHes33 y con mayor relevancia en shHes72 (Figura 14.B).

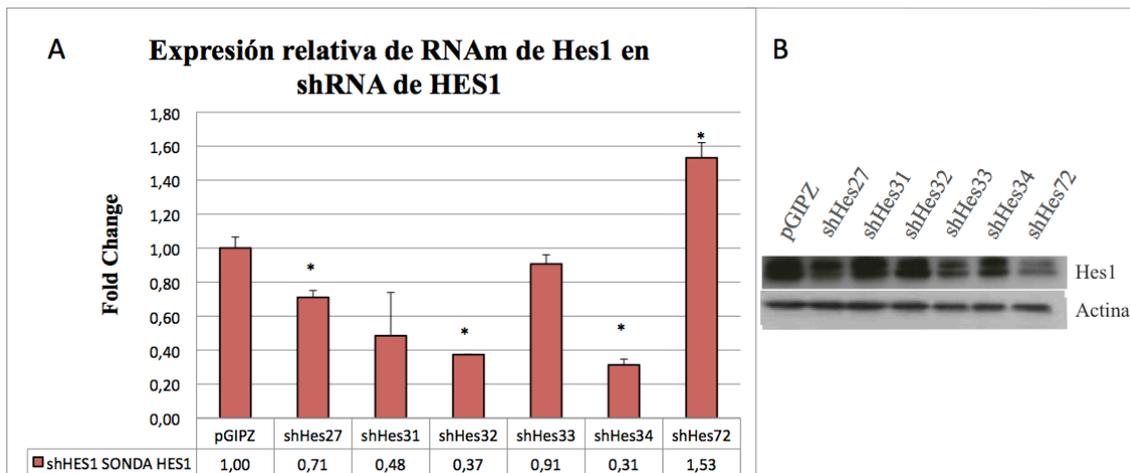


Figura 14. Efectos de los distintos clones de shRNA de Hes1. **A**| Efectos de los shRNA en la expresión de ARNm de HES1 expresada en función del control (línea celular con el vector pGIPZ vacío). Los niveles de expresión se normalizaron con el gen de referencia TBP. La significación estadística de las diferencias con respecto al control: *, $p < 0,05$. Todas las medidas de ARN se realizaron por triplicado. Las barras muestran la desviación estándar de las réplicas. **B**| WB que muestra los efectos de los shRNAs de Hes1 a nivel de proteína (25 μg de proteína por pocillo). Se utilizó la Actina como control de carga.

Según los resultados obtenidos, los shRNAs elegidos para la realización de los experimentos fueron shGli49 y shHes72.

7.2. LA INHIBICIÓN DE LAS VÍAS HEDGEHOG Y NOTCH REDUCE LA PROLIFERACIÓN CELULAR

Cuando los shRNAs más eficaces de cada vía fueron seleccionados, se compararon los efectos funcionales asociados a la inhibición de cada vía mediante un ensayo de proliferación. La inhibición de las vías se realizó genética y farmacológicamente.

Para la elección de la concentración adecuada de cada fármaco, se utilizaron diferentes concentraciones: 10, 25 y 50 μM de DAPT y 1, 10 y 50 μM de Vismodegib. En la figura 15 se muestran las concentraciones con mejor resultado obtenido. En el caso del Vismodegib el efecto fue significativamente mayor en la concentración más elevada testada, mientras que en la prueba con DAPT, la diferencia entre las concentraciones de 25 y 50 μM era mínima, debido a la precipitación del fármaco.

Los resultados mostrados en la figura 15, indican que la inhibición de la vía Hedgehog disminuye significativamente la proliferación in vitro de la línea celular de RMSe (RD) tras 5 días de cultivo, con un nivel de significación de 0'05 en la inhibición genética y de 0'005 en el tratamiento con Vismodegib. Por otro lado, en la vía Notch, la inhibición genética de HES1 causa un descenso proliferativo significativo ($p < 0'005$) tras 5 días de cultivo, mientras que la reducción conseguida mediante la inhibición farmacológica de la vía con DAPT no es significativa.

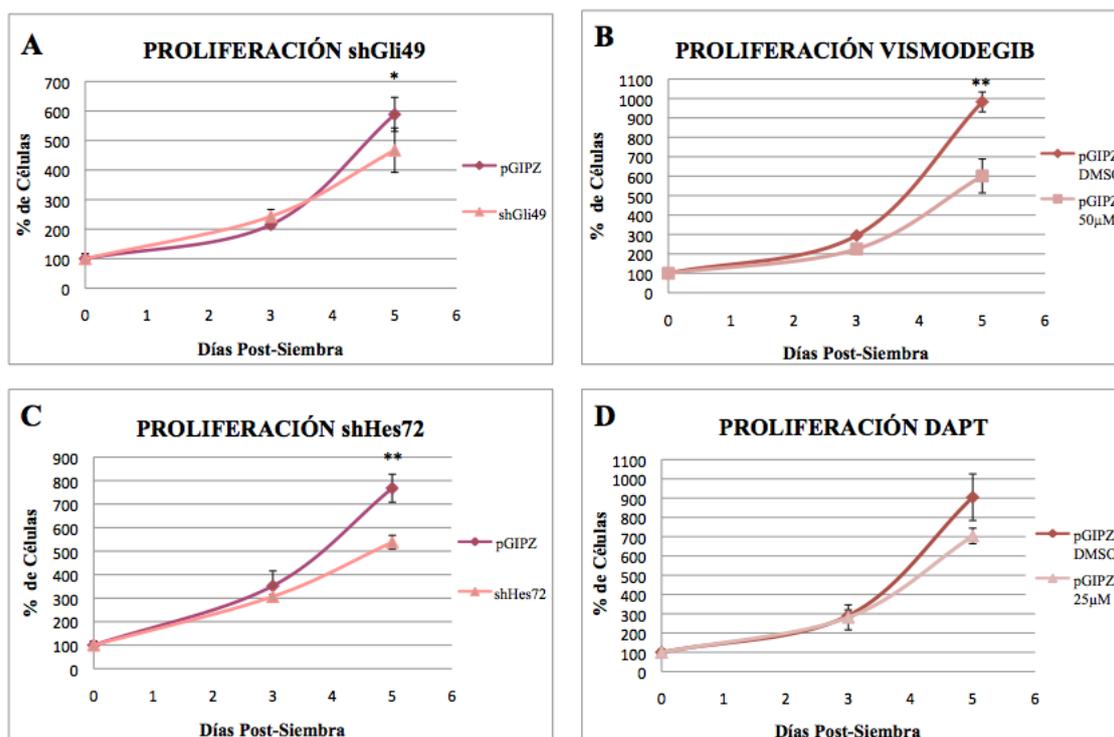


Figura 15. La inhibición de Hedgehog y Notch reduce la proliferación celular. Gráficas representativas del crecimiento celular de células infectadas con shGli49 con respecto a las células control (pGIPZ) (A), de células tratadas con Vismodegib (50µM) con respecto a células tratadas con el volumen de DMSO equivalente (B), de células infectadas con shHes72 con respecto a las células control (pGIPZ) (C) y de células tratadas con DAPT (25µM) con respecto a células tratadas con el volumen de DMSO equivalente (D), durante 5 días de cultivo. Todas las siembras se realizaron por triplicado y se capturaron fotos los días 0, 3 y 5 post-siembr. El % de células corresponde a la cantidad de células contadas ese día respecto al número de células sembradas el día 0. Para la obtención del número de células se realizó el promedio de las células contadas en las fotos, primero entre los 5 campos de cada pocillo y después entre las 3 réplicas de cada condición. Las barras muestran la desviación estándar de las réplicas. La significación estadística de las diferencias con respecto al control: *: $p < 0,05$ y **: $p < 0,005$.

Estos resultados, sugieren la importancia oncogénica de las vías en RMS, señalándolas como dianas prometedoras de nuevas terapias. Además, permiten comparar el efecto de la inhibición génica específica de la vía respecto a la inhibición farmacológica.

7.3. LA INHIBICIÓN SIMULTÁNEA DE LAS VÍAS SUGIERE UN EFECTO FUNCIONAL ADITIVO

Para comprobar si la inhibición conjunta de ambas vías causaba un efecto aditivo o sinérgico en la disminución de la proliferación celular, se realizó un ensayo de proliferación combinando la inhibición génica con la inhibición farmacológica: shHes72 con Vismodegib (50 µM) y shGli49 con DAPT (25 µM). Las condiciones usadas como comparación fueron: pGIPZ con los volúmenes de DMSO equivalentes a cada fármaco, pGIPZ con cada fármaco y los shHes72 y shGli49 con los respectivos volúmenes equivalentes de DMSO.

Los resultados del silenciamiento génico de HES1 tratado con Vismodegib muestran una disminución de la proliferación muy significativa ($p < 0,005$) con respecto al control pGIPZ y al shHes72 sin tratar. Sin embargo, no se aprecian diferencias en el tratamiento con Vismodegib de ambas células, pGIPZ y shHes72. Por otro lado, la gráfica de la inhibición con shGli49 y DAPT muestra un descenso significativo ($p < 0,05$) del % de células en las condiciones shGli49 y shGli49 tratada con DAPT respecto a pGIPZ. La disminución de las células pGIPZ tratadas con DAPT no es significativa respecto al control pGIPZ tratado con DMSO. El shGli49 tratado con DAPT muestra una disminución de la proliferación significativa ($p < 0,05$) respecto al tratamiento con DAPT en pGIPZ y una disminución no significativa con respecto al shGli49 con DMSO.

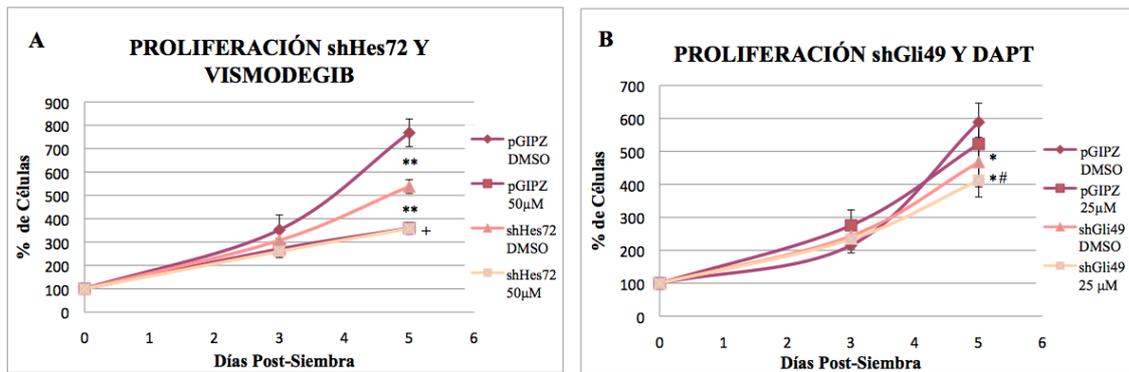


Figura 16. La inhibición simultánea de ambas vías sugiere un efecto aditivo en la disminución de la proliferación. A) Gráfica representativa de la proliferación celular durante 5 días bajo los efectos de la inhibición genética de Notch y farmacológica de Hedgehog. B) Gráfica representativa de la proliferación asociada a la inhibición genética de Hedgehog y farmacológica de Notch durante 5 días de cultivo. En ambas gráficas existen 3 controles: las células pGIPZ tratadas con DMSO, las células pGIPZ tratadas con el fármaco y las células con los respectivos shRNA tratadas con DMSO. Todas las siembras se realizaron por triplicado y se captaron fotos los días 0, 3 y 5 post-siembr. El % de células corresponde a la cantidad de células contadas ese día respecto al número de células sembradas el día 0. Para la obtención del número de células se realizó el promedio de las células contadas en las fotos, primero entre los 5 campos de cada pocillo y después entre las 3 réplicas de cada condición. Las barras muestran la desviación estándar de las réplicas. La significación estadística de las diferencias con respecto al control: *: $p < 0,05$ y **: $p < 0,005$, con respecto al fármaco #: $p < 0,05$ y con respecto al shRNA +: $p < 0,005$.

7.3. EXISTEN MECANISMOS COMPENSATORIOS ENTRE AMBAS VÍAS

Para intentar explicar a nivel molecular los resultados del estudio de proliferación y comprobar si realmente existen interacciones entre ambas vías, se analizaron los niveles de ARNm de los efectores de cada vía, al inhibir genéticamente la vía contraria. Por otro lado, se estudiaron los efectos de la inhibición farmacológica en los niveles de proteína de ambos genes.

Se realizó una qRT-PCR con la sonda de GLI1 en las células shHes72, con la sonda de HES1 en las células shGli49 y con ambas sondas en el control pGIPZ. En la figura 17 se muestran los resultados de esta qRT-PCR, junto con los valores del shGli49 y shHes72 de la primera qRT-PCR (Figuras 13.A y 14.A). Al inhibir genéticamente la expresión de HES1, aumentan

significativamente los niveles de expresión de GLI1. Por otro lado, silenciando la expresión de GLI1, los niveles de HES1 se reducen, pero no de manera significativa.

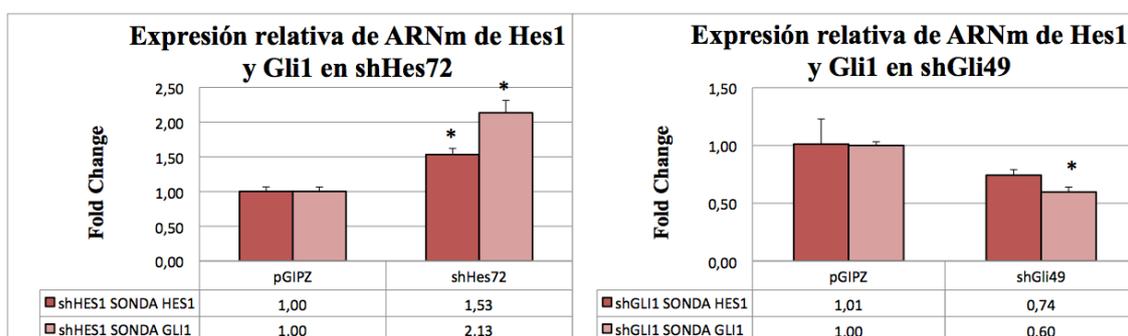


Figura 17. Nivel de expresión de Hes1 y Gli1 en los shRNA seleccionados. En la izquierda se compara pGIPZ con shHes72. En la derecha, pGIPZ y shGli49. Los niveles de ARNm de Hes1 se muestran en rojo y los niveles de Gli1 en rosa. El gen de referencia usado para la normalización de los valores fue el TBP. Todas las medidas de ARNm se realizaron por triplicado. Las barras muestran la desviación estándar entre las réplicas. La significación estadística de las diferencias con respecto al control: *, $p < 0,05$.

Los resultados de los niveles de proteína se muestran en la figura 18. Las células pGIPZ fueron tratadas con DMSO, Vismodegib (50 μ M), DAPT (25 μ M) y una combinación de Vismodegib y DAPT durante 5 días, cuando se extrajo la proteína. A pesar de que el WB debería ser repetido debido a las diferencias el control de carga (Actina), nos sirve para realizar una aproximación de los efectos moleculares de cada condición. Los niveles de Hes1 se reducen en el tratamiento con Vismodegib, manteniendo un nivel alto en DAPT. Los niveles de Gli1 aumentan en el tratamiento de DAPT y disminuyen en el tratamiento con Vismodegib.

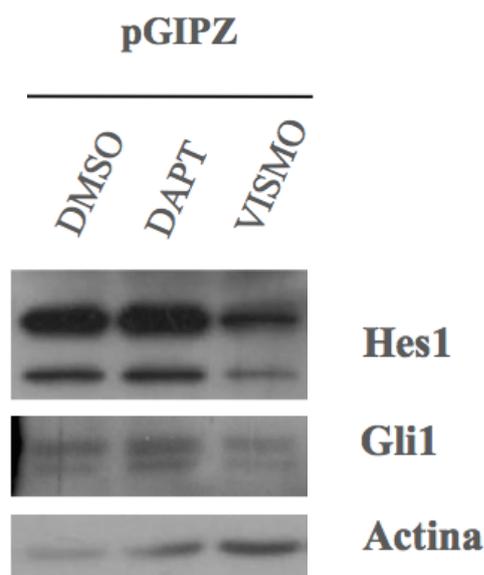


Figura 18. Existe una relación compensatoria entre los niveles de Hes1 y Gli1. WB que muestra las variaciones en los niveles de proteína de Hes1 y Gli1 según el tratamiento aplicado. Se cargaron 15 μ g de proteína por pocillo. La Actina fue utilizada como control de carga.

8. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Los componentes celulares que regulan la proliferación, la invasividad y la metástasis en RMS siguen siendo en gran parte desconocidos. Las dos vías embrionarias sujetas a estudio en este proyecto han sido relacionadas por separado con la oncogenicidad del RMS (Zibat A, 2010; De Salvo M, 2014; Roma J, 2011). Varias publicaciones con modelos de rhabdomyosarcoma xenoinjertados coinciden en la posibilidad de reducir de manera efectiva, aunque no total, el crecimiento del tumor por inhibición farmacológica de la vía de Hedgehog (Eichenmüller M, 2010; Tostar U, 2010; Yamanaka H, 2011). Por otro lado, a pesar de que la vía Notch ha sido relacionada con la proliferación tumoral (Tanaka M, 2009; De Salvo M et al. 2014), los tratamientos inhibidores de la vía Notch en modelos murinos pre-clínicos no resultan demasiado efectivos. Este hecho podría explicarse debido a una baja eficiencia de los compuestos o de las concentraciones usadas. Alternativamente, la comprobación del descenso en la proliferación y movilidad asociada a la inhibición de Notch *in vitro*, sugiere la existencia de mecanismos compensatorios basados en el *cross-talking* entre distintas vías, que podrían explicar la resistencia parcial a las terapias específicas de Hh y la baja efectividad de los fármacos específicos de Notch (Roma J, 2012).

Para comprobar esta hipótesis, en este trabajo se ha optimizado la inhibición genética de ambas vías mediante shRNAs. Se han realizado experimentos comparativos de proliferación celular bajo la inhibición génica y farmacológica de las vías por separado y finalmente se han estudiado los efectos de la inhibición simultánea de ambas vías.

Las células elegidas para realizar el estudio fueron las RD, una línea celular de RMS, que presenta ambas vías activas (Roma J, 2011; Brian C, 2011; Ridzewski R, 2015). Los genes utilizados para la inhibición genética de las vías fueron sus efectores *downstream*: GLI1 y HES1. Ambos son considerados indicadores fiables de la activación de las vías Hedgehog y Notch, respectivamente (Scales SJ, 2009; Masià A, 2012).

Tras la infección con los shRNAs en las células RD, se compararon los niveles de Gli1 y Hes1 a nivel de ARNm y proteína. Los resultados mostrados en la figura 13 señalan el shGli49 como el shRNA que consigue una disminución mayor en los niveles de ARNm y proteína de Gli1. En el caso de HES1, los resultados de la qRT-PCR no fueron concluyentes por sí solos, debido a los diferentes mecanismos de acción de los shRNA. Gracias al análisis proteico, se eligió el shHes72 como el shRNA más efectivo. De este modo, el aumento en los niveles de ARNm, indica que el mecanismo de actuación del shHes72 no provoca la degradación del ARNm, sino que actúa impidiendo su traducción a proteína, provocando un aumento del ARNm, que como

podemos observar en la figura 14.B, no se traduce a proteína.

El análisis de proliferación permitió estimar las diferencias en el crecimiento celular provocadas por las diferentes condiciones. En la figura 15 se compararon los efectos proliferativos del silenciamiento génico y la inhibición farmacológica de cada vía. La inhibición de la vía Hedgehog provoca una disminución de la proliferación en ambas condiciones, siendo más significativa la inhibición farmacológica. La inhibición de la vía Notch sólo produce una disminución de la proliferación significativa mediante el silenciamiento génico. Estos resultados concuerdan con los modelos murinos observados por Roma et al, en los que la inhibición de Notch mediada por GSIs como el DAPT tienen efectos funcionales insuficientes y no significativos y la inhibición con compuestos inhibidores de SMO como el Vismodegib tiene efectos muy significativos en la reducción del tumor.

La inhibición genética proporciona información sobre el efecto real que tienen los genes reprimidos. La inhibición provocada por el tratamiento con Vismodegib es más significativa que la obtenida con el shGli49. Esta diferencia sugiere que el efecto del Vismodegib no solo se debe a la inhibición la vía Hh, sino que puede presentar efectos *off-targets* que incrementen la inhibición conseguida con la vía Hh. Por otro lado, la reducción no significativa en la proliferación obtenida con el tratamiento de DAPT, sugiere que los efectos inhibitorios del fármaco se ven compensados por otros mecanismos moleculares en RMS. Se ha desestimado la posibilidad de que el fármaco no sea capaz de inhibir la vía, ya que existen estudios que comprueban la reducción en la expresión de HES1 mediada por DAPT en otras patologías (Kathrein KL, 2008).

Siguiendo la línea de estudio de los efectos funcionales, realizamos un ensayo de proliferación con la inhibición simultánea de ambas vías para testar si existía un efecto aditivo o sinérgico en la inhibición de la proliferación (Figura 16). La disminución de la proliferación en las células shHes72 tratadas con Vismodegib, es significativa con respecto al control pGIPZ y al shHes72, sugiriendo un efecto aditivo de la inhibición de ambas vías. Sin embargo, esta doble inhibición causa el mismo efecto en la proliferación que la inhibición con Vismodegib. Este hecho podría explicarse con la hipótesis planteada por Roma et al. sugiriendo que la inhibición de HES1 causa un aumento de GLI1 y por lo tanto una activación de la vía Hh (Roma J, 2012). Esta activación tendría un efecto compensatorio en la inhibición de las dos vías, que no permitiría ver diferencias con el efecto del fármaco. La figura 16.B permite la comparación entre los efectos conseguidos con DAPT y la doble inhibición de DAPT con el shGli49. En este caso, la inhibición con DAPT tiene efectos no significativos respecto al control y la inhibición con shGli49 causa efectos significativos. La inhibición simultánea de ambas vías causa una

disminución de la proliferación significativa con respecto al control y al tratamiento con DAPT. Sin embargo, esta disminución no es significativa con respecto a la provocada por el shGli49. En conjunto, estos resultados sugieren una interrelación entre ambas vías con un efecto aditivo en la proliferación. No obstante, el efecto inhibitorio conseguido no supera al efecto asociado al tratamiento con Vismodegib.

Por último, con la intención de confirmar a nivel molecular la existencia de un mecanismo compensatorio entre ambas vías, se realizó el análisis de los niveles de ARNm y proteína de ambos genes durante la inhibición de las vías. Los resultados del análisis de ARNm mostrados en la figura 17, revelan un aumento significativo de la expresión de GLI1 causado por la inhibición genética de HES1 y una disminución, aunque no significativa, de los niveles de HES1 al inhibir GLI1. Los resultados del WB de la figura 18 muestran que el tratamiento de DAPT aumenta los niveles de Gli1 y no disminuye los niveles de Hes1. Con el tratamiento de Vismodegib, disminuyen los niveles de ambas proteínas. La figura 19 ilustra un posible mecanismo molecular de interacción entre ambas vías basado en los resultados obtenidos.

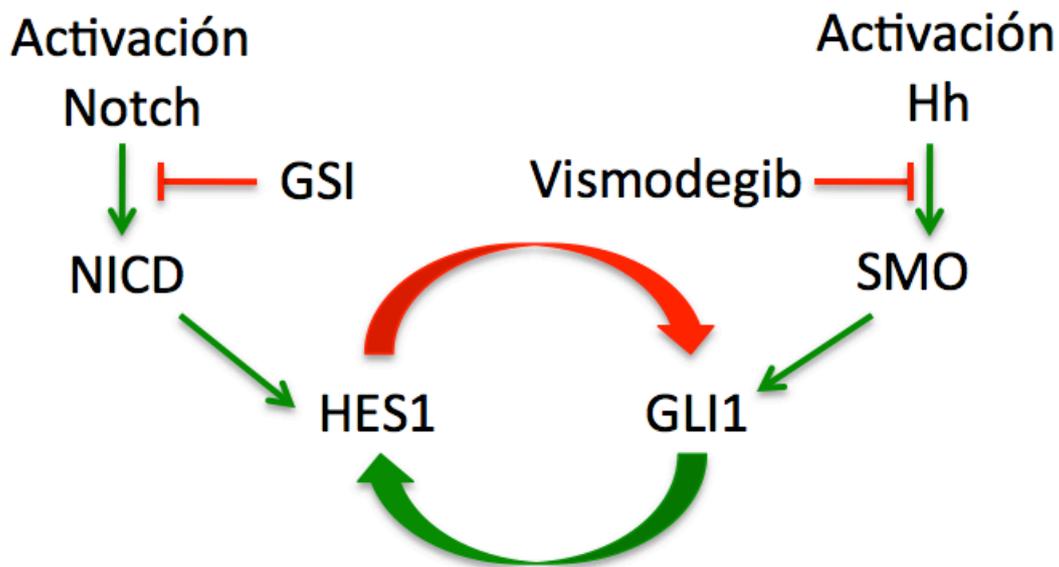


Figura 19. Modelo de interacción entre las vías Notch y Hedgehog, sus genes efectores y sus inhibidores farmacológicos. Las líneas verdes indican activación. Las líneas rojas indican inhibición.

A continuación se detalla la explicación de los resultados según el modelo de la figura 19. La inhibición genética de ambos genes supone una disminución de la proliferación celular. La inhibición farmacológica de las vías disminuye la proliferación de manera significativa con Vismodegib y no significativa con DAPT. La inhibición simultánea mediante el shRNA de HES1 y el Vismodegib, causa un efecto significativo en la disminución de la proliferación con respecto al shHes72. Al combinar ambas inhibiciones, el efecto sobre la proliferación celular es

igual al efecto que genera únicamente la inhibición farmacológica. Este resultado podría explicarse ya que la inhibición con el shRNA de HES1, bloquea la inhibición que éste ejerce sobre Gli1. Esto provocaría un posible aumento en los niveles de Gli1, que podría contrarrestar el efecto inhibitorio de la inhibición de HES1. La inhibición simultánea mediante el shRNA de GLI1 y el DAPT, disminuye la proliferación de forma significativa con respecto al control pGIPZ y al tratamiento con DAPT y de manera no significativa con respecto al shGli49. Esta disminución, se vería explicada según el esquema de interacción entre ambas vías. Al inhibir HES1 farmacológicamente, se produce un aumento de los niveles de GLI1 que contrarresta el efecto inhibitorio, tal como indican los resultados del tratamiento con DAPT. Sin embargo, la combinación de DAPT con la inhibición genética de GLI1 impide este efecto compensatorio y permite una mayor inhibición de la proliferación.

Los resultados obtenidos no pueden ser directamente comparados con resultados anteriores, ya que no hay estudios realizados en RMS que combinen la inhibición farmacológica y genética de ambas vías. Los estudios que existen de inhibiciones farmacológicas combinadas en otros cánceres, no siguen una correlación, ya que los efectos dependen de las líneas y fármacos utilizados. Por ejemplo, Yuki Okuhashi et al. obtienen resultados significativos con un tratamiento combinado del GSI-XXI y la Ciclopamina en una línea celular de leucemia linfoblástica aguda y no observan variaciones en otras 5 líneas testadas.

9. CONCLUSIONES

Los tipos de tratamiento normalmente usados en RMS incluyen la cirugía, la quimioterapia y la radioterapia. No son tratamientos específicos y pueden provocar graves reacciones secundarias. El estudio de los mecanismos celulares que regulan la proliferación, la invasividad y la metástasis en RMS es necesario como paso previo al desarrollo de terapias específicas que sustituyan los tratamientos agresivos normalmente utilizados. En este trabajo se ha estudiado la inhibición de dos vías relacionadas con el RMS. Las principales conclusiones del estudio son:

- El uso de shRNAs permite la inhibición específica de los genes efectores (HES1 y GLI1) de las vías Notch y Hedgehog.
- La inhibición genética o farmacológica individual de Hedgehog y Notch reduce la proliferación celular.
- El tratamiento con DAPT no consigue una reducción significativa de la proliferación celular, ni una reducción de los niveles de Hes1. Este hecho, se explica con posibles mecanismos *cross-talking* entre las vías Notch y Hedgehog que compensen el efecto inhibitorio del fármaco.
- La reducción de la proliferación asociada al tratamiento con Vismodegib es

significativamente mayor que la asociada al silenciamiento génico de la vía Hedgehog, lo que sugiere la implicación de posibles efectos *off-targets* del fármaco.

- Los efectos en la proliferación de la inhibición simultánea de las vías sugieren un efecto aditivo. Para comprobar esta afirmación se requieren más experimentos, como por ejemplo, la doble inhibición genética, para evitar posibles *off-targets* de los fármacos.
- Proponemos un modelo de interacción que es capaz de ajustarse y dar explicación a las conclusiones anteriores, mediante el cual HES1 es capaz de inhibir GLI1 y GLI1 es capaz de activar HES1. Sin embargo, se necesitan más experimentos para validar este modelo.

Todas estas conclusiones están basadas en la línea celular de rhabdomyosarcoma embrionario, RD, por lo que no pueden generalizarse al rhabdomyosarcoma. Por otro lado, debido a la falta de tiempo, al desconocimiento sobre los mecanismos de acción de las vías y a la cantidad de factores que pueden influir en las vías de señalización y en los procesos oncogénicos, serían necesarios más experimentos para poder entender los mecanismos moleculares de las vías y llegar a desarrollar estrategias inhibitoras de importancia traslacional.

10. AGRADECIMIENTOS

En estas últimas líneas me gustaría agradecer a todos los que han aportado su granito de arena para hacer posible la realización de este trabajo.

A Josep Roma, por brindarme la oportunidad de realizar este proyecto y su total confianza, por su dedicación y emoción puestas en él, pero sobre todo Pep, gracias por descubrirme el maravilloso mundo de la investigación en oncología pediátrica y por todos los consejos y las lecciones humanas.

A todos los miembros del laboratorio con los que he compartido penas y alegrías durante estos meses, por hacer más llevaderos los madrugones. A Isaac, por formar un gran equipo, por todas sus explicaciones, su paciencia, su entusiasmo y su buen humor. A Ana, Carla e Irina, por estar siempre dispuestas a ayudar, por los consejos y las soluciones prácticas a todos los problemas, por los momentos de café y desconexión.

A los profesores que he tenido a lo largo de mi vida, por transmitirme sus conocimientos y su pasión por el saber, por recompensar el esfuerzo y por los ánimos y consejos recibidos.

A mi familia, por ser como son, por hacerme ser como soy, por animarme a estudiar lo que quería fuera donde fuera. Por los momentos de morriña, por todas las fechas importantes en las que no he podido estar con vosotros, por vuestro apoyo incondicional, por las largas conversaciones de

teléfono y por todos los kilómetros recorridos para vernos de nuevo. Gracias por vuestro esfuerzo y cariño.

A mis amigos de toda la vida, porque a pesar de la distancia, cada vez que nos reencontramos es como si no hubiera pasado el tiempo, por su apoyo y porque con ellos siempre hay algo que celebrar.

A mis nuevos amigos de la época universitaria, a mi querida familia vigatana y a mis chicas puño en alto, no me faltéis nunca.

11. BIBLIOGRAFÍA

ABIDI, A. “Hedgehog signaling pathway: A novel target for cancer therapy: Vismodegib, a promising therapeutic option in treatment of basal cell carcinomas” *Indian J Pharmacol* (2014) 46:3–12.

ALDANA, JA. “Aspectos básicos de la miogénesis y algunas consideraciones prácticas”. *Acta Biológica Colombiana* (2002) 7: 59-60.

AMAKYE D, JAGANI Z, DORSCH M. “Unraveling the therapeutic potencial of the Hedgehog pathway in cancer”. *NatMed* (2013) 19:1410–22.

BARR FG, GALLILI N, HOLICH J, BIEGEL JA, ROVERA G, EMANUEL BS. “Rearrangement of the PAX3 paired box gene in the paediatric solid tumour alveolar rhabdomyosarcomas”. *Nat Genet* (1993) 3: 113-7.

BRENEMAN JC, LYDEN E, PAPPO AS, LINK MP, ANDERSON JR, PARHAM DM, et al. “Prognostic factors and clinical outcomes in children and adolescents with metastatic rhabdomyosarcoma – a report from the Intergroup Rhabdomyosarcoma Study IV.” *J Clin Oncol* (2003) 21:78–84

BRIAN C. BELYEA, SARASIJA NAINI, REX C. BENTLEY, AND CORINNE M. LINARDIC “Inhibition of the Notch-Hey1 Axis Blocks Embryonal Rhabdomyosarcoma Tumorigenesis” *Clin Cancer Res.* (2011) 17:7324-7336.

BRIDGE JA, LIU J, WEIBOLT V, ET AL. "Novel genomic imbalances in embryonal rhabdomyosarcoma revealed by comparative genomic hybridization: an Intergroup Rhabdomyosarcoma Study". *Genes Chromosomes Cancer* (2000) 27:337–344.

CALZADA-WACK, J., SCHNITZBAUER, U., WALCH, A., WURSTER, K.-H., KAPPLER, R., NATHRATH, M. AND HAHN, H. "Analysis of the PTCH coding region in human rhabdomyosarcoma". *Human Mutation* (2002) 20:233–234.

CHEN, JAMES K. et al. "Inhibition of Hedgehog Signaling by Direct Binding of Cyclopamine to Smoothed." *Genes & Development* (2002) 2743–2748

DAVIS RJ, D'CRUZ CM, LOWELL MA, BIEGEL JA, BARR FG. "Fusion of PAX7 to the FOXO1 by the variant t(1;13) (p36;q14) translocation in alveolar rhabdomyosarcomas". *Cancer Res.* (1994) 54:2869-72.

DE ALAVA E, KAWAI A, HEALEY JH, FLIGMAN I, MEYERS PA, HUVOS AG, et al. "EWS-FLI1 fusion transcript structure is an independent determinant of prognosis indicators in Ewing's sarcoma". *J Clin Oncol.* (1998) 16:1248-55

DE SALVO M, RAIMONDI L, VELLA S, ADESSO L, CIARAPICA R, VERGINELLI F. "Hyperactivation of Notch3 amplifies the proliferative potential of rhabdomyosarcoma cells." *PLoS One* (2014) 9:96238.

DUBEY AK, DUBEY S, HANDU SS, QAZI MA. "Vismodegib: the first drug approved for advanced and metastatic basal cell carcinoma". *J Postgrad Med.* (2013) 59:48-50.

EICHENMÜLLER M, HEMMERLEIN B, VON SCHWEINITZ D, KAPPLER R. "Betulinic acid induces apoptosis and inhibits hedgehog signalling in rhabdomyosarcoma". *Br J Cancer* (2010) 103: 43-51.

FAN X, MATSUI W, KHAKI L, STEARNS D, CHUN J, LI Y, et al. "Notch pathway inhibition repletes stem-like cells and blocks engraftment in embryonal brain tumors". *Cancers Res.* (2006) 66:7445-52

FLEMING RJ. "Structural conservation of Notch receptor and ligands". *Semin Cell Dev Biol.* (1998) 9:599-607.

FUNAHASHI Y, HERNANDEZ SL, DAS I, AHN A, HUANG J, VORONTCHIKHINA M, et al. “A Notch1 ectodomain construct inhibits endothelial notch signaling, tumor growth, and angiogenesis.” *J. Cancer Res* (2008) 68:4727-35.

GLAHAN D, CALLAHAN R. “The Mouse mammary tumor associated gene INT3 is a unique member of the NOTCH gene family (NOTCH4)”. *Oncogene* (1997) 14:1883-90.

HAHN H, L WOJNOWSKI, A.M. ZIMMER, J. HALL, G. MILLER, AND A. ZIMMER, “Rhabdomyosarcomas and radiation hypersensitivity in a mouse model of Gorlin syndrome,” *Nature Medicine* (1998) 4: 619-622.

HERETSCH P, L. TZAGKAROULAKI, AND A. GIANNIS. “Modulators of the hedgehog signaling pathway”. *Bioorganic and medicinal chemistry* (2010) 18:6613-6624.

HETTNER S, WAGERS AJ. “Muscling in: Uncovering the origins of rhabdomyosarcoma”. *Nature medicine* (2010) 16:171-173.

INGRAM WJ, MCCUE KI, TRAN TH, HALLAHAN AR, WAINWRIGHT BJ. “Sonic Hedgehog regulates Hes1 through a novel mechanism that is independent of canonical Notch pathway signaling”. *Oncogene* (2008) 28;27:1489-1500.

KATHREIN, Katie L. Defining the role of Ikaros as a tumor suppressor and repressor of Notch target genes. 2008.

<https://books.google.es/books?id=W02FXaG5yQ8C&printsec=frontcover&hl=es#v=onepage&q=DAPT&f=false>

(Consulta: 31 de Agosto de 2015).

KATO M. “Networking of WNT, FGF, notch, BMP, and hedgehog signaling pathways during carcinogenesis” *Stem Cell Rev.* (2007) 3:30–38.

KELLY KM, WOMER RB, SORENSEN PH, XIONG QB, BARR FG. “Common and variant gene fusions predict distinct clinical phenotypes in rhabdomyosarcoma”. *J Clin Oncol.* (1997) 15:1831-6

LIN TL, MATSUI W. “Hedgehog pathway as a drug target: Smoothed inhibitors in development”. *Onco Targets Ther.* (2012) 5:47-58.

LIVAK KJ, SCHMITTGEN TD. “Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method.” *Methods* (2001) 25:402-8.

LOH WE JR, SCRABLE HJ, LIVANOS E, ARBOLEDA MJ, CAVENEE WK, OSHIMURA M, et al. “Human chromosome 11 contains two different growth suppressor genes for embryonal rhabdomyosarcoma”. *Proc Natl Acad Sci.* (1992) 89:1755–1759.

LUO D, RENAULT VM, RANDO TA. “The regulation of Notch signaling in muscle stem cell activation and postnatal myogenesis” *Semin Cell Dev Biol.* (2005) 16:612-22.

MASIÀ A, ALMAZÁN-MOGA A, VELASCO P, REVENTÓS J, TORÁN N, SÁNCHEZ DE TOLEDO J, ROMA J, GALLEGRO S. “Notch-mediated induction of N-cadherin and $\alpha 9$ -integrin confers higher invasive phenotype on rhabdomyosarcoma cells.” *Br J Cancer* (2012) 107:1374-83.

MERLINO G, KHANNA C. “Fishing for the origins of cancer”. *Genes Dev* (2007) 1;21:1275-1279.

OKUHASHI Y, ITOH M, NARA N, TOHDA S.” Effects of combination of notch inhibitor plus hedgehog inhibitor or Wnt inhibitor on growth of leukemia cells.” *Anticancer Res* (2011) 31:893-6.

PARK JT, LI M, NAKAYAMA K, MAO TL, DAVIDSON B, ZHANG Z, et al. “Notch3 gene amplification in ovarian cancer”. *Cancer Res* (2006) 66:6312-8.

PASCA DI MAGLIANO M1, HEBROK M. “Hedgehog signalling in cancer formation and maintenance.” *Nat Rev Cancer.* (2003) 3:903-11.

PRESSEY JG, J.R. ANDERSON, D.K. CROSSMAN, J.C. LYNCH, AND F.G. BARR, “Hedgehog pathway activity in pediatric embryonal rhabdomyosarcoma and undifferentiated sarcoma: A report from the Children's Oncology Group,” *Pediatric Blood and Cancer* (2011) 57:930-938.

PUROW, B. “Notch inhibition as a promising new approach to cancer therapy”. *Advances in Experimental Medicine and Biology* (2012) 727: 305–319.

RADTKE F, WILSON A, STARK G, BAUER M, VAN MEERWIJK J, MACDONALD HR, et al. "Deficient T cell fate specification in mice with an induced inactivation of Notch1". *Immunity* (1999) 10:547-58.

RIDZEWSKI R, RETTBERG D, DITTMANN K, CUVELIER N, FULDA S, HAHN H et al. "Hedgehog Inhibitors in Rhabdomyosarcoma: A Comparison of Four Compounds and Responsiveness of Four Cell Lines." *Frontiers in Oncology* (2015).

RISTORCELLI E, LOMBARDO D. "Targeting Notch signaling in pancreatic cancer". *Expert Opin Ther Targets* (2010) 14:541-52.

ROHATGI R, SCOTT MP. "Patching the gaps in Hedgehog signalling" *Nat Cell Biol.* (2007) 9:1005-9

ROMA J, ALMAZÁN-MOGA A, SÁNCHEZ DE TOLEDO J, GALLEGO S. "Notch, wnt, and hedgehog pathways in rhabdomyosarcoma: from single pathways to an integrated network" *Sarcoma* (2012) 2012:695603.

ROMA J, MASIÀ A, RAVENTÓS J et al. "Notch pathway inhibition significantly reduces Rhabdomyosarcoma invasiveness and mobility in vitro". *Clin Carcer Res.* (2011) 17:505-513.

SANCHEZ-IRIZARRY C, CARPENTER AC, WENG AP, PEAR WS, ASTER JC, BLACKLOW SC. "Notch subunit heterodimerization and prevention of ligand-independent proteolytic activation depend, respectively, on a novel domain and the LNR repeats". *Mol Cell Biol* (2004) 24:9265-9273.

SANTOS L, LEON-GALVAN MF, MARINO-MARMOLEJO EN. "Notch signaling pathway and new strategies in cancer treatment". *Salud Publica Mex.* (2006) 48:155-165.

SCALES SJ, DE SAUVAGE FJ. "Mechanisms of Hedgehog pathway activation in cancer and implications for therapy". *Trends Pharmacol Sci.* (2009) 30:303-12.

SCHRECK K.C, TAYLOR P , MARCHIONNI L. et al., "The Notch target Hes1 directly modulates Gli1 expression and Hedgehog signaling: a potential mechanism of therapeutic resistance," *Clinical Cancer Research* (2010) 16: 6060-6070.

SORENSEN PH, LYNCH JC, QUALMAN SJ, TIRABOSCO R,LIMJF, MAURER HM, et al. "PAX3-FKHR and PAX7-FKHR gene fusions are prognostic indicators in alveolar

rhabdomyosarcoma: a report from the children's Oncology Group." *J Clin Oncol.* (2002) 20:2672-9

TANAKA M, SETOGUCHI T, HIROTSU M, GAO H, SASAKI H, MATSUNOSHITA Y, et al. "Inhibition of Notch pathway prevents osteosarcoma growth by cell cycle regulation." *Br J Cancer* (2009) 100:1975-65.

TEGLUND S, TOFTGARD R. "Hedgehog beyond medulloblastoma and basal cell carcinoma". *Biochim Biophys Acta.* (2010) 1805: 181-208.

THE INSTITUTE OF CANCER RESEARCH (ICR) :

<http://www.icr.ac.uk/our-research/research-divisions/division-of-molecular-pathology/sarcoma-molecular-pathology/research-projects/soft-tissue-sarcoma>

(Consulta: 22 de Julio de 2015)

TOSTAR U, R. TOFTGÅRD, P.G. ZAPHIROPOULOS, AND T. SHIMOKAWA, "Reduction of human embryonal rhabdomyosarcoma tumor growth by inhibition of the hedgehog signaling pathway," *Genes and Cancer* (2010) 1: 941-951.

YAMANAKA H, OUE T, UEHARA S, FUKUZAWA M." Hedgehog signal inhibitor forskolin suppresses cell proliferation and tumor growth of human rhabdomyosarcoma xenograft". *J Pediatr Surg.* (2011) 46:320-5.

ZANOTTI S, CANALIS E. "Notch and skeleton." *Mol Cell Biol* (2010) 30:886-896.

ZHANG P, YANG Y, ZWEIDLER-MCKAY PA, HUGHES DP. "Critical role of Notch signaling in osteosarcoma invasion and metastasis" *Clin Cancer Res* (2008) 14:2962-9.

ZIBAT A, E. MISSIAGLIA, A. ROSENBERGER et al. "Activation of the hedgehog pathway confers a poor prognosis in embryonal and fusion gene-negative alveolar rhabdomyosarcoma," *Oncogene* (2010) 29:6323-6330.