



**EXPRESIÓN DE FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN TCF7L2  
DURANTE LA DIFERENCIACIÓN *IN VITRO* DE CÉLULAS DE  
NEUROBLASTOMA INDUCIDA POR EL ÁCIDO RETINOICO**

Departamento de Ciencias Básicas. Facultad de Medicina y Ciencias de la Salud.

Programa de doctorado: Investigación en Salud.

**Universitat Internacional de Catalunya**

TESIS DOCTORAL

Lourdes Navarro Martínez

2017

Director

Pau Mezquita Mas



# AGRADECIMIENTOS

Hace cinco años acabé el máster de Biomedicina muy ilusionada con la expectativa de seguir en la investigación. Gracias a que mi entonces director de Tesina supo transmitirme la pasión por este trabajo. Fue cuando estaba finalizando el máster, en uno de mis viajes desde el CEK al estabulario cuando vi la oferta para la posición predoctoral que se ofrecía en el grupo de mi ahora director de tesis el Dr. Pau Mezquita. Mediante el intercambio de un par de correos electrónicos y un par de entrevistas pasé a formar parte del equipo de la UIC. Estoy muy agradecida por la confianza que el Dr. Mezquita depositó en mí, como también lo estoy por el tiempo dedicado a plantear y diseñar experimentos y por comprenderme en los momentos de frustración. Son incalculables los conocimientos y aptitudes que he adquirido bajo su dirección.

Agradezco también a los Dres. Cristóbal Mezquita, Belén Mezquita, Jovita Mezquita y también a Montserrat Pau por los grandes consejos y conocimientos proporcionados, también por el tiempo dedicado a la presente tesis y el apoyo recibido cuando los resultados no salían.

Agradezco al entonces director de departamento el Dr. Josep Clotet y a la actual directora la Dra. María Fernández-Capo por dedicarme su tiempo y gestionar todo lo necesario para que yo haya podido llevar mi doctorado en la UIC.

Hago extensible el agradecimiento a todos los miembros administrativos que me atendieron y que nos han ayudado con la burocracia durante estos años, entre otros se puede destacar a Beatriz Sitjes y Sonia Soriano que siempre me han atendido de manera

eficiente y muy amable. También a los entonces secretarios de la facultad Carlos Velilla y a María Ponce.

Estoy muy agradecida a todo el departamento de Ciencias Básicas por ser tan amables, serviciales y divertidos. En especial a mis compañeros más cercanos Laura Gasa, María Gámiz, Juan Carlos Martín, Albert Pérez, Cristina Lidón, Silvia Recoder, Nuria Matilla, Carles Escalona, Bernat Torres, Pilar Gual e Ignacio MacPherson, que más que compañeros son amigos que me han apoyado en todo y me han hecho crecer como profesora y persona. Quiero también resaltar el apoyo recibido por la doctora Marian Lorente.

Me gustaría también agradecer a mis alumnos de la Fundación Marcet por sacarme mil sonrisas y ser tan cariñosos. Gracias a ellos los días duros acaban siendo días bonitos.

Agradezco a toda mi familia el apoyo moral, en especial a mis padres que han puesto mucho esfuerzo para que yo hoy en día pueda estar escribiendo una tesis doctoral.

Por último gracias a mi pareja, Kossi A. Gbama, que me ha sido el apoyo fundamental durante los últimos cuatro años, aportándome madurez y comprensión. Gracias por admirarme tanto y valorar todo lo que hago.

# ÍNDICE DE CONTENIDO

1. Resumen	7
2. Introducción	9
2.1. Factores de transcripción TCF7L2	9
2.2. Función de los factores de transcripción TCF7L2 en la vía Wnt canónica	11
2.3. Funciones de los factores de transcripción TCF7L2 durante el desarrollo del sistema nervioso en el embrión y en el organismo adulto	14
2.4. Funciones de los factores de transcripción TCF7L2 en las células tumorales	16
2.5. Líneas celulares de neuroblastoma como modelo experimental de diferenciación neuronal	17
2.6. Diferenciación de células de neuroblastoma SH-SY5Y inducida por retinoides	18
2.7. Ácido retinoico y TCF7L2	22
3. Hipótesis de trabajo y objetivos	23
4. Materiales y métodos	25
4.1. Líneas celulares: cultivo y diferenciación	25
4.2. Extracción de proteínas	26
4.2.1. Cuantificación de proteínas por el método de Bradford	27
4.3. Análisis de proteínas <i>Western blot</i> (WB)	28
4.3.1. Electroforesis en gel de poliacrilamida	28
4.3.2. Transferencia de las proteínas a una membrana de polivinilo	32

4.3.3. Marcaje inmunológico	34
4.4. Extracción de RNA	37
4.5. Análisis de transcritos RNA	39
4.5.1. Síntesis de cDNA	39
4.5.2. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	40
4.5.3. PCR a tiempo real	42
4.5.4. RACE 5'	44
4.5.5. <i>Northern Blot</i>	49
4.6. Clonación TOPO TA	59
4.6.1. Reacción de transformación	59
4.6.2. Obtención de clones	60
4.6.3. Mini preparaciones de plásmido	61
4.7. Silenciamiento	62
4.8. Estudio de la supervivencia celular.	63
5. Resultados	65
5.1. Inducción de la diferenciación de células SH-SY5Y con ácido retinoico.	65
5.2. Cambios en la expresión de las proteínas TCF7L2 durante la diferenciación de células SH-SY5Y.	66
5.3. Cambios en la expresión de los transcritos de <i>TCF7L2</i> durante la diferenciación de células SH-SY5Y.	69

5.4. Caracterización de posibles isoformas de TCF7L2 sin el dominio de unión a la $\beta$ -catenina (formas dominante negativas) durante la diferenciación de células SH-SY5Y inducida por ácido retinoico.	70
5.5. Caracterización de la banda de 40kDa inducida durante la diferenciación de células SH-SY5Y con ácido retinoico.	72
5.6. Cuantificación de la expresión relativa de isoformas con y sin dominio $\beta$ -catenina durante la diferenciación de las células SH-SY5Y inducida por ácido retinoico.	74
5.7. Cambios en la capacidad de supervivencia de las células SH-SY5Y durante la diferenciación inducida por ácido retinoico y después de la interferencia con siRNA de distintos transcritos de TCF7L2.	75
5.8. Expresión y actividad de las cinasas c-Src y YAP durante la diferenciación de células de SH-SY5Y inducida por ácido retinoico.	77
6. Discusión	81
6.1. Inducción de la diferenciación de células SH-SY5Y tras la exposición a ácido retinoico.	81
6.2. Cambios en la expresión de los factores de transcripción TCF7L2 durante la diferenciación de células SH-SY5Y inducida por ácido retinoico.	82
6.3. Cambios de expresión de los factores de transcripción TCF7L2 y actividad de la vía de señalización Wnt canónica.	83
6.4. Expresión de isoformas dominante negativas de TCF7L2 durante la diferenciación de células SH-SY5Y inducida por ácido retinoico.	84

6.5. Expresión diferencial de isoformas de TCFL2 con y sin dominio de unión de la $\beta$ -catenina durante la diferenciación de células SH-SY5Y inducida por ácido retinoico.	85
6.6. Cambios en la supervivencia de las células SH-SY5Y durante la diferenciación inducida por ácido retinoico y tras el silenciamiento de la expresión de los factores de transcripción TCF7L2 dominante negativos.	86
6.7. Actividad del eje Src-YAP durante la diferenciación de las células SH-SY5Y inducida por ácido retinoico.	87
6.8. Ácido retinoico, factores de transcripción TCF7L2 y enfermedades psiquiátricas.	88
7. Conclusiones	91
8. Aportación científica	93
9. Bibliografía	94
10. Anexos	109
Anexo I: <i>Primers</i>	109
Anexo II: Sonda para <i>Northern Blot</i>	110
Anexo III: RACE	111
Anexo IV: Silenciamiento	112
Anexo V: Plásmidos	114



## ÍNDICE DE IMÁGENES

Figura 1: Intervención de TCF7L2 y Src-YAP en la diferenciación de las células SH-SY5Y	8
Figura 2: Heterogeneidad de los transcritos del gen <i>TCF7L2</i>	11
Figura 3: Vía canónica Wnt/ $\beta$ -catenina	12
Figura 4: Secuencia de unión de los factores de transcripción TCF7L2 con la $\beta$ -catenina	13
Figura 5: Bloqueo de la vía Wnt/ $\beta$ -catenina canónica mediante las isoformas dominante negativas de TCF7L2 (TCF7L2dn)	14
Figura 6: Transporte del retinol y síntesis, acción y catabolismo del ácido retinoico	20
Figura 7: Protocolo de diferenciación de las células SH-SY5Y	26
Figura 8: Diferenciación de la línea SH-SY5Y inducida por restricción de FBS y por la presencia de ácido retinoico	66
Figura 9: Expresión de los factores de transcripción de TCF7L2 durante la diferenciación de células SH-SY5Y inducida por ácido retinoico	68
Figura 10: Expresión de los transcritos de <i>TCF7L2</i> durante la diferenciación de células SH-SY5Y inducida por ácido retinoico	69
Figura 11: Iniciación alternativa de la transcripción de <i>TCF7L2</i> determinada por RACE 5' en células SH-SY5Y diferenciadas con ácido retinoico	71
Figura 12: Efecto del silenciamiento de las isoformas dominante negativas ID30 y de todas las isoformas de TCF7L2 en células SH-SY5Y diferenciadas con ácido retinoico	73

Figura 13: Expresión relativa de los transcritos de <i>TCF7L2</i> durante la diferenciación de células SH-SY5Y inducida por ácido retinoico	75
Figura 14: Cambios en la supervivencia en células SH-SY5Y diferenciadas con ácido retinoico y mediante el silenciamiento de la familia de isoformas ID30	76
Figura 15: Cambios en la actividad y expresión de la cinasa c-Src en células SH-SY5Y tras la exposición a ácido retinoico	78
Figura 16: Cambios en la actividad y expresión de la cinasa YAP en células SH-SY5Y tras la exposición a ácido retinoico	79

## 1. RESUMEN

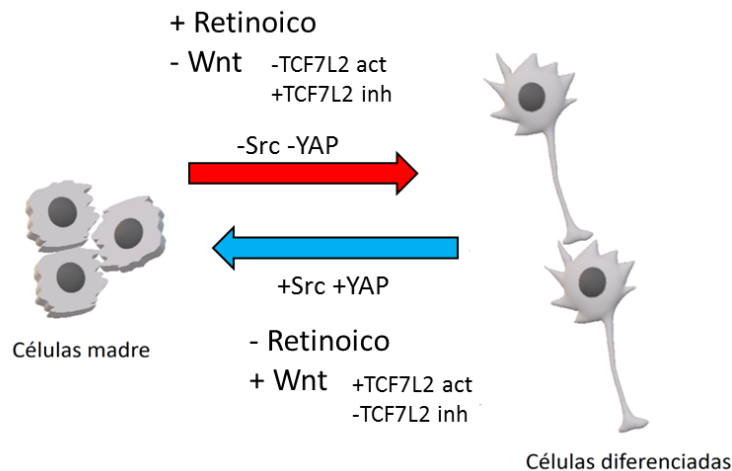
Las proteínas TCF7L2 (transcription factor 7-like 2) son un conjunto de factores de transcripción que participan en la vía Wnt y son responsables, entre otras funciones, del mantenimiento de las células madre y la formación de conexiones sinápticas. Las proteínas TCF7L2 están codificadas por el gen *TCF7L2*, cuya expresión da lugar a una gran diversidad de transcritos como consecuencia de la iniciación, la terminación o el *splicing* alternativos. Estos transcritos dan lugar a múltiples isoformas de proteína con distintas funciones. Entre las isoformas de TCF7L2 destacan las variantes que carecen de la región de unión a la  $\beta$ -catenina, proteína que actúa como coactivador indispensable de los factores de transcripción TCF7L2. Dichas variantes actúan como dominante negativas (TCF7L2dn) puesto que poseen la capacidad de bloquear la vía de señalización Wnt.

El ácido retinoico, un derivado de la vitamina A, es una molécula promotora de la diferenciación celular indispensable para el desarrollo fetal, en particular del sistema nervioso. En este trabajo hemos analizado el efecto del ácido retinoico sobre la expresión de TCF7L2 en la línea celular de neuroblastoma SH-SY5Y, utilizada como un modelo de diferenciación de células neurogénicas. Hemos observado que la exposición durante 6 días de células SH-SY5Y a las dosis supra-fisiológicas de ácido retinoico utilizadas habitualmente para la inducción de diferenciación, disminuye la expresión de proteína TCF7L2 activadoras de la vía Wnt e incrementa la proporción relativa de transcritos dominante negativos (TCF7L2dn), que carecen de la región de unión  $\beta$ -catenina y bloquean la vía Wnt. Este efecto se acompaña de una disminución de la supervivencia de las células SH-SY5Y sometidas a la acción del ácido retinoico cuando no es contrarrestado por un

incremento de actividad de la vía Src-YAP, que aumenta por la acción del ácido *retinoico* en algunas células transformadas.

La disminución de factores de transcripción TCF7L2 activadores de la vía Wnt, y el aumento de factores de transcripción TCF7L2 inhibidores de la vía Wnt, junto a la falta de activación de la vía Src-YAP en células de neuroblastoma tras la exposición al ácido retinoico, se acompaña de una disminución de la supervivencia y explicaría las ventajas de la utilización de esta molécula para evitar las recidivas en el tratamiento del neuroblastoma.

Por otra parte, dada la relevancia de la expresión de los factores de transcripción TCF7L2 en la formación de conexiones sinápticas y su posible implicación en la esquizofrenia, nuestras observaciones sobre la modulación de la expresión de los factores de transcripción TCF7L2 por el ácido retinoico podría relacionarse con los efectos observados en la terapia con retinoides de esta enfermedad. La figura 1 muestra el resumen gráfico de los resultados obtenidos.



**Figura 1: Intervención de TCF7L2 y Src-YAP en la diferenciación de las células SH-SY5Y.**

## 2. INTRODUCCIÓN

### 2.1. FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN TCF7L2

Los factores TCF7L2 (*transcription factor 7-like 2*) son una familia de factores de transcripción codificados por el gen *TCF7L2* (cromosoma 10, posición 25.3q) que participan como eslabones nucleares de la vía canónica Wnt, una vía de señalización implicada en la regulación de la proliferación, la migración, la polaridad y la diferenciación celular durante el desarrollo embrionario y en el individuo adulto. Los factores TCF7L2 pertenecen a la familia de proteínas de unión al DNA LEF1/TCF, que en mamíferos consta de cuatro miembros: TCF7, TCF7L1, TCF7L2 y LEF1 (Arce et al., 2006; Archbold et al., 2012). Los tres primeros se conocen también como TCF1, TCF3 y TCF4, respectivamente. Sin embargo, debido a que la denominación TCF4 se aplica también a una proteína codificada por un gen distinto, utilizaremos en lo sucesivo la denominación TCF7L2 para referirnos a los factores de transcripción.

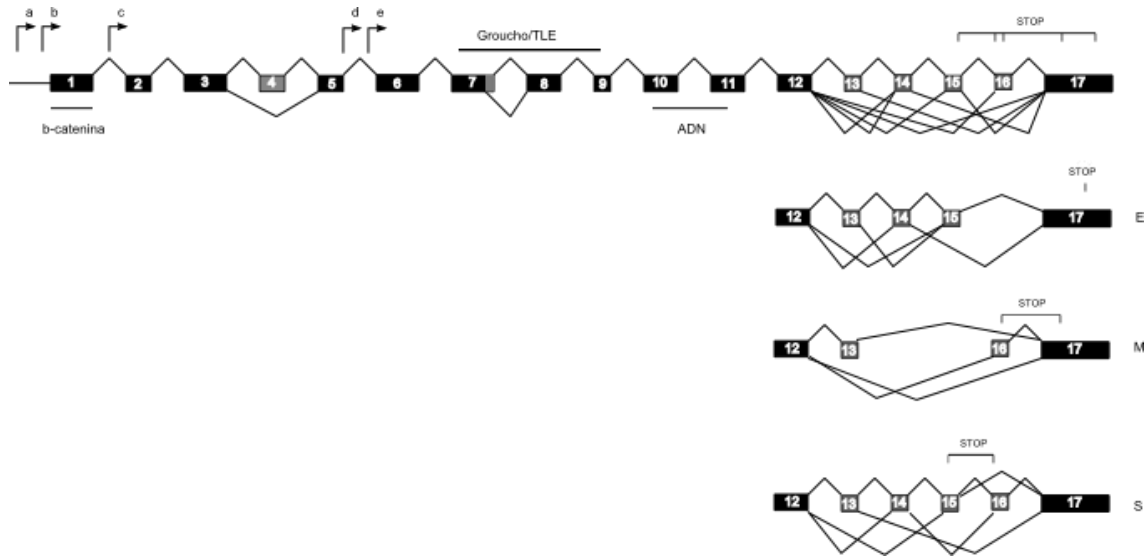
Los transcritos del gen *TCF7L2* presentan multitud de variantes que resultan de la iniciación o la terminación alternativas, o bien del *splicing* alternativo (Fig. 2) (Arce et al., 2006; Prokunina-Olsson et al., 2009; Struewing et al., 2010; Vacik et al., 2011; Weise et al., 2009; Archbold et al., 2012).

Las proteínas de la familia LEF1/TCF contienen un dominio de unión a la  $\beta$ -catenina en la región N-terminal y un dominio HMG (*High Mobility Group*) en la parte central de la molécula. Este último reconoce la secuencia del DNA denominada *elemento de respuesta Wnt* (WRE) (van de Wetering et al., 1997; van Beest et al., 2000; Barolo 2006; Hallikas et

al., 2006; Chang et al., 2008). Aunque las proteínas de la familia LEF1/TCF muestran similitud de secuencias en los dominios mencionados, tienen diferentes especificidades al unirse a los promotores.

Existen isoformas a las que les falta el dominio de unión de la  $\beta$ -catenina y actúan como dominante negativas (Roose et al., 1999; Hovanes et al., 2000). Otro grupo resulta del *splicing* alternativo de los exones de la región C-terminal que codifican un dominio de unión al ADN denominado C clamp (Van de Wetering et al., 1996; Duval et al., 2000; Hovanes et al., 2000; Nazwar et al., 2009; Weise et al., 2010; Vacik et al., 2011). Este dominio se une a una secuencia rica en GCs, la denominada *TCF-helper sequence*, localizada a un lado u otro de la secuencia WRE. La secuencia C clamp aumenta de forma muy notable la afinidad de la proteína al ADN y determina la transcripción diferencial de un grupo de genes (Hovanes et al., 2001; Hecht and Stemmler 2003; Atcha et al., 2007; Chang et al., 2008; Hoverter et al., 2012). Por último, otros *splicing* alternativos pueden modificar las propiedades de las proteínas LEF1/TCFs y cambiar su actividad represora o activadora (Gradl et al., 2002; Liu et al., 2005; Ghogomu et al., 2006), además de determinar una especificidad de genes diana concretos para distintos tipos tisulares (Wallmen, Schrempp y Hecht, 2012).

Las isoformas de TCF7L2 denominadas E (Figura 2) muestran un peso molecular comprendido entre 75 y 95 kDa, y poseen la secuencia de unión al ADN denominada C-clamp. Otra población de isoformas llamadas S y M (Figura 2) son más cortas, de pesos moleculares comprendidos entre 55 y 65 kDa y no contienen la secuencia C-clamp (M) o contienen parte de ella (S). Las isoformas grandes (E) muestran mayor actividad en la transcripción que las pequeñas (M/S) (Weise y cols, 2009).

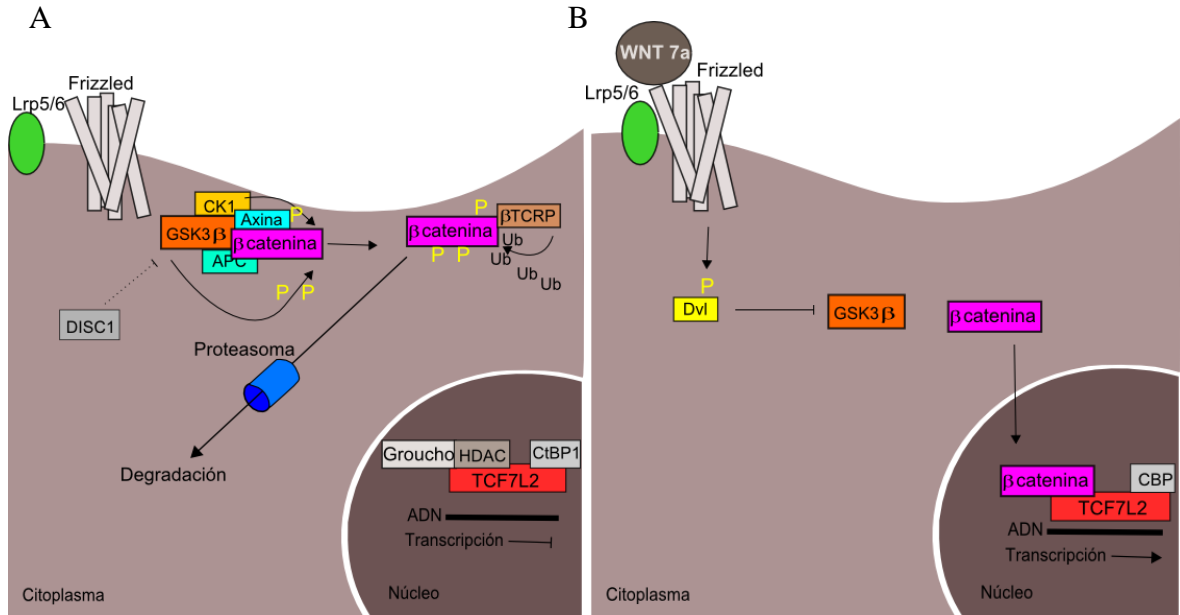


**Figura 2. Heterogeneidad de los transcritos del gen *TCF7L2*.** Las flechas con letras minúsculas indican inicios alternativos (a, b y c: Prokunina-Olsson et al., 2009; d y e; Vacik et al., 2011). Las letras E, M y S indican terminaciones alternativas del transcrito (Weise et al., 2010 y NCBI GeneBank GeneID: 6934).

## 2.2. FUNCIÓN DE LOS FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN *TCF7L2* EN LA VÍA WNT CANÓNICA

Las proteínas LEF1/TCFs, de las que forman parte el grupo de factores de transcripción *TCF7L2*, participan en la vía de señalización Wnt canónica. Los factores Wnt son glicoproteínas que se unen a receptores de la membrana celular denominados Frizzled (Mikels, y Nusse, 2006). Los mamíferos presentan más de 16 tipos distintos de Wnt y 10 tipos distintos de receptores Frizzled, involucrados en una gran variedad de vías celulares, una de las cuales es la vía canónica de Wnt (van Amerongen y Nusse, 2009). La inducción de esta vía inhibe la degradación de la  $\beta$ -catenina y, en consecuencia, la  $\beta$ -catenina se acumula en el citoplasma y experimenta translocación al núcleo, donde se une a

la familia de proteínas LEF1/TCF y desencadena la transcripción de un conjunto de genes (Angers and Moon 2009; MacDonald et al., 2009; Archbold et al., 2012) (Figura 3).



**Figura 3. Vía canónica Wnt/β-catenina.** **A:** En ausencia del ligando Wnt la β-catenina se degrada en el proteasoma (Ikeda et al., 2009). **B:** En presencia del ligando Wnt la β-catenina entra al núcleo interacciona con TCF7L2, los represores (Groucho, HDAC y CtBP1) se desacoplan y se inicia la transcripción de los genes diana (MacDonald, Tamai y He, 2009). La proteína DISC1 (*Disrupted In Schizophrenia 1*) inhibe la glucógeno sintetasa cinasa beta (GSK3β) responsable del catabolismo de la β-catenina en el proteasoma. La inhibición de esta cinasa promueve la translocación nuclear de la β-catenina.

Los factores de transcripción TCF7L2 pueden activar la vía de señalización Wnt canónica, tal como se ha comentado anteriormente, pero pueden también bloquearla cuando actúan las isoformas dominante negativas desprovistas del sitio de unión de la β-catenina. Las isoformas dominante negativas de TCF7L2 (TCF7L2dn) son incapaces de interactuar con la β-catenina ya que carecen del dominio de unión. La secuencia mínima de los factores de transcripción TCF7L2 necesaria para la interacción con la β-catenina se sitúa entre los aminoácidos 13 y 31, tanto en los TCF7L2 humanos como en los de ratón. Hay 2 aminoácidos críticos para la interacción con la β-catenina: el aspártico de la posición



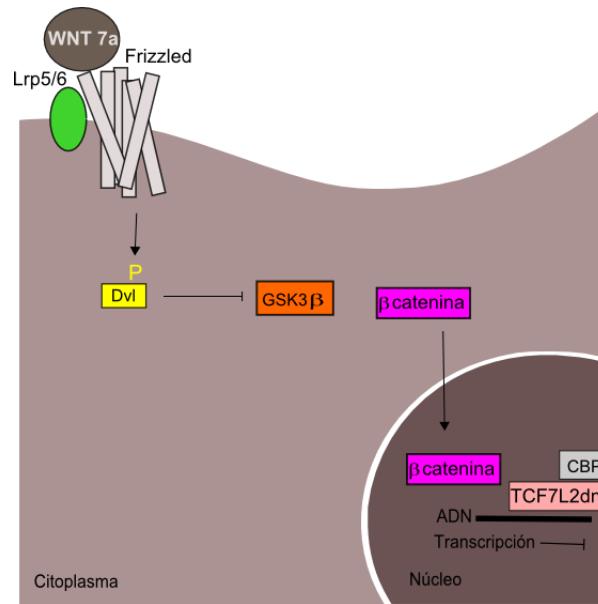
16 y la leucina en la posición 48, y una secuencia formada por varios glutámicos, del aminoácido 24 al 29 (Graham et al., 2001) (Figura 4).



**Figura 4. Secuencia de unión de los factores de transcripción TCF7L2 con la  $\beta$ -catenina.** La secuencia muestra los primeros 52 aminoácidos del extremo N-terminal. Se señalan en rojo los aminoácidos críticos para la unión de la  $\beta$ -catenina.

En presencia de isoformas dominante negativas de TCF7L2, a pesar de que el ligando Wnt está presente e interacciona con Frizzled, lo que desencadena la secuencia de acontecimientos habitual, una vez la  $\beta$ -catenina llega al núcleo no puede activar la vía de transcripción, por lo que esta vía permanece bloqueada (Figura 5).

En el encéfalo del embrión de ratón se han descrito cuatro transcritos de *TCF7L2dn*, los denominados 1b, 1c, 1d y 1e que tienen el sitio de iniciación en el intrón 5 del gen y carecen, por lo tanto, del dominio de unión de la  $\beta$ -catenina (Vacik et al., 2011). Actúan como represores de la transcripción de los genes diana de TCF7L2 (Vacik et al., 2011). Las formas dominante negativas predominarían durante el desarrollo embrionario, mientras que en estadios postnatales dominan las formas activas, sugiriendo así un papel importante de TCF7L2dn en la maduración neuronal durante el desarrollo (Nagalski et al., 2012).



**Figura 5: Bloqueo de la vía Wnt/ $\beta$ -catenina canónica mediante las isoformas dominante negativas de TCF7L2 (TCF7L2dn).** La  $\beta$ -catenina puede entrar en el núcleo, pero no puede unirse a los factores de transcripción TCF7L2dn que carecen del sitio de unión de la  $\beta$ -catenina. En consecuencia, la transcripción de los genes diana no se produce y la vía resulta bloqueada.

### 2.3. FUNCIONES DE LOS FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN TCF7L2 DURANTE EL DESARROLLO DEL SISTEMA NERVIOSO EN EL EMBRIÓN Y EN EL ORGANISMO ADULTO

La vía canónica Wnt controla el desarrollo embriológico de los diferentes sistemas del organismo, incluido el sistema nervioso (McMahon et al., 1992; Galceran et al., 2000; Mukhopadhyay et al., 2001; Maretto et al., 2003; Logan and Nusse 2004; Zhou et al., 2004; Ciani and Salinas 2005; Grigoryan et al., 2008; Petersen and Reddien 2009; Freese et al., 2010; Niehrs 2010). La transcripción de *TCF7L2* es elevada en el tálamo durante la embriogénesis y durante el período perinatal y disminuye luego, aunque sigue expresándose en el adulto. En el adulto, la actividad de la vía Wnt queda restringida a las células madre y a las células progenitoras (Maretto et al., 2003; Haegebarth y Clevers

2009; Wend et al., 2010). Se ha detectado señalización Wnt en las neuronas progenitoras de la zona subgranular del hipocampo (Lie et al., 2005; Kuwabara et al., 2009).

Durante el desarrollo del sistema nervioso tiene lugar la diferenciación de las células progenitoras en diferentes tipos de neuronas (Jessell y Sanes, 2000) que a continuación migran hacia regiones más superficiales del tubo neural y emiten axones que establecen conexiones sinápticas específicas con otras neuronas formando los circuitos neuronales. Recientemente se ha demostrado que los factores de transcripción *TCF7L2* resultan esenciales en la diferenciación de las neuronas talámicas y de la habénula (Lee et al., 2017). El tálamo integra y procesa información sensorial y motora estableciendo conexiones con la corteza cerebral. La habénula modula los circuitos dopaminérgicos y serotoninérgicos implicados en las emociones. En ausencia de *TCF7L2* los axones eferentes del tálamo, denominados axones talamo-corticales, no experimentan una elongación normal. De igual forma, los axones eferentes de la habénula faltan en ausencia de *TCF7L2*. Los factores de transcripción *TCF7L2* resultan esenciales para la adquisición del fenotipo característico de las neuronas talámicas y de las neuronas de la habénula (Lee et al., 2017).

La función de los factores *TCF7L2* en el desarrollo del sistema nervioso y en el sistema nervioso del organismo adulto, ha motivado la investigación de este grupo de factores de transcripción en las enfermedades psiquiátricas. Del mismo modo que variantes del gen *TCF7L2* se consideran un factor de riesgo de la diabetes tipo 2 (Grant et al., 2006), las variantes del gen se han relacionado también con el riesgo de esquizofrenia (Hansen et al., 2011; Alkelai et al., 2012).

La haploinsuficiencia del gen *TCF7L2* provoca un fenotipo de ansiedad en los ratones (Savic et al., 2011), lo que sugiere la posible implicación de las proteínas TCF7L2 en trastornos psiquiátricos. Otros componentes de la vía de señalización Wnt están asociados con la susceptibilidad a la esquizofrenia (Cui et al., 2005; Kishimoto et al., 2008; Proitsi et al., 2008; Li et al., 2011) y muchas proteínas mutadas en el autismo esporádico son parte de la vía de la  $\beta$ -catenina (O’Roak et al., 2012). Como se ha indicado anteriormente, los factores de transcripción TCF7L2 regulan genes que codifican proteínas implicadas en el fenotipo de las células talámicas, una de las regiones que presenta características anormales en la esquizofrenia (Byne et al., 2009; Cronenwett y Csernansky 2010; Pinault 2011; Guller et al., 2012).

### **2.4. FUNCIONES DE LOS FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN TCF7L2 EN LAS CÉLULAS TUMORALES**

En células de cáncer de mama triple negativo, los factores de transcripción TCF7L2 promueven el fenotipo característico de las células madre tumorales (*stemness*) y la formación de metástasis induciendo la transcripción de la proteína LIN28B (Chen et al., 2015). A su vez, esta proteína se une a los mensajeros de *TCF7L2* y aumenta su traducción. De esta manera se establece un *feedback* positivo que contribuye a mantener el fenotipo indiferenciado e invasivo en células madre de cáncer de mama triple negativo (Chen et al., 2015).

En células de cáncer de colon (células LoVo) el aumento de la capacidad de supervivencia frente a la quimioterapia implica la activación de la vía de señalización Wnt con una marcada fosforilación de la  $\beta$ -catenina y un aumento de la expresión de las

proteínas TCF7L2 (Mezquita et al., 2016). De las diferentes variantes de *splicing* generadas en la transcripción del gen *TCF7L2* la denominada TCF7L2E es la que experimenta un mayor incremento cuando las células adquieren resistencia a la quimioterapia. Tanto la cantidad global de TCF7L2E como la cantidad de TCF7L2E unida a la  $\beta$ -catenina aumentan en las células resistentes. La inhibición de expresión de TCF7L2 mediante RNA de interferencia disminuye la viabilidad de las células de cáncer de colon resistentes a la quimioterapia (Mezquita et al., 2016).

## **2.5. LÍNEAS CELULARES DE NEUROBLASTOMA COMO MODELO EXPERIMENTAL DE DIFERENCIACIÓN NEURONAL**

La implicación de los factores de transcripción TCF7L2 en el desarrollo del sistema nervioso y la observación de que la actividad de la vía Wnt queda restringida en el adulto a las células madre y a las células progenitoras (Maretto et al., 2003; Haegebarth y Clevers 2009; Wend et al., 2010) sugiere la importancia de los factores de transcripción TCF7L2 en estas células. Para investigar cómo cambia la expresión de los factores de transcripción TCF7L2 durante la transición de células madre y células progenitoras a células diferenciadas hemos utilizado la línea celular de neuroblastoma SH-SY5Y.

El neuroblastoma es un tumor característico de la infancia derivado de células precursoras o inmaduras. Estas neuronas en el proceso fisiológico de maduración dan lugar a neuronas diferenciadas del sistema nervioso simpático. Desde el punto de vista clínico el pronóstico de los neuroblastomas es muy variable según sea su grado de diferenciación, desde los que evolucionan de forma relativamente benigna a los extremadamente malignos (Brodeur, 2003). Los mecanismos implicados en la diferenciación de las células madre y

las células progenitoras de los neuroblastomas a células diferenciadas constituyen un tema central para mejorar el tratamiento de este tipo de tumores. Por otra parte, las alteraciones de los mecanismos de diferenciación durante la neurogenesis tienen importantes implicaciones en otras enfermedades del sistema nervioso.

Las células del neuroblastoma son células indiferenciadas, redondas, de pequeño tamaño, y con escaso citoplasma. Cushing y Wolbach (1927) sugirieron por primera vez que los neuroblastomas podían experimentar en algunos casos diferenciación espontánea. El trabajo pionero de Biedler y Seeger (1973) y muchos otros permitió establecer líneas de neuroblastoma y estudiar los mecanismos de diferenciación neuronal.

La primera demostración de diferenciación celular del neuroblastoma in vitro y la más importante conceptualmente se estableció utilizando células SH-SY5Y que respondían con cambios morfológicos y bioquímicos a la acción de los ésteres de forbol (Påhlman et al., 1981). La inducción de prolongaciones (neuritas) en las células que experimentaban diferenciación se acompañaba de un aumento de la síntesis de noradrenalina y de la aparición de una enolasa específica de las neuronas. Como agentes de diferenciación se han utilizado retinoides y factor de crecimiento nervioso. El mayor impacto clínico corresponde a la utilización de retinoides naturales o sintéticos, aunque su mecanismo de acción aún es objeto de investigación (Reynolds et al., 2003).

### **2.6. DIFERENCIACIÓN DE CÉLULAS DE NEUROBLASTOMA SH-SY5Y INDUCIDA POR RETINOIDES**

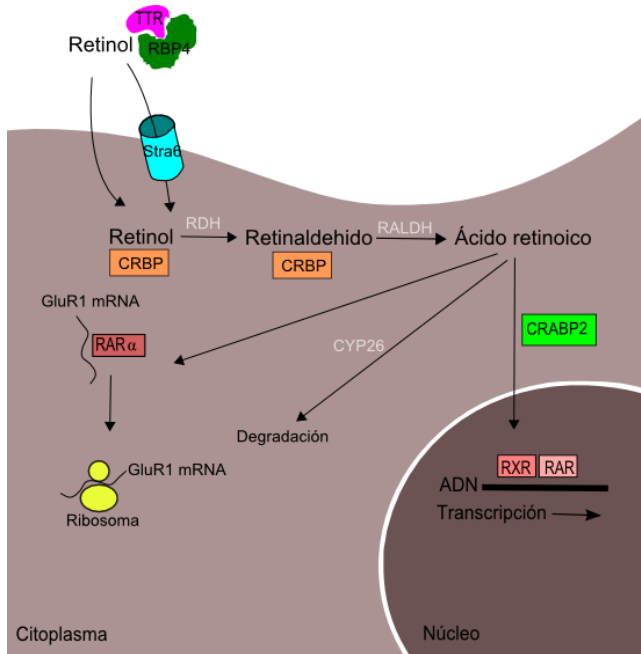
El ácido retinoico es un producto metabólico de la vitamina A (retinol) que juega un papel esencial durante el desarrollo y en el organismo adulto, en el que es responsable de

funciones como la visión, el sistema inmunitario, la fertilidad y la plasticidad neuronal (Jacobs et al., 2006).

El retinol no se sintetiza en el organismo y es un componente de la dieta que se almacena en forma de ésteres de retinil en el hígado, pulmones, medula ósea y riñones (Maden, 2007). Desde estos reservorios el retinol se dirige, mediante las proteínas transportadoras RBP4 y la transtiretina (TTR) a los tejidos periféricos donde lleva a cabo su función. El retinol puede entrar en las células por difusión o bien con la ayuda de los receptores STRA 6. En el citoplasma se une a proteínas como la CRBP o a enzimas RAH y RALDH que lo transforman en ácido retinoico (Figura 6).

Los efectos biológicos del ácido retinoico se producen regulando la transcripción a través de receptores nucleares (Rastinejad, 2001) o a través de mecanismos independientes de la transcripción. Los receptores del ácido retinoico son los RAR ( $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ ) a los cuales se unen el *holo-trans* ácido retinoico y el 9-cis ácido retinoico, y los receptores RXR ( $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ ), que responden solamente al 9-cis ácido retinoico pero también a otros ligandos no lipídicos. RAR y RXR forman heterodímeros unidos a secuencias específicas del ADN llamadas RARE (*retinoic acid response element*) y controlan la expresión de un gran número de genes (Bremner y McCaffery, 2008).

Entre las acciones del ácido retinoico independientes de la transcripción cabe destacar la unión del receptor RAR $\alpha$ -retinoico al RNA mensajero de la proteína GluR1 permitiendo su traducción en el ribosoma (Lerner, McCaffery y Ritsner, 2016). GluR1 es un receptor ionotrópico transmembrana del glutamato implicado en la transmisión excitadora sináptica del sistema nervioso central (Shi et al., 1999).



**Figura 6. Transporte de retinol y síntesis, acción y catabolismo del ácido retinoico.** El retinol entra en las células a través de la proteína Stra6 o bien por difusión. En el citoplasma se une a la proteína CRBP. La enzima RDH lo convierte en retinaldehído y éste es convertido a ácido retinoico mediante la enzima RALDH. Después puede ir a núcleo acompañado de la proteína CRABP2 y unirse a los receptores nucleares RAR y RXR y activar la transcripción de una serie de genes. En el citoplasma la interacción del retinoico con el receptor RAR $\alpha$  promueve la traducción de determinados mensajeros como el que codifica GluR1. El retinoico en el citoplasma puede ser también degradado por CYP26 (Lerner et al., 2016).

Otras acciones del ácido retinoico independientes de la transcripción consisten en la activación de cinasas esenciales para la supervivencia, como la PI3K (Rossetti et al., 2016) y la c-Src (Mezquita et al., 2017, enviado para publicación).

En las células de neuroblastoma el ácido retinoico induce la diferenciación, pero los mecanismos de acción implicados solo se conocen parcialmente. Aunque el neuroblastoma puede curarse con el tratamiento quirúrgico y la quimioterapia, a veces no son eliminadas todas las células del tumor y las que resisten el tratamiento y sobreviven provocan recaídas. En los neuroblastomas avanzados, para evitar las recaídas después de la quimioterapia, se realiza un tratamiento con ácido 13-cis-retinoico. Aunque el tratamiento resulta efectivo en la mitad de los casos, aún mueren la otra mitad de los niños, por causas que se desconocen



(Matthay et al., 2009). Para curar la enfermedad, es necesario conocer mejor el mecanismo de acción del retinoico, lo que permitirá utilizar terapias combinadas, potencialmente más efectivas.

El ácido retinoico puede inducir el proceso de diferenciación de las células madre y de las células progenitoras, pero también puede inducir la supervivencia y el fenotipo invasivo que es característico de las células madre. El resultado final dependería del balance entre las acciones pro-supervivencia y pro-invasiva del ácido retinoico (Rossetti et al., 2016; Mezquita et al., 2017) y las acciones anti-invasivas y pro-apoptóticas que también ejerce el ácido retinoico (Mezquita et al., 2010, 2014; Rossetti et al., 2016).

Diferentes líneas de neuroblastoma (SH-SY5Y, IMR32, RT-BM-1, CHP134, NLF, and LA-N-5) tratadas con el inhibidor de Src PP2 (0.1-10  $\mu$ M) experimentan una drástica agregación, apoptosis y disminución de la proliferación (Hishiki et al., 2011). La cinasa Src se sobreexpresa en el neuroblastoma avanzado, habiéndose determinado un aumento de entre 20 y 40 veces más de pp60c-src en este tipo celular que en otros glioblastomas o fibroblastos (Bolen, Rosen y Israel, 1985), por lo que constituye una importante diana terapéutica en la prevención de metástasis (Kratimenos et al., 2014; Palacios-Moreno et al., 2015; Tintori et al., 2015). Por lo contrario, la inhibición de la familia de cinasas Src aumenta la expresión de los genes inducidos por ácido retinoico y promueve la diferenciación de las células mieloides en la leucemia promielocítica humana (Miranda et al., 2007; Yoon et al., 2013; Jung et al., 2013; Jensen et al., 2013, 2015).

## 2.7. ÁCIDO RETINOICO Y TCF7L2

La relación entre el ácido retinoico y los factores de transcripción TCF7L2 ha sido investigada en células de cáncer de colon. En estas células el ácido retinoico disminuye la actividad de la vía de señalización  $\beta$ -catenina–LEF/TCF. Se ha postulado que la  $\beta$ -catenina interacciona directamente con el receptor RAR-RA, de modo que RAR competiría con TCF por la unión de la  $\beta$ -catenina (Easwaran et al., 1999).

En otro modelo experimental, en células totipotentes F9 de teratocarcinoma, la vía de señalización  $\beta$ -catenina/Lef-Tcf es activada en respuesta al ácido retinoico durante la formación del endodermo primitivo (Liu et al., 2002).

La ausencia de trabajos previos relativos a la acción del ácido retinoico sobre la expresión de los factores de transcripción TCF7L2 en células de neuroblastoma y sobre la actividad de la cinasa Src en esas mismas células motivó el planteamiento del trabajo experimental que se describe a continuación.

### **3. HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS**

Nuestra hipótesis de trabajo propone que el ácido retinoico induce la diferenciación de las células de neuroblastoma disminuyendo la expresión de los factores de transcripción TCF7L2 activadores de la vía Wnt canónica y aumentando la expresión de factores TCF7L2 inhibidores, de modo que el efecto final sobre la expresión de los factores de transcripción TCF7L2 consiste en reducir la actividad de la vía de señalización Wnt canónica. Para inducir el fenotipo de las neuronas diferenciadas resulta además esencial que el ácido retinoico no promueva acciones que impliquen la activación de vías de señalización responsables del fenotipo de las células madre y de las células progenitoras, como la activación de la cinasa Src y de la vía de señalización Src-YAP. Para confirmar esta hipótesis de trabajo proponemos los siguientes objetivos:

1. Diferenciar las células de neuroblastoma SH-SY5Y en presencia de ácido retinoico.
2. Determinar los cambios de expresión de las proteínas TCF7L2 y de los correspondientes transcritos durante el proceso de diferenciación.
3. Caracterizar la posible expresión de isoformas dominante negativas de TCF7L2 durante el proceso de diferenciación.
4. Cuantificar la expresión relativa de isoformas activadoras y de isoformas dominante negativas de TCF7L2 durante el proceso de diferenciación.
5. Determinar el efecto de la interferencia de isoformas dominante negativas de TCF7L2 en la supervivencia de las células de neuroblastoma SH-SY5Y.

6. Determinar la actividad de la cinasa Src y de la vía Src-YAP durante la diferenciación de las células de neuroblastoma SH-SY5Y inducida por el ácido retinoico.

## 4. MATERIALES Y MÉTODOS

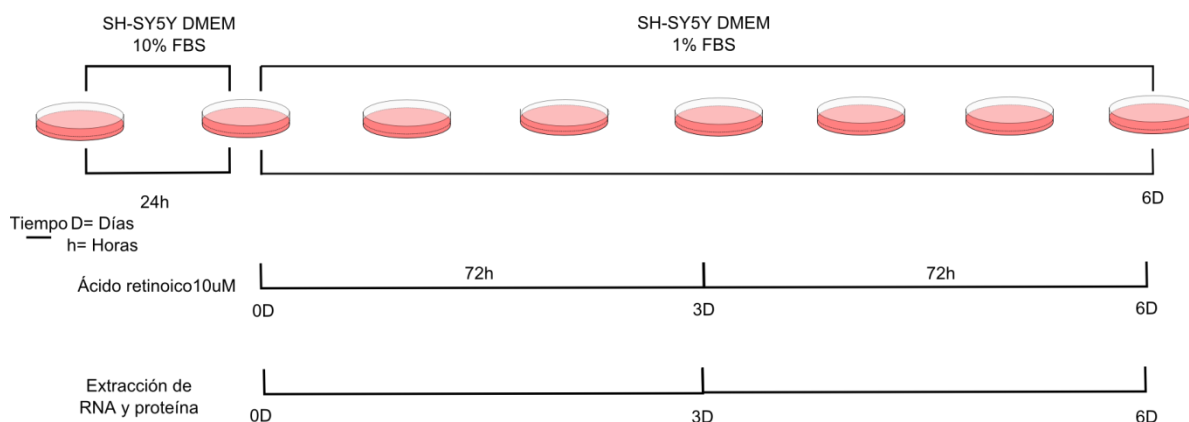
### 4.1. LÍNEAS CELULARES: CULTIVO Y DIFERENCIACIÓN

En este trabajo se ha utilizado la línea celular de neuroblastoma humano SH-SY5Y (ATCC Manassas, VA #CRL-2266).

**Medio de cultivo para las células SH-SY5Y:** DEMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium SIGMA #d5671 St. Louis, MO) con 50 U/ml de Penicilina y 50 mg/ml de Estreptomicina (Penicillin-Streptomycin, Life Technologies-Gibco #15070-063, Waltham, MA), suplementado con 2mM de GlutaMAX (Gibco #35050-061 Waltham, MA). Para el mantenimiento de las células se utiliza suero bovino fetal (FBS) a una concentración final del 10%. Las células se cultivan en un incubador a 37 °C al 5% de CO<sub>2</sub> y 95% de humedad constante.

**Experimento de diferenciación:** para la diferenciación de las células SH-SY5Y se lleva a cabo el protocolo adaptado de Cheung et al., 2009 (Figura 7).

Se siembran las células a una concentración de  $2 \times 10^5$  células por ml en el medio DMEM descrito anteriormente, con una concentración de FBS al 10%. Se mantienen las células en la incubadora durante 24 horas y al día siguiente se sustituye el medio por medio de diferenciación, con 10 $\mu$ M de ácido trans-retinoico (Sigma #R 2625 St. Louis, Missouri) y FBS al 1%. El medio de diferenciación se renueva cada 72 h hasta un máximo de 6 días.



**Figura 7. Protocolo de diferenciación de la línea SH-SY5Y.** Protocolo de diferenciación y momentos en los que se obtiene muestra tanto para proteína como para RNA.

## 4.2. EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS

La recogida de células se hace mediante la utilización de un *scraper* para separar las células de la placa y dos lavados con PBS por placa. Se introducen los volúmenes que contienen las células en tubos Eppendorf, que se someten a centrifugación a 11.000 rpm durante 5 minutos para descartar el sobrenadante.

Para la lisis celular se utiliza el tampón NP-40, cuya composición se detalla en la tabla adjunta (Tabla 1). La preparación de tampón de lisis resulta más fácil si se conserva en la nevera una mezcla de NaCl y HEPES autoclavada a la concentración adecuada, lo que evita tener que preparar las soluciones de nuevo en cada experimento.

Tabla 1: Tampón de lisis NP-40

<i>Producto</i>	<i>Concentración</i>	<i>Para 10ml</i>	<i>Casa comercial y número de referencia.</i>
<b>NaCl</b>	150 mM	0.09 g	Serva #30183 Heidelberg, Alemania
<b>HEPES</b>	20 mM	0.05 g	Merck #391338 Kenilworth, NJ
<b>Nonidet NP-40 (protegido de la luz)</b>	0.5 %	50 µl	Sigma #74385 St. Louis, MO
<b>Inhibidores de fosfatasa</b>		100 µl	Merck #24625 Kenilworth, NJ
<b>Tableta de inhibidores de proteasas</b>		1 unidad	Merck #524625 Kenilworth, NJ

Para llevar a cabo la lisis celular se sigue el siguiente procedimiento:

1. Añadir 25-100µl del tampón de lisis NP-40 en cada muestra dependiendo de la densidad de células por placa.
2. Pipetear vigorosamente para facilitar la lisis de las células.
3. Dejar reposar en hielo media hora.
4. Una vez la lisis se completa, centrifugar 10 minutos a 12000 x g a 4 °C.
5. Descartar el *pellet* y conservar el sobrenadante (que contiene las proteínas).

#### **4.2.1. CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS POR EL MÉTODO DE BRADFORD**

Para cargar la misma cantidad de proteína en cada pocillo y que los resultados sean comparables se usa el método cuantificación de Bradford:

1. Preparar el reactivo de Bradford (Bio-Rad Protein Assay #500-0006 Hercules, CA) mediante una dilución en agua (1:5).

2. Usar una placa de 96 pocillos transparente para el lector de placas.
3. Hacer una recta patrón con albúmina de suero bovino (BSA) con dos réplicas por concentración en un rango de 0 a 12 mg/ml.
4. Poner 1 µl de muestra por pocillo, haciendo 2 réplicas para cada muestra.
5. Añadir 200 µl del reactivo de Bradford preparado en el paso 1.
6. Hacer la lectura de la absorción a 595 nm con el lector de placas Synergy HT (Biotek. Horsham, PA) y el software de análisis de datos Gene5 (Biotek. Horsham, PA).
7. Extrapolar los datos de las muestras a la recta patrón creada con las distintas diluciones de BSA para calcular la concentración de proteína.

### **4.3. ANÁLISIS DE PROTEÍNAS *WESTERN BLOT* (WB)**

Esta técnica permite separar las proteínas en un campo eléctrico según su peso molecular, obteniéndose un patrón de bandas correspondiente a proteínas distintas. Por otro lado, permite identificar las bandas mediante anticuerpos que se unen de forma específica a las proteínas de interés.

#### **4.3.1. ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA**

1. Montar los cristales que delimitarán el gel con los separadores de 1.5mm de grosor entre los cristales colocar el montaje en el soporte.
2. Preparar el tampón de resolución (Tabla 2):



Tabla 2: Tampón de resolución.

<i>Componente</i>	<i>Cantidad para 500 ml</i>	<i>Concentración</i>	<i>Casa comercial y número de referencia.</i>
<b>Tris</b>	7.55 g	25 mM	Trizma base Sigma #93352 St. Louis, MO
<b>Glicina</b>	47 g	250 mM	Panreac #131340-1211 Castellar del Vallès, España
<b>SDS10%</b>	25 ml	0.5%	Sigma #75796-2506 St. Louis, MO

3. Preparar el gel de resolución al 10% de acrilamida (Tabla 3), añadiendo en último lugar el TEMED, responsable de iniciar la polimerización:

Tabla 3: Gel de resolución

<i>Componente</i>	<i>Cantidad para 7 ml</i>	<i>Casa comercial y número de referencia.</i>
<b>Agua destilada</b>	4 ml	
<b>Acrilamida (Acrylamide:Bis Solution, 37.5:1 (30% w/v) 30%</b>	3.3 ml	Serva #10688.01 Heidelberg, Alemania
<b>Tris 1.5M (Trizma Base)</b>	2.5 ml	Sigma #93352 St. Louis, MO
<b>APS (Persulfato amónico) al 10%.</b>	0.1 ml	Sigma #4418 St. Louis, MO
<b>SDS (Sodio Dodecil Sulfato) al 10%.</b>	0.1 ml	Sigma #L3771 Louis, MO
<b>TEMED (Tetrametil-Etilenediamina)</b>	4 µl	Serva #35930.01 Heidelberg, Alemania

4. Verter la mezcla del gel de resolución rápidamente, pero con cuidado de no hacer burbujas entre los cristales del montaje para el gel.

5. Añadir con cuidado 1 ml de butanol de manera que cree una superficie llana por encima del gel.
6. Mientras se espera a que el gel polimerice, calcular los microlitros de muestra a cargar para los pocillos contengan la cantidad de proteína requerida, y completar con tampón de lisis para que todas las muestras tengan el mismo volumen (50 µl).
7. Añadir el colorante 2X (tabla 4):

**Tabla 4: Colorante para muestras.**

<i>Componente</i>	<i>Cantidad para 40 ml de colorante 2X</i>	<i>Casa comercial y número de referencia.</i>
<b>Agua destilada</b>	7 ml	
<b>Tris 1.5M (Trizma Base)</b>	5 ml	Sigma #93352 St. Louis, MO
<b>Glicerol</b>	8 ml	Sigma #G5516 St. Louis, MO
<b>SDS (Sodio Diodecil Sulfato) 10%</b>	16 ml	Sigma #L3771 St. Louis, MO
<b>β-mercaptoetanol</b>	4 ml	Sigma #M7154 St. Louis, MO
<b>Azul de bromofenol</b>	8 mg	Merck #8122 Kenilworth, NJ

8. Una vez el gel de resolución ha polimerizado, eliminar el butanol que lo cubre y lavar muy bien con agua destilada.
9. Secar con papel de filtro la parte superior del gel y entre los cristales.
10. Incubar las muestras en el bloque térmico en agitación durante 5 minutos a 90 °C, para desnaturalizar las proteínas. Este paso nos permitirá separar en el gel las proteínas por su tamaño y no por su conformación tridimensional.
11. Colocar inmediatamente las muestras en hielo.

12. Preparar 4ml de gel de apilamiento (Tabla 5). Este gel permite concentrar la muestra hasta reducirla a una banda bien definida:

**Tabla 5: Gel de apilamiento.**

<i>Componente</i>	<i>Cantidad para 4 ml Gel al 5% acrilamida</i>	<i>Casa comercial y número de referencia.</i>
<b>Agua destilada</b>	2.7 ml	
<b>Acrilamida (Acrylamide:Bis Solution, 37.5:1 (30% w/v) 30% Tris 1.5M (Trizma Base)</b>	0.67 ml	Serva #10688.01 Heidelberg, Alemania
<b>APS (Persulfato amónico) al 10%.</b>	0.04 ml	Sigma #93352 St. Louis, MO
<b>SDS (Sodio Dodecil Sulfato) al 10%.</b>	0.04 ml	Sigma #4418 St. Louis, MO
<b>TEMED (Tetrametil-Etilenediamina)</b>	4 µl	Sigma #L3771 Louis, MO
		Serva #35930.01 Heidelberg, Alemania

13. Verter la mezcla rápidamente, con una pipeta de 1ml, pero con cuidado de no formar burbujas en el proceso.
14. Poner el peine para los pocillos en la parte superior y entre los dos cristales.
15. Esperar a que polimerice.
16. Una vez polimerizado el gel de apilamiento, sacar el peine.
17. Enjuagar con agua destilada y eliminarla mediante succión.
18. Sumergir el montaje en la cubeta con el tampón de resolución.
19. Cargar las muestras de proteína y, en uno de los extremos, 5 µl del marcador PageRuler (Thermo Scientific #26616 Waltham, MA).

20. Añadir el contenedor de hielo en la parte dispuesta para ello de la cubeta de electroforesis.
21. Poner la tapa con los electrodos en la parte superior de la cubeta. Asegurarse que cada electrodo está en su posición correspondiente (color negro-polo negativo, color rojo-polo positivo).
22. Colocar la cubeta montada en hielo.
23. Conectar a la fuente e iniciar la electroforesis a 130 V. Este proceso durará aproximadamente 2 h. Se desconecta la fuente cuando veamos que el colorante ha salido del gel.

#### 4.3.2. TRANSFERENCIA DE LAS PROTEÍNAS A UNA MEMBRANA DE POLIVINILO

1. Preparar el tampón de transferencia al 10% de metanol (Tabla 6):

Tabla 6: Tampón de transferencia.

<i>Componente</i>	<i>Cantidad para 1 L</i>	<i>Concentración</i>	<i>Casa comercial y número de referencia.</i>
<b>Tris</b>	3.02 g	25 mM	Trizma base Sigma #93352 St. Louis, MO
<b>Glicina</b>	14.4 g	192 mM	Panreac #131340-1211 Castellar del Vallès, España
<b>Metanol</b>	100 ml	10%	Panreac #131091-1212 Castellar del Vallès, España

2. Preparar la cubeta y el sándwich para transferencia: casete, los 4 papeles Whatman y las 2 esponjas. Empapar el papel y las esponjas en el tampón de transferencia.
3. Cortar una membrana de PVDF (Hybond-P, Life Sciences #RPMF/97/03 Amersham, UK) de la medida del gel de resolución.
4. Activar la membrana sumergiéndola y agitándola en metanol durante 20 segundos. Este paso permite que la membrana, que inicialmente es hidrófoba, se convierta en hidrófila y adquiera su máximo potencial de unión a proteína.
5. Sumergir la membrana PVDF en agua durante 3 minutos y equilibrar con el tampón de resolución.
6. Montar las piezas del sándwich, con los plásticos abiertos y la parte negra abajo (polo negativo). En este orden se colocan los siguientes elementos empapados en el tampón de transferencia, evitando burbujas durante su colocación:
  - a. Polo negativo (cara negra del casete).
  - b. Esponja.
  - c. 2 papeles Whatman.
  - d. El gel de poliacrilamida (solo la parte de resolución, eliminando con cuidado el gel de apilamiento).
  - e. La membrana (marcar el lado en el que se adherirán las proteínas).

- f. 2 papeles Whatman.
  - g. Esponja.
  - h. Polo positivo (cara transparente del casete).
7. Apretar cada capa con un rodillo de plástico y cerrar bien el casete.
  8. Colocar el sándwich en la parte correspondiente de la cubeta, teniendo en cuenta la polaridad.
  9. Llenar la cubeta con tampón de transferencia, añadir *frost it* y taparla.
  10. Conectar a la fuente a 400 mA durante 2 horas.
  11. Las proteínas, cargadas negativamente, migrarán por gradiente eléctrico hacia el polo positivo, donde se adherirán a la membrana de PVDF.

### 4.3.3. MARCAJE INMUNOLÓGICO

1. Preparar el tampón TBS (Tabla 7):

Tabla 7: Tampón TBS.

<i>Componente</i>	<i>Cantidad para 1 L</i>	<i>Concentración</i>	<i>Casa comercial y número de referencia</i>
<b>NaCl</b>	3.02 g	25 mM	Serva #30183 Heidelberg, Alemania
<b>Tris pH 7.4-7.5</b>	14.4g	192 mM	Trizma base Sigma #93352 St. Louis, MO

2. Preparar TBS-Tween: añadir 1 mL de Tween 20 (Sigma #P 2287, St. Louis, MO) por cada litro de TBS preparado anteriormente.

3. Desmontar el sándwich y recuperar la membrana PVDF con las pinzas.
4. Bloquear la membrana sumergiéndola en tampón de bloqueo (5% leche en polvo diluida en 50 ml de TBS 1X) durante 0,5 - 1 h en agitación.
5. Incubar la membrana O/N a 4 °C y en agitación con el anticuerpo primario, que se unirá específicamente a la proteína de interés. En la tabla siguiente se especifican las concentraciones de anticuerpo primario para cada proteína (Tabla 8). Todas se preparan en TBS-Tween con leche al 5%.

**Tabla 8: Anticuerpos primarios.**

<b>Anticuerpo primario</b>	<b>Concentración</b>	<b>Origen</b>	<b>Casa comercial y número de referencia</b>
<b><math>\beta</math>-actina</b>	1:30000	Ratón	Sigma #A5316 St. Louis, MO
<b>TCF7L2 (C48H11)</b>	1:1000	Conejo	Cell Signaling #2569 Beverly, MA
<b>TH</b>	1:1000	Conejo	Millipore #AB152 Billerica, MA
<b>Src</b>	1:1000	Conejo	Cell Signaling #2101 Beverly, MA
<b>p-Src</b>	1:1000	Conejo	Cell Signaling #2108 Beverly, MA

6. Hacer 2 lavados de 5 minutos y 2 de 15 minutos con TBS-Tween en agitación.
7. Preparar el anticuerpo secundario, que se unirá al primario y será el que emitirá la señal lumínica para la detección. El anticuerpo secundario se utiliza en una dilución 1:2000 en TBS-Tween con leche al 5%.

8. Incubar la membrana con el anticuerpo secundario (Tabla 9) durante 1 h a temperatura ambiente y en agitación. En la tabla siguiente se indican los anticuerpos secundarios utilizados.

**Tabla 9: Anticuerpos secundarios.**

<b>Anticuerpo secundario</b>	<b>Concentración</b>	<b>Casa comercial y número de referencia</b>
<b>Anti-Conejo</b>	1:2000	Amersham ECL #NA934V Amersham, UK
<b>Anti-Ratón</b>	1:2000	Amersham ECL #NA931V Amersham, UK

9. Repetir el paso 6.
10. Eliminar el exceso de líquido de la membrana y ponerla con la cara que contiene las proteínas hacia arriba en un soporte plano.
11. Verter encima de la membrana el líquido de detección (Amersham ECL Prime *Western blotting* Detection Reagent #RPN2232 Buckinghamshire, UK).
12. Revelar con G:Box y el software GeneSnap (Syngene Cambridge, UK).
13. En caso de querer utilizar la membrana para hacer la detección con un anticuerpo distinto, es necesario lavarla bien con TBS-Tween. Este paso habitualmente se requiere antes detectar la actina, tras llevar a cabo la detección de TCF7L2.



#### 4.4. EXTRACCIÓN DE RNA

Para la extracción de RNA se utilizó el kit RNeasy Mini (Qiagen #74104 Hilden, Alemania). El volumen de tampón de homogeneización RLT depende del tamaño de la placa y del número/grado de confluencia de las células. Así, para una placa control de 6-10 cm que contiene  $1 \times 10^7$  células confluyentes, el volumen a utilizar sería de 600  $\mu$ l. En los experimentos de diferenciación, en cambio, el crecimiento y grado de confluencia de las células es menor, por lo que un volumen de tampón RT de 350  $\mu$ l es suficiente para obtener resultados satisfactorios.

El protocolo de extracción de RNA consiste en los siguientes pasos:

1. Separar las células de la placa con un *scraper*, hacer dos lavados de la placa con PBS e introducir los volúmenes con las células en tubos Eppendorf. Centrifugar los tubos 5 minutos a 11.000 rpm y descartar el sobrenadante.
2. Preparar el tampón RLT añadiendo 10  $\mu$ l de  $\beta$ -mercaptoetanol por ml de RLT.
3. Añadir el volumen adecuado de tampón RLT (ver comentario previo).
4. Añadir un volumen de etanol al 70% y pipetear varias veces para disgregar bien.
5. Poner las columnitas en los tubos colectores y rellenar con hasta 700 $\mu$ l de la mezcla.
6. Centrifugar 15 segundos a 8000 x g a 4 °C.
7. Descartar el filtrado.

8. Añadir 700µl de tampón RW1 en la columnita y volver a centrifugar 15 segundos a 8000 x g a 4 °C.
9. Añadir 500µl de tampón RPE en la columnita y centrifugar a 8000 x g durante 15 segundos a 4 °C.
10. Descartar el filtrado.
11. Volver a añadir 500 µl de tampón RPE en la columnita y centrifugar a 8000 x g durante 2 minutos a 4 °C.
12. Descartar el filtrado.
13. Poner la columnita en tubos de 1.5 ml y añadir con cuidado 30-50 µl de agua libre de RNasas en el centro de la membrana, sin que la punta la toque.
14. Centrifugar a 8000 x g a 4 °C.
15. El volumen eluido contiene el RNA.
16. Repetir los pasos 11 y 12 si se espera obtener más de 30 µg de RNA.
17. Cuantificar con el lector de placas multi-modo Synergy HT (Biotek. Horsham, PA) y el software de análisis de datos Gene5 (Biotek. Horsham, PA), haciendo duplicados por muestra y calculando los valores medios para determinar la concentración de RNA.

El RNA obtenido puede utilizarse para la síntesis de cDNA mediante el iScript cDNA Synthesis Kit (Bio Rad #170-8890 Hercules, CA) o bien para la preparación directa de sonda, con el OneStep RT-PCR Kit (Qiagen #210210 Hilden, Alemania), en combinación con los *primers* correspondientes la secuencia de interés.

## 4.5. ANÁLISIS DE TRÁNSCRITOS RNA

Para determinar la posible existencia de formas dominante negativas de TCF7L2 (TCF7L2dn) a nivel de transcrito se ha utilizado varias técnicas, como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), el análisis de transcritos mediante *Northern blot* y la técnica RACE, que permite caracterizar la secuencia exacta de dichos transcritos en sus extremos (en nuestro caso, el extremo de interés es el 5'). Las técnicas de PCR y RACE emplean como material de partida el cDNA. Se describe a continuación todas estas técnicas:

### 4.5.1. SÍNTESIS DE cDNA

Una vez completada la preparación y cuantificación de RNA:

1. Calcular el volumen de muestra necesario para obtener unos 0.5 µg de RNA en el volumen requerido por el iScript cDNA Synthesis kit (de 5 a 15µl).
2. Si el volumen es inferior a 15µl, añadir agua libre de RNAsas. Si el volumen es superior, precipitar el RNA y resuspenderlo en el volumen adecuado.
3. Añadir 4 µl de iScript *reaction mix*.
4. Añadir 1 µl de iScript *reverse transcriptase*.
5. Mantener la mezcla en hielo.
6. Ejecutar el siguiente programa en el termociclador (Tabla 10):

**Tabla 10: Programa de termociclador para la síntesis de cDNA.**

1 ciclo	25 °C	5 minutos
1 ciclo	42 °C	30 minutos

1 ciclo	85 °C	5 minutos
Holding	4 °C	Infinito

Una vez se obtiene el cDNA, se procede a la amplificación de la región de interés mediante la técnica de PCR convencional o PCR en tiempo real.

#### 4.5.2. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

1. En un tubo de tamaño compatible con el termociclador (0.2µl en nuestro caso), añadir los siguientes componentes (Tabla 12):

**Tabla 12: Reactivos para la PCR.**

<i>Reactivo</i>	<i>Cantidad x1</i>
<b>Agua libre de RNasas</b>	39 µl
<b>Tampón 10X</b>	5 µl
<b>ClMg<sub>2</sub> (25mM)</b>	0.5 µl
<b>dNTP (200µM)</b>	1 µl
<b>Primer Forward (20µM)</b>	1 µl
<b>Primer Reverse (20µM)</b>	1 µl
<b>cDNA</b>	1.5 µl
<b>Polimerasa</b>	1 µl

2. El volumen final para la reacción de PCR debe ser de 50 µl. Mantener en hielo las muestras hasta el inicio de la reacción.
3. Ejecutar el siguiente programa en el termociclador (Tabla 13):

**Tabla 13: Programa del termociclador para la PCR.**

1 ciclo	95° C	5 minutos
26 ciclos	95	30 segundos

	Tm	45 segundos
	72 °C	2 minutos
1 ciclo	72 °C	10 minutos
Holding	4 °C	Infinito

Como controles de amplificación se utiliza la actina (positivo) y agua (negativo).

Mientras se completa la reacción de PCR, preparar el gel de agarosa para la separación y el análisis de las muestras mediante electroforesis:

1. Preparar el tampón TAE 50X, con la siguiente composición (Tabla 11):

**Tabla 11: Tampón TAE.**

<i>Componente</i>	<i>Cantidad para 1 L a 50x</i>	<i>Casa comercial y número de referencia.</i>
<b>Agua destilada</b>	700 ml y acabar de rellenar hasta 1 L al final.	
<b>Tris</b>	242 g	Trizma base Sigma #93352 St. Louis, MO
<b>EDTA.Na<sub>2</sub>.H<sub>2</sub>O</b>	37.2 g	Serva #3976101 Heidelberg, Alemania
<b>Ácido acético</b>	57.1 ml	Merck #101830 Kenilworth, NJ

2. Pesar 2g de agarosa y colocarla en 250 ml de tampón TAE 1X. Pesar el conjunto en su recipiente.
3. Calentar la mezcla al microondas hasta que la agarosa esté bien disuelta.

4. Dejar enfriar la mezcla hasta que no queme al tacto. Añadir el agua evaporada tomando como referencia el peso inicial.
5. Añadir 12.5  $\mu$ l de bromuro de etidio.
6. Preparar la cubeta del gel, sellar los extremos y colocar el peine para los pocillos.
7. Verter la mezcla en la cubeta y esperar a que gelifique.
8. Llenar la cubeta de electroforesis de tampón TAE 1X.
9. Preparar las muestras para cargar: 9 $\mu$ l de muestra más 1 $\mu$ l de tampón de carga 10X.
10. Una vez el gel ha solidificado, quitar el peine y los toques de los extremos e introducirlo en la cubeta. Asegurarse que queda sumergido en el tampón TAE.
11. Cargar los 12 $\mu$ l de muestra con el tampón de carga y el marcador de peso molecular 1 kb en uno de los extremos del gel.
12. Poner la tapa y conectar a la fuente a 130V durante 20-40 minutos, dependiendo de la separación entre las bandas que se desee.
13. Observar mediante luz ultravioleta las bandas correspondientes a la amplificación PCR.

#### **4.5.3. PCR A TIEMPO REAL**

1. Preparar tantos tubos de 1.5 ml como parejas de *primers* a usar. A la hora de diseñar los *primers*, tener presente que los productos de amplificación no deben exceder los 200 bp. Utilizar la actina como control.

2. Preparar la siguiente mezcla máster, empleando las cantidades adecuadas en función del número de réplicas deseadas (Tabla 14):

**Tabla 14: Reactivos para la PCR a tiempo real.**

<i>Reactivo</i>	<i>Cantidad x1</i>
<b>SYBR Green</b>	10 $\mu$ l
<b>Agua MiliQ</b>	6 $\mu$ l
<b>Primer Forward</b>	1 $\mu$ l
<b>Primer Reverse</b>	1 $\mu$ l

3. Rellenar los pocillos de las placas para PCR con 2  $\mu$ l de la muestra de cDNA y añadir a cada pocillo los 18  $\mu$ l de la mezcla anterior. De esta manera cada pocillo debería contener 20  $\mu$ l de volumen total.
4. Cubrir la placa de PCR con film protector y hacer un leve centrifugado para llevar la mezcla al fondo de los pocillos.
5. Ejecutar el programa de PCR habitual descrito anteriormente (Tabla 13).

El PCR en tiempo real es un método que permite determinar el número de copias de una secuencia en una muestra, a base de medir la señal fluorescente que se acumula durante la amplificación. Para distinguir la señal de la señal de fondo, el software establece un valor umbral (representado por el parámetro Ct), que se sitúa aproximadamente al inicio de la curva de amplificación exponencial de nuestra secuencia. El valor del parámetro Ct es inversamente proporcional al número de copias de nuestra secuencia, es decir, valores bajos indican un número copias elevado, y a la inversa.

#### 4.5.4. RACE 5'

RACE (*Rapid Amplification of cDNA Ends*) es una técnica que permite caracterizar la secuencia completa de un transcrito, o bien la secuencia de sus extremos 5' o 3' a partir de una secuencia conocida localizada en sus inmediaciones. Mediante la técnica RACE se obtiene el cDNA del transcrito de interés, combinando la transcripción inversa y la amplificación por PCR de las copias de cDNA. La técnica requiere un *primer* específico (GSP) para secuencia conocida y un *primer* que se una a una secuencia anclada al extremo del transcrito (*achor*). La técnica RACE es también conocida como “PCR de un solo lado”.

Para llevar a cabo la técnica RACE se utilizó el GeneRacer Kit (Invitrogen Life Technologies #L1500-01; L1500-02; L1502-01; L1502-02, Carlsbad, CA). A continuación, se describe el protocolo seguido:

##### A. Desfosforilación de los RNA no mensajeros o truncados:

1. Preparar el RNA a partir de la muestra de células.
2. En un tubo de 1.5ml estéril y tratado con DEPC hacer la siguiente mezcla

(Tabla 15):

**Tabla 15: Reactivos para la reacción de desfosforilación de mRNA.**

<b><i>Reactivo</i></b>	<b><i>Cantidad</i></b>
<b>RNA</b>	xµl (3 µg)
<b>10X CIP Buffer</b>	1 µl
<b>RNaseOut(40U/µl)</b>	1 µl
<b>CIP (10U/µl)</b>	1µl
<b>Agua-DEPC</b>	hasta 10 µl
<b>Volumen total</b>	10 µl



3. Agitar vigorosamente con ayuda de la pipeta y el vórtex. Dar un pico de centrifuga para recoger el líquido en la base del tubo.
4. Incubar a 50 °C durante 1 h.
5. Centrifugar y dejar en hielo.

B. Precipitación del RNA:

1. Añadir 90 µl de agua tratada con DEPC y 100 µl de fenol:cloroformo y mezclar con el vórtex vigorosamente durante 30 segundos.
2. Centrifugar a máxima velocidad 5 minutos a temperatura ambiente.
3. Transferir con cuidado la fase superior a un tubo nuevo tratado con DEPC (100 µl aproximadamente).
4. Añadir 2 µl de glucógeno a 10 mg/ml, 10 µl de acetato de sodio 3 M (pH 5.2) y mezclar bien. Añadir 220 µl de etanol al 95% y mezclar con vórtex.
5. Congelar en hielo seco durante 10 minutos.
6. Centrifugar a velocidad máxima durante 20 minutos a 4 °C.
7. Eliminar cuidadosamente el etanol con la pipeta. Centrifugar otra vez para eliminar cualquier resto de etanol.
8. Añadir 500 µl de etanol al 70%, invertir varias veces y mezclar con vórtex.
9. Centrifugar a máxima velocidad durante 2 minutos a 4 °C.
10. Eliminar cuidadosamente el etanol con la pipeta y dejar secar al aire libre unos 2 minutos a temperatura ambiente.
11. Resuspender el *pellet* en 7µl de agua tratada con DEPC.

C. Eliminación de la estructura cap del RNA mensajero:

1. Mezclar los reactivos siguientes, manteniendo el tubo en hielo (Tabla 16):

**Tabla 16: Reactivos para la eliminación de la estructura CAP del mRNA.**

<i>Reactivo</i>	<i>Cantidad</i>
<b>RNA defosforilado</b>	7 $\mu$ l
<b>10X TAP Buffer</b>	1 $\mu$ l
<b>RNaseOut (40U/<math>\mu</math>l)</b>	1 $\mu$ l
<b>TAP (0.5U/<math>\mu</math>l)</b>	1 $\mu$ l
<b>Volumen total</b>	10 $\mu$ l

2. Mezclar con vórtex. Centrifugar brevemente para recoger el volumen.
3. Incubar a 37 °C durante 1 hora.
4. Centrifugar y dejar en hielo.
5. Repetir la precipitación.

D. Ligación del RNA oligo al RNA mensajero sin estructura cap:

1. Añadir la muestra al tubo suministrado por el kit que contiene el oligo pre-  
aliquotado y liofilizado (0.25  $\mu$ g).
2. Pipetear arriba y abajo hasta resuspender el oligo. Centrifugar brevemente  
para recoger el líquido.
3. Incubar a 65 °C durante 5 minutos para eliminar la estructura secundaria del  
RNA.
4. Dejar en hielo 2 minutos.
5. Añadir los siguientes reactivos (Tabla 17):

Tabla 17: Reactivos para la ligación del RNA oligo al mRNA.

<i>Reactivo</i>	<i>Cantidad</i>
<b>10X Ligase Buffer</b>	1 $\mu$ l
<b>10mM ATP</b>	1 $\mu$ l
<b>RNaseOut</b>	1 $\mu$ l
<b>T4RNA ligasa (5U/<math>\mu</math>l)</b>	1 $\mu$ l
<b>Volumen total</b>	10 $\mu$ l

6. Incubar a 37 °C durante 1 hora.
7. Centrifugar brevemente y dejar en hielo.
8. Precipitar el RNA y resuspender el *pellet* en 10  $\mu$ l de agua tratada.

E. Transcripción inversa del RNA mensajero.

1. Añadir los siguientes reactivos a la muestra (Tabla 18):

Tabla 18: Random primers y dNTP mix

<i>Reactivo</i>	<i>Cantidad</i>
<b>Random primers (54<math>\mu</math>M)</b>	1 $\mu$ l
<b>dNTP Mix 10mM cada nucleótido</b>	1 $\mu$ l
<b>Agua estéril destilada</b>	1 $\mu$ l

2. Incubar a 65 °C durante 5 minutos para eliminar la estructura secundaria del RNA.
3. Dejar en hielo como mínimo 1 minuto y centrifugar brevemente.
4. Añadir los siguientes reactivos (Tabla 19):

Tabla 19: Reactivos para la transcripción inversa del mRNA.

<i>Reactivo</i>	<i>Cantidad</i>
<b>5X First strand buffer</b>	4 $\mu$ l
<b>0.1M DTT</b>	1 $\mu$ l
<b>RNaseOut (40U/<math>\mu</math>l)</b>	1 $\mu$ l
<b>SuperScript III RT (200U/<math>\mu</math>l)</b>	1 $\mu$ l
<b>Volumen total</b>	20 $\mu$ l

5. Mezclar bien pipeteando arriba y abajo.
6. Centrifugar brevemente e incubar a 55 °C durante 60 minutos.
7. Inactivar la reacción de transcripción inversa a 70°C durante 15 minutos.  
Incubar en hielo 2 minutos y centrifugar brevemente a máxima velocidad.
8. Añadir 1 $\mu$ l de RNasa H (2U) a la mezcla.
9. Incubar a 37°C durante 20 minutos.
10. Centrifugar brevemente y usar para el PCR o guardar a -20 °C.

F. Reacción de PCR para el RACE.

La reacción de PCR se lleva a cabo siguiendo el protocolo descrito en el apartado 4.5.2., utilizando el *primer* específico (GSP) y el *primer* que se une al *anchor*. La reacción subsiguiente con *primers nested* incrementa la especificidad en la amplificación de la secuencia de interés.

Tabla 20: *Primers* para el RACE 5'.

<i>Primera PCR</i>		<i>PCR Nested</i>	
<b>GeneRacer5' Primer (10mM)</b>	3 $\mu$ l	<b>GeneRacer Nested (10mM)</b>	1 $\mu$ l
<b>Reverse GSP (exón 11, 10mM)</b>	1 $\mu$ l	<b>Reverse Nested GSP(exón 10, 10mM)</b>	1 $\mu$ l

Una vez se obtienen los productos de PCR se procede a su separación mediante electroforesis con el fin de aislar la banda de interés y llevar a cabo su clonación y posterior secuenciación.

#### 4.5.5. *NORTHERN BLOT*

Esta técnica consiste en la separación mediante electroforesis de RNA en un gel de agarosa, su transferencia a una membrana y su hibridación mediante una sonda específica que se une al transcrito de interés. La sonda de hibridación emite una señal fluorescente que se registra en una película fotográfica, lo que permite discriminar a los transcritos por tamaño y abundancia relativa.

A continuación se describe la composición de los tampones y reactivos, así como el procedimiento para llevar a cabo la técnica de *Northern blot*:

Tampón MOPS 10X, pH 7.0 (Tabla 21)

Tabla 21: Tampón MOPS.

<i>Reactivo</i>	<i>Cantidad para 1L a 10x</i>	<i>Casa comercial y número de referencia</i>
<b>Agua destilada</b>	900 ml y acabar de rellenar hasta 1L al final	
<b>MOPS</b>	41.86 g	Sigma #M1254 St. Louis, MO
<b>Acetato sódico anhidrato</b>	4.1 g	Sigma #S2889 St. Louis, MO
<b>EDTA 0.5M</b>	20 ml	Sigma #M1254 St. Louis, MO

Mezcla Cocktail, usar 19 µl por muestra (Tabla 22)

Tabla 22: Mezcla *Cocktail*.

<i>Reactivo</i>	<i>Cantidad para 100 muestras</i>	<i>Casa comercial y número de referencia</i>
<b>MOPS 10X</b>	250 µl	
<b>Formaldehido 37%</b>	400 µl	Merk #104002 Kenilworth, NJ
<b>Formamida desionizada</b>	1250 µl	ThermoFisher #17899 Waltham, MA
<b>Bromuro de etidio 10mg/ml</b>	5 µl	Merk #111608 Kenilworth, NJ

Colorante stop de muestras (Tabla 23)

Tabla 23: Colorante stop de muestras.

<i>Reactivo</i>	<i>Cantidad para 1ml (12.5x)</i>	<i>Casa comercial y número de referencia.</i>
<b>Agua destilada</b>	495 µl	
<b>Glicerol autoclavado (dispensar en caliente)</b>	600 µl	Sigma #G5516 St. Louis, MO
<b>EDTA 0.5 M pH 8.0</b>	2.5 µl	Sigma #M1254 St. Louis, MO
<b>Azul de bromofenol</b>	3 mg	Merck #8122 Kenilworth, NJ

A. Preparación del gel de agarosa al 1.6%:

1. Sellar las paredes de la cubeta para el gel con cinta adhesiva de papel.

2. Colocar en un Erlenmeyer: 0.8 g de agarosa (Agarose D1 Low EEO, Conda #8010 Madrid, España) y 37ml de agua tratada con DEPC.
3. Pesar el recipiente que contiene la mezcla, para poder después ajustar el volumen de agua evaporada.
4. Llevar la mezcla hasta la ebullición utilizando el microondas, agitando el recipiente de vez en cuando para que la agarosa se disuelva bien.
5. Dejar enfriar la agarosa hasta unos 60 °C.
6. En una campana de flujo añadir 5 ml de MOPS 10X y 8 ml de formaldehído al 37% (concentraciones finales: MOPS 20mM, formaldehído 2M). Mezclar bien y verter en la cubeta.
7. Colocar inmediatamente el peine para los pocillos. Generalmente usamos un peine de 8 pocillos de 5x2mm.
8. Dejar gelificar durante aproximadamente 1h dentro de la campana de flujo, para no respirar los vapores tóxicos del formaldehído.
9. Sacar la cinta adhesiva de la cubeta del gel y colocar dentro de la cubeta de electroforesis.
10. Llenar la cubeta de electroforesis con MOPS 1X hasta el nivel del gel, sin que lo cubra, para evitar la difusión del formaldehído. Rellenar los pocillos con el mismo tampón.

B. Preparación de las muestras y electroforesis:

1. Disolver el RNA en *pellet* seco con agua tratada, hasta obtener una concentración de 10-20 µg/4 µl. Es importante asegurar que el RNA quede bien disuelto, dejándolo en agua durante 20 minutos si hiciera falta.
2. Añadir 19 µl de mezcla *cocktail* y mezclar suavemente.
3. Desnaturalizar a 65-70 °C durante 10 minutos. Enfriar enseguida en hielo.
4. Añadir 2.5 µl de colorante stop de muestras, mezclar y conservar en hielo.
5. Cargar las muestras en el gel.
6. Cerrar la tapa de la cubeta de electroforesis y aplicar un voltaje de 60-70V (10V/cm) durante 2.5 - 4 horas.
7. Cada hora mezclar o cambiar el tampón MOPS de la cubeta para evitar que se agote.
8. Fotografíar el gel con luz UV para visualizar la cantidad y calidad del RNA.

C. Transferencia a membrana de nilón:

1. Preparar el tampón SSC para la transferencia (Tabla 24).

Tampón SSC (filtrar y autoclavar).

**Tabla 24: Tampón SSC.**

<b>Reactivo</b>	<b>Cantidad para 1L 20X</b>	<b>Casa comercial y número de referencia.</b>
<b>NaCl 3.0M</b>	175.3 g	Serva #30183 Heidelberg, Alemania
<b>Citrato sódico 0.3M</b>	88.2 g	Sigma #S4641 St. Louis, MO
<b>Agua-DEPC</b>	700 ml y acabar de rellenar hasta 1L al final.	



2. Sumergir el gel que contiene el RNA en agua destilada tratada con DEPC y lavar en agitación durante 20 minutos a temperatura ambiente dos veces. De esta forma se elimina el exceso de formaldehído del gel.
3. Hacer otro lavado de 20 minutos equivalente al anterior, pero esta vez con tampón SSC 10X, para equilibrar el gel.
4. Eliminar el exceso de líquido del gel.
5. Cortar la membrana de nilón de acuerdo con las medidas del gel. Usar guantes.
6. Cortar y preparar las piezas para el *blot* con papel absorbente Schleicher and Schuell (8 x GB004 y 3 x Whatman 3MM CHR).
7. Montar sobre la bandeja de pila los componentes en el orden siguiente: 8 x GB004, 1 x 3MM seco, 1 x 3MM equilibrado con tampón, membrana de nilón, gel de agarosa, 1 x 3MM equilibrado con tampón. El gel debe estar orientado de manera que su cara inferior esté en contacto con la membrana.
8. Poner encima la bandeja de tampón, de manera que los extremos del puente de papel absorbente estén sumergidos en el líquido. Es importante asegurarse de que no queden burbujas entre ninguna de las capas.
9. Dejar transferir durante toda la noche.
10. Eliminar las capas de papel absorbente, teniendo cuidado a la hora de separar la membrana del gel, con el fin de evitar arrastrar restos de agarosa, que podrían interferir con la hibridación.
11. Comprobar que la transferencia ha sido completa visualizando brevemente el gel y la membrana con luz ultravioleta (310 nm). En el gel no debería quedar ningún resto RNA, que se transfiera en su mayor parte a la membrana.

12. Hacer un corte en el extremo superior derecho de la membrana para reconocer la orientación.
13. Dejar secar la membrana 5 minutos a temperatura ambiente sobre papel de filtro y con la cara superior hacia arriba.
14. Colocar la membrana como en la etapa anterior en la cámara de *crosslinking* UV e irradiarla con una energía de 125 Joule/cm<sup>2</sup>.
15. Guardar la membrana protegida de la humedad en una bolsa de plástico sellada a temperatura ambiente.

D. Marcaje no radioactivo de la sonda:

Para el marcaje no radioactivo de la sonda se utiliza el kit PCR DIG Probe (Roche #11636090910 Basel, Suiza).

1. Partiendo de cDNA, hacer un PCR de la región que se pretende detectar a partir de la mezcla de PCR y el programa que se indican a continuación (Tablas 25 y 26 respectivamente):

**Tabla 25: Componentes para la PCR DIG Probe.**

<i>Reactivo</i>	<i>Cantidad</i>
<b>Muestra</b>	1 µl (1:200 del producto de la PCR)
<b>Tampón 10X</b>	5 µl
<b>Primer Forward (20µM)</b>	1 µl
<b>Primer Reverse (20µM)</b>	1 µl
<b>Agua-DEPC</b>	36.25 µl
<b>Polimerasa (Expand Hight Fidelity)</b>	0.75 µl
<b>Volumen total</b>	10 µl

**Tabla 26: Programa para el termociclador para la PCR DIG Probe.**

1 ciclo	95 °C	3 minutos
30 ciclos	95 °C	1 minuto
	T <sub>m</sub>	1 minuto
	72 °C	3 minutos
1 ciclo	72 °C	7 minutos
Holding	4 °C	Infinito

2. Cargar en un gel de agarosa al 1.5% 3 µl de muestra en cada pocillo. Añadir en los pocillos de los extremos los marcadores de peso molecular.
3. Correr la electroforesis a 75V durante 30 minutos.
4. Inspeccionar las bandas mediante luz ultravioleta. La banda correspondiente al producto marcado debe poseer un tamaño ligeramente superior al producto de PCR.
5. Pasar el producto de PCR por una columna de purificación.
6. Guardar la sonda a -20 °C hasta su utilización.

**E. Hibridación no radioactiva con la sonda específica:**

1. Colocar la membrana transferida en un tubo Falcon de 50 ml.
2. Añadir 6-12 ml de solución de prehibridación ExpressHyb (Clontech #636832 Mountain View, CA) precalentada e incubar el tubo en el horno de hibridación a 68 °C en agitación suave durante 30 minutos.

3. Diez minutos antes de finalizar la prehibridación, desnaturalizar la sonda. En un tubo de 1.5 ml se colocan entre 20 y 100 ng de sonda en un volumen de agua destilada de 20 a 30  $\mu$ l. Se cierra bien el tubo para que la tapa no abra debido a la temperatura. Incubar la sonda en el bloque térmico a 100 °C durante 10 minutos (cuando se reutiliza la sonda este tiempo debe prolongarse a 20 minutos). Tras la desnaturalización, colocar enseguida los tubos en hielo.
4. Centrifugar 1 segundo a máxima velocidad y diluir la sonda en solución de prehibridación fresca precalentada a 68 °C, volumen que corresponderá al líquido de hibridación.
5. Substituir el líquido de prehibridación por el de hibridación. No verter el líquido directamente sobre la membrana y asegurarse de que quede distribuido uniformemente.
6. Incubar 1 hora a 68 °C.
7. Transferir la membrana a un tubo de cristal que contenga 200 ml de solución de lavado previamente precalentada en el horno de hibridación.
8. Hacer 3 lavados de 20 minutos a 65 °C.

F. Detección de la sonda:

1. Preparar los siguientes tampones:

Tampón de lavado (Tabla 27)

Tampón maleico, pH 8.3 (Tabla 28)

Tampón de bloqueo (Tabla 29)

Tampón alcalino, pH 9.5 (Tabla 30)

Tabla 27: Tampón de lavado.

<i>Reactivo</i>	<i>Cantidad para 1L</i>	<i>Concentración</i>	<i>Casa comercial y número de referencia.</i>
<b>Agua destilada</b>	900 ml y acabar de llenar hasta 1 L		
<b>EDTA.Na<sub>2</sub></b>	0.37 g	1 mM	Merck #819040 Kenilworth, NJ
<b>Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub></b>	3.56 g	20 mM	Merck # 567547 Kenilworth, NJ
<b>SDS</b>	10 g (se añade en último lugar después de autoclavar).	1%	Merck # 817034 Kenilworth, NJ

Tabla 28: Tampón maleico.

<i>Reactivo</i>	<i>Cantidad para 1L</i>	<i>Concentración</i>	<i>Casa comercial y número de referencia.</i>
<b>Agua destilada</b>	900 ml y acabar de llenar hasta 1 L		
<b>Ácido maleico</b>	11.61 g	0.1 M	Merck # 845002 Kenilworth, NJ
<b>NaCl</b>	175 g	3 M	Serva #30183 Heidelberg, Alemania
<b>Tween 20</b>	3 g	0.35%	Merck # 817072 Kenilworth, NJ

Tabla 29: Tampón de bloqueo.

<i>Reactivo</i>	<i>Cantidad para 1L</i>	<i>Concentración</i>	<i>Casa comercial y número de referencia.</i>
<b>Tampón maleico</b>	1 L		
<b>Reactivo de blocking</b>	5 g	0.5 %	Roche #11096176001 Basel, Suiza

Tabla 30: Tampón alcalino.

<i>Reactivo</i>	<i>Cantidad para 1L</i>	<i>Concentración</i>	<i>Casa comercial y número de referencia.</i>
<b>Agua destilada</b>	900 ml y acabar de rellenar hasta 1 L al final.		
<b>Tris</b>	12.11 g	0.1 M	Merck #108387 Kenilworth, NJ
<b>NaCl</b>	5.84 g	0.1 M	Serva #30183 Heidelberg, Alemania
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	203.2 g	50 mM	Merck #442615 Kenilworth, NJ

2. Incubar la membrana en unos 150-200 ml de tampón maleico durante 5 minutos.
3. Incubar la membrana en unos 150-200 ml de solución de blocking durante 60 minutos.
4. Preparar la solución de conjugado B-AntiD (Roche #11093274910, Basel, Suiza): mezclar 3.33 µl de B-AntiD en 50 ml de solución blocking.
5. Incubar durante 30 minutos en la solución anterior.
6. Hacer 5 lavados de 8 minutos cada uno con 150 ml de tampón maleico.
7. Equilibrar la membrana con 100 ml de tampón alcalino durante 5 minutos.
8. Preparar 15 ml de la solución de sustrato: diluir 15 µl de sustrato quimioluminiscente CSPD (Roche #116558854001, Basel, Suiza) en 14.85 ml de tampón alcalino, evitando la luz directa.

9. Incubar la membrana con la solución sustrato durante 5 minutos, protegiéndola de la luz directa.
10. Tomar la membrana con pinzas, eliminar el exceso de líquido y colocarla entre láminas de plástico transparente.
11. En la cámara oscura, colocar la membrana en un casete en contacto con una película (Amersham Hyperfilm MP). Pueden ser necesarias entre 1 y 15 horas de exposición.

## 4.6. CLONACIÓN TOPO TA

Para la secuenciación de los productos obtenidos mediante la técnica RACE se ha procedido a su clonación utilizando el kit TOPO TA Cloning for Sequencing (Life Technologies #K4575. Carlsbad, CA). La ventaja de este kit es que no requiere el empleo de *primers* con secuencias específicas, ni la preparación del vector, ni la utilización de ligasas. El producto de PCR simplemente se incuba con vector cargado con topoisomerasa y a continuación se transforman células *E. Coli*.

### 4.6.1. REACCIÓN DE TRANSFORMACIÓN

1. Preparar la siguiente reacción de transformación (Tabla 31):

Tabla 31: Reactivos para la transformación.

<i>Reactivo</i>	<i>Cantidad</i>
<b>Producto de PCR</b>	0,5-4 $\mu$ l
<b>Agua</b>	Hasta 6 $\mu$ l
<b>Solución salina</b>	1 $\mu$ l
<b>pCR-TOPO (vector)</b>	1 $\mu$ l
<b>Volumen total</b>	6 $\mu$ l

2. Mezclar e incubar durante 5 minutos a temperatura ambiente. Colocar la muestra seguidamente en hielo.
3. Asegurarse que el medio SOC se encuentra a temperatura ambiente y las placas a 37 °C.
4. Sacar del congelador de -80 °C y descongelar en hielo una alícuota de células competentes One Shot TOP10 para cada transformación.
5. Bajo la llama, añadir 2µl de la reacción de transformación a la alícuota de células. Agitar manualmente, sin pipeta.
6. Incubar la mezcla de transformación en hielo durante 30 minutos.
7. Atemperar el medio S.O.C, poner el baño a 42 ° C y colocar las placas a 37 °C. En caso de añadir X-gal, utilizar 40 µl de 40 mg/ml de X-gal 1000x por placa, esparciendo con el asa.
8. Colocar la mezcla de transformación durante 45 segundos en el baño a 42 °C para el shock térmico y a continuación 1 minuto en hielo.
9. Bajo la llama, añadir 250 µl de medio S.O.C.
10. Agitar la mezcla de transformación en horizontal a 37 °C durante 1 h para permitir la expresión de los genes de resistencia a los antibióticos.
11. Bajo la llama, verter todo el contenido de la mezcla de transformación en la placa LB-kanamicina, esparciendo con el asa, e incubar a 37 °C O/N.

#### **4.6.2. OBTENCIÓN DE CLONES**

1. Preparar 50 ml de medio LB líquido que contenga 50 µg/ml de kanamicina.
2. Repartir el medio en tubos de vidrio autoclavados.



3. Seleccionar varias colonias con el asa esterilizada con llama colocando cada una de ellas en un tubo independiente. Incluir un tubo sin muestra como control de contaminación.
4. Incubar los tubos en agitación a 37 °C O/N.

#### **4.6.3. MINI PREPARACIONES DE PLÁSMIDO**

Para extraer el DNA plasmídico se utiliza el kit NucleoSpin Plasmid (Macherey-Nagel #740588 Düren, Alemania).

1. Tomar una muestra de 1.5 de cada tubo de crecimiento bacteriano y centrifugar durante 5 minutos a velocidad máxima.
2. Eliminar el sobrenadante y decantar el tubo en papel absorbente para eliminar cualquier resto de medio.
3. Resuspender muy lentamente las células con la pipeta en 250 µl de Solución de Resuspensión Celular.
4. Añadir 250 µl de Solución de Lisis y mezclar invirtiendo 4 veces.
5. Incubar durante 3 minutos exactos.
6. Añadir 10 µl de proteasa alcalina y mezclar invirtiendo 4 veces.
7. Incubar 5 minutos a temperatura ambiente, sin exceder el tiempo.
8. Añadir 350 µl de Solución de Neutralización y mezclar invirtiendo 4 veces.
9. Centrifugar a velocidad máxima durante 10 minutos a temperatura ambiente.
10. Transferir el sobrenadante con cuidado a una columna de purificación insertada en el tubo de colección, evitando cualquier residuo.
11. Centrifugar 2 minutos a 6000 x g y descartar el contenido del tubo colector.

12. Añadir 750  $\mu$ l de Solución de Lavado, previamente diluida con etanol 95%, a la columna.
13. Centrifugar a velocidad máxima 1 minuto y eliminar el contenido del tubo colector.
14. Repetir el lavado con 250  $\mu$ l de Solución de Lavado.
15. Centrifugar 2 minutos a velocidad máxima.
16. Transferir a la columna a un tubo nuevo de 1.5 ml estéril.
17. Eluir el DNA con 50  $\mu$ l de agua libre de nucleasas.
18. Centrifugar durante 2 minutos a 6000 x g
19. El producto está listo para secuenciación.

#### **4.7. SILENCIAMIENTO**

Para determinar si alguna de las bandas de TCF7L2 que se obtienen tras la exposición de células SH-SY5Y a ácido retinoico corresponde a isoformas dominante negativas, hemos llevado a cabo experimentos de silenciamiento con siRNA con afinidad por distintas regiones de TCF7L2, incluyendo un pool de siRNA que se une a la región del intrón 1 presente en las isoformas ID30.

El experimento consiste en inducir la diferenciación de células SH-SY5Y siguiendo el protocolo habitual descrito en el apartado 4.1. Al cabo de 3 días, coincidiendo con el cambio de medio, se coloca DMEM fresco sin FBS, que se suplementa con 1,1 ml de Opti-MEM (Gibco #31985-062 Waltham, MA), conteniendo 3,5  $\mu$ l de siRNA 20  $\mu$ M por ml de medio y 2,5  $\mu$ l de lipofectamina (Invitrogen #11668-019 Carlsbad, CA) por ml de medio.

Se incuban las células durante 6 horas en este medio, y a continuación se sustituye con medio convencional, con o sin ácido retinoico, hasta su recogida al finalizar el periodo de 6 días.

La técnica de silenciamiento también se ha aplicado para evaluar la capacidad de supervivencia antes y después de la diferenciación con ácido retinoico y después de la supresión de distintas isoformas de TCF7L2 con siRNA. En este último caso las células se exponen a los oligonucleótidos siRNA durante un periodo de 48 horas, para a continuación analizar la capacidad de supervivencia mediante el método que se describe en el apartado siguiente.

#### **4.8. ESTUDIO DE LA SUPERVIVENCIA CELULAR.**

Para analizar la capacidad de supervivencia de las células antes y después de la diferenciación con ácido retinoico y después de la supresión de distintas isoformas de TCF7L2 con siRNA, se ha utilizado el kit Cell Titer 96® Non-Radioactive Cell Proliferation Assay (Promega #G4000, Madison, WI). Este test consiste un método colorimétrico en el cual se mide la producción de un compuesto detectable por su absorbancia a 570 nm en un lector de placas. Cuanto mayor es el número de células viables que llevan a cabo la reacción colorimétrica, mayor es la absorbancia que se detecta, por lo que mayor es la capacidad de supervivencia estimada para esas células.

El protocolo consiste en los siguientes pasos:

1. Sembrar 10.000 células SH-SY5Y por pocillo en placas de 96 en un volumen de medio DMEM al 10% FBS de 100 µl.

2. A las 24 h cambiar el medio por el medio de diferenciación o bien proceder al experimento de silenciamiento.
3. Una vez concluidos los tratamientos respectivos, añadir 15  $\mu$ l de *Dye Solution* del kit Cell Titer 96® Non-Radioactive Cell Proliferation Assay a cada pocillo (las células se tiñen de color amarillo).
4. Incubar a 37 °C en ambiente húmedo y en 5% de CO<sub>2</sub> durante 4 horas. Observar el viraje de color que se da en las células, de amarillo a morado.
5. Después de la incubación, añadir 100  $\mu$ l de DMSO para lisar las células y que color se distribuya de forma uniforme en el pocillo.
6. Utilizar el lector de placas para leer la absorbancia a 570 nm.

## **5. RESULTADOS**

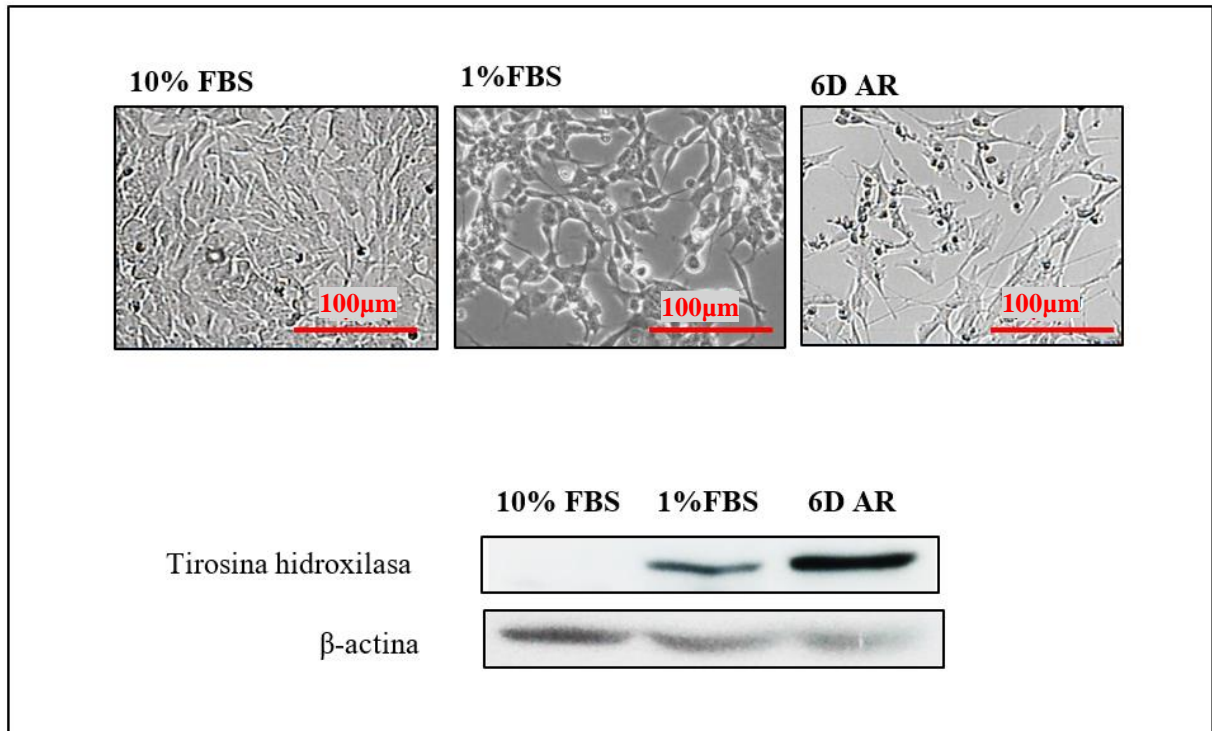
### **5.1. INDUCCIÓN DE LA DIFERENCIACIÓN DE CÉLULAS SH-SY5Y CON ÁCIDO RETINOICO.**

Las líneas celulares de neuroblastoma constituyen un modelo experimental para investigar la diferenciación de las células neoplásicas y de las neuronas (Abemayor y Sidell, 1989). La adición de ácido retinoico al medio de cultivo de células de neuroblastoma SH-SY5Y induce la transición de un fenotipo indiferenciado, proliferativo, invasivo y con gran capacidad de supervivencia, a un fenotipo diferenciado caracterizado por el cese de las divisiones celulares y un cambio de morfología consistente principalmente en la emisión de prolongaciones (neuritas). Como marcador molecular de diferenciación se ha utilizado la tirosina hidroxilasa. La información obtenida en este modelo experimental tiene interés tanto en el estudio del mecanismo de diferenciación de las células neoplásicas como en el estudio de la neurogénesis y sus trastornos.

La restricción de suero bovino fetal (FBS) disminuye la capacidad proliferativa de las células SH-SY5Y e induce la formación de prolongaciones (neuritas) (Figura 8).

Las células SH-SY5Y incubadas durante 6 días en presencia de ácido retinoico experimentan diferenciación tal como muestra la disminución de la proliferación, la formación de largas prolongaciones citoplasmáticas (neuritas) que superan en longitud a las propias células, y la expresión de tirosina hidroxilasa (Figura 8).

La albúmina del medio de cultivo fija el ácido retinoico, lo que puede disminuir su acción. Para inducir la diferenciación se utiliza una concentración menor de FBS y concentraciones suprafisiológicas de ácido retinoico (10  $\mu$ M).



**Figura 8. Diferenciación de la línea celular de neuroblastoma SH-SY5Y inducida por restricción de FBS y por la presencia de ácido retinoico (AR).** Cambios morfológicos y *Western blot* del marcador de diferenciación tirosina hidroxilasa. **10% FBS:** incubación durante 6 días en presencia de 10% FBS y en ausencia de ácido retinoico. **1% FBS:** 6 días con medio al 1% FBS sin retinoico. **6D AR:** 6 días con FBS al 1% y ácido retinoico 10 $\mu$ M.

## 5.2. CAMBIOS EN LA EXPRESIÓN DE LAS PROTEÍNAS TCF7L2 DURANTE LA DIFERENCIACIÓN DE CÉLULAS SH-SY5Y.

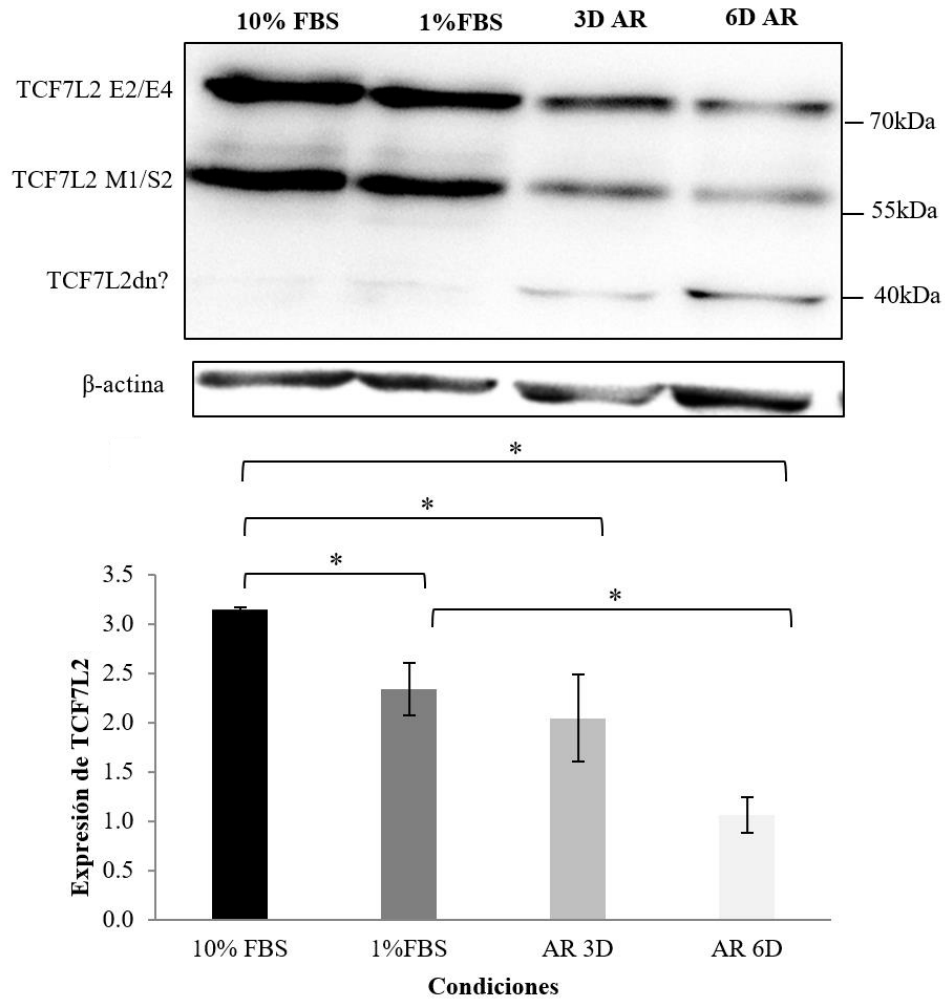
Uno de los principales objetivos de la tesis consistía en determinar los cambios de expresión de los factores de transcripción TCF7L2 en células de neuroblastoma durante el proceso de diferenciación inducida por el ácido retinoico.

Previamente se había observado en células de cáncer de colon que el ácido retinoico disminuía la vía Wnt canónica (Easwaran et al., 1999) y se postulaba que el ácido retinoico se une al receptor RAR y este compite con los factores de transcripción TCF7L2 por la  $\beta$ -catenina. De esta manera el ácido retinoico bloquea la vía Wnt canónica.

Otro mecanismo posible de interferencia de la vía Wnt canónica sería la disminución de expresión de los factores de transcripción TCF7L2 que intervienen en dicha vía uniéndose a la  $\beta$ -catenina.

Aunque la familia de factores de transcripción TCF7L2 es muy compleja, el *Western blot* de lisados de células de neuroblastoma SH-SY5Y muestra únicamente dos bandas, la E2/E4, por encima de 70 kDa y la M1/S2, por encima de 55 kDa. La electroforesis no indica si se trata de formas capaces de unirse a la  $\beta$ -catenina, y por tanto capaces de activar la vía Wnt canónica, o se trata de factores de transcripción TCF7L2 desprovistos del dominio de unión de la  $\beta$ -catenina que pueden actuar como dominante negativos de la vía Wnt canónica.

En presencia de ácido retinoico las bandas E2/E4 y M1/S2 disminuyen y una banda de 40 kDa aumenta. Los cambios más marcados se observan cuando las células son incubadas con ácido retinoico durante 6 días (Figura 9). No conocemos la identidad de la banda de 40 kDa detectada por el anticuerpo anti-TCF7L2.

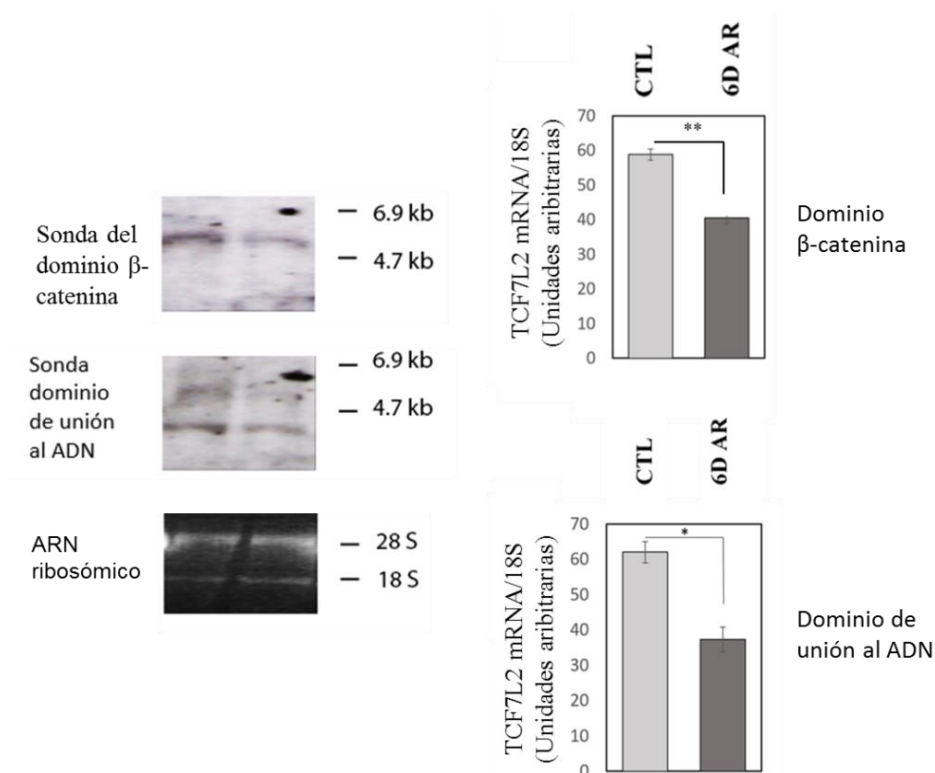


**Figura 9:** Expresión de los factores de transcripción TCF7L2 durante la diferenciación de células SH-SY5Y inducida por ácido retinoico. *Western blot* de los factores de transcripción TCF7L2 obtenidos a partir de lisados de células de neuroblastoma SH-SY5Y. **10% FBS:** 6 días con medio al 10%, **1% FBS:** 6 días con medio al 1% FBS sin ácido retinoico, **3D AR:** 3 días con medio al 1% FBS con ácido retinoico 10  $\mu$ M y **6D AR:** 6 días con medio al 1% FBS con ácido retinoico 10  $\mu$ M. TCF7L2 E2/E4, isoformas largas y TCF7L2 M1/S1, isoformas cortas. La actina se ha utilizado como control de carga. En la parte inferior de la figura se muestra la densitometría de las bandas. \* $p < 0.05$ ;  $n = 4$ .



### 5.3. CAMBIOS EN LA EXPRESIÓN DE LOS TRÁNSCRITOS DE *TCF7L2* DURANTE LA DIFERENCIACIÓN DE CÉLULAS SH-SY5Y.

Para determinar si los cambios en la expresión de los factores de transcripción *TCF7L2* durante la diferenciación de células SH-SY5Y se deben a cambios de transcripción, analizamos los cambios en los RNA mensajeros de *TCF7L2* en extractos de RNA total utilizando la técnica del *Northern blot* (Figura 10). Más adelante se muestran los resultados obtenidos por PCR.



**Figura 10: Expresión de los transcritos completos de *TCF7L2* durante la diferenciación de células SH-SY5Y inducida por ácido retinoico.** Análisis *Northern blot* de los transcritos *TCF7L2*, detectados hibridando en la zona inicial (sonda PR1Fw-PR2Rv, Anexo II), obtenidos a partir del RNA total de células de neuroblastoma SH-SY5Y tratadas en ausencia (CTL) o en presencia (AR) de ácido retinoico 10  $\mu$ M. A la derecha, análisis densitométrico de las bandas. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ ,  $n = 3$

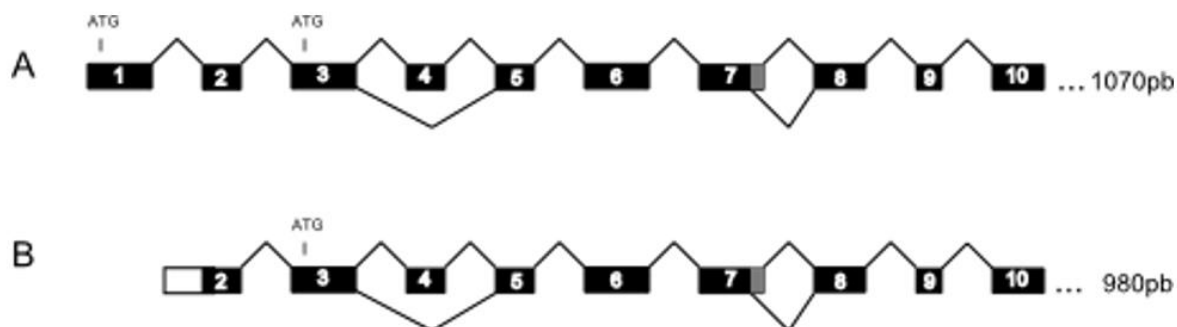
La sonda utilizada para realizar los *Northern* corresponde a la región del dominio  $\beta$ -catenina de los factores TCF7L2, por lo que los transcritos detectados contienen este dominio y dan lugar a factores de transcripción capaces de activar la vía Wnt. Los *primers* utilizados en la fabricación de esta sonda son PR1Fw y PR2Rv (Anexo I), que amplifican el fragmento de los exones 1 y 2. En los *Northern*s obtenidos mediante esta sonda no se detectan las formas de TCF7L2 dominante negativas que codifican factores de transcripción que inhiben la vía Wnt.

La figura 10 muestra el *Northern* de los RNA mensajeros TCF7L2 obtenidos a partir de extractos de RNA total de células SH-SY5Y durante el proceso de diferenciación celular inducido por el ácido retinoico. El *Northern* muestra una disminución significativa de los transcritos con dominio  $\beta$ -catenina. Este resultado indica que la disminución de las proteínas correspondientes tiene lugar, al menos en parte, por una disminución de la transcripción. La disminución de los transcritos de TCF7L2 con dominio de unión de la  $\beta$ -catenina puede determinar la disminución de la señalización en la vía Wnt canónica.

#### **5.4. CARACTERIZACIÓN DE POSIBLES ISOFORMAS DE TCF7L2 SIN EL DOMINIO DE UNIÓN A LA $\beta$ -CATENINA (FORMAS DOMINANTE NEGATIVAS) DURANTE LA DIFERENCIACIÓN DE CÉLULAS SH-SY5Y INDUCIDA POR ÁCIDO RETINOICO.**

Para determinar la posible existencia de isoformas TCF7L2 sin el dominio de unión de la  $\beta$ -catenina en células SH-SY5Y diferenciadas en presencia de ácido retinoico, se procedió a realizar un RACE 5' (*Rapid Amplification of cDNA Ends*) de los transcritos usando los *primers*, GSP2 y Nested (Anexo I y III). Una de las bandas más intensas del

producto de RACE en un gel de agarosa se recortó y se clonó para seleccionar isoformas independientes. Se secuenciaron mediante el empleo de *primer nested* (Anexo I) 9 isoformas, 4 de las cuales contenían el exón 1, seguido del 2 y el 3. Un segundo grupo, representado por 5 de las 9 isoformas secuenciadas empezaba por el intrón 1, seguido por los exones 2 y 3 (Figura 11). Las isoformas que empiezan en el intrón 1 carecen del dominio de unión de la  $\beta$ -catenina que se encuentra en el exón 1 y son, en consecuencia, dominante negativas.



**Figura 11. Iniciación alternativa de la transcripción de TCF7L2 determinada por RACE 5' en células SH-SY5Y diferenciadas con ácido retinoico.** Representación esquemática de la estructura de los 2 grupos de isoformas obtenidas mediante RACE con un inicio alternativo de la transcripción. La representación acaba en el exón 10 en el que estaba situado el *reverse primer*. Las isoformas A poseen el dominio de unión de la  $\beta$ -catenina, mientras que las isoformas B carecen de dicho dominio y pueden actuar, en consecuencia, como isoformas dominante negativas.

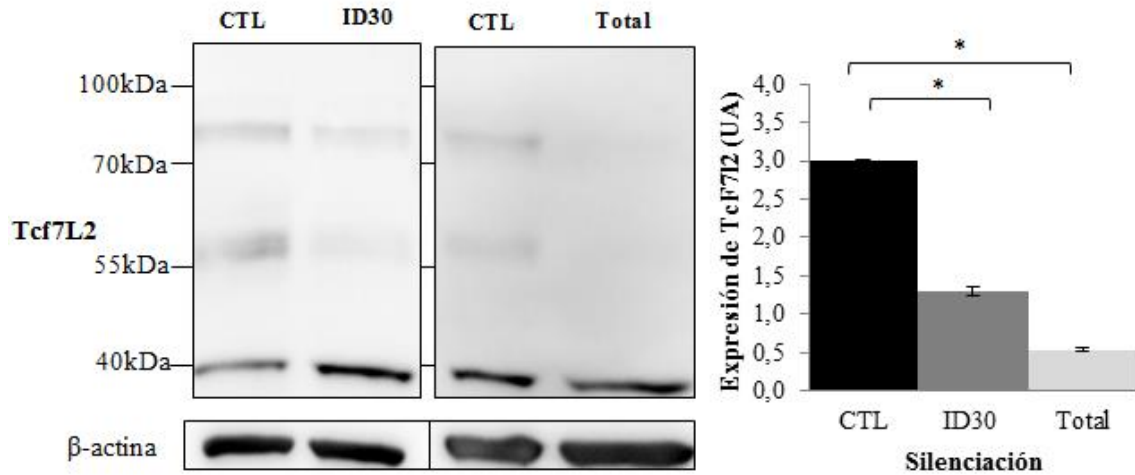
A este inicio específico en el intrón 1 se le denomina ID30, entendiéndose de esta manera que varias isoformas pueden tener este mismo inicio siendo diferentes otras zonas del transcrito.

Para caracterizar el extremo 3' de una de las isoformas dominante negativas se procedió a realizar el RACE 3'. La existencia de una región rica en adeninas en el exón 10 que actúa como una cola poliA a la que se une el oligo dT impidió realizar el RACE 3' (Anexo III).

### **5.5. CARACTERIZACIÓN DE LA BANDA DE 40KDA INDUCIDA DURANTE LA DIFERENCIACIÓN DE CÉLULAS SH-SY5Y CON ÁCIDO RETINOICO.**

En la introducción se ha comentado que en el encéfalo del embrión de ratón se han descrito cuatro transcritos de *TCF7L2* dominante negativos que tienen el sitio de iniciación en el intrón 5 del gen (Vacik et al., 2011). Estos transcritos dan lugar a proteínas de pesos moleculares 35 kDa y 40 kDa.

Una de las bandas reconocidas por el anticuerpo anti-TCF7L2 en células SH-SY5Y tratadas con ácido retinoico muestra un peso molecular de 40 kDa. Para determinar si la banda de 40 kDa es una isoforma dominante negativa inducida por el ácido retinoico hemos silenciado los transcritos de *TCF7L2* con siRNA compuesto de un pool comercial de oligonucleótidos con afinidad por los exones 2 (SE2), 6 (SE6), 10 (SE10) y 14 (SE14) (Anexo IV).



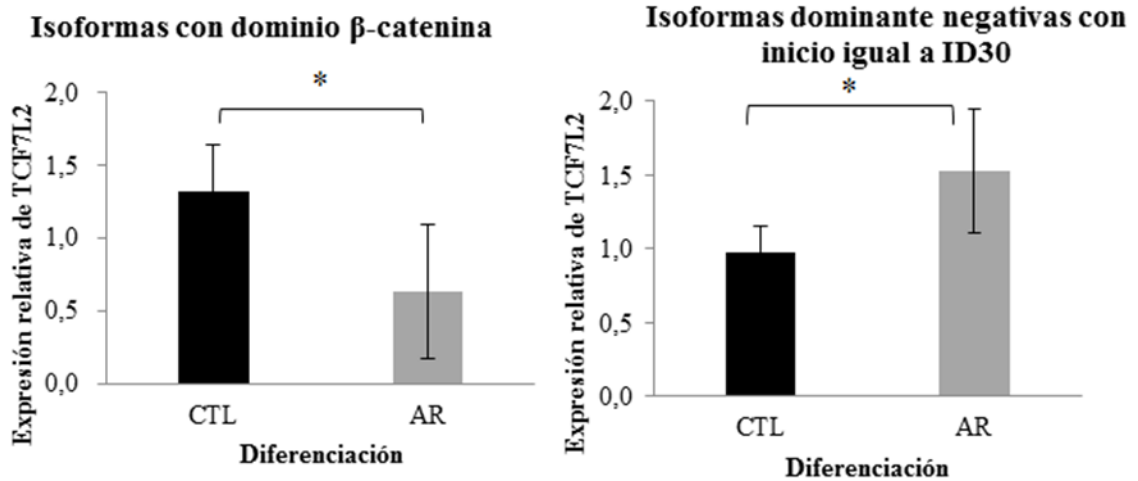
**Figura 12. Efecto del silenciamiento de las isoformas dominante negativas ID30 y de todas las isoformas de TCF7L2 en células SH-SY5Y diferenciadas con ácido retinoico.** El silenciamiento de la isoforma dominante negativa ID30 y de otras isoformas dominante negativas que compartan con la ID30 la misma secuencia del intrón 1 da lugar a una notable disminución de los transcritos de TCF7L2. El silenciamiento de todos los transcritos de TCF7L2 produce una disminución mayor de la expresión del gen. **CTL**: células diferenciadas 6 días con ácido retinoico, **ID30**: células diferenciadas 6 días con ácido retinoico y silenciadas para la isoforma con inicio ID30, **Total**: células diferenciadas 6 días con ácido retinoico y silenciadas para todas las formas de TCF7L2. n=3, \*p<0.05

Después de silenciar los transcritos de *TCF7L2*, las isoformas E2/E4 y M1/S2 disminuyen tal como cabía esperar, mientras que la banda de peso molecular 40 kDa persiste. Lo mismo ocurre silenciando las isoformas que inician en el intrón 1, como la ID30 (Figura 12), con el pool SIp1/2/3 hecho a medida (Anexo IV).

Los experimentos de interferencia indicarían que las formas E2/E4 y M1/S2 detectadas con el anticuerpo anti-TFC7L2 contienen isoformas con el dominio  $\beta$ -catenina e isoformas sin dicho dominio. La isoforma de peso molecular 40 kDa no resulta silenciada por ninguno de los sistemas de interferencia utilizados por lo que, a pesar de ser reconocida por el anticuerpo, no pertenecería a la familia de isoformas del gen *TCF7L2*.

## **5.6. CUANTIFICACIÓN DE LA EXPRESIÓN RELATIVA DE ISOFORMAS CON Y SIN DOMINIO $\beta$ -CATENINA DURANTE LA DIFERENCIACIÓN DE LAS CÉLULAS SH-SY5Y INDUCIDA POR ÁCIDO RETINOICO.**

Las isoformas con dominio  $\beta$ -catenina activan la vía Wnt canónica en células madre y células progenitoras, mientras que las isoformas que carecen de  $\beta$ -catenina, actúan como dominante negativas inhibiendo la vía Wnt canónica. En células de cáncer de colon que adquieren resistencia a la quimioterapia aumenta la  $\beta$ -catenina fosforilada unida a las isoformas TCF7L2, particularmente a las E2/E4 (Mezquita et al., 2016). Nuestra hipótesis de trabajo propone que la diferenciación de las células de neuroblastoma SH-SY5Y inducida por ácido retinoico implicaría la disminución de las isoformas TCF7L2 con dominio  $\beta$ -catenina, tal como hemos mostrado anteriormente en el análisis de la transcripción mediante *Northern blot* y también podrían aumentar durante la diferenciación las isoformas dominante negativas. La cuantificación por PCR muestra que la expresión de los transcritos con dominio  $\beta$ -catenina, determinados mediante los *primers* PR1Fw y PR2Rv (Anexo I), disminuye, mientras que la expresión de isoformas dominante negativas del tipo ID30, determinadas mediante los *primers* PRi1Rv y PRe2Rv (Anexo I), aumenta (Figura 13).

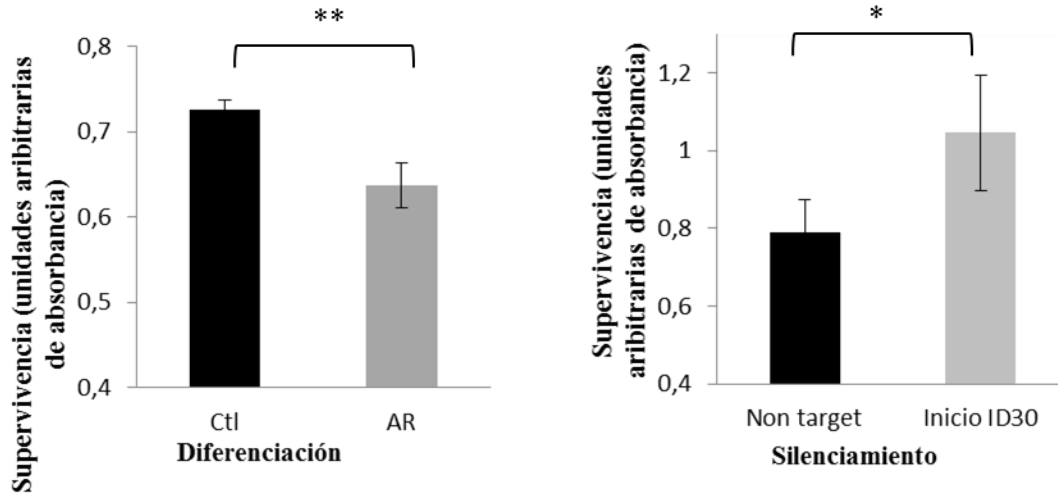


**Figura 13: Expresión relativa de los transcritos de *TCF7L2* durante la diferenciación de células SH-SY5Y inducida por ácido retinoico.** Análisis mediante *real-time* PCR para determinar la expresión de transcritos con dominio de unión de la  $\beta$ -catenina y de transcritos sin el dominio  $\beta$ -catenina (dominante negativos) con un sitio de iniciación común al de la isoforma ID30. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ;  $n = 6$ . Expresión relativa.

### 5.7. CAMBIOS EN LA CAPACIDAD DE SUPERVIVENCIA DE LAS CÉLULAS SH-SY5Y DURANTE LA DIFERENCIACIÓN INDUCIDA POR ÁCIDO RETINOICO Y DESPUÉS DE LA INTERFERENCIA CON siRNA DE DISTINTOS TRÁNSCRITOS DE TCF7L2.

La adquisición de resistencia a la quimioterapia en células de cáncer de colon (LoVo) implica un notable aumento de la  $\beta$ -catenina fosforilada y de los factores de transcripción TCF7L2, particularmente de las isoformas E2/E4 (Mezquita et al., 2016). La interferencia de la expresión global de TCF7L2 disminuye la capacidad de supervivencia frente a la quimioterapia (Mezquita et al., 2016). Para determinar la relación entre la expresión de TCF7L2 y la capacidad de supervivencia, hemos evaluado dicha capacidad antes y después

de la diferenciación con ácido retinoico y después de la supresión de distintas isoformas de TCF7L2 con siRNA (Figura 14).



**Figura 14. Cambios en la supervivencia de células SH-SY5Y diferenciadas con ácido retinoico y mediante el silenciamiento de la familia de isoformas ID30.** Diferencias en la viabilidad celular en células SH-SY5Y en las siguientes condiciones: **Ctl**: mantenidas 6 días al 1% FBS; **AR**: diferenciadas 6 días con ácido retinoico; **Non target**: cultivadas al 10% FBS con una combinación de siRNA non-target; **Inicio ID30**: cultivadas al 10% FBS y silenciadas con siRNA Sp1/2/3 (Anexo IV)\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0,005$ :  $n=6$ .

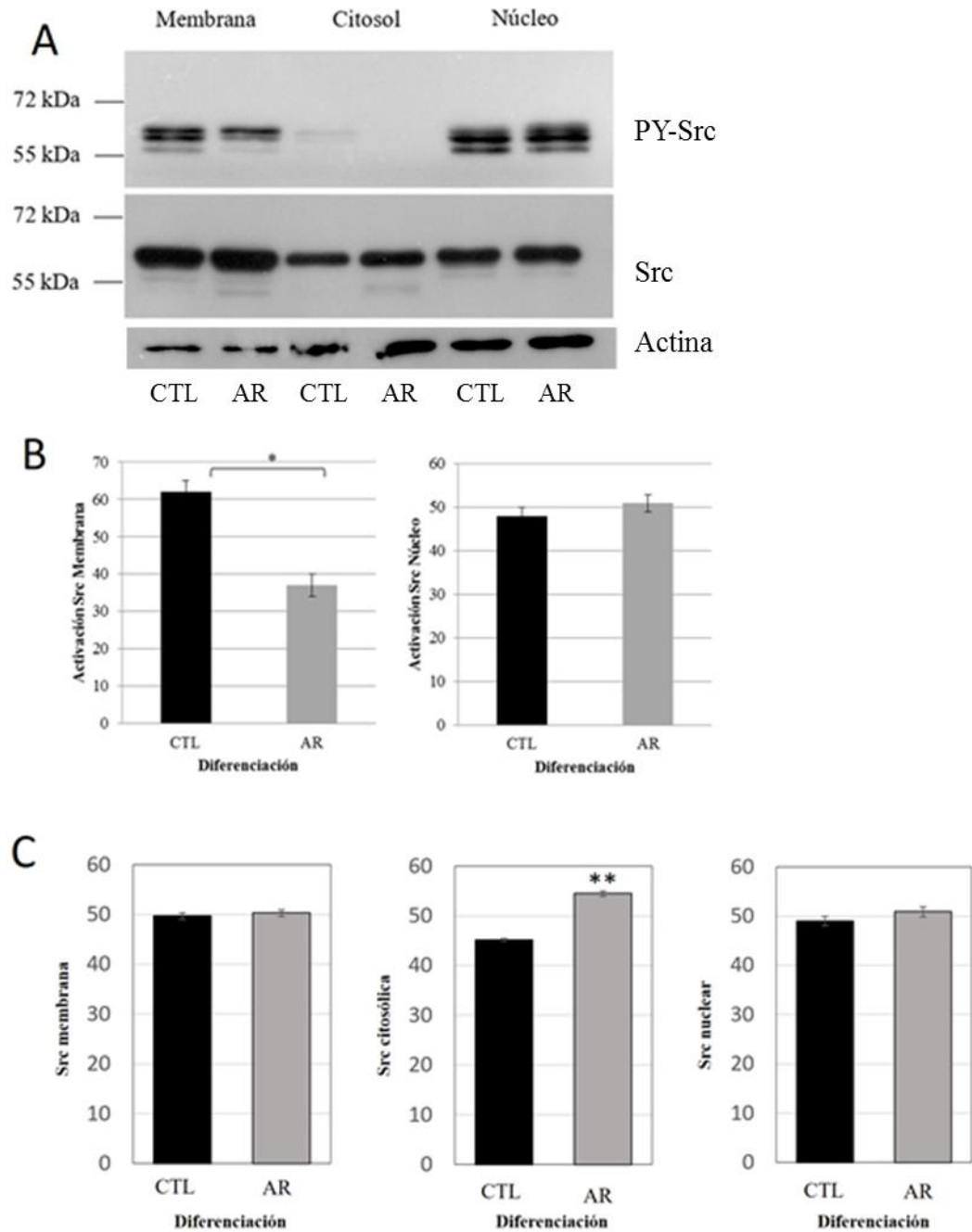
La figura 15 muestra cómo la viabilidad celular disminuye en las células tratadas con ácido retinoico durante 6 días, es decir disminuye la capacidad de supervivencia a celular tal y como se ha comentado anteriormente. Por otra parte, se observa que las células a las que se silencian la familia de isoformas ID30 aumentan la viabilidad celular y por lo tanto el silenciamiento de estas isoformas dominante negativas incrementa la capacidad de supervivencia de las células SH-SY5Y.



## **5.8. EXPRESIÓN Y ACTIVIDAD DE LAS CINASAS c-SRC Y YAP DURANTE LA DIFERENCIACIÓN DE CÉLULAS DE SH-SY5Y INDUCIDA POR ÁCIDO RETINOICO.**

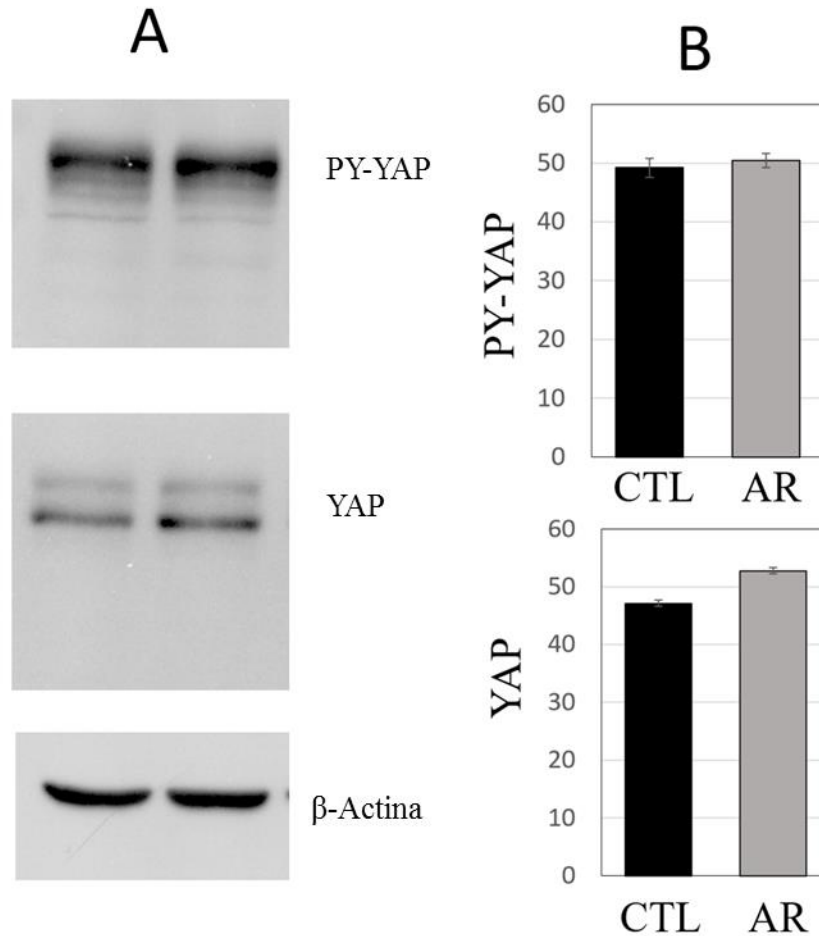
El cambio de expresión de los factores de transcripción TCF7L2 que hemos observado durante el proceso de diferenciación de las células de neuroblastoma SH-SY5Y inducido por el ácido retinoico puede contribuir al cambio del fenotipo de las células junto a otros cambios genómicos y extra-genómicos. Entre las acciones del ácido retinoico que potencian el fenotipo de las células madre cabe destacar la activación de la cinasa IP3K (Rossetti et al., 2015) y la activación de la cinasa c-Src (Mezquita et al., 2017).

La figura 15 muestra los cambios de actividad de la cinasa c-Src durante la diferenciación de las células de neuroblastoma SH-SY5Y inducida por el ácido retinoico. La actividad de Src disminuye significativamente en la membrana celular y no se modifica en el compartimiento nuclear. La expresión de Src no se modifica en la membrana celular ni en el núcleo. En el citosol la Src no es activa, tal como muestra la falta de fosforilación. Esta forma inactiva aumenta discretamente por acción del ácido retinoico.



**Figura 15.** Cambios en la actividad y expresión de la cinasa c-Src en células SH-SY5Y tras la exposición a ácido retinoico 10 $\mu$ M durante 48 horas. *Western blot* (A) y análisis densitométricos de la PY-Src (B) y c-Src (C). La actividad de c-Src disminuye en la membrana celular (n=3, \*p<0.05) y la cantidad de c-Src inactiva aumenta en el citosol (n=3, \*\*p<0.01). No se observan cambios en las otras localizaciones.

La expresión y la actividad de la cinasa YAP no se modifican por la acción del ácido retinoico (Fig. 16). El eje Src-YAP no se activa en las células SH-SY5Y incubadas con retinoico durante 48 horas. Tampoco se observaron cambios en exposiciones más largas de 5 días.



**Figura 16. Cambios en la actividad y expresión de la cinasa YAP en células SH-SY5Y tras la exposición a ácido retinoico 10 $\mu$ M durante 48 horas.** *Western blot* (A) y análisis densitométricos (B) de la PY-YAP y YAP. La actividad de YAP y la expresión de YAP no se modifican significativamente durante la inducción.



## **6. DISCUSIÓN**

El ácido retinoico modula la transición de las células madre a células diferenciadas a través de múltiples acciones genómicas y extra-genómicas. Las vías de señalización inducidas por el ácido retinoico que son responsables del equilibrio entre la persistencia del fenotipo de las células madre y la adquisición del fenotipo de las células diferenciadas sólo se conocen parcialmente. Como modelo experimental para investigarlas hemos utilizado células de neuroblastoma SH-SY5Y incubadas en presencia de concentraciones supra-fisiológicas de ácido retinoico. Este modelo ha sido utilizado para investigar la diferenciación neuronal en células normales y transformadas (Abemayor y Sidell, 1989). En estas células hemos investigado la acción del ácido retinoico sobre dos vías de señalización esenciales en el mantenimiento del fenotipo de las células madre: la vía Wnt canónica ( $\beta$ -catenina-TCF7L2) y la vía Src-YAP.

### **6.1. INDUCCIÓN DE LA DIFERENCIACIÓN DE CÉLULAS SH-SY5Y TRAS LA EXPOSICIÓN A ÁCIDO RETINOICO.**

La incubación de células de neuroblastoma SH-SY5Y en presencia de dosis supra-fisiológicas de ácido retinoico induce la diferenciación celular con emisión de prolongaciones (neuritas) y expresión de tirosina hidroxilasa. Se utilizan dosis supra-fisiológicas de ácido retinoico debido a que, en las células transformadas, muchos de los genes inducidos por el ácido retinoico en condiciones fisiológicas experimentan represión epigenética y sólo se expresan en respuesta a concentraciones supra-fisiológicas de ácido

retinoico (Rossetti et al., 2016). Los resultados que hemos obtenido al inducir la diferenciación de las células SH-SY5Y coinciden con los descritos en la bibliografía.

## **6.2. CAMBIOS EN LA EXPRESIÓN DE LOS FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN TCF7L2 DURANTE LA DIFERENCIACIÓN DE CÉLULAS SH-SY5Y INDUCIDA POR ÁCIDO RETINOICO.**

No existen datos previos en la bibliografía sobre el cambio de expresión de los factores de transcripción TCF7L2 durante el proceso de diferenciación de las células de neuroblastoma SH-SY5Y inducida por el ácido retinoico. El patrón electroforético de las proteínas TCF7L2 es semejante al obtenido en otras células. Aunque este grupo de factores de transcripción es altamente heterogéneo, en la electroforesis aparecen únicamente dos bandas principales, la E2/E4, por encima de 70 kDa, y la M1/S2, por encima de 55 kDa. Además, se detecta una banda de 40 kDa. En presencia de ácido retinoico, las bandas E2/E4 y M1/S2 disminuyen y la banda de 40 kDa aumenta.

Aunque no existan datos en la bibliografía sobre los cambios de expresión del grupo de factores de transcripción TCF7L2 en respuesta al ácido retinoico, existen dos referencias relativas al efecto del ácido retinoico sobre la vía de señalización  $\beta$ -catenina/Lef-Tcf. En células de cáncer de colon el ácido retinoico disminuye la actividad de la vía de señalización  $\beta$ -catenina–LEF/TCF (Easwaran et al., 1999). En este caso el efecto no tendría lugar a través del control de la expresión de TCF7L2, sino que sería debido a que el complejo retinoico-receptor competiría con los factores de transcripción TCF por la unión de la  $\beta$ -catenina. En otro modelo experimental, en células totipotentes F9 de

teratocarcinoma, la vía de señalización  $\beta$ -catenina/LEF-TCF es activada en respuesta al ácido retinoico durante la formación del endodermo primitivo (Liu et al., 2002).

### **6.3. CAMBIOS DE EXPRESIÓN DE LOS FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN TCF7L2 Y ACTIVIDAD DE LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN WNT CANÓNICA.**

Tal como se ha descrito en la introducción, la vía canónica Wnt controla el desarrollo embriológico del sistema nervioso y de otros sistemas. En el adulto, la actividad de la vía Wnt queda restringida a las células madre y a las células progenitoras (Maretto et al., 2003; Haegebarth y Clevers 2009; Wend et al., 2010; Lie et al., 2005; Kuwabara et al., 2009). En células de cáncer de colon, el ácido retinoico disminuye la actividad de la vía de señalización  $\beta$ -catenina–LEF/TCF (Easwaran et al., 1999).

Si todos los factores de transcripción TCF7L2 activaran la vía de señalización Wnt canónica, la disminución de la expresión de este grupo de factores de transcripción implicaría la inhibición de la vía de señalización Wnt canónica. No obstante, el anticuerpo utilizado en el *Western blot* no permite discriminar entre las formas que poseen el dominio de unión de la  $\beta$ -catenina y activan la vía de señalización Wnt canónica y las formas que no poseen el dominio de unión y actúan como dominante negativas inhibiendo la vía de señalización. Para obviar este inconveniente se realizaron análisis *Northern* con sondas que reconocen específicamente los factores de transcripción TCF7L2 con dominios de unión de  $\beta$ -catenina. Los *Northern* muestran una disminución significativa de los transcritos con dominio  $\beta$ -catenina. La disminución de transcritos TCF7L2 con dominio de unión de la  $\beta$ -catenina puede contribuir a la disminución de la señalización en la vía Wnt canónica.

Para determinar la existencia de factores de transcripción TCF7L2 sin dominio de unión de la  $\beta$ -catenina que actúen inhibiendo la vía Wnt canónica, se procedió a realizar un RACE 5' de los transcritos TCF7L2.

#### **6.4. EXPRESIÓN DE ISOFORMAS DOMINANTE NEGATIVAS DE TCF7L2 DURANTE LA DIFERENCIACIÓN DE CÉLULAS SH-SY5Y INDUCIDA POR ÁCIDO RETINOICO.**

Durante la diferenciación de las células de neuroblastoma se expresan, pues, isoformas con dominio de unión a la  $\beta$ -catenina e isoformas sin este dominio de unión. Por *Northern* habíamos determinado que las isoformas con dominio de unión de la  $\beta$ -catenina disminuían durante el proceso de diferenciación inducido por el ácido retinoico, lo que puede implicar una disminución de la actividad de la vía Wnt canónica. Como la actividad de esta vía depende adicionalmente de las isoformas dominante negativas, determinamos por PCR cuantitativo cómo varían las isoformas dominante negativas durante la diferenciación de las células SH-SY5Y inducida por el ácido retinoico.

La banda de 40 kDa, que aumenta durante el proceso de diferenciación inducido en las células SH-SY5Y por el ácido retinoico, aunque sea detectada por el anticuerpo anti-TCF7L2, no corresponde a ninguna isoforma de la proteína, ya que su concentración no disminuye al silenciar la expresión de todas las isoformas de TCF7L2 o de las isoformas dominante negativas. Las bandas E2/E4 y M1/S2 disminuyen al silenciar todas las isoformas o las isoformas dominante negativas. Ello indica que las bandas E2/E4 y M1/S2 contienen isoformas con el dominio de unión de la  $\beta$ -catenina e isoformas sin dicho dominio. Debido a la posibilidad de un reconocimiento inespecífico por los anticuerpos



anti-TCF7L2, es importante validar los resultados mediante el silenciamiento de los transcritos de TCF7L2.

### **6.5. EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE ISOFORMAS DE TCF7L2 CON Y SIN DOMINIO DE UNIÓN DE LA $\beta$ -CATENINA DURANTE LA DIFERENCIACIÓN DE CÉLULAS SH-SY5Y INDUCIDA POR ÁCIDO RETINOICO.**

La cuantificación por PCR muestra que la expresión de los transcritos con dominio  $\beta$ -catenina disminuye, mientras que la expresión de isoformas dominante negativas que hemos detectado en estas células aumenta.

En células de cáncer de colon que adquieren resistencia a la quimioterapia, aumenta la  $\beta$ -catenina fosforilada unida a las isoformas TCF7L2, particularmente a las E2/E4 (Mezquita et al., 2016). Puesto que la diferenciación de las células de neuroblastoma SH-SY5Y inducida por ácido retinoico implica la disminución de las isoformas TCF7L2 con dominio  $\beta$ -catenina y el aumento de las isoformas dominante negativas sin dicho dominio, cabe esperar que la disminución de actividad de la vía de señalización Wnt se acompañe de una disminución de la capacidad de supervivencia de las células SH-SY5Y, tal como ocurre en otros sistemas.

## **6.6. CAMBIOS EN LA SUPERVIVENCIA DE LAS CÉLULAS SH-SY5Y DURANTE LA DIFERENCIACIÓN INDUCIDA POR ÁCIDO RETINOICO Y TRAS EL SILENCIAMIENTO DE LA EXPRESIÓN DE LOS FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN TCF7L2 DOMINANTE NEGATIVOS.**

La viabilidad de las células SH-SY5Y disminuye durante el proceso de diferenciación inducido en respuesta al ácido retinoico. En estas células hemos observado una disminución de la expresión de isoformas TCF7L2 con dominio de unión de la  $\beta$ -catenina y un aumento de las isoformas desprovistas de este dominio. El silenciamiento de la expresión de las isoformas dominante negativas implica un aumento de la supervivencia.

Los cambios observados en la capacidad de supervivencia están de acuerdo con los que ocurren en la transición de las células madre, con gran capacidad de supervivencia, a las células diferenciadas con una capacidad más limitada. La acción del ácido retinoico sobre la expresión de TCF7L2 puede aumentar la vulnerabilidad de las células de neuroblastoma frente al tratamiento quimioterápico. Esta acción puede contribuir a la disminución de las recidivas que se observan después del tratamiento de los neuroblastomas con ácido retinoico.

Tal como se ha indicado anteriormente, en los neuroblastomas avanzados, para evitar las recaídas después de la quimioterapia, se realiza un tratamiento con ácido 13-cis-retinoico. Aunque el tratamiento resulta efectivo en la mitad de los casos, aún mueren la otra mitad de los niños, por causas que se desconocen. El aumento de vulnerabilidad celular por el cambio de expresión de los factores TCF7L2 en respuesta al ácido retinoico podría contribuir a una terapia efectiva. No sabemos si diferentes formas clínicas de

neuroblastoma implican una respuesta diferente al ácido retinoico en la expresión de TCF7L2.

No todas las acciones del ácido retinoico sobre las células tumorales y sobre células normales favorecen la transición del fenotipo de las células madre al fenotipo de las células diferenciadas. Algunas de las acciones del ácido retinoico promueven el fenotipo de las células madre, por ejemplo, la activación de la cinasa IP3K (Rossetti et al., 2015) o la activación de la cinasa c-Src (Mezquita et al., 2017, enviado para publicación). Por este motivo hemos investigado la acción del ácido retinoico sobre el eje Src-YAP.

### **6.7. ACTIVIDAD DEL EJE SRC-YAP DURANTE LA DIFERENCIACIÓN DE LAS CÉLULAS SH-SY5Y INDUCIDA POR ÁCIDO RETINOICO.**

El ácido retinoico puede promover la diferenciación, pero también el fenotipo de las células madre. El resultado final de la acción del retinoico depende del balance entre las acciones promotoras de la diferenciación (Marcato et al., 2015; Mezquita et al., 2010, 2014; Rossetti et al., 2016) y las acciones promotoras de la expresión del fenotipo de las células madre (Marcato et al., 2015; Rossetti et al., 2016; Mezquita et al., 2017 enviado para publicación). El eje Src-YAP-Interleucina 6 induce el fenotipo característico de las células madre y es activado por el ácido retinoico en determinadas células tumorales (Mezquita et al., 2017). Nuestros resultados indican que durante la diferenciación de las células de neuroblastoma SH-SY5Y inducida por el ácido retinoico, no se observan cambios en la expresión de Src en ninguna de las tres fracciones analizadas, membrana, citosol y núcleo. La actividad de Src disminuye significativamente en la membrana celular

y no se modifica en el compartimiento nuclear. La actividad de YAP no se modifica (Fig. 16). Por lo tanto, el eje Src-YAP no se activa durante la diferenciación de las células SH-SY5Y inducida por el ácido retinoico.

La falta de activación de Src resulta crítica, puesto que se ha observado que diferentes líneas de neuroblastoma tratadas con el inhibidor de Src PP2 experimentan una drástica agregación, apoptosis y disminución de la proliferación (Hishiki et al., 2011). Aunque c-Src no aumente de actividad en células SH-SY5Y en respuesta al ácido retinoico, la elevada actividad de Src en estas células sugiere que su inhibición puede constituir una importante diana terapéutica (Kratimenos et al., 2014; Palacios-Moreno et al., 2015; Tintori et al., 2015). La inhibición de la familia de cinasas Src, por otra parte, aumenta la expresión de los genes inducidos por ácido retinoico y promueve la diferenciación de las células mieloides en la leucemia promielocítica humana (Miranda et al., 2007; Yoon et al., 2013; Jung et al., 2013; Jensen et al., 2013, 2015).

## **6.8. ÁCIDO RETINOICO, FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN TCF7L2 Y ENFERMEDADES PSIQUIÁTRICAS.**

Anteriormente se ha comentado que la haploinsuficiencia del gen TCF7L2 provoca un fenotipo de ansiedad en los ratones (Savic et al., 2011), lo que sugiere la posible implicación de las proteínas TCF7L2 en trastornos psiquiátricos. Del mismo modo que variantes del gen TCF7L2 se consideran un factor de riesgo de la diabetes tipo 2 (Grant et al., 2006), se han relacionado variantes del gen con el riesgo de esquizofrenia (Hansen et al., 2011; Alkelai et al., 2012). Otros componentes de la vía de señalización Wnt están

asociados con la susceptibilidad a la esquizofrenia (Cui et al., 2005; Kishimoto et al., 2008; Proitsi et al., 2008; Li et al., 2011).

Por otra parte, se han investigado las funciones del ácido retinoico en el cerebro y las alteraciones de esta función en la esquizofrenia, así como los resultados de los ensayos clínicos con retinoides en la terapia de la esquizofrenia (Lerner et al., 2016). Estas investigaciones y nuestras observaciones sobre el efecto del ácido retinoico en la expresión de los factores de transcripción TCF7L2 sugieren que el control de la vía de señalización Wnt canónica por el ácido retinoico puede contribuir a explicar los efectos terapéuticos de los retinoides en la esquizofrenia.



## 7. CONCLUSIONES

- Las células de neuroblastoma humano SH-SY5Y incubadas durante 6 días en presencia de una concentración supra-fisiológica de ácido retinoico presentan un fenotipo diferenciado en comparación con las células control. Es decir, se caracterizan por tener neuritas prolongadas, presentar una disminución de la proliferación y aumento en la expresión de tirosina hidroxilasa.
- La expresión de los factores de transcripción TCF7L2 con dominio de unión a la  $\beta$ -catenina disminuye durante la diferenciación de las células SH-SY5Y inducida por el ácido retinoico.
- Existen isoformas dominante negativas de TCF7L2 que aumentan su expresión durante la diferenciación por ácido retinoico. En este trabajo se ha descrito una familia de transcritos que presentan un inicio alternativo en el intrón 1.
- La diferenciación de las células SH-SY5Y inducida por el ácido retinoico da lugar a una disminución de la supervivencia celular.
- La interferencia de las isoformas dominante negativas con el inicio alternativo, descrito en este trabajo, da lugar a un aumento de la supervivencia celular de las células SH-SY5Y.
- La actividad de la cinasa c-Src disminuye en la membrana y no se modifica en el núcleo durante la diferenciación de las células SH-SY5Y con ácido retinoico.





## 8. APORTACIÓN CIENTÍFICA

¿Qué se sabe del tema hasta ahora?

- Las células de neuroblastoma humano experimentan diferenciación en respuesta al tratamiento con ácido retinoico. Por este motivo el ácido retinoico se utiliza para evitar las recidivas después del tratamiento del neuroblastoma con quimioterapia.
- La vía Wnt/ $\beta$ -catenina, de la que forman parte los factores de transcripción TCF7L2, promueve la expresión de un conjunto de genes implicados en el fenotipo de las células madre, esenciales para el desarrollo del sistema nervioso y otros sistemas del organismo.
- Se han caracterizado isoformas de TCF7L2 desprovistas del dominio de unión a la  $\beta$ -catenina que actúan como formas dominante negativas de la vía de señalización Wnt canónica y que juegan un papel relevante en el desarrollo del sistema nervioso.
- Los factores TCF7L2 y el ácido retinoico resultan esenciales para la fisiología del sistema nervioso durante el desarrollo y en el adulto.
- La vía de señalización Src-YAP resulta esencial para el mantenimiento del fenotipo de las células madre.
- No se conoce el efecto del ácido retinoico sobre la expresión de los factores de transcripción TCF7L2 y sobre la actividad de la vía Src-YAP en células de neuroblastoma.

¿Qué aporta este estudio?

- La caracterización en células de neuroblastoma SH-SY5Y de isoformas TCF7L2 sin dominio de unión a la  $\beta$ -catenina que inician su transcripción en el intrón 1.
- El efecto de la diferenciación de las células de neuroblastoma SH-SY5Y inducida por ácido retinoico en la expresión de los factores de transcripción.
- Los factores TCF7L2 con dominio de unión a la  $\beta$ -catenina disminuyen, mientras los factores TCF7L2 desprovistos de dicha secuencia (dominante negativos) aumentan.
- La diferenciación de las células de neuroblastoma SH-SY5Y inducida por ácido retinoico implica una disminución de la supervivencia celular, mientras que la supresión de los factores TCF7L2 dominante negativos que inician la transcripción en el intrón 1 aumenta la supervivencia celular.
- La diferenciación de las células de neuroblastoma SH-SY5Y inducida por ácido retinoico no implica un aumento de la actividad de la vía de señalización Src-YAP inductora del fenotipo característico de las células madre.
- El efecto del ácido retinoico disminuyendo los factores de transcripción TCF7L2 activadores de la vía Wnt canónica y aumentando los factores TCF7L2 bloqueadores de esta vía en células de neuroblastoma SH-SY5Y puede contribuir a la transición del fenotipo de células madre indiferenciadas a células diferenciadas, cuando otras vías que se oponen a esta transición, como la Src-YAP, no resultan activadas.

## 9. BIBLIOGRAFÍA

- Abemayor, E., Sidell, N. (1989). Human neuroblastoma cell lines as models for the in vitro study of neoplastic and neuronal cell differentiation. *Environmental Health Perspectives*, 80, 3-15.
- Alkelai, A., Greenbaum, L., Lupoli, S., Kohn, Y., Sarner-Kanyas, K., Ben-Asher, E., Lerer, B. (2012). Association of the type 2 diabetes mellitus susceptibility gene, TCF7L2, with schizophrenia in an Arab-Israeli family sample. *PLoS One*, 7(1), e29228.
- Angers, S., Moon, R. T. (2009). Proximal events in Wnt signal transduction. Nature reviews *Molecular Cell Biology*, 10(7), 468-477.
- Arce, L., Yokoyama, N. N., Waterman, M. L. (2006). Diversity of LEF/TCF action in development and disease. *Oncogene*, 25(57), 7492.
- Archbold, H. C., Yang, Y. X., Chen, L., Cadigan, K. M. (2012). How do they do Wnt they do?: regulation of transcription by the Wnt/ $\beta$ -catenin pathway. *Acta Physiologica*, 204(1), 74-109.
- Atcha, F. A., Syed, A., Wu, B., Hoverter, N. P., Yokoyama, N. N., Ting, J. H. T., Waterman, M. L. (2007). A unique DNA binding domain converts T-cell factors into strong Wnt effectors. *Molecular and Cellular Biology*, 27(23), 8352-8363.
- Barolo, S. (2006). Transgenic Wnt/TCF pathway reporters: all you need is Lef ?. *Oncogene*, 25(57), 7505-7511.

- Biedler, J. L., Helson, L., Spengler, B. A. (1973). Morphology and growth, tumorigenicity, and cytogenetics of human neuroblastoma cells in continuous culture. *Cancer Research*, 33(11), 2643-2652.
- Bolen, J. B., Rosen, N., Israel, M. A. (1985). Increased pp60c-src tyrosyl kinase activity in human neuroblastomas is associated with amino-terminal tyrosine phosphorylation of the src gene product. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 82(21), 7275-7279.
- Bremner, J. D., McCaffery, P. (2008). The neurobiology of retinoic acid in affective disorders. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 32(2), 315-331.
- Brodeur, G. M. (2003). Neuroblastoma: biological insights into a clinical enigma. *Nature Reviews Cancer*, 3(3), 203-216.
- Byne, W., Hazlett, E. A., Buchsbaum, M. S., Kemether, E. (2009). The thalamus and schizophrenia: current status of research. *Acta Neuropathologica*, 117(4), 347.
- Chang, M. V., Chang, J. L., Gangopadhyay, A., Shearer, A., Cadigan, K. M. (2008). Activation of wingless targets requires bipartite recognition of DNA by TCF. *Current Biology*, 18(23), 1877-1881.
- Chen, C., Cao, F., Bai, L., Liu, Y., Xie, J., Wang, W., Liu, D. (2015). IKK $\beta$  enforces a LIN28B/TCF7L2 positive feedback loop that promotes cancer cell stemness and metastasis. *Cancer Research*, 75(8), 1725-1735.

- Cheung, Y. T., Lau, W. K. W., Yu, M. S., Lai, C. S. W., Yeung, S. C., So, K. F., Chang, R. C. C. (2009). Effects of all-trans-retinoic acid on human SH-SY5Y neuroblastoma as in vitro model in neurotoxicity research. *Neurotoxicology*, 30(1), 127-135.
- Ciani, L., Salinas, P. C. (2005). WNTs in the vertebrate nervous system: from patterning to neuronal connectivity. *Nature Reviews Neuroscience*, 6(5), 351-362.
- Cronenwett, W. J., Csernansky, J. (2010). Thalamic pathology in schizophrenia. In *Behavioral Neurobiology of Schizophrenia and Its Treatment* (pp. 509-528). Springer Berlin Heidelberg.
- Cui, D. H., Jiang, K. D., Jiang, S. D., Xu, Y. F., Yao, H. (2005). The tumor suppressor adenomatous polyposis coli gene is associated with susceptibility to schizophrenia. *Molecular Psychiatry*, 10(7), 669-677.
- Cushing, H., Wolbach, S. B. (1927). The transformation of a malignant paravertebral sympatheticoblastoma into a benign ganglioneuroma. *The American Journal of Pathology*, 3(3), 203.
- Duval, A., Rolland, S., Tubacher, E., Bui, H., Thomas, G., Hamelin, R. (2000). The human T-cell transcription factor-4 gene: structure, extensive characterization of alternative splicings, and mutational analysis in colorectal cancer cell lines. *Cancer Research*, 60(14), 3872-3879.
- Easwaran, V., Pishvaian, M., Byers, S. (1999). Cross-regulation of  $\beta$ -catenin–LEF/TCF and retinoid signaling pathways. *Current Biology*, 9(23), 1415-1419.

- Encinas, M., Iglesias, M., Liu, Y., Wang, H., Muhaisen, A., Cena, V., Comella, J. X. (2000). Sequential treatment of SH-SY5Y cells with retinoic acid and brain-derived neurotrophic factor gives rise to fully differentiated, neurotrophic factor-dependent, human neuron-like cells. *Journal of Neurochemistry*, 75(3), 991-1003.
- Freese, J. L., Pino, D., Pleasure, S. J. (2010). Wnt signaling in development and disease. *Neurobiology of disease*, 38(2), 148-153.
- Galceran, J., Miyashita-Lin, E. M., Devaney, E., Rubenstein, J. L., Grosschedl, R. (2000). Hippocampus development and generation of dentate gyrus granule cells is regulated by LEF1. *Development*, 127(3), 469-482.
- Ghogomu, S. M., van Venrooy, S., Ritthaler, M., Wedlich, D., Gradl, D. (2006). HIC-5 is a novel repressor of lymphoid enhancer factor/T-cell factor-driven transcription. *Journal of Biological Chemistry*, 281(3), 1755-1764.
- Gradl, D., König, A., Wedlich, D. (2002). Functional diversity of Xenopus lymphoid enhancer factor/T-cell factor transcription factors relies on combinations of activating and repressing elements. *Journal of Biological Chemistry*, 277(16), 14159-14171.
- Graham, T. A., Ferkey, D. M., Mao, F., Kimelman, D., Xu, W. (2001). Tcf4 can specifically recognize beta-catenin using alternative conformations. *Nature Structural Biology*, 8(12), 1048-1052.
- Grant, S. F., Thorleifsson, G., Reynisdottir, I., Benediktsson, R., Manolescu, A., Sainz, J., Styrkarsdottir, U. (2006). Variant of transcription factor 7-like 2 (TCF7L2) gene confers risk of type 2 diabetes. *Nature Genetics*, 38(3), 320-323.

- Grigoryan, T., Wend, P., Klaus, A., Birchmeier, W. (2008). Deciphering the function of canonical Wnt signals in development and disease: conditional loss-and gain-of-function mutations of  $\beta$ -catenin in mice. *Genes and Development*, 22(17), 2308-2341.
- Guller, Y., Ferrarelli, F., Shackman, A. J., Sarasso, S., Peterson, M. J., Langheim, F. J., Postle, B. R. (2012). Probing thalamic integrity in schizophrenia using concurrent transcranial magnetic stimulation and functional magnetic resonance imaging. *Archives of General Psychiatry*, 69(7), 662-671.
- Haegebarth, A., Clevers, H. (2009). Wnt signaling, *lgr5*, and stem cells in the intestine and skin. *The American Journal of Pathology*, 174(3), 715-721.
- Hallikas, O., Palin, K., Sinjushina, N., Rautiainen, R., Partanen, J., Ukkonen, E., Taipale, J. (2006). Genome-wide prediction of mammalian enhancers based on analysis of transcription-factor binding affinity. *Cell*, 124(1), 47-59.
- Hansen, T., Ingason, A., Djurovic, S., Melle, I., Fenger, M., Gustafsson, O., Frank, J. (2011). At-risk variant in *TCF7L2* for type II diabetes increases risk of schizophrenia. *Biological Psychiatry*, 70(1), 59-63.
- Hecht, A., Stemmler, M. P. (2003). Identification of a promoter-specific transcriptional activation domain at the C terminus of the Wnt effector protein T-cell factor 4. *Journal of Biological Chemistry*, 278(6), 3776-3785.
- Hino, S. I., Tanji, C., Nakayama, K. I., Kikuchi, A. (2005). Phosphorylation of  $\beta$ -catenin by cyclic AMP-dependent protein kinase stabilizes  $\beta$ -catenin through inhibition of its ubiquitination. *Molecular and Cellular Biology*, 25(20), 9063-9072.

- Hishiki, T., Saito, T., Sato, Y., Mitsunaga, T., Terui, E., Matsuura, G., Yoshida, H. (2011). Src kinase family inhibitor PP2 induces aggregation and detachment of neuroblastoma cells and inhibits cell growth in a PI3 kinase/Akt pathway-independent manner. *Pediatric Surgery International*, 27(2), 225-230.
- Hovanes, K., Li, T. W. H., Waterman, M. L. (2000). The human LEF-1 gene contains a promoter preferentially active in lymphocytes and encodes multiple isoforms derived from alternative splicing. *Nucleic Acids Research*, 28(9), 1994-2003.
- Hovanes, K., Li, T. W., Munguia, J. E., Truong, T., Milovanovic, T., Marsh, J. L., Waterman, M. L. (2001).  $\beta$ -catenin-sensitive isoforms of lymphoid enhancer factor-1 are selectively expressed in colon cancer. *Nature Genetics*, 28(1), 53-57.
- Hoverter, N. P., Ting, J. H., Sundaresh, S., Baldi, P., Waterman, M. L. (2012). A WNT/p21 circuit directed by the C-clamp, a sequence-specific DNA binding domain in TCFs. *Molecular and Cellular Biology*, 32(18), 3648-3662.
- Ikeda, S., Kishida, S., Yamamoto, H., Murai, H., Koyama, S., Kikuchi, A. (1998). Axin, a negative regulator of the wnt signaling pathway, forms a complex with GSK-3 $\beta$  and  $\beta$ -catenin and promotes GSK-3 $\beta$ -dependent phosphorylation of  $\beta$ -catenin. *The EMBO Journal*, 17(5), 1371-1384.
- Jacobs, S., Lie, D. C., DeCicco, K. L., Shi, Y., DeLuca, L. M., Gage, F. H., Evans, R. M. (2006). Retinoic acid is required early during adult neurogenesis in the dentate gyrus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(10), 3902-3907.



- Jensen, H. A., Bunaciu, R. P., Varner, J. D., Yen, A. (2015). GW5074 and PP2 kinase inhibitors implicate nontraditional c-Raf and Lyn function as drivers of retinoic acid-induced maturation. *Cellular Signalling*, 27(8), 1666-1675.
- Jensen, H. A., Styskal, L. E., Tasseff, R., Bunaciu, R. P., Congleton, J., Varner, J. D., Yen, A. (2013). The Src-family kinase inhibitor PP2 rescues inducible differentiation events in emergent retinoic acid-resistant myeloblastic leukemia cells. *PLoS One*, 8(3), e58621.
- Jessell, T. M., Sanes, J. R. (2000). Development: The decade of the developing brain. *Current Opinion in Neurobiology*, 10(5), 599-611.
- Jung, Y. S., Cheong, H. J., Kim, S. J., Kim, K. H., Lee, N., Park, H. S., Won, J. H. (2014). Src family kinase inhibitor PP2 enhances differentiation of acute promyelocytic leukemia cell line induced by combination of all-trans-retinoic acid and arsenic trioxide. *Leukemia Research*, 38(8), 977-982.
- Kishimoto, M., Ujike, H., Okahisa, Y., Kotaka, T., Takaki, M., Kodama, M., Sora, I. (2008). The Frizzled 3 gene is associated with methamphetamine psychosis in the Japanese population. *Behavioral and Brain Functions*, 4(1), 37.
- Kratimenos, P., Koutroulis, I., Marconi, D., Syriopoulou, V., Delivoria-Papadopoulos, M., Chrousos, G. P., Theocharis, S. (2014). Multi-targeted molecular therapeutic approach in aggressive neuroblastoma: the effect of Focal Adhesion Kinase–Src–Paxillin system. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 18(12), 1395-1406.

- Kuwabara, T., Hsieh, J., Muotri, A., Yeo, G., Warashina, M., Lie, D. C., Gage, F. H. (2009). Wnt-mediated activation of NeuroD1 and retro-elements during adult neurogenesis. *Nature Neuroscience*, *12*(9), 1097-1105.
- Lee, M., Yoon, J., Song, H., Lee, B., Lam, D. T., Yoon, J., Jeong, Y. (2017). Tcf7l2 plays crucial roles in forebrain development through regulation of thalamic and habenular neuron identity and connectivity. *Developmental Biology*, *424*(1), 62-76.
- Lerner, V., McCaffery, P. J., Ritsner, M. S. (2016). Targeting Retinoid Receptors to Treat Schizophrenia: Rationale and Progress to Date. *CNS drugs*, *30*(4), 269-280.
- Li, M., Mo, Y., Luo, X. J., Xiao, X., Shi, L., Peng, Y. M., Su, B. (2011). Genetic association and identification of a functional SNP at GSK3 $\beta$  for schizophrenia susceptibility. *Schizophrenia Research*, *133*(1), 165-171.
- Lie, D. C., Colamarino, S. A., Song, H. J., Désiré, L., Mira, H., Consiglio, A., Gage, F. H. (2005). Wnt signaling regulates adult hippocampal neurogenesis. *Nature*, *437*(7063), 1370-1375.
- Liu, T., Lee, Y. N., Malbon, C. C., & Wang, H. Y. (2002). Activation of the  $\beta$ -catenin/Lef-Tcf pathway is obligate for formation of primitive endoderm by mouse F9 totipotent teratocarcinoma cells in response to retinoic acid. *Journal of Biological Chemistry*, *277*(34), 30887-30891.
- Logan, C. Y., Nusse, R. (2004). The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annual Review of Cell Developmental Biology*, *20*, 781-810.

- MacDonald, B. T., Tamai, K., He, X. (2009). Wnt/ $\beta$ -catenin signaling: components, mechanisms, and diseases. *Developmental Cell*, 17(1), 9-26.
- Maden, M. (2007). Retinoic acid in the development, regeneration and maintenance of the nervous system. *Nature Reviews Neuroscience*, 8(10), 755-765.
- Marcato, P., Dean, C. A., Liu, R. Z., Coyle, K. M., Bydoun, M., Wallace, M., Giacomantonio, C. A. (2015). Aldehyde dehydrogenase 1A3 influences breast cancer progression via differential retinoic acid signaling. *Molecular Oncology*, 9(1), 17-31.
- Maretto, S., Cordenonsi, M., Dupont, S., Braghetta, P., Broccoli, V., Hassan, A. B., Piccolo, S. (2003). Mapping Wnt/ $\beta$ -catenin signaling during mouse development and in colorectal tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(6), 3299-3304.
- Matthay, K. K., Reynolds, C. P., Seeger, R. C., Shimada, H., Adkins, E. S., Haas-Kogan, D., Villablanca, J. G. (2009). Long-term results for children with high-risk neuroblastoma treated on a randomized trial of myeloablative therapy followed by 13-cis-retinoic acid: a children's oncology group study. *Journal of Clinical Oncology*, 27(7), 1007-1013.
- McMahon, A. P., Bradley, A. (1990). The Wnt-1 (int-1) proto-oncogene is required for development of a large region of the mouse brain. *Cell*, 62(6), 1073-1085.
- Mezquita, B., Mezquita, J., Barrot, C., Carvajal, S., Pau, M., Mezquita, P., Mezquita, C. (2014). A Truncated-Flt1 Isoform of Breast Cancer Cells Is Upregulated by Notch and Downregulated by Retinoic Acid. *Journal of Cellular Biochemistry*, 115(1), 52-61.

- Mezquita, B., Mezquita, J., Pau, M., Mezquita, C. (2010). A novel intracellular isoform of VEGFR-1 activates Src and promotes cell invasion in MDA-MB-231 breast cancer cells. *Journal of Cellular Biochemistry*, 110(3), 732-742.
- Mezquita, B., Mezquita, P., Pau, M., Gasa L., Navarro L., Samitier M., Mezquita C. (2017) All-trans retinoic acid activates the axis Src-YAP-Interleukin 6 in triple negative MDA-MB-231 breast cancer cells. Enviado para publicación.
- Mezquita, B., Pineda, E., Mezquita, J., Mezquita, P., Pau, M., Codony-Servat, J., Mezquita, C. (2015). LoVo colon cancer cells resistant to oxaliplatin overexpress c-MET and VEGFR-1 and respond to VEGF with dephosphorylation of c-MET. *Molecular Carcinogenesis*, 55(5):411-9.
- Miranda, M. B., Redner, R. L., Johnson, D. E. (2007). Inhibition of Src family kinases enhances retinoic acid-induced gene expression and myeloid differentiation. *Molecular Cancer Therapeutics*, 6(12), 3081-3090.
- Mukhopadhyay, M., Shtrom, S., Rodriguez-Esteban, C., Chen, L., Tsukui, T., Gomer, L., Niehrs, C. (2001). Dickkopf1 is required for embryonic head induction and limb morphogenesis in the mouse. *Developmental Cell*, 1(3), 423-434.
- Nagalski, A., Irimia, M., Szewczyk, L., Ferran, J. L., Misztal, K., Kuznicki, J., Wisniewska, M. B. (2013). Postnatal isoform switch and protein localization of LEF1 and TCF7L2 transcription factors in cortical, thalamic, and mesencephalic regions of the adult mouse brain. *Brain Structure and Function*, 218(6), 1531-1549.

- Nazwar, T. A., Glassmann, A., Schilling, K. (2009). Expression and molecular diversity of Tcf712 in the developing murine cerebellum and brain. *Journal of Neuroscience research*, 87(7), 1532-1546.
- Niehrs, C. (2010). On growth and form: a Cartesian coordinate system of Wnt and BMP signaling specifies bilaterian body axes. *Development*, 137(6), 845-857.
- O’Roak, B. J., Vives, L., Girirajan, S., Karakoc, E., Krumm, N., Coe, B. P., Turner, E. H. (2012). Sporadic autism exomes reveal a highly interconnected protein network of de novo mutations. *Nature*, 485(7397), 246-250.
- Påhlman, S., Odelstad, L., Larsson, E., Grotte, G., Nilsson, K. (1981). Phenotypic changes of human neuroblastoma cells in culture induced by 12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate. *International Journal of Cancer*, 28(5), 583-589.
- Palacios-Moreno, J., Foltz, L., Guo, A., Stokes, M. P., Kuehn, E. D., George, L., Grimes, M. L. (2015). Neuroblastoma tyrosine kinase signaling networks involve FYN and LYN in endosomes and lipid rafts. *PLoS Comput Biol*, 11(4), e1004130.
- Petersen, C. P., Reddien, P. W. (2009). Wnt signaling and the polarity of the primary body axis. *Cell*, 139(6), 1056-1068.
- Pinault, D. (2011). Dysfunctional thalamus-related networks in schizophrenia. *Schizophrenia Bulletin*, 37(2), 238-243.
- Proitsi, P., Li, T., Hamilton, G., Di Forti, M., Collier, D., Killick, R., Lovestone, S. (2008). Positional pathway screen of wnt signaling genes in schizophrenia: association with DKK4. *Biological Psychiatry*, 63(1), 13-16.

- Prokunina-Olsson, L., Welch, C., Hansson, O., Adhikari, N., Scott, L. J., Usher, N., Hall, J. L. (2009). Tissue-specific alternative splicing of TCF7L2. *Human Molecular Genetics*, 18(20), 3795-3804.
- Rastinejad, F. (2001). Retinoid X receptor and its partners in the nuclear receptor family. *Current Opinion in Structural Biology*, 11(1), 33-38.
- Reynolds, C. P., Matthay, K. K., Villablanca, J. G., Maurer, B. J. (2003). Retinoid therapy of high-risk neuroblastoma. *Cancer Letters*, 197(1), 185-192.
- Roose, J., Huls, G., Van Beest, M., Moerer, P., Van Der Horn, K., Goldschmeding, R., Clevers, H. (1999). Synergy between tumor suppressor APC and the  $\beta$ -catenin-Tcf4 target Tcf1. *Science*, 285(5435), 1923-1926.
- Rossetti, S., Ren, M., Visconti, N., Corlazzoli, F., Gagliostro, V., Somenzi, G., Sacchi, N. (2016). Tracing anti-cancer and cancer-promoting actions of all-trans retinoic acid in breast cancer to a RAR $\alpha$  epigenetic mechanism of mammary epithelial cell fate. *Oncotarget*, 7(52), 87064-87080.
- Savic, D., Distler, M. G., Sokoloff, G., Shanahan, N. A., Dulawa, S. C., Palmer, A. A., Nobrega, M. A. (2011). Modulation of Tcf7l2 expression alters behavior in mice. *PLoS One*, 6(10), e26897.
- Shi, S. H., Hayashi, Y., Petralia, R. S., Zaman, S. H., Wenthold, R. J., Svoboda, K., Malinow, R. (1999). Receptors after Synaptic NMDA Receptor Activation. *Science*, 284, 1811-1816.

- Struewing, I., Boyechko, T., Barnett, C., Beildeck, M., Byers, S. W., Mao, C. D. (2010). The balance of TCF7L2 variants with differential activities in Wnt-signaling is regulated by lithium in a GSK3 $\beta$ -independent manner. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 399(2), 245-250.
- Tintori, C., Fallacara, A. L., Radi, M., Zamperini, C., Dreassi, E., Crespan, E., Richters, A. (2014). Combining X-ray crystallography and molecular modeling toward the optimization of pyrazolo [3, 4-d] pyrimidines as potent c-Src inhibitors active in vivo against neuroblastoma. *Journal of Medicinal Chemistry*, 58(1), 347-361.
- Vacik, T., Stubbs, J. L., Lemke, G. (2011). A novel mechanism for the transcriptional regulation of wnt signaling in development. *Genes and Development*, 25(17), 1783-1795.
- van Amerongen, R., Nusse, R. (2009). Towards an integrated view of Wnt signaling in development. *Development*, 136(19), 3205-3214.
- van Beest, M., Dooijes, D., van de Wetering, M., Kjaerulff, S., Bonvin, A., Nielsen, O., Clevers, H. (2000). Sequence-specific high mobility group box factors recognize 10–12-base pair minor groove motifs. *Journal of Biological Chemistry*, 275(35), 27266-27273.
- Van de Wetering, M., Castrop, J., Korinek, V., Clevers, H. (1996). Extensive alternative splicing and dual promoter usage generate Tcf-1 protein isoforms with differential transcription control properties. *Molecular and Cellular Biology*, 16(3), 745-752.

- Van de Wetering, M., Cavallo, R., Dooijes, D., Van Beest, M., Van Es, J., Loureiro, J., Peifer, M. (1997). Armadillo coactivates transcription driven by the product of the *Drosophila* segment polarity gene dTCF. *Cell*, 88(6), 789-799.
- Wallmen, B., Schrempp, M., Hecht, A. (2012). Intrinsic properties of Tcf1 and Tcf4 splice variants determine cell-type-specific Wnt/ $\beta$ -catenin target gene expression. *Nucleic Acids Research*, 40(19): 9455–9469.
- Weise, A., Bruser, K., Elfert, S., Wallmen, B., Wittel, Y., Wöhrle, S., Hecht, A. (2009). Alternative splicing of Tcf712 transcripts generates protein variants with differential promoter-binding and transcriptional activation properties at Wnt/ $\beta$ -catenin targets. *Nucleic Acids Research*, 38(6):1964-81.
- Wend, P., Holland, J. D., Ziebold, U., Birchmeier, W. (2010). Wnt signaling in stem and cancer stem cells. In *Seminars in Cell and Developmental biology* (Vol. 21, No. 8, pp. 855-863). Academic Press.
- Yoon, S. G., Cheong, H. J., Kim, S. J., Kim, K. H., Lee, S. C., Lee, N., Won, J. H. (2013). Src family kinase inhibitor PP2 has different effects on all-trans-retinoic acid or arsenic trioxide-induced differentiation of an acute promyelocytic leukemia cell line. *Cancer Research and Treatment*, 45(2), 126-133.
- Zhou, C. J., Pinson, K. I. Pleasure, S. J. (2004). Severe defects in dorsal thalamic development in low-density lipoprotein receptor-related protein-6 mutants. *Journal of Neuroscience*, 24(35), 7632-7639.



## 9. ANEXOS

### ANEXO I: *PRIMERS*

#### *Primers PCR convencional para TCF7L2*

TCF7L2 exón 11-12	PR11Fw	GCACTGTCCAGAGAAGAGCA
	PR12Rv	GGCTGCTTGTCCTTTTCCT
TCF7L2 exón 1-2	PR1Fw	TTCAAAGACGAGGGCGAACA
	PR2Rv	CCCGGGATTTGTCTCGGAAA
TCF7L2 ID30 completo	PRi1Fw	GTTTTTTTCTACCCCCCCTCGA
	PRf17Rv	GGGGCAAATTAAGAAAAGTGAA
TCF7L2 exón 5	PR5Fw	GACAAGCCCTCAAGGATGCC
TCF7L2 exón 6	PR6Rv	CGTCGGCTGGTAAGTGTGG
TCF7L2 exón 1b	PR1bFw	GCCGCAACCCTCTCTAGATG
TCF7L2 exón 1e	PR1eFw	CTCTGTTCCAGCAGTTGGGC

#### *Primers RACE 5'*

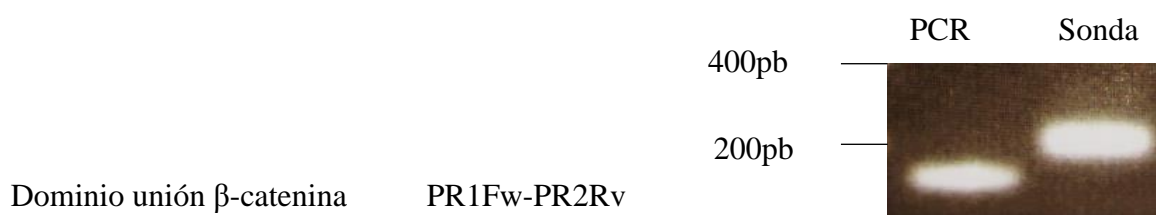
TCF7L2 exón 11-12	GSP1	TTCTTTCCATAGTTA
TCF7L2 exón 11	GSP2	ACCAGCCGGGGTACAGTTGC
TCF7L2 exón 10	Nested	CCTCCGCCCAAGGATCTGGT

**Primers RACE 3'**

TCF7L2 intrón 1	GSP2	CCCCCTCGACCTCGCCGATTCTTTTT
TCF7L2 intrón 1	Nested	CTTCTCCCCCTTCTGCGTGGCGTTT

**Primers RT PCR**

TCF7L2 intrón 1-exón2	PRi1Fw	GTTTTTTTCTACCCCCCCTCGA
	PRe2Rv	TCTTTCCGCCTTCCCAGAG
TCF7L2 exón 11-12	PR11Fw	GCACTGTCCAGAGAAGAGCA
	PR12Rv	GGCTGCTTGTCCCTTTTCCT
TCF7L2 exón 1-2	PR1Fw	TTCAAAGACGAGGGCGAACA
	PR2Rv	CCCGGGATTTGTCTCGGAAA

**ANEXO II: SONDA PARA *NORTHERN BLOT*****Hibridación:****Primers para la síntesis:****Comprobación:****Figura 1 Anexo II: Sonda exón 1-2 para *Northern***

Dominio común isoformas PR11Fw- PR12Rv

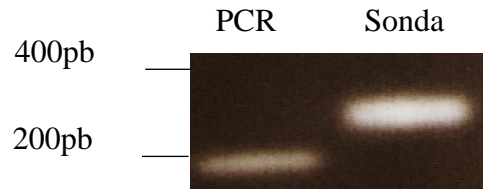


Figura 2 Anexo II: Sonda exón 11-12 para Northern

### ANEXO III: RACE

#### Localización de primers para el RACE 5'

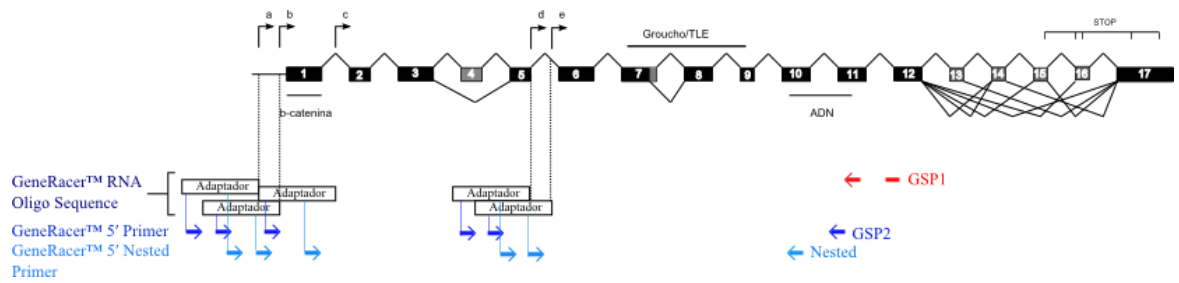


Figura 3 Anexo III: RACE 5'

#### Localización de primers para el RACE 3'

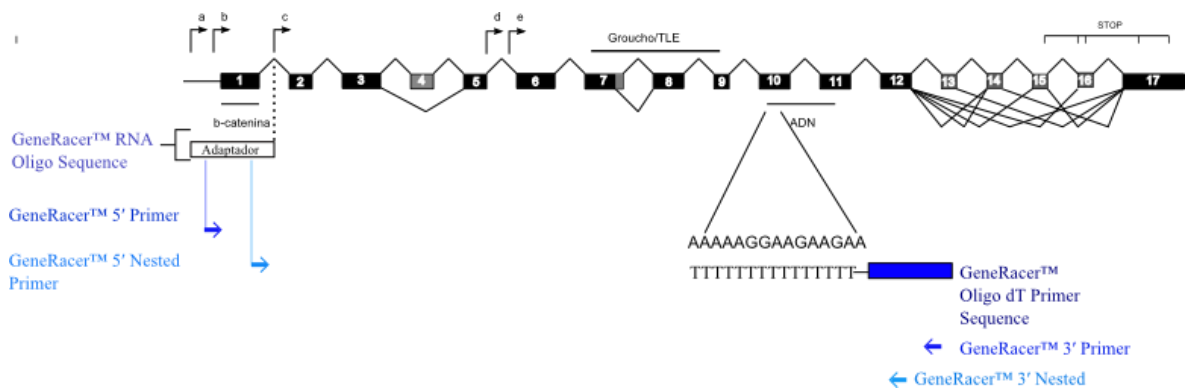


Figura 4 Anexo III: RACE 3'

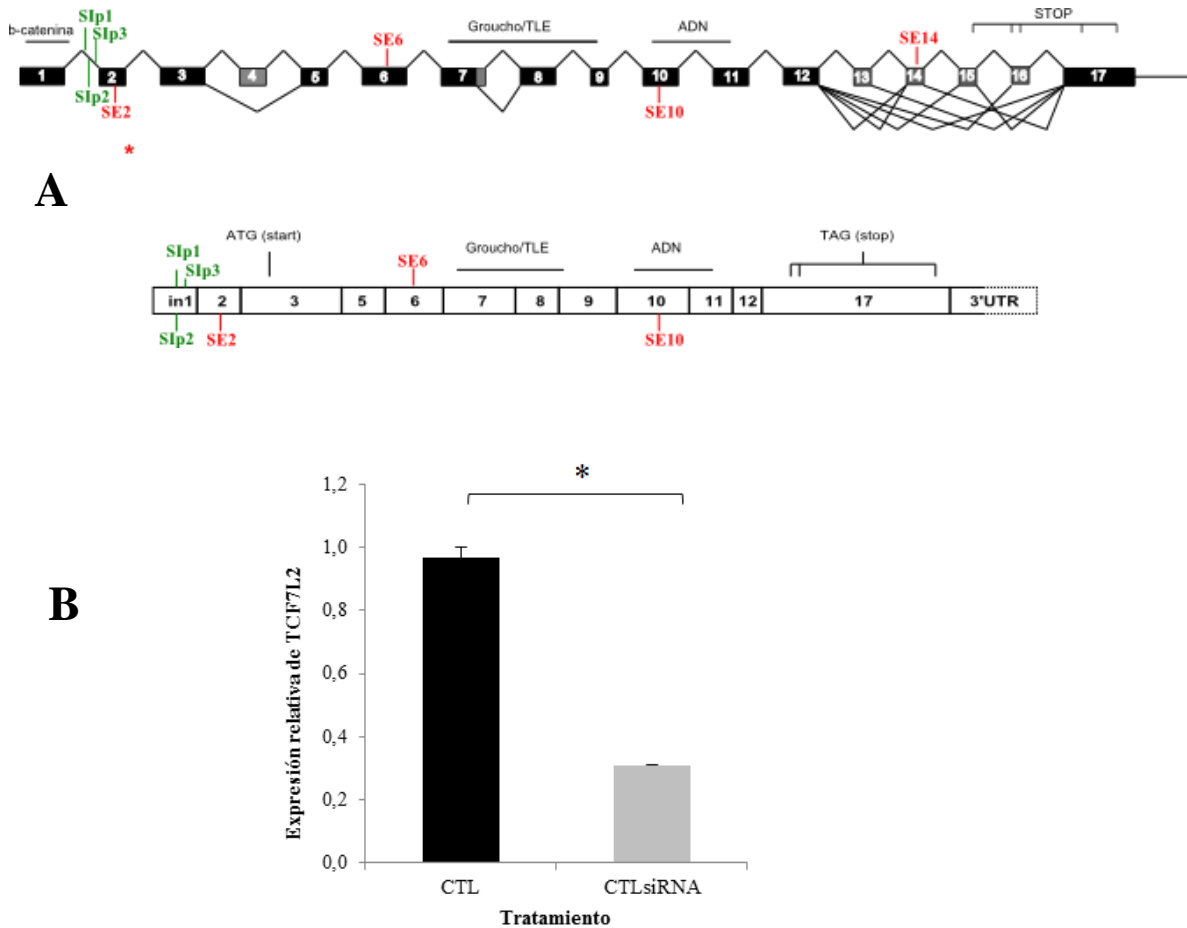
**ANEXO IV: SILENCIAMIENTO****Oligonucleótidos para el silenciamiento de todas las isoformas de TCF7L2 (estándar)**

Exón 2	SE2	CGAGACAAAUCCCGGGAAA
Exón 6	SE6	ACACUUACCAGCCGACGUA
Exón 10	SE10	GAUGUCGGCUCACUCCAUA
Exón 14	SE14	CAGCGAAUGUUUCCUAAA

**Oligonucleótidos para el silenciamiento de las isoformas de la familia ID30 (a medida)**

Intrón 1	SIp1	CCUCGACCUCGCCGAUUCUUU
Intrón 1	SIp2	UCGACCUCGCCAUUCUUUUU
Intrón 1	SIp3	CCUUCUGCGUGGCGUUUGCUU

**Regiones del transcrito de TCF7L2 reconocidas por los oligonucleótidos siRNA y comprobación del efecto de silenciamiento para las isoformas ID30.**



**Figura 5 Anexo IV. A:** Regiones del transcrito de TCF7L2 reconocidas por los oligonucleótidos siRNA. En rojo, localización de los siRNA que se unen a todas las isoformas de TCF7L2. En verde: localización de los siRNA que se unen a las isoformas ID30. **B:** Comprobación del efecto de silenciamiento de los oligonucleótidos diseñados a medida para silenciar las isoformas ID30. **CTL:** células SH-SY5Y mantenidas al 10% FBS. **CTL siRNA:** células SH-SY5Y mantenidas al 10% FBS y 48h de silenciamiento con el pool de siRNA específico para silenciar ID30.

Anexo V: Plásmidos

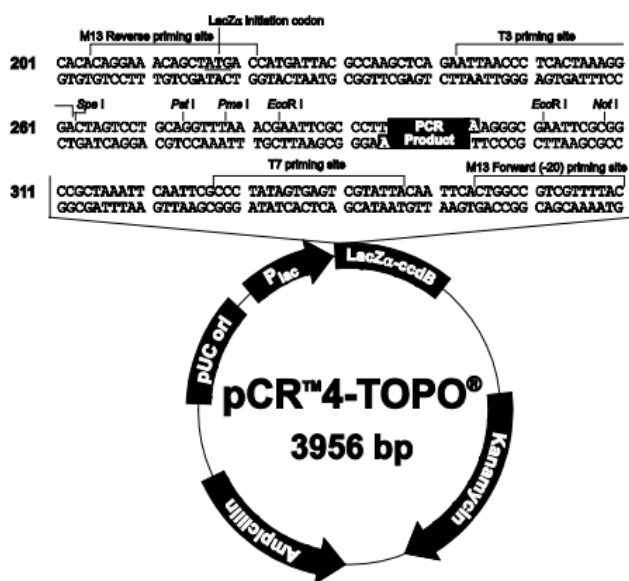


Figura 6 Anexo IV: pCR™4-TOPO® (Life Technologies #K4575 Carlsbad, CA) Estructura del plásmido pCR 4-TOPO utilizado para la clonación y secuenciación de los transcritos obtenidos mediante RACE.

