



**Universidad Nacional Autónoma  
de México**

---

---

Facultad de Medicina  
Instituto de Fisiología Celular  
Instituto de Investigaciones Biomédicas

**CARACTERIZACIÓN DEL PROMOTOR DE PPAP2B/LPP3  
PAPEL DE SONIC-HEDGEHOG EN SU REGULACIÓN**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
LICENCIADA EN INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA BÁSICA

PRESENTA

**CARLA ELIZABETH CADENA DEL CASTILLO**

DIRECTORA DE TESIS

**DRA. DIANA MARIA ESCALANTE ALCALDE**



2010



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**A mi mamá**

**A mi abuelita Rosy**

Este trabajo fue realizado con los apoyos de PAPIIT IN216009 y CONACyT 45085.

## **Agradecimientos**

Gracias a la Dra. Diana Escalante por permitirme trabajar en su laboratorio.

A los miembros del jurado por su apoyo y revisión de este trabajo.

Gracias a la Lic. Cynthia Lima por su ayuda en trámites, eventos y dudas varias.

A la Unidad de Biología Molecular, a Lupita, Mine y la Dra. Laura.

A los biomédicos, en especial a Eunice, Fátima, Diego, Daniela, Marlon, Alejandra, Mariana, Uriel, Mez, Silvina, Carlos, Manuel, Isui, Aldo y Fernando por haber sido una excelente generación y a Paco por su apoyo desde sitios remotos.

A mis compañeros de laboratorio Alex, Robert, Ari, Ricardo, Sandra, Manuel; especialmente a Sara por su apoyo y por enseñarme tantas cosas. A Edmundo por sus muchos consejos y ayuda. También a los que en otros laboratorios me ensaaron, ayudaron, acompañaron y apoyaron: Cynthia, Rafael, Kioko, Perla.

A mi papá, a mis tíos y primos, especialmente a tía Rita, a tía Auro y a tío Peter, a Edy y a mi hermanito Beto. A mis amigas (Silvia, Gaby, Argelia) por su apoyo y comprensión, por entender que en los horarios y días más extraños tenía que estar en el laboratorio.

A mi abuelita, por cuidarme y quererme.

Sobre todo mi mamá, gracias por el apoyo, por haber leído desde mis primeros garabatos hasta esta tesis aun cuando para la mayoría de la gente ambos eran igual de incomprensibles, por haber memorizado el nombre de mi carrera, por acompañarme en cada momento aun sin tener idea de a qué tenía que ir al lab un domingo de vacaciones y por soportar que por un año llegara a casa con olor a ratón.

# Índice

Resumen.....	4
<b>CARACTERIZACIÓN DEL PROMOTOR DE <i>PPAP2B/LPP3</i>: PAPEL DE SONIC-HEDGEHOG EN SU REGULACIÓN. ....</b>	<b>6</b>
<b>I. Introducción .....</b>	<b>6</b>
I.i Los lípidos bioactivos.....	6
I.ii Fosfatasa de lípidos fosfatados.....	12
I.iii Sonic-hedgehog .....	17
I.iv Regulación de la transcripción .....	21
<b>II. Justificación .....</b>	<b>24</b>
<b>III. Problema .....</b>	<b>24</b>
<b>IV. Hipótesis .....</b>	<b>24</b>
<b>V. Objetivo general.....</b>	<b>25</b>
V.i Objetivos particulares.....	25
<b>VI. Material y Métodos .....</b>	<b>26</b>
VI.i. Cultivo celular.....	26
VI.ii. Estimulación de células NIH-3T3.....	26
VI.iii. Extracción de RNA.....	26
VI.iv. RT-PCR semicuantitativa.....	27
VI.v. Western Blot.....	28
VI.vi. Clonación del fragmento promotor en pGL3 .....	28
VI.vii. Análisis Bioinformático.....	29
VI.viii. Transfección .....	30
VI.ix. Ensayos de Luciferasa.....	30
<b>VII. Resultados .....</b>	<b>32</b>
VII.i. Respuesta de <i>Ppap2b /LPP3</i> a la inducción con SHH.....	32
VII.ii. Análisis Bioinformático del promotor de <i>Ppap2b</i> .....	33
VII.iii. Clonación del fragmento promotor en pGL3 .....	38
VII.iv. Actividad del fragmento de 2070 pb.....	39
VII.iv.i. Actividad basal en AD2993 y 3T3.....	39

VII.iv.ii. Actividad en presencia de Gli1.....	39
VII.iv.iii. Actividad en presencia de Foxa2 .....	40
<b>VIII. Discusión .....</b>	<b>41</b>
<b>IX. Conclusiones.....</b>	<b>45</b>
<b>X. Perspectivas .....</b>	<b>45</b>
Apéndice 1: .....	47
Soluciones.....	47
Apéndice 2: .....	49
MathInspector .....	49
<b>Bibliografía.....</b>	<b>56</b>

## **Abreviaturas**

c.b.p.: Cuanto baste para

C1P: Ceramida -1- fosfato

DAG: Diacil-glicerol

Foxa2: Factor de transcripción de la familia forkhead (forkhead transcription factor). Antes Hnf3-beta.

GTF: Factores generales de la transcripción

KO: *Knock-out*, nulo

LPA: Ácido lisofosfatídico

LPA<sub>n</sub>: Receptor a LPA

*LPARs*: Genes que codifican para receptores a LPA

LPP3 o Ppap2b: Fosfatasa de lípidos fosfatados 3

MAG: Monoacil-glicerol

PA: Ácido fosfatídico

PLC: fosfolipasa C

Ptch: Patched

S1P: Esfingosina -1- fosfato

SHH: Sonic hedgehog

Smo: smoothed



## Resumen

La fosfatasa de lípidos fosfatados-3 (LPP3) es una proteína importante para regular la disponibilidad y actividad de algunos lípidos bioactivos fosfatados mediante su defosforilación. El estudio de la LPP3 ha sido de gran interés ya que cuando ésta es eliminada se origina un fenotipo letal embrionario, con lo que se muestra que es fundamental para el desarrollo y supervivencia del embrión (Escalante-Alcalde et al., 2003). Además, esta enzima está involucrada con el desarrollo neuronal (Sanchez et al., 2007). El gen que codifica para la LPP3 es *Ppap2b*. Dado que se observó que esta enzima tiene un patrón de expresión muy definido y dinámico durante el desarrollo embrionario (Escalante-Alcalde et al., 2009) surgió el interés en conocer los elementos que están regulando su expresión de manera espacial y temporal. De particular interés para nuestro grupo es la regulación de su expresión durante el desarrollo embrionario en dominios en los que se expresa el morfógeno Sonic hedgehog (SHH) como son la notocorda y la placa del piso del tubo neural.

Ya que el promotor de *Ppap2b*/LPP3 no había sido caracterizado, este proyecto tuvo como objetivo encontrar las regiones regulatorias que determinan su expresión dependiente de la vía de señalización de SHH. Por medio de análisis bioinformático de una región de 2070 bases se predijeron 2 sitios potenciales de unión a factores Gli, los cuales son los factores de transcripción que median la actividad de SHH, y múltiples sitios probables de unión a Foxa2, un factor de transcripción blanco de la vía de SHH. El fragmento de 2070 pb se encuentra río arriba del inicio de la transcripción, tiene su extremo 3' a 480 pb del codon de inicio y contiene dos de los 3 sitios predichos de inicio de la transcripción. Dicho fragmento se clonó en un plásmido reportero y su actividad transcripcional se probó en dos líneas celulares. Por otro lado, mediante RT-PCR semi-cuantitativa se observó que la transcripción del mRNA de LPP3 se moduló por tratamiento con SHH y por ensayos de luciferasa fue posible comprobar que el fragmento del promotor no tiene ninguna respuesta a Gli mientras que fué responsivo a Foxa2.

Esta última respuesta podría ser la que sea responsable de la expresión de LPP3 mediada por la vía de SHH. Con los resultados obtenidos se tiene una primera aproximación a una de las formas en las que podría estarse regulando la expresión de la LPP3.

# **Caracterización del promotor de *Ppap2b/LPP3*: Papel de Sonic-hedgehog en su regulación.**

## **I. Introducción**

La célula es la unidad mínima de un ser vivo. Tanto para la vida individual de cada célula, como para la vida de los organismos de los que pueden formar parte, las células necesitan llevar a cabo múltiples procesos que deben ser controlados de forma precisa. Entre estos procesos se encuentra la expresión de genes, la proliferación, la diferenciación, la migración y la muerte celular. Dichos procesos están regulados no solo por factores proteicos, sino también por moléculas de naturaleza lipídica

### **I.i Los lípidos bioactivos**

El papel de los lípidos en la vida celular es muy importante ya que además de tener funciones estructurales como componentes de las membranas celulares, algunos lípidos tienen actividad biológica y actúan como reguladores de funciones celulares. Este tipo de lípidos son conocidos como lípidos bioactivos.

Los lípidos bioactivos pueden actuar en el medio intracelular a través de la interacción con proteínas asociadas a cascadas de señalización, o desde el medio extracelular por receptores de siete dominios transmembranales acoplados a proteínas G, como las  $G_s$  que estimulan la acción de la adenilato ciclasa y por lo tanto aumentan la cantidad de AMPc; las proteínas  $G_i$  inhiben a la adenilatociclasa; las  $G_q$  activan a la fosfolipasa C (PLC) y las  $G_{12/13}$  activan a la GTPasa Rho (Alberts et al., 2002).

Entre los lípidos bioactivos se encuentran el ácido fosfatídico (PA), el ácido lisofosfatídico (LPA), la ceramida-1-fosfato (C1P) y la esfingosina-1-fosfato (S1P) (Brindley, 2004). Algunos de éstos al ser defosforilados pierden su actividad biológica, mientras que otros cambian su actividad y se tornan activos (Sciorra and Morris, 2002) (Fig 1).

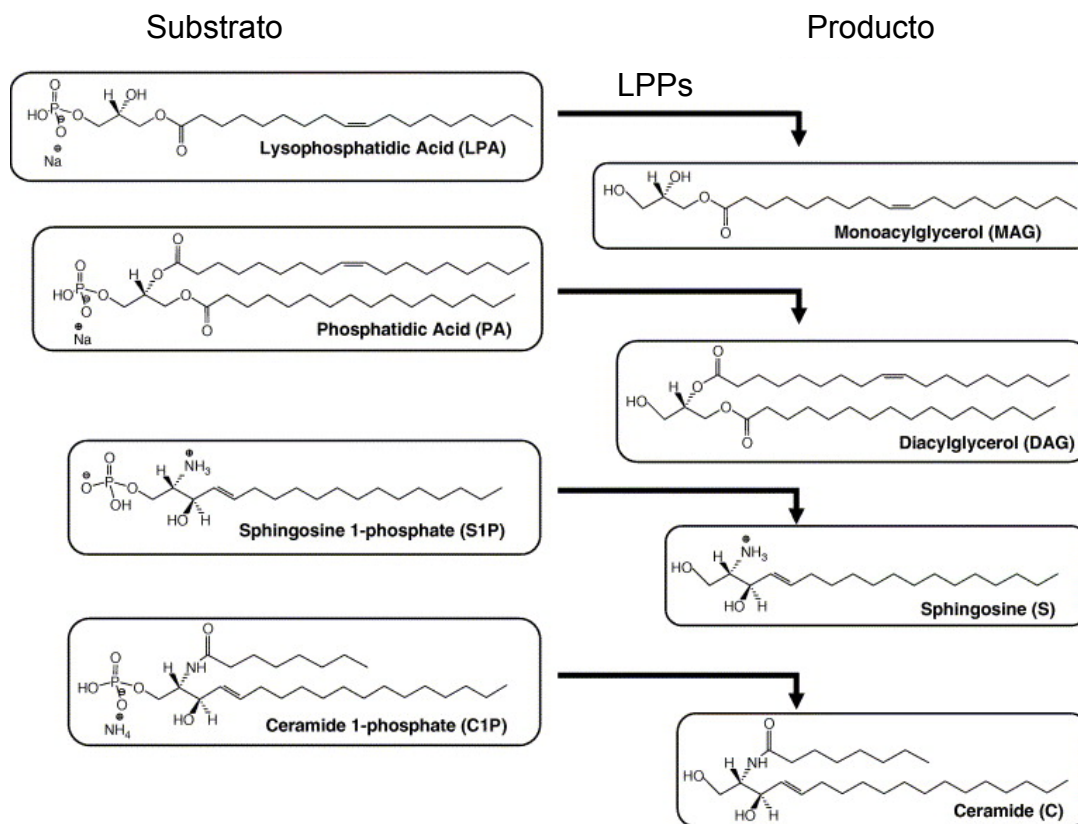


Fig. 1. Estructura de los lípidos bioactivos substratos de LPPs y sus productos defosforilados. (Modificado de Mcdermott et al., 2006).

### ***1.1.1 Esfingolípidos***

La esfingosina puede ser generada por mas de una vía, ya sea a partir del corte de una cadena de ácidos grasos de la ceramida por la acción de la ceramidasa o bien mediante la defosforilación de la S1P, llevada a cabo por algunas fosfatasa de lípidos (Rosen et al., 2009). La esfingosina tiene funciones reguladoras debido a que puede inhibir a la proteína cinasa C (PKC), y modular otras enzimas como la fosfolipasa D (PLD) y la cinasa de diacil-glicerol (DAGK) (Gómez-Muñoz, 2006). La esfingosina al ser fosforilada por las cinasas de esfingosina genera S1P, que a su vez puede regular funciones biológicas implicadas en el desarrollo embrionario. La señalización de la S1P se da por medio de alguno de sus 5 diferentes receptores acoplados a proteínas G (S1P<sub>1-5</sub>). Cada uno de sus receptores se

encuentra expresado en sitios y momentos diferentes en el organismo y se ha demostrado que participan de distinta manera en el desarrollo y vida del individuo (Rosen et al., 2009).

Algunos de los efectos de la señalización mediada por S1P han sido observados mediante la generación de ratones transgénicos que carecen de alguno de sus receptores. La S1P participa en múltiples procesos: mediante el receptor 1 (S1P<sub>1</sub>) actúa en el desarrollo del sistema vascular y la migración de astrocitos y la de células troncales neurales. Por otra parte, la señalización mediada por el receptor 2 (S1P<sub>2</sub>) regula el desarrollo e integridad de los epitelios de la coclea y del cabello, además de actuar en procesos patogénicos como en la angiogénesis del endotelio de la retina. El receptor 3 (S1P<sub>3</sub>) participa en la supervivencia de cardiomiocitos en condiciones de isquemia y el receptor 4 (S1P<sub>4</sub>) actúa en el sistema inmunológico, regulando la migración y la secreción de citocinas en células T. El receptor 5, en los progenitores de oligodendrocitos, inhibe la migración y promueve la retracción de procesos gliales (Rosen et al., 2009).

Cada uno de los receptores señala mediante alguna de las distintas proteínas G. Actualmente se ha descrito que el S1P<sub>1</sub> se une de forma específica a G<sub>i</sub>; el S1P<sub>2</sub> puede interactuar de forma similar con G<sub>i</sub>, G<sub>q</sub> y G<sub>12/13</sub> mientras que los tres receptores restantes, S1P<sub>3,4,5</sub> se unen a G<sub>i</sub> o G<sub>12/13</sub> de forma similar (Rosen et al., 2009). De forma independiente a la interacción con sus receptores transmembranales, la S1P también puede actuar desde el medio intracelular. En este caso su efecto es diferente, ya que promueve la activación de la ciclooxigenasa 2 (COX-2) para producir prostaglandinas (Baumruker et al., 2005). Otra manera en la que la S1P tiene funciones bioactivas es mediante la inhibición de acetiltransferasas de histonas, lo cual modifica la transcripción de algunos genes (Hait et al., 2009).

La ceramida tiene funciones reguladoras mediante su interacción con algunas cinasas, como la proteína cinasa C- $\zeta$  y la cinasa de Jun (Gómez-Muñoz, 2006). La ceramida también puede ser fosforilada a C1P por la cinasa de ceramida, y

promover la síntesis de DNA y la división celular. También se ha demostrado que la C1P bloquea la activación de caspasa-3 y caspasa-9, lo que sugiere tiene un papel inhibitor de la apoptosis (Chalfant and Spiegel 2005). Otra función de la C1P se encuentra en la respuesta inflamatoria, ya que estimula la producción de prostaglandina E2 y ácido araquidónico (Pettus et al., 2003).

### ***1.1.ii LPA***

El LPA es un glicero-fosfolípido que se encuentra presente en tejidos y plasma sanguíneo. El LPA tiene varias formas, de las cuales el de 18 carbonos es el más común. Su producción se da a partir de lípidos de membrana, ya sea por la acción conjunta de fosfolipasa D (PLD) que genera primero ácido fosfatídico y su posterior deacilación por acción de la fosfolipasa A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>); o bien a través de la lisofosfolipasa D o Autotaxina (ATX) (Tigyi, 2003) que genera LPA a partir de la lisofosfatidil colina.

Como lípido bioactivo, al LPA se le han atribuido múltiples funciones en varios sistemas como son el inmune, reproductivo, nervioso y vascular. Así mismo, cuando hay defectos en su señalización se le ha asociado a procesos patológicos tales como neuroinflamación, cáncer, fibrosis y obesidad (Choi et al., 2010). Estos efectos del LPA se generan por su acción desde el medio extracelular.

Al igual que la S1P, el LPA señala mediante receptores transmembranales acoplados a proteínas G. En mamíferos se han descrito 6 receptores a LPA, denominados LPARs, que se distribuyen de forma heterogénea en tejidos y en diferentes momentos de la vida del organismo, por lo que su señalización es muy variada. Adicionalmente, en el 2004 el LPA se describió como un ligando para un receptor intracelular, el PPAR $\gamma$  (peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$ ) (Zhang et al., 2004)

Para analizar mas a fondo las variaciones del efecto de LPA en la función de cada uno de los receptores a LPA, se generaron ratones carentes de alguno o algunos de los LPARs. Estos ratones han ayudado a identificar algunas de las funciones del LPA, y también han permitido evidenciar que la señalización por cada uno de

los receptores no es igual, ya que los fenotipos de los ratones nulos para cada receptor son muy variados. Por ejemplo, el ratón nulo para el *Lpar2* no tiene un fenotipo anormal, mientras que el ratón nulo para el *Lpar1* tiene anomalías craneofaciales y presenta un fenotipo letal con poca penetrancia, debido a que presentan problemas para alimentarse (Contos et al., 2002).

El LPA<sub>1</sub> en el ratón adulto se encuentra en cerebro, útero, testículos, pulmón, intestino delgado, corazón, estómago, riñón, bazo, timo, placenta y músculo esquelético. En el desarrollo embrionario se ha observado su expresión en tejido nervioso en desarrollo. LPA<sub>1</sub> se asocia a G<sub>i</sub>, G<sub>q</sub> y G<sub>12/13</sub> e induce las vías de fosfolipasa C (PLC), Rho y Akt, dando respuestas como proliferación, supervivencia y migración celular, además de cambios en citoesqueleto.

LPA<sub>2</sub> tiene sitios de expresión más limitados, como son el riñón, útero y testículos, y con menor nivel de expresión en estómago, bazo, timo y cerebro. LPA<sub>2</sub> se une a G<sub>i</sub>, G<sub>q</sub> y G<sub>12/13</sub>, transduce por MAPK, Ras, Rac y PLC.

LPA<sub>3</sub>, que tiene gran similitud con LPA<sub>1</sub> y LPA<sub>2</sub> actúa de forma similar a éstos, al unirse a G<sub>i</sub> y G<sub>q</sub>, y además tiene una distribución similar al LPA<sub>1</sub>. A pesar de las similitudes entre LPA<sub>1</sub> y LPA<sub>3</sub> el ratón KO del primero tiene una letalidad del 50%, mientras que el KO de LPA<sub>3</sub> es viable, aunque la hembra presenta algunos problemas reproductivos (Choi et al., 2010).

LPA<sub>4</sub>, LPA<sub>5</sub> y LPA<sub>6</sub> son considerablemente diferentes al resto de los receptores a LPA, sin embargo, entre sí tienen una alta similitud. LPA<sub>4</sub> se expresa en ovarios, fibroblastos embrionarios, en el cerebro en desarrollo, piel, corazón y timo. La señalización de LPA<sub>4</sub> se da por G<sub>12/13</sub>, mediante la vía de Rho, o bien se une a G<sub>s</sub> y tiene un efecto inhibitor de la movilidad celular; su eliminación resulta en una mayor estimulación de la migración inducida por LPA en fibroblastos (Choi et al., 2010). LPA<sub>5</sub> se une a G<sub>q</sub> y G<sub>s</sub>, al igual que otros receptores induce retracción de neuritas y formación de fibras de estrés. Adicionalmente funciona como receptor de otros lípidos como el farnesil fosfatado, aunque a muy altas concentraciones (Choi et al., 2010). El LPA<sub>6</sub> se describió en el 2008, y presenta homología con los

receptores LPA<sub>4</sub> y LPA<sub>5</sub> se expresa en el folículo piloso y está implicado en el crecimiento de cabello en humanos; aparentemente su señalización es similar a la de los receptores LPA<sub>4</sub> y LPA<sub>5</sub> (Pasternack et al., 2008). Existe otra proteína denominada GPR87, que recientemente ha sido postulada como posible receptor de LPA (Tabata et al., 2007); hasta el momento se le ha relacionado con algunos tipos de carcinomas y con la supervivencia de células tumorales (Zhang et al., 2010).

Como es de esperarse, la regulación de LPA es muy importante para la supervivencia de los individuos. Una de las formas en las que el LPA puede ser regulado es mediante su defosforilación lo que produce al MAG, lípido que no tiene actividad biológica conocida.

### ***1.i.iii PA***

El ácido fosfatídico puede producirse por distintas vías, entre las que se encuentran la hidrólisis de la fosfatidil colina mediada por la fosfolipasa D (PLD), la fosforilación del DAG por parte de la cinasa de DAG, y la acilación del LPA por la aciltransferasade LPA (Brindley, 2002).

Algunas de las funciones del PA como lípido bioactivo son modular la fosforilación de proteínas, en el proceso oxidativo mediante la interacción con la NADPH oxidasa (Rosen et al., 2009) y en la modulación del tráfico de membrana. Sin embargo, los estudios con PA son complejos ya que bloquear su producción por la vía mediada por PLD es difícil por que son pocos los inhibidores específicos de esta enzima y los que se conocen tienen efectos colaterales.

El PA tiene su función señalizadora mediante la interacción específica con algunas proteínas como la proteína cinasa C (PKC), PLC- $\gamma$ , Raf-1, mTOR, la fosfodiesterasa PDE4D3 y la fosfatasa de tirosinas SHP-1, entre otras. Además se sabe que el PA modula la vía de ERK mediante su interacción con cRaf-1, lo cual promueve que esta última se dirija a la membrana y así interactúa con Ras. De forma conjunta, cRaf-1 y Ras pueden unirse a MEK y ERK (Andresen, 2002).



La síntesis de PA puede ser inducida por LPA, se ha descrito que la formación de fibras de estrés observadas por el tratamiento con LPA no parece deberse al LPA directamente, sino a la generación de PA y la activación de PLD, lo que contribuye a la señalización sobre la vía de Rho (Cross, 1996).

EL producto defosforilado del PA es el DAG, lípido que también es bioactivo y que tiene algunos efectos en el medio intracelular como la activación de PKC (Waggoner et al., 1999).

## **I.ii Fosfatasas de lípidos fosfatados**

Es por las múltiples e importantes funciones de los lípidos bioactivos, que su disponibilidad está muy regulada a nivel celular, tisular y del organismo en su conjunto. Una forma de regular a los lípidos bioactivos fosfatados es mediante su defosforilación.

Algunas de las enzimas encargadas de defosforilar lípidos han sido identificadas como PAPs. Éstas pueden dividirse en dos grupos las PAP1 y las PAP2. La actividad de las PAP1 depende de  $Mg^{2+}$  y es inhibida por N-etilmaleimida. Este grupo de PAPs defosforila al PA (Waggoner et al., 1999) y se han vinculado con la señalización intracelular mediante la regulación de la expresión de ciclo-oxigenasa y la formación de eicosanoides y también se ha descrito que se unen a receptores de EGF (Brindley, 2004).

El otro grupo de enzimas son las PAP2, que han sido denominadas Fosfatasas de Lípidos Fosfatados o LPPs por sus siglas en inglés. Éstas no son inhibidas por N-etilmaleimida ni necesitan  $Mg^{2+}$ , difieren en su mecanismo de las de tipo 1 (Waggoner et al., 1999), y adicionalmente al PA tienen como substratos al LPA, S1P y C1P. En mamíferos se han descrito tres isoformas de las LPPs: la LPP1 que además cuenta con una variante de splicing en humano (LPP1a), la LPP2 y la LPP3 codificadas por los genes *Ppap2a*, *Ppap2c*, *Ppap2b* respectivamente.

Las LPPs defosforilan lípidos como LPA, PA, S1P y C1P generando monoacilglicerol, diacilglicerol, esfingosina y ceramida respectivamente. A pesar de que las

tres LPPs defosforilan in vitro a todos estos sustratos, cada una de las tres isoenzimas tiene distinta especificidad sobre cada uno de los lípidos (Roberts et al., 1998).

Estructuralmente las LPPs tienen seis segmentos transmembranales formados por  $\alpha$  hélices, con el extremo amino y carboxilo terminal del lado citoplásmico. Su sitio catalítico está formado por aminoácidos conservados en la segunda y tercera asas extracelulares o luminales, cuentan con un sitio para N-glicosilación en la segunda asa extracelular y su peso molecular aproximado es de 35 kDa (Barilà et al., 1996) (Fig.2). Es por sus características estructurales que las LPPs tienen actividad de ecto-fosfatasa (Brindley, 2004).

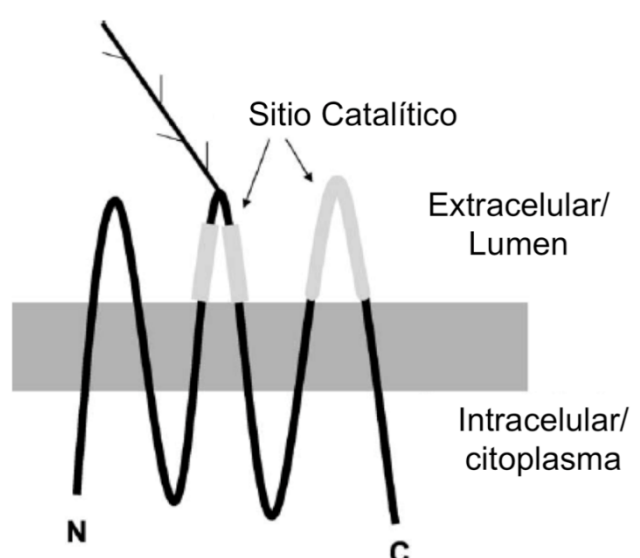


Fig. 2. Topología de las LPPs (Modificado de Sciorra y Morris 2002)

En *Drosophila* la proteína Wunen (Wun), ortóloga a las LPPs, lleva a cabo la función de defosforilar lípidos fosforilados y es de gran importancia para la migración de la línea germinal (Zhang et al., 1997). Las LPPs en mamífero tienen una identidad conservada, que es de un 70% en toda la proteína y superior al 90% en el sitio catalítico; a pesar de esto, su habilidad para defosforilar distintos sustratos cambia (Hooks et al., 2001) ya que la LPP1 y la LPP3 actúan de manera más eficiente sobre PA y LPA que sobre S1P y C1P a diferencia de la LPP2 donde la eficiencia cambia (Roberts et al., 1998).

Se ha descrito que las LPPs pueden formar tanto homo-oligómeros como hetero-oligómeros y que la formación de estos complejos cambia su localización subcelular. Sin embargo, la actividad catalítica es independiente de su capacidad de oligomerizar (Long et al., 2008).

La transcripción de LPP1 es regulada por p73, uno de los miembros de la familia de p53 (Ishida et al., 2007) y en adenocarcinomas de próstata está regulada por andrógenos (Ulrix et al., 1998); sin embargo, no hay evidencia que la LPP2 ó LPP3 sean reguladas por p73 o por andrógenos. Se describió en el 2006 que LPP1 y LPP3 no se encuentran en las mismas balsas lipídicas en una célula, lo que podría crear microambientes y repercutir en su carencia de redundancia fisiológica (Kai et al., 2006). LPP2 y LPP3 modulan la supervivencia celular mediante la regulación de la apoptosis, sin embargo, parece que lo hacen de distinta manera, ya que LPP2 lo hace mediante la modulación del PA y LPP3 de la S1P intracelular (Long et al., 2005).

LPP2 se ha descrito como reguladora del ciclo celular, específicamente regula a la ciclina A y la entrada a fase S; al disminuir la expresión de LPP2 se retasa el inicio de la fase S y la acumulación de ciclina A. Además, se ha probado que la sobre expresión de LPP2 tiene el efecto contrario. Esta actividad regulatoria sobre el ciclo celular parece no existir en las otras LPPs (Morris et al., 2006).

Otra evidencia de las diferencias entre las distintas LPPs es que el KO de LPP2 (Zhang et al., 2000) y el hipomorfo de LPP1, que cuenta con expresión considerable de LPP1 únicamente en el cerebro (Tomsig et al., 2009), no tienen un fenotipo evidente, ya que son viables y fértiles, mientras que el KO de LPP3 tiene un fenotipo letal embrionario, originado por múltiples problemas en el desarrollo, como son defectos en la vascularización del saco vitelino y la gastrulación (Escalante-Alcalde et al., 2003).

### ***1.ii.i* LPP3**

La LPP3 fue originalmente descrita como Dri42, un gen diferencialmente expresado durante la diferenciación intestinal en rata. A nivel celular se le encontró localizada en el retículo endoplásmico de este tipo celular (Barilà et al., 1996). A la

LPP3 también se le conoce como VCIP (VEGF and type I collagen inducible protein) y se ha demostrado que interactúa con integrinas  $\alpha 5\beta 3$  y  $\alpha 5\beta 1$  mediante un motivo RGD (Arginina–Glicina–Aspartato) en la LPP3 humana y RGE (Arginina-Glicina-Glutamato) en ratón. Esta interacción activa señales río abajo de las integrinas y promueve la agregación celular (Humtsoe et al., 2003 y Humtsoe et al., 2005). Adicionalmente se le ha atribuido un papel antagónico a la vía de los Wnts (Escalante-Alcalde et al., 2003).

Inicialmente la LPP3, además de en el intestino, se encontró en placenta y corazón (Barilà et al., 1996). Después, empleando una línea de ratones con un alelo reportero de *lacZ* (*Ppap2b<sup>lacZ</sup>*) integrado en el locus de LPP3, se generó una descripción mas detallada de la expresión de este gen en el desarrollo embrionario. Se le encontró expresado en el alantoides, el mesodermo, las regiones anterior media y posterior del cerebro, el pericardio, somitas, la parte anterior del intestino, los dedos, la notocorda y en la placa del piso (Escalante-Alcalde et al., 2009; Fig.3 ).

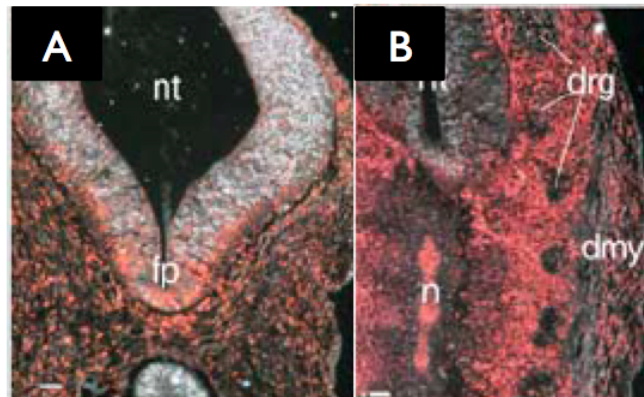


Fig. 3. Embriones heterocigotos *Ppap2b<sup>lacZ</sup>* de 10.5 días con tinción histoquímica de beta-galactosidasa, en A se puede observar la expresión (rosa) en la placa del piso (fp) y en B en la notocorda (n). *nt*, tubo neural, *drg* ganglio de la raíz dorsal, *dmy* dermomyotomo. Modificado de Escalante-Alcalde et al., 2009.

La LPP3 también participa en el desarrollo de capilares linfáticos (Senda et al., 2009), está involucrada en el desarrollo neuronal (Sánchez et al., 2007) y en el desarrollo del cerebelo (López-Juárez et al, en prensa). Además, cuando la LPP3

se sobreexpresa en líneas celulares derivadas de cáncer de ovario disminuye la capacidad de estas células para formar tumores además de aumentar su muerte por apoptosis (Tanyi et al., 2003),

Distintos estudios sugieren que *Ppap2b* está regulado por varios factores. Por Northern blot se describió que TNF- $\alpha$  y lipopolisacáridos inducen a *Ppap2b* (Magder et al., 2006). Otros estudios sugieren que LPP3 es regulado negativamente por las vías de Wnt3 y Wnt 1 (Jackson et al., 2005). Además se ha encontrado que LPP3 se regula de forma tejido específica en hígado y pulmón (Kawaji et al., 2006) y es regulada positivamente por VEGF (vascular endothelial growth factor) (Humtsoe et al., 2003). Otro regulador potencial es Sonic Hedgehog (SHH), ya que la transcripción de *Ppap2b* se ve aumentada cuando se tratan células mesenquimales con SHH (Ingram et al., 2008). Adicionalmente en muestras de pacientes con carcinoma de células basales (basal cell carcinoma/BCC) se ha encontrado que LPP3 aumenta junto con otros genes relacionados a la vía de SHH (Asplund, et al., 2008). En el 2008 se describió que al disminuir la expresión de Musashi, una proteína de unión a RNA, se disminuye la expresión de genes blanco de la vía de SHH, entre otros genes que mostraron una disminución considerable se encontró LPP3 (Sánchez-Díaz et al., 2008). La participación de la vía de SHH se apoya también en la expresión de LPP3 en zonas ventrales del tubo neural, la notocorda, la placa del piso y en un análisis *in silico* que describe que hay sitios potenciales de unión de factores de transcripción relacionados a la vía de SHH y a la ventralización del tubo neural como son Gli, Foxa2, Pax6, Nkx2.2 y Nkx6.1 (Escalante-Alcalde et al., 2009).

### ***I.iii* Sonic-hedgehog**

Los morfógenos son factores que se secretan e inducen distintos destinos celulares, su efecto depende de la concentración en la que se encuentren (Lodish et al., 1999). En *Drosophila* uno de los principales morfógenos es Hedgehog, éste se encarga de controlar la segmentación embrionaria, el desarrollo del sistema nervioso y el patrón de los discos imagales. En vertebrados existen tres homólogos, Indian-hedgehog (IHH), Desert-hedgehog (DHH) y Sonic-hedgehog (SHH). A Dhh se le han atribuido funciones en el desarrollo de la línea germinal en el macho y en la diferenciación de células gliales. Ihh tiene un papel importante en el desarrollo del endodermo, particularmente en la diferenciación del endodermo visceral y en estadios más tardíos está involucrado en el desarrollo del intestino (Gilbert, 2003).

Entre los tres homólogos el más estudiado ha sido SHH, por la importancia que tiene en el desarrollo y su relación con varias enfermedades como la Holoprosencefalia y varios tipos de cáncer como el BCC y el meduloblastoma (Ruiz i Altaba, 1999). Este morfógeno sufre modificaciones postraduccionales como son la unión covalente de colesterol y el corte del extremo-carboxilo; estas modificaciones son necesarias para su secreción, difusión y señalización.

En humanos, alteraciones en la vía de SHH están asociados a defectos en la formación de hemisferios (Gilbert, 2003; Fuccillo et al., 2006). En el embrión, SHH se produce inicialmente en la notocorda desde donde señala a la placa del piso para que ésta también produzca SHH; es así que inicia un gradiente en el que la concentración de SHH es mayor en zonas ventrales y menor en la parte dorsal (Roelink et al., 1995). SHH participa también en la diferenciación de neuronas y es necesario para la eficiente diferenciación a motoneuronas, tiene una acción importante en la polaridad de la extremidad y el desarrollo de estructuras epidérmicas esqueléticas, craneofaciales y viscerales (Gilbert, 2003).

La vía de SHH ha sido asociada a una gran variedad de genes blanco que participan en cada uno de los procesos que son regulados por esta vía. Entre los

blancos de esta vía se encuentran CCND1 y CCND2 que contribuyen al ciclo celular, FoxA2, FoxC2, FoxE1, FoxF1, FoxL1, FoxP3, Pou3F1, RunX2, Sox13 y Tbx2 que participan en la determinación de distintos linajes celulares. FoxA2, Nkx6.1, Nkx2.2, Nkx2.9 e Irx3 participan en la especificación de la ventralización del tubo neural (Nishi et al., 2009). Por otra parte JAG2, que participa en la vía de Notch es regulado positivamente por SHH y la vía de los WNTs es inhibida por SHH mediante la expresión de SFRP1 en células mesenquimales (Katoh and Katoh, 2008).

Como la mayoría de las vías de señalización, la vía de SHH cuenta con una vía principal que ha sido la más descrita (a la que se le denomina vía canónica) y vías alternas o no canónicas. En la vía canónica, el receptor de SHH, Patched (Ptch), que es regulado positivamente por la misma vía (Ågren et al., 2004), inhibe a smoothened (Smo). Smo tiene la capacidad de inhibir un corte sobre los factores de transcripción responsables de la actividad de esta vía. En *Drosophila* el factor de transcripción responsable es cubitus interruptus (Ci) y en mamíferos el homólogo es Gli.

Cuando SHH se une al receptor Ptch, la proteína Smo deja de ser reprimida por éste, por lo que puede ejercer su acción e inhibe el corte en los Gli; al no ser cortados, los Gli pasan de ser un represor a un activador. En *Drosophila*, otras proteínas involucradas en la regulación de Ci son la kinesina Costal2 (Cos2), la cinasa serina/treonina fused (Fu) y el suppressor-of-fused (Sufu). Estas proteínas forman al complejo encargado de cortar a Ci. Cuando Smo es desinhibido, entonces éste forma un complejo con Cos2, lo que no permite que se forme el complejo represor (Simpson et al., 2009). En vertebrados se han encontrado homólogos para éstas proteínas. Sin embargo, parecen tener un mecanismo de acción diferente dado que los fenotipos de los organismos que carecen de alguna de estas proteínas son diferentes a los encontrados en la mosca, como es el caso de fused, que en *Drosophila* es indispensable para el establecimiento del patrón embrionario y en ratón el KO no tiene fenotipo, por el contrario Sufu en mosca es

dispensable pero en ratón el KO de su homólogo presenta letalidad embrionaria (Simpson et al., 2009).

En el ratón existen tres isoformas de la proteína Gli, Gli1, Gli2 y Gli3. Cada uno cuenta con 5 dedos de Zinc como dominios de unión a DNA, pero difieren entre sí principalmente en su región N-terminal, Gli1 es un activador transcripcional muy fuerte y no se ha reportado que tenga dominios represores. En el ratón Gli1 es prescindible, ya que Gli2 puede asumir su función, Gli1 es un blanco de la vía de SHH, por lo que su expresión puede estar regulada por Gli2 y 3. Estos últimos tienen mucha similitud y cuentan con dominios de activación y represión, adicionalmente cuentan con múltiples sitios de fosforilación por PKA (proteína cinasa A), sin embargo *in vitro* se ha reportado que Gli2 posee una mayor actividad transcripcional que Gli3. Otros estudios mencionan que Gli2 funciona únicamente como activador, ya que al ser procesado tiende a dirigirse al proteosoma y degradarse (Simpson et al., 2009). Gli3 actúa principalmente como represor transcripcional que suprime genes blanco de la vía de SHH, ya que en ausencia de SHH, se genera una proteína de 83kDa la cual corresponde al fragmento represor, a esta proteína se le conoce como Gli3-R (Riobo and Manning, 2007).

De modo alternativo a la vía canónica, SHH puede tener su efecto señalizador por la acción de otros elementos que generan una respuesta a SHH de forma independiente a los factores Gli. Una de estas formas es mediante la interacción física de Ptch con la ciclina B1 en la fase G2 del ciclo celular. Con esta interacción se evita que el complejo ciclina B1/ CDK1 llegue al núcleo. Cuando se une algún ligando de la familia de los HH a Ptch, se rompe la interacción de éste con la ciclina y de esta forma la ciclina B1 es liberada permitiendo que el ciclo continúe a fase M (Jenkins, 2009). Se ha descrito que la sobreexpresión de Ptch induce la apoptosis de forma independiente a los Gli. Esta actividad se da mediante la regulación de un sitio de corte para caspasas en Ptch, lo que modificaría su función induciendo muerte celular. En otra vía alterna Gli3-R participa pero no como represor transcripcional, sino mediante la interacción con beta-catenina y la



unión simultánea a microtúbulos; esto permite regular la función como activador transcripcional de beta-catenina. Estas vías aun no se han explorado de forma mas extensa por lo que no se conocen más detalles de su funcionamiento (Jenkins, 2009).

En muchas ocasiones, genes que son activados por la vía de SHH no son blancos directos, ya que muchos factores de transcripción son blanco de los factores Gli, por lo que otra de las formas en las que SHH puede regular la expresión de algunos genes es mediante la activación de alguno de estos factores como es el caso de *Foxa2* (HNF3-beta) (Pérez-Balaguer et al., 2009). *Foxa2* es un factor de transcripción de la familia “winged-helix”, es un homólogo del gen homeótico fork head de *Drosophila* (Lai et al., 1991). Este factor es indispensable para el desarrollo embrionario, el ratón KO para *Foxa2* muere al día embrionario 10 y no forma la notocorda, como consecuencia tiene defectos en la organización de somitas y del tubo neural. Además en los KO la placa del piso y las motoneuronas desaparecen (Weinstein et al., 1994), lo que nos indica la importancia de este factor en el desarrollo del sistema nervioso.

#### ***I.iv Regulación de la transcripción***

La regulación de un gen es uno de los procesos más importantes en la vida celular, como son el control del crecimiento, la supervivencia celular y la diferenciación. La RNA polimerasa es la encargada de llevar a cabo la transcripción junto con otros factores generales. Este proceso difiere en distintos organismos, en los eucariontes es más complejo este proceso que en los procariontes y arqueas.

En células eucariontes la expresión de un gen puede ser regulada a varios niveles, como en el inicio de la transcripción, la elongación, el splicing y por los microRNAs. En eucariontes existen tres RNA polimerasas denominadas Pol I, Pol II y Pol III. La Pol I y Pol III se encargan de la transcripción de RNAs especializados. La Pol I transcribe los RNAs ribosomales (rRNA) y la Pol III se encarga de la transcripción de los RNAs de transferencia (tRNA), algunos RNAs pequeños y la subunidad 5S del rRNA; la Pol II es la encargada de la transcripción del RNA mensajero (mRNA) que es el que da lugar a las proteínas (Watson et al., 2004).

Para transcribir un gen, la RNA Pol II pasa por una serie de fases que son la iniciación, la elongación y la terminación. Para la iniciación es necesario que la RNA pol, junto con algunos factores de iniciación se unan a una secuencia promotora. La unión al promotor define cuál hebra es la que será transcrita ya que la transcripción ocurre siempre en dirección 5' a 3', por eso este paso es el primero en la regulación. En la elongación se requiere que la polimerasa sufra mayores cambios conformacionales; estos cambios suelen ocurrir cuando el RNA tiene apenas 10 bases. Para la terminación, es necesario que la polimerasa se disocie del DNA y para esto hay diversas señales (Maston et al., 2006 )

Los factores involucrados en la transcripción por Pol II se clasifican en tres grupos: factores generales (GTFs), activadores promotor específico y coactivadores. Entre los GTFs se encuentra la RNA Pol II, TFIIA, TFIIB, TFIID, TFIIIE, TFIIF, TFIIH y el complejo mediador. Estos factores se ensamblan en el promotor y forman un

complejo preiniciador (PIC). El primer paso en la formación del PIC es la unión de TFIID, que es un complejo formado por la TBP (proteína de unión a la caja TATA) y varios factores asociados a esta proteína conocidos como TAFs; cuando la polimerasa abandona el promotor, TFIID, TFIIE, TFIIH y el mediador se mantienen en el promotor, de esta forma es más fácil el reinicio de la transcripción. La transcripción mediada únicamente por el PIC se conoce como transcripción basal y se puede aumentar mediante los activadores, que son proteínas con dominios específicos de unión a DNA. Estos dominios se han dividido en 5 superclases: dominios básicos, dominios de Zinc, hélice vuelta hélice, andamio beta con unión al surco menor y otros. Estas superclases a su vez se dividen en otras 31 clases que a su vez se dividen en 78 familias (Stegmaier et al., 2004). Además del dominio de unión a DNA, los activadores cuentan con un dominio de activación que es el encargado de unir a algún factor del PIC, o atraer al PIC y a remodeladores de la cromatina. Los activadores suelen funcionar como dímeros, ya sea homodímeros o heterodímeros, por lo que los sitios de reconocimiento (TFBS) muchas veces se encuentran en pares. Los TFBS en general comprenden entre 6 y 12 bases, sin embargo solo de 4 a 6 son fundamentales para la especificidad. Los coactivadores no cuentan con dominios de unión a DNA, sino que tienen dominios de unión a proteínas mediante los cuales interactúan con uno o más activadores, el mecanismo por el que activan es muy parecido al de los activadores (Maston et al., 2006).

La iniciación de la transcripción puede ser focalizada o dispersa. En la focalizada, inicia en un solo nucleótido o serie de nucleótidos, en la dispersa inicia en alguno de múltiples sitios de inicio de la transcripción. La proporción de cada uno de estos tipos de iniciación depende del tipo de organismo del que se trate, ya que en dos terceras partes de los vertebrados el inicio disperso es el más común, mientras que en organismos más simples predomina la iniciación focalizada. Por otro lado el tipo de gen del que se trate impone diferencias en el tipo de inicio, un gen altamente regulado suele tener promotores focalizados contrario a los promotores de los genes constitutivos (Juven-Gershon et al., 2010).

Dentro del promotor existe una región que se denomina promotor basal que es esencial para el correcto posicionamiento del PIC. Dentro de esta región del promotor se encuentran varios sitios de unión para las unidades de la maquinaria de transcripción. Algunos de los sitios más comunes son la caja TATA, a la que se une TBP, este sitio suele estar entre -31 y -26 bases del sitio de inicio de la transcripción (TSS), el sitio BRE o sitio de unión a TFIIB se encuentra entre -37 y -32 del TSS, el iniciador (Inr) se localiza justo en el TSS y se le unen factores asociados a TBP (TAFs) y DPE (elemento promotor río abajo) que se localiza entre 28 y 32 bases río debajo de TSS. Sin embargo, ninguno de estos sitios es esencial por lo que no están en todos los genes, el más común es el Inr que se encuentra casi en la mitad de los promotores descritos, mientras que el BRE y el DPE se encuentran en una cuarta parte de los promotores y la caja TATA solamente en una octava parte (Hahn 2004 y Maston et al., 2006). La presencia o ausencia de estos elementos marca un primer punto en la regulación de los promotores (Hsu et al., 2008).

Existe otra región proximal que tiene actividad reguladora, la cual se caracteriza por estar a solo algunos cientos de bases del TSS. Esta región puede tener islas CpG que son regiones de DNA no metilado con un contenido rico en GC además de tener múltiples sitios de unión a activadores. El estudio de estas regiones ha mostrado que los activadores pueden actuar de forma sinérgica en la activación de un gen (Maston et al., 2006).

El control del inicio de la transcripción también puede modularse por otros elementos, como son la localización de genes en territorios nucleares, la composición de los nucleosomas y sus modificaciones, elementos distales tales como potenciadores, silenciadores, LCR y aisladores. (Watson et al., 2004).

## **II. Justificación**

El promotor de *Ppap2b* no ha sido caracterizado y dado que LPP3 tiene un patrón de expresión muy definido durante el desarrollo embrionario, esto sugiere que este gen tiene una regulación muy fina. Por este motivo, conocer los elementos que están regulando la expresión de manera espacial y temporal de *Ppap2b* es de interés.

Dado que la expresión de SHH correlaciona con la expresión de LPP3 durante el desarrollo embrionario en dominios como la notocorda y la placa del piso del tubo neural, en conjunción con la presencia de potenciales sitios de unión a factores de esta vía hace de particular interés analizar la influencia de SHH en la regulación a nivel transcripcional desde el promotor de *Ppap2b*.

## **III. Problema**

Para conocer cómo es la regulación de *Ppap2b* en los dominios ventrales del tubo neural, es necesario estudiar cómo es su región promotora y si vías como la de SHH la regulan de forma específica.

## **IV. Hipótesis**

SHH regula mediante su vía canónica la transcripción de *Ppap2b* en el desarrollo embrionario, por medio de alguno de los sitios de unión a factores Gli, o por medio del factor de transcripción Foxa2.

## ***V. Objetivo general***

Explorar las regiones regulatorias que determinan la expresión de LPP3, principalmente la dependiente de la vía de señalización de SHH.

### ***V.i Objetivos particulares***

- 1.- Encontrar una zona con actividad promotora en la región 5' de *Ppap2b*
- 2.- Analizar mediante herramientas bioinformáticas las características de la región 5' de *Ppap2b*.
- 3.- Analizar la funcionalidad de los potenciales sitios de unión a Gli y Foxa2.

## ***VI. Material y Métodos***

### ***VI.i. Cultivo celular***

Se utilizaron células AD-293 (Cat. No.240085 Stratagene) para la co-transfección de la construcción del promotor con vectores de expresión de Gli1 o Foxa2 y células NIH-3T3 (ATCC No. CRL-1658) para los ensayos de estimulación con SHH. Las células se mantuvieron en medio de cultivo con 10% de suero bovino fetal (SFB) a una confluencia menor al 90%, como se indica en la hoja técnica. Las células fueron descartadas después del pase 25.

### ***VI.ii. Estimulación de células NIH-3T3***

Se sembraron células a 80% de confluencia, ya a confluencia 24 horas después de sembradas se trataron con SHH (R&D Systems) 4 nM por 48 horas (Taipale et al., 2000), después de esto se extrajo RNA total o proteína a células tratadas y a células control.

### ***VI.iii.Extracción de RNA***

Se extrajo con TRIzol (Invitrogen) el RNA de células 3T3 tratadas y control. Para una caja de 3.5 cm de diámetro, se agregó 0.5 ml de TRIzol, se esperó a que se disociaran completamente los complejos nucleares por 5 minutos, se añadió 100 µl de cloroformo y se mezcló por inversión, se dejó reposar por 3 minutos y se centrifugó a 12 000 X g durante 15 minutos a 4-8°C. La fase superior acuosa se recuperó y se precipitó de ella el RNA con 250 µl de isopropanol, se centrifugó a 12 000 X g durante 15 minutos a 4-8°C, se descartó el sobrenadante y se lavó el RNA con 0.5 ml de etanol al 75% y se centrifugó a 7500 X g durante 5 minutos a 4-8°C. El RNA se disolvió en agua tratada con DEPC.

#### **VI.iv. RT-PCR semicuantitativa**

A partir de 1 µg de RNA total se generó cDNA

	Volumen utilizado por reacción
MgCl <sub>2</sub> , 25 mM	4 µl
Buffer de transcription reversa 10X	2 µl
Mezcla de dNTP 10 mM	2 µl
AMV Transcriptasa Reversa (22u/µl)	0.65 µl
Random Primers 0.5 µg/µl	1 µl
RNA	1 µg
Agua DEPC	c.b.p. 20 µl

La reacción se incubó por 10 minutos a 25° C, posteriormente se calentó por 30 minutos a 42 °C. Para inactivar la transcriptasa reversa de AMV calentó por 5 minutos a 95 °C y se mantuvo otros 5 minutos a 5 °C. Todos los reactivos fueron de la marca Promega.

A continuación se enlistan los primers utilizados, los cuales fueron diseñados para detectar únicamente cDNA ya que se encuentran a distancias superiores a 1Kb en DNA genómico:

Primer	Secuencia 5'-3'	Tamaño del producto	Temperatura de alineamiento	Número de ciclos
Hprt 3'	GCTAAGGGCATATCCAACAACAAAC	344 pb	57 °C	25
Hprt 5'	CCTGCTGGATTACATTAAGCACT			
Ptch 3'	TTTGTTAGGGGCTGTGGCAG	300 pb	55 °C	25
Ptch 5'	AATCAGGGGAACCTTATCACGGAG			
<i>Ppap2b3'</i>	GACACGAAGAACAACACTATGCAGCAG	381 pb	55 °C	35
<i>Ppap2b 5'</i>	CAAAGTGTCCATTGGGCGCCTG			



### **VI.v. Inmuno Blot**

Se utilizaron geles de acrilamida al 10%, se corrió el gel por hora y media a corriente fija de 20 mA. Como marcador de peso se utilizó 0.3  $\mu$ l de ChemiBlotMWMMarker (Millipore Cat. No.2230-S) y 7  $\mu$ l de Precision Plus Protein Dual Color Standards (Biorad Cat. No. 161-0379). De todas las muestras se cargaron 40  $\mu$ g de proteína. La transferencia se realizó por dos horas a 100 V a una membrana de PVDF (Millipore). Para detectar LPP3 se usó un suero anti-LPP3 sin purificar 1:1000 (Sigma) con previo bloqueo de una hora con leche sin grasa al 6% peso/volumen. Como control de carga se usó anti-GAPDH 1:3000 (Millipore Cat. No. MAB374) con bloqueo de una hora con leche sin grasa al 5%. Ambas proteínas se detectaron con anticuerpos secundarios anti-conejo y anti-ratón (Santacruz, SC-2030 y SC-2031 respectivamente) acoplados a HRP a una dilución de 1:5000. Después de los anticuerpos se realizaron 3 lavados con TBS-T 0.1%. Entre la detección de LPP3 y de GAPDH se desnudó la membrana con solución de desnudado a 50°C por 30 min.

### **VI.vi. Clonación del fragmento promotor en pGL3**

Se adquirió un cromosoma bacteriano artificial (BAC RP23-258J11, CHORI) el cual contiene parte de la secuencia genómica de ratón de los genes *Prkaa2* y *Ppap2b*, incluyendo la región 5' de este último. Este BAC se utilizó como templado para amplificar por PCR, con los primers 5' GGTACCAGTCTCATCGTTAATTAGGT 3' y 5' GGTACCTCTGAGCTTATATTTACGA 3', un fragmento de 2070 pb en el extremo 5' de *Ppap2b*. El fragmento fue amplificado por la Dra. Sara Morales empleando la enzima de alta fidelidad Herculasa (Stratagene) y clonado en un vector de tránsito. El fragmento amplificado comprende desde 477 pb río arriba del ATG y hasta alrededor de 2547 pb río arriba incluyendo secuencias de sitios de corte para *KpnI* mediante los cuales se clonó en el vector pGL3 Basic el cual contiene el gen reportero de luciferasa. El plásmido pGL3 fue digerido con la

enzima *KpnI*, posteriormente fue defosforilado con fosfatasa intestinal de becerro (CIP, New England) y la ligación fue hecha en relación 3:1 inserto/vector toda la noche a 16 °C con T4 DNA ligasa (Invitrogen). El tamizado de las clonas se realizó con la enzima *XhoI* para determinar cuales tenían el inserto y la orientación del mismo. El plásmido con el promotor en orientación sentido será referido en adelante como Sen2070, mientras que en orientación inversa será referido como antisentido.

Los plásmidos se amplificaron de cultivos de una sola colonia de *E. coli* DH5 $\alpha$  que se crecieron en medio LB con ampicilina [100  $\mu$ g/ml] a 37°C en agitación de 250 rpm. Posteriormente, las bacterias se procesaron mediante el protocolo MaxiPrep de Qiagen.

#### **VI.vii. Análisis Bioinformático**

Se analizó con el programa Genomatix (<http://www.genomatix.de/en>) la secuencia de 2070 pb del promotor putativo para localizar los sitios de inicio de la transcripción predichos de *Ppap2b* así como los potenciales sitios de unión a factores de transcripción. Genomatix cuenta con múltiples herramientas que se basan en matrices de sitios consenso y además cuenta con 8 diferentes tipos de análisis. En este trabajo solamente se utilizó el “MathInspector” para buscar posibles sitios de unión de factores de transcripción, el “Dorado” que analiza el contexto genómico de una secuencia dada y “RegionMiner” que busca las posibles regiones promotoras para el gen de interés mediante el análisis de CAGE (Cap-analysis gene expression), el cual se basa en atrapar los transcritos por el extremo del 5' Cap.

También se utilizó DCODE (<http://www.dcode.org/>) que basa su análisis en la conservación de sitios predichos de unión a factores de transcripción entre los genomas de diferentes especies.

Para analizar sitios compuestos se usó otro programa llamado Matrix Catch, que pertenece al sitio Biobase (<http://www.gene-regulation.com>), este programa busca si hay similitud de la secuencia a analizar con reportes de datos experimentales. Este programa analiza la similitud del sitio consenso con el sitio de la secuencia y la distancia que hay entre dos sitios que tengan un papel conjunto como reguladores.

#### ***VI.viii. Transfección***

Las células AD-293 se sembraron a 70% de confluencia, 12 horas después se les cambió el medio a Opti-MEM (Gibco). Para transfectar se utilizó Lipofectamina 2000 (Invitrogen). Para cajas de 48 pozos se sembraron 30 mil células y se utilizó 0.5  $\mu$ l de lipofectamina 2000 y 0.4  $\mu$ g de DNA. El DNA y la lipofectamina se mezclaron en 50  $\mu$ l de Opti-MEM respectivamente, 5 minutos después se adicionó el DNA a la lipofectamina 2000 y se incubó a temperatura ambiente por 20 minutos; a cada pozo se le adicionó 100  $\mu$ l de OptiMEM, se le agregaron 100  $\mu$ l de la mezcla y se dejó transfectando por 6 horas. Transcurrido este tiempo se retiró la mezcla de DNA-Lipofectamina y se agregó medio DMEM con 10% de SBF.

#### ***VI.ix. Ensayos de Luciferasa***

Para estos ensayos se utilizó el kit Dual-Glo Luciferase Assay System (Promega) y se siguieron las instrucciones del fabricante. Los ensayos se realizaron en cajas de 48 pozos 36 horas después de la transfección. Para estos ensayos se requiere la cotransfección de un plásmido de expresión de la Luciferasa de Renilla (RL) para normalizar la eficiencia de transfección. Por esto se realizó la cotransfección de 3 plásmidos en cada pozo, el plásmido pRL-CMV (Promega) que expresa la luciferasa de *Renilla*, el plásmido de expresión de Gli1 pMe18S-mGli1 (donación Dra. Katia del Río-Tsonis) o el plásmido de expresión de Foxa2 pcDNA3.1(+)\_rfoxa2 (donación de Dr. Thomas Weiss) y el plásmido con el

fragmento del posible promotor Sen2070. Se utilizaron como controles negativos los plásmidos pcDNA3.1(+) como control del pcDNA3.1(+)\_rfoxa2, el plásmido pMe18S como control de pMe18S-mGli1, el fragmento del promotor de 2070pb en dirección antisentido para tener un control de la actividad promotora. Como control positivo de la activación por parte de Gli1 se utilizó el plásmido 6bsSV40 (donación del Dr. Thomas Eichberger), este plásmido tiene 6 sitios de unión a Gli, por lo que es altamente inducible la expresión de lucifera por este factor.

*\*Las soluciones se encuentran en el Apéndice 1*

## VII. Resultados

### VII.i. Respuesta de *Ppap2b* /LPP3 a la inducción con SHH.

Se indujeron células 3T3 con SHH y en éstas se analizaron los niveles del mRNA de *Ppap2b* por RT-PCR semicuantitativa. Se pudo observar que a las 48 hrs. de estimulación, el transcrito de *Ppap2b* aumentó su expresión al triple (n=5). Como control positivo de la inducción por SHH se analizó el transcrito de *Ptch*, que también mostró aumento en su expresión. El aumento fue analizado con una prueba de t, y fué estadísticamente significativo el aumento de *Ppap2b* al estimular con SHH (Fig 4).

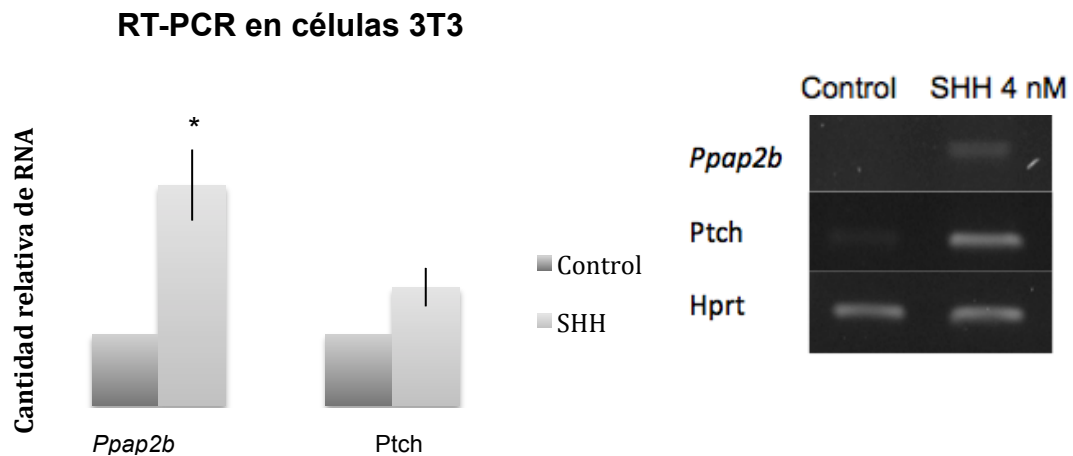


Fig. 4. a) Gráfica del promedio de 5 reacciones de RT-PCR semicuantitativas que muestra un aumento significativo en el transcrito de LPP3 después de la estimulación con SHH durante 48 hr. b) Imagen representativa de un rt-PCR de LPP3, *Ptch* y el control de carga *Hprt*.  $P < 0.05$

Posteriormente se decidió analizar si al igual que en el transcrito, había algún cambio en el nivel de expresión de la proteína tras la inducción con SHH, por lo que a cultivos tratados de la misma manera con SHH se les extrajo proteína y se realizó western blot. En este caso al analizar por Inmunodetección por fase sólida (Inmunoblot) lo que ocurre a nivel proteína no se observó ningún aumento, a nivel proteína hay una aparente disminución con el tratamiento de SHH, cambio que no es estadísticamente significativo. Como control de carga se utilizó GAPDH (Fig 5).

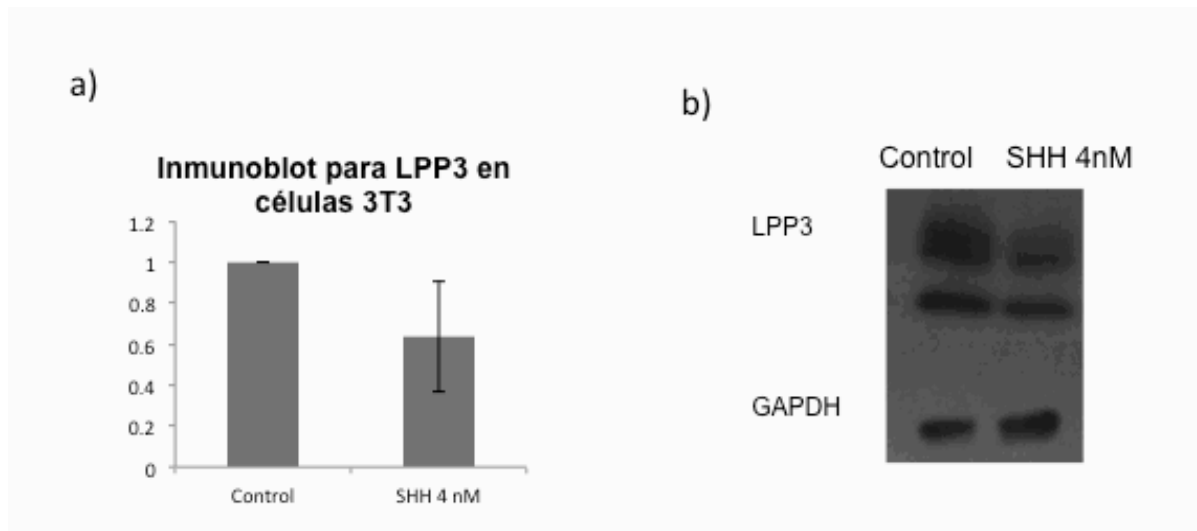


Fig. 5. a) Gráfica de la cantidad promedio de LPP3 de células 3T3 no tratadas y tratadas con SHH 4 nM por 48 h, no se aprecia ningún cambio estadísticamente significativo. b) Imagen representativa de un Inmunoblot de LPP3.  $P > 0.05$

### **VII.ii. Análisis Bioinformático del promotor de *Ppap2b***

Para comenzar a indagar cómo es que se puede estar regulando la expresión de LPP3 se utilizaron algunas herramientas bioinformáticas para tener un indicio de que región puede estar regulando a *Ppap2b*/LPP3 y mediante qué factores se podría estar regulando su transcripción. Se utilizaron tres tipos de análisis: por similitud con una matriz, conservación de secuencias entre especies y comparación con datos experimentales.

## VII.ii.i. Genomatix

### VII.ii.i.i. RegionMiner

Esta aplicación localizó tres posibles regiones promotoras en el extremo 5' de *Ppap2b*, de las cuales dos fueron descartados, por estar en orientación invertida o por contar con pocos CAGE (Análisis de Cap que predice sitios de inicio de la transcripción) que los respalden. El promotor que se tomó en cuenta fue el que da lugar a un mRNA de 6 exones y que además está respaldado por mas de 200 CAGE (Fig 6).

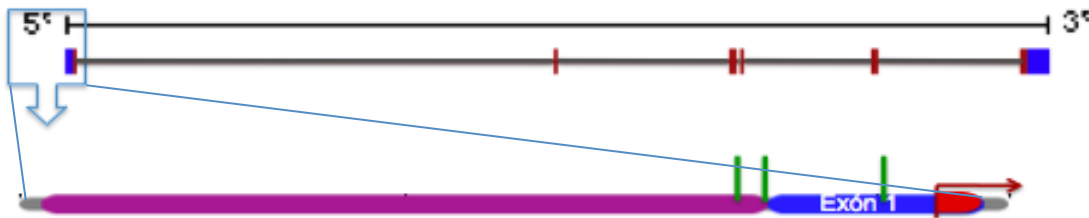


Fig. 6. Estructura del gen *Ppap2b*. En la parte superior, los rectángulos esquematizan los 6 exones y las regiones en azul a los UTR; abajo se muestra una ampliación de un fragmento de *Ppap2b*, se muestra la posible región promotora (rosa), los 3 sitios predichos de inicio de la transcripción (verde) de *Ppap2b*, el exón 1 (azul/rojo) y el ATG (flecha roja).

### VII.ii.i.ii. El Dorado

La siguiente aplicación utilizada fue el Dorado permitió la localización de los sitios más importantes en la región 5' del gen de *Ppap2b*, así se pudo conocer donde podría iniciar la transcripción, la localización del ATG, los SNPs y los 3 sitios donde podría iniciar la transcripción.

El análisis de la región con el promotor antes mencionado (Tabla 1) arrojó entre otras cosas que había dos posibles promotores en esa zona, sin embargo uno era en el fragmento antisentido por lo que se descartó, y de los 4 posibles sitios de inicio de la transcripción, uno de ellos fue eliminado dado que correspondía al

promotor en la cadena antisentido, los otros 3 fueron tomados como posibles sitios de inicio (TSS).

Elementos	Número de coincidencias en la secuencia
Exones	6
UTR	6
Promotores	2
TSS (sitios de inicio)	4
Micro RNAs	0
SNPs	8
Regiones repetidas	0
Regiones Conservadas	0

Tabla 1. Sitios encontrados por *el Dorado* en la secuencia potencialmente promotora en la región 5' de *Ppap2b*.

#### VII.ii.i.iii. MathInspector

El promotor predicho por RegionMiner fue analizado, cuenta con 989 pb y tiene 228 sitios probables de unión a factores de la transcripción, de los sitios encontrados relacionados a la vía de SHH se reportan tres sitios Gli y un sitio Foxa2 o HNF3b (Tabla 2 y Apéndice 2).

Familia	Matriz	Inicio	Fin	Hebra	Similitud	Secuencia
V\$FKHD	V\$HNF3.01	206	222	+	0.975	tgtaaataAAATaaacaa
V\$GLIF	V\$GLI1.01	57	71	+	0.893	accaccgCCCAgccc
V\$GLIF	V\$GLI1.01	250	264	+	0.936	tagacctCCCAccga

Tabla 2. Potenciales sitios de unión para factores Gli y Foxa2 obtenidos por MathInspector. La columna familia se refiere al grupo según la clasificación de Genomatix al que pertenecen los factores de transcripción, mientras que matriz se refiere a la matriz consenso utilizada para el análisis.



#### VII.ii.ii. dCode. NCBI

Por otra parte en el análisis por conservación de sitios entre especies se analizaron 3 regiones altamente conservadas entre rata y ratón, una de 351 pb, otra de 3073 pb y la más grande de 5705, denominados fragmento 1, 2 y 3. Fragmentos de estas se encuentran en la secuencia sen2070 (Fig 7). En estas regiones también se encontraron posibles sitios de unión a Gli y a Foxa2.

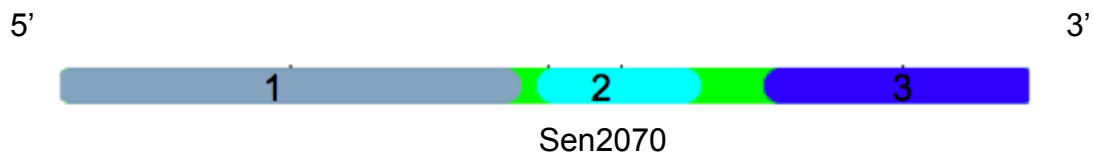


Fig. 7. Se muestra la distribución en el fragmento Sen2070 de los sitios conservados entre rata y ratón. El fragmento 2 correspondiente a la zona conservada de 353pb (azul agua) se encuentra completa. De la región de 3073 o fragmento1 (gris) se cuenta con 983pb, correspondientes al extremo 3' de la región conservada de 3073. La región 3' el fragmento Sen 2070 tiene 586 pb del sitio de 5765 pb o fragmento 3 (azul).

#### VII.ii.iii *Matrix Catch*

La secuencia de 2070 pb tiene 10 posibles parejas de factores de transcripción que podrían trabajar de forma conjunta para regular a *Ppap2b*. Como primer y segundo elemento se muestran los nombres que Matrix Catch asigna a cada uno de los factores, la distancia corresponde a la separación en pares de bases que hay entre el primer y segundo elemento. A continuación se muestra la tabla 3 con la información más relevante:

Primer elemento	Distancia	Segundo elemento	Sitio de inicio	de	Valor compuesto	P-Valor
V\$STAT5B_01	49	V\$HNF1_Q6	1640+		0	1.14E-04
V\$HNF3_Q6	39	V\$HNF3_Q6	1657-		0.009	1.83E-03
V\$NFKB_Q6_01	5	V\$HMGIIY_Q6	1319+		-0.005	3.52E-03
V\$HNF3_Q6	35	V\$HNF3_Q6	1657-		-0.079	4.86E-03
V\$NFKB_Q6_01	5	V\$HMGIIY_Q6	935+		0.004	7.10E-03
V\$HNF3_Q6	37	V\$HNF3_Q6	1655-		0.013	1.19E-02
V\$HMGIIY_Q6	-4	V\$NFKB_Q6_01	858-		-0.106	2.41E-02
V\$PU1_Q6	-2	V\$IRF_Q6	1074-		-0.267	2.85E-02
V\$HNF3_Q6	23	V\$NF1_Q6	2324+		-0.065	3.74E-02
V\$AP1_C	5	V\$NFAT_Q6	852-		-0.069	4.22E-02

Tabla 3. De los 10 pares encontrados 3 corresponden a sitios Foxa2/HNF3 $\beta$ , sitio que puede ser reconocido por Foxa2, factor de transcripción que es activado directamente por la vía de SHH, por lo que la activación de *Ppap2b* por medio de este factor es probable. El valor compuesto negativo indica que el sitio de unión de al menos uno de los factores es mejor de lo necesario para el funcionamiento del modelo de cooperatividad de sitios, por lo que el segundo par HNF3-HNF3 es un buen candidato para regular el promotor de *Ppap2b*. En blanco se muestra el par que tiene la mayor probabilidad de ser funcional.

Al finalizar estos análisis se procedió a conjuntar los posibles sitios de unión a factores de transcripción de los diferentes programas (Fig 8), para poder tener una mejor visión de la localización de los sitios dentro de la secuencia Sen2070.

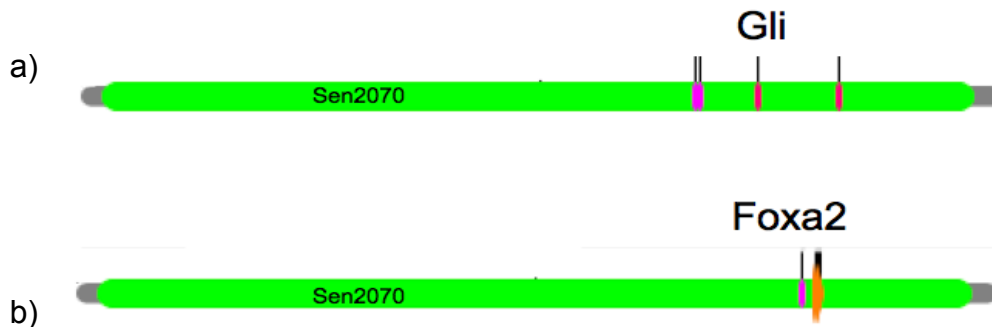


Fig. 8. En el mapa se pueden observar los sitios predichos para unión a Gli (a) y de unión a Foxa2 (b), mientras que los sitios Gli encontrados por cada uno de los diferentes programas no son los mismos, en los sitios Foxa2 solo encontramos 3 diferentes uno de ellos solo fue encontrado por MatixCatch y los otros fueron localizados tanto por MatixCatch como por dCode y el tercero por MatixCatch, dCode y MathInspector.

### VII.iii. Clonación del fragmento promotor en pGL3

Una vez detectada la región con posible actividad promotora y con sitios probables de unión a factores de transcripción, se procedió a clonar en pGL3 un fragmento de 2070pb del promotor putativo (Fig 9). Éste tiene 2 potenciales sitios de inicio de la transcripción y coincide en gran parte con el promotor predicho por RegionMiner

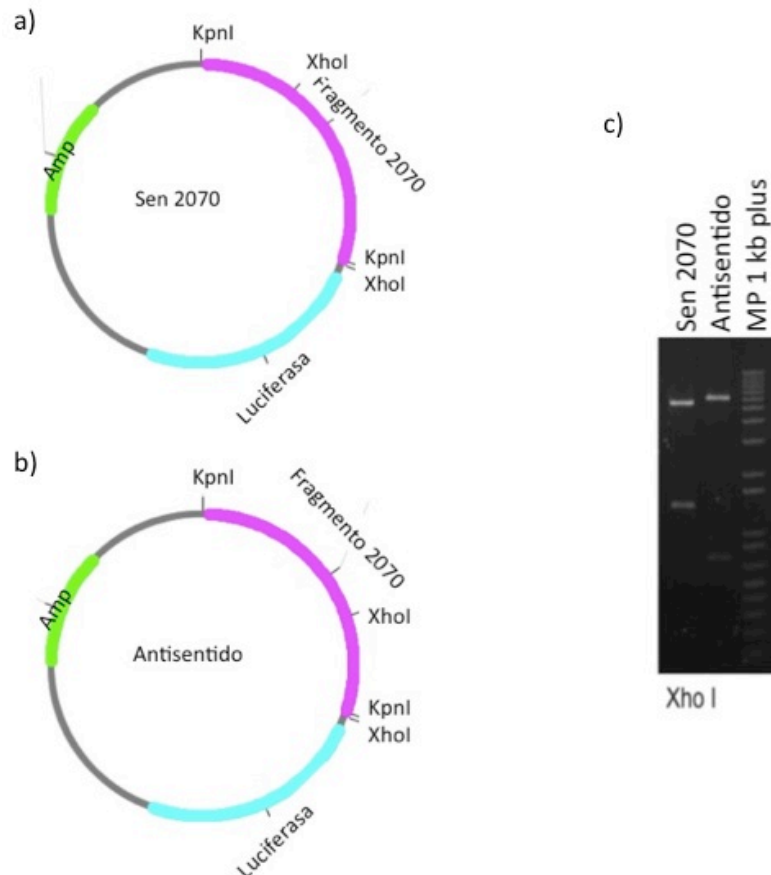


Fig. 9. a) Mapa de la construcción Sen2070, incluye el fragmento 2070 en el plásmido pGL3. b) Mapa de la construcción Antisentido, que será utilizada como control negativo en las pruebas de actividad del promotor. c) Verificación de la dirección del inserto en el plásmido pGL3, la construcción fue clonada en sitios KpnI en ambos lados, por eso es posible encontrar el promotor en ambas direcciones, para poder diferenciar entre las construcciones en sentido y antisentido se digirió con XhoI que tiene un sitio de corte en pGL3 y un sitio asimétrico en el fragmento de 2070 pb.

#### **VII.iv. Actividad del fragmento de 2070 pb**

##### **VII.iv.i. Actividad basal en AD2993 y 3T3**

Ya que se contaba con la construcción Sen2070, en células AD-293 se realizó la transfección de esta construcción y su capacidad activadora fue clara. Esta actividad se probó también en células 3T3 donde la actividad también fue evidente (Fig. 10).

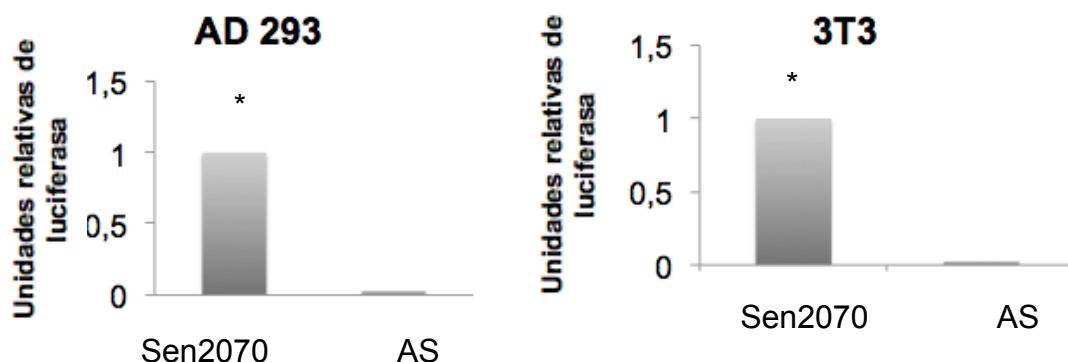


Fig. 10. Actividad del fragmento de 2070 pb en el plásmido pGL3 insertado en orientaciones sentido y antisentido, se observa que la construcción sentido tiene actividad ya que puede dirigir la expresión de la luciferasa, mientras que la secuencia en antisentido no presentó actividad.  $P < 0.01$

##### **VII.iv.ii. Actividad en presencia de Gli1**

Posteriormente se decidió realizar en las células AD-293 la co-transfección del Sen2070 con un vector de expresión de Gli1 no generó un cambio significativo en su actividad, como control positivo se usó el plásmido 6bsSV40, el cual presentó una activación 8 veces superior en presencia de Gli1 que del plásmido vacío, nuevamente se confirmó que el fragmento 2070 en antisentido no presentara actividad (Fig. 11).

### VII.iv.iii. Actividad en presencia deFoxa2

También se probó si Foxa2/HNF3beta tenía la capacidad de activar a Sen2070, y se pudo observar que sí hay aumento en la actividad del reportero de luciferasa al cotransfectar con Foxa2 con respecto ala cotransfección con el vector vacío (Fig 12).

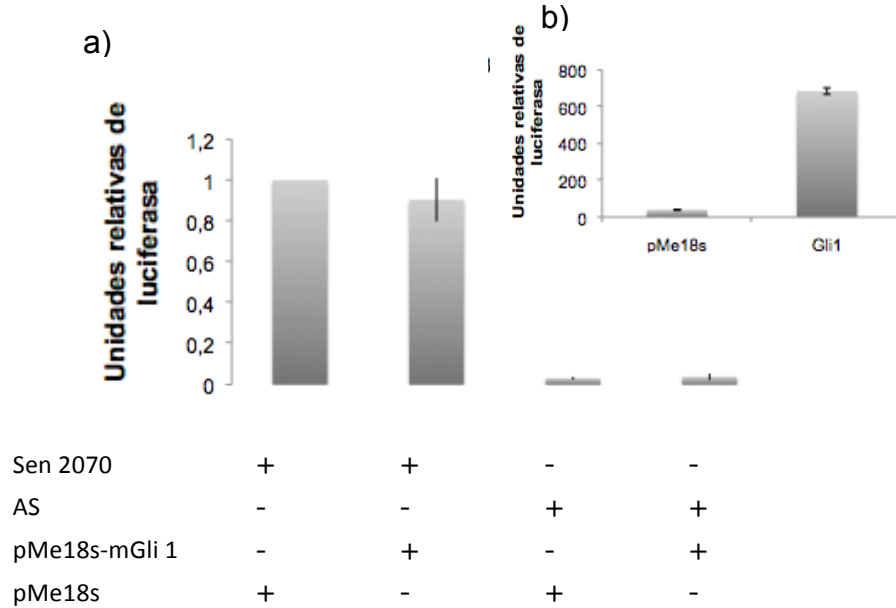


Fig. 11. a) En las células AD-293 la co-transfección del Sen2070 con un vector de expresión de Gli1 (pMe18s-mGli1) no genera un cambio significativo en su actividad (n=4). b) actividad del plásmido 6bsSV40 utilizado como control positivo de la activación de Gli. El pMe18s corresponde al vector vacío de Gli.

### Activación de Sen2070 por Foxa2

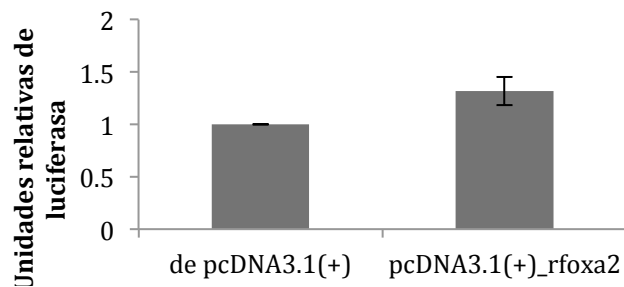


Fig. 12. La cotransfección de pcDNA3.1(+)\_rfoxa2, vector de expresión de Foxa2 con el plásmido Sen2070 genera una mayor actividad del reportero de luciferasa, indicando que Foxa2 lo estimula (n=4). P<0.05.

## **VIII. Discusión**

El análisis de un promotor es importante ya que permite conocer como es que se da la regulación de éste en un primer nivel, lo cual, permite indagar en que procesos y estructuras puede estar involucrado.

Como primera aproximación se indujeron células responsivas a SHH con el fragmento activador de la vía, y se analizó el transcrito para ver si esta vía era la responsable de la expresión de LPP3 en las regiones antes mencionadas. Se encontró que esta vía es capaz de inducir el aumento en la transcripción de LPP3 (Fig. 4), mediante el uso de RT-PCR semicuantitativa y se determinó que el transcrito de LPP3 aumentaba a las 48 hrs de tratamiento con SHH, este dato es similar a lo encontrado en células mesenquimales (Ingram et al., 2008).

Al analizar si a nivel proteína también se observaba algún aumento el resultado no fue el esperado (Fig. 5). Esto podría explicarse por una regulación diferencial de la expresión de la proteína a nivel de la traducción que la codifica o por degradación de la proteína (LPP3 no suele tener niveles elevados en las células 3T3), la vida media de ésta en la línea celular 3T3 y por el tiempo en que se realizaron los ensayos; por otro lado, existen indicios de que LPP3 está regulado por microRNAs como miRNA200-c (Park et al., 2008) y miR-184 (Malzkorn B et al., 2010). El que no hayamos encontrado diferencias a nivel de proteína no es indicativo de la falta de influencia de la vía de SHH sobre la regulación de la transcripción de *Ppap2b*.

Se decidió continuar entonces con el análisis del efecto de esta vía sobre el promotor de LPP3. Para poder analizar cómo es que la vía de SHH podría modificar los niveles del transcrito que codifica a LPP3 se decidió analizar su secuencia promotora. Debido a que existen múltiples formas de realizar los análisis de secuencia se decidió utilizar mas de un software para conocer las características de la región que podría estar regulando su expresión.

Inicialmente se buscaron las posibles regiones que podrían fungir como promotores para tener una mejor idea sobre que región era la mas pertinente a analizar, para esto se utilizó *RegionMiner*. La secuencia obtenida fue

subsecuentemente analizada con otros dos programas. Inicialmente se usó *e/Dorado*, para conocer qué regiones importantes tenía el promotor o el posible transcrito al que estaría dando lugar, en la Tabla 1 se puede observar que el transcrito cumple con las mismas características que *Ppap2b* en cuanto a cantidad de exones y que no es un sitio altamente conservado entre especies, excepto para ratón y rata.

Para poder conocer los posibles sitios de unión a factores de transcripción esta secuencia fue analizada con *MathInspector*. Este programa nos indicó que había 228 posibles sitios de unión a factores de transcripción. Después de esto se procedió a buscar si había sitios que pudieran corresponder a Gli o bien a Foxa2, así se descartó a la mayoría y se redujeron los datos a 3 sitios (Tabla 2).

La siguiente estrategia fue buscar la conservación de sitios entre especies, en este caso, la conservación de la región promotora no es muy alta entre la mayoría de las especies, por esto se decidió solamente analizar la conservación de la secuencia en ratón con la secuencia en rata que muestra tres sitios altamente conservados (Fig. 7). Al revisar los factores que existen en estos sitios se enfocó la atención a aquellos que podrían ser responsables de la activación por la vía de SHH, y se encontraron sitios para Gli y Foxa2 en la región conservada de 5765 pb, marcado como fragmento 3 en azul en la figura 7.

Por último se procedió a utilizar el programa *MatrixCatch* que coteja la secuencia del posible promotor con sitios que cooperativamente tienen actividad dados por datos experimentales. En este tipo de análisis solamente se encontraron 10 diferentes parejas con estas características, y notablemente se encontró que de estas 10 parejas cuatro involucran al sitio de unión para Foxa2 (HNF3 $\beta$ ) y tres de éstas son parejas de Foxa2-Foxa2; una de estas parejas se encuentra con un valor compuesto negativo, lo cual es indicativo de que el sitio podría ser funcional.

Dado que los distintos análisis se basan en parámetros diferentes, los resultados no fueron exactamente los mismos, sobre todo en el caso de los factores Gli. Sin embargo, uno de los sitios para Foxa2 fue localizado por los tres programas

*MathInspector*, *MatrixCatch* y *dCode*; otro de los sitios por *MatrixCatch* y *dCode* y un tercero solo por *MatrixCatch*.

Ya que los análisis *in silico* solo son una aproximación y no son concluyentes fué necesario analizar si estos sitios eran funcionales. Para esto se obtuvo una secuencia de 2070 pb con sitios de restricción KpnI para ser clonada en el plásmido pGL3 y así poder mediante el gen reportero de luciferasa identificar y comparar como son las propiedades activadoras de este fragmento (Fig. 9).

Lo primero a probar del fragmento clonado fue si tenía actividad promotora, para esto se utilizó un sistema *in vitro* donde se transfectaron células AD-293 y 3T3 con el plásmido Sen2070, y en ambas líneas celulares se observó que se estaba produciendo el reportero de Luciferasa (Fig. 10), mientras que el fragmento clonado en antisentido careció de actividad, lo cual indica que el fragmento Sen2070 tiene función promotora.

Se intentó inducir la actividad de Sen2070 con tratamiento con SHH sin embargo el análisis no fue posible debido a la baja eficiencia de transfección que presenta la línea celular 3T3 al 100% de confluencia, lo cual es necesario para la estimulación con SHH. Es por esto que se decidió implementar la estrategia de cotransfectar un vector de expresión de Gli1. Al realizar los ensayos no se observó que se modificara la actividad del reportero, se probó que la cotransfección y expresión de Gli1 estuviera siendo exitosa mediante la utilización de un control con 6 sitios de unión a Gli, que tuvo el aumento en la actividad esperada (Fig. 11).

Hay que recordar que los estudios *in silico* no son concluyentes, por lo que se realizaron los ensayos *in vitro* para poder corroborar experimentalmente si los datos de los análisis bioinformáticos son sitios reales de unión o no. Los datos obtenidos experimentalmente demuestran que el fragmento de 2070 pb no es activado por Gli, sin embargo, la activación por los factores Gli no puede ser descartada aun, ésta podría ocurrir dentro de otras zonas del promotor, hay que recordar que el fragmento fue sacado de su contexto genómico por lo que si existen sitios distales que pudieran funcionar como enhancers o LCRs, su



regulación se estaría perdiendo en la construcción Sen2070, aunque aun no se sabe si estos elementos son parte de la regulación de LPP3.

Por otra parte algunas regiones que normalmente no se encuentran expuestas debido a su estado de cromatina al estar integradas en el DNA en este caso podrían quedar totalmente accesibles al encontrarse en un plásmido, esto generaría que alguna región pudiera estar evitando la estimulación con Gli1, por lo que tomar regiones mas pequeñas donde este efecto quedara eliminado podría ser importante, tal como se ha hecho en otros estudios de promotores (Popovic et al., 2010).

Al no encontrar mediante los ensayos de cotransfección (Fig 11) que la activación del promotor fuera por Gli se decidió explorar alguna de las otras formas en las que la vía de SHH regula positivamente la transcripción de algunos genes, por esto fue que se utilizó a Foxa2, factor de transcripción que mediante un potenciador (enhancer) es blanco de factores Gli en el tubo neural (Sasaki et al., 1997).

Al cotransfectar con la construcción de expresión de Foxa2 se observó un aumento de la actividad transcripcional de la construcción reportera (Fig 12). Esto indica que el fragmento de 2070pb cuenta con sitios que responden al factor Foxa2. Este resultado abre la posibilidad de que en el caso de que *Ppap2b* no sea regulado por Gli, la vía de SHH esté regulando indirectamente a *Ppap2b* mediante la acción de Foxa2.

## **IX. Conclusiones**

El gen que codifica para la LPP3 se regula positivamente por la vía de SHH en células 3T3, estos datos sugieren que es por esta vía que LPP3 se está expresando en algunas regiones del embrión durante el desarrollo.

La región promotora del gen de LPP3 no está conservada entre especies con excepción de la rata y el ratón en donde tiene tres regiones altamente conservadas, mismas regiones que cuentan con múltiples sitios putativos de unión a factores de transcripción.

El fragmento de 2070 pb *in vitro* no se estimula por Gli, mientras que aumenta su actividad con Foxa2, por lo que la regulación de LPP3 por SHH podría ser mediante Foxa2.

## **X. Perspectivas**

Con los resultados obtenidos se tiene una primera aproximación a una de las formas en las que podría regularse la expresión de la LPP3 a nivel trascricional. Se sugieren ensayos de mutagénesis dirigida a los sitios probables de unión a Foxa2 para probar si estos sitios son los responsables del aumento en la actividad del promotor. Además podría analizarse por ensayos de retardo si en verdad a esta zona se une Foxa2.

Si se comprueba que Foxa2 está aumentando la actividad del promotor de *Ppap2b*, sería pertinente hacer un análisis *in situ*, que podría ser inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP) con un anticuerpo anti-Foxa2 en embriones de ratón de 10.5 días. De esta forma se podría probar que el aumento observado al cotransfectar con Foxa2 es algo que puede estar ocurriendo *in vivo*. Posteriormente sería pertinente generar un ratón mediante el método “hit & run” con mutaciones puntuales en los sitios de unión a Foxa2 en el promotor de *Ppap2b*, con este ratón sería posible analizar en que sitios la expresión de LPP3 es dependiente de Foxa2, además se podría analizar el fenotipo para saber que

tan importante es la expresión de LPP3 mediada por Foxa2 en el desarrollo embrionario.

Aún hace falta mucho por analizar en el promotor de LPP; para saber que tanto de la regulación de LPP3 está contenida en la secuencia del Bac y si hay regulación de *Ppap2b* desde regiones distales, en regiones intrónicas o en el extremo 3' podemos analizar la secuencia del Bac y mediante recombinación insertar un gen reportero como GFP o LacZ al Bac que contiene a *Ppap2b* y mediante éste generar líneas transientes transgénicas de ratones y así comparar el patrón de este reportero con el patrón ya observado en el ratón *Ppap2b*<sup>lacZ</sup> (Escalante-Alcalde et al., 2009). O bien se pueden analizar otros fragmentos del promotor para buscar la regulación a la que otras zonas del promotor pueden estar sujetas. Con los datos obtenidos de los distintos análisis de la secuencia Sen2070 es posible analizar qué otros factores podrían estar regulando a LPP3 y así se podrían estudiar vías concretas, ya que por el patrón observado se espera que su regulación sea muy específica.

Sería interesante analizar la regulación que tiene en el ciclo celular y en procesos de supervivencia/muerte celular, esto debido a que existen indicios de que LPP3 está involucrada en procesos tumorales y que su expresión o falta de expresión correlaciona con la agresividad de distintas líneas de cáncer de pulmón (Ariadna Aparicio, comunicación verbal). Por otra parte, la influencia que tiene en el desarrollo neuro-glial también podría ser analizado tomando como base el estudio de la secuencia de este trabajo. Además se puede utilizar la construcción Sen2070 para ver qué otras vías modulan su actividad.

## Apéndice 1:

### Soluciones

#### Méδιο de cultivo DMEM 10% SFB (500ml)

- DMEM Gibcoaltaglucosa sin glutamina (Cat. No. 10313-039) 450 ml
- Glutamina 200mM (100X) 5 ml
- Beta-mercaptoetanol 100mM (1000X) 0.5 ml
- Penicilina-estreptomicina (100X) 5 ml
- Suero fetal bovino 50 ml
- Piruvato de Na 5 ml
- MEM (100X) 5 ml

#### PBS 10X pH 7.2 (1 l)

- NaCl 80 g
- KCl 2 g
- Na<sub>2</sub> HPO<sub>4</sub> 14.4 g
- KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2.4 g

#### Buffer de corrida 5X

- Tris base 15.1 g
- Glicina 72 g
- SDS 5 g
- Agua c.b.p. 1 L

Buffer de transferencia (1 L)

- Tris base 5.8 g
- Glicina 2.9 g
- SDS 0.37 g
- Metanol 200 ml

TBS-tween 0.1% pH 7.6

- Trizma base 2.42 g
- NaCl 8 g
- Agua c.b.p. 1 L

Buffer de desnudado (10 ml)

- Tris Cl pH 6.7 0.5M 1.250 ml
- SDS 10% 2 ml
- $\beta$ -mercaptoetanol 68  $\mu$ l
- Agua 6.682 ml

## Apéndice 2:

### **MathInspector**

Potenciales sitios de unión para factores de transcripción del promotor identificado por RegionMiner, continuación de Tabla 2.

Familia	Matriz	Inicio	Fin	Hebra	Similitud	Secuencia
V\$STAF	V\$STAF.01	10	32	-	0.771	ttaaCCCAcactcctctcctttt
V\$HNF1	V\$HNF1.04	20	36	+	0.85	gagtgtggGTTAatagc
V\$HOMF	V\$HHEX.01	19	37	+	0.96	ggagtgtgggtTAATagct
V\$HOXF	V\$HOXB8.01	22	40	-	0.863	ctcagctATTAaccacac
V\$HOMF	V\$HMX1.01	23	41	+	0.866	tgtgggtTAATagctgagc
V\$NKX6	V\$NKX61.01	25	39	+	0.923	tgggTTAAtagctga
V\$HNF1	V\$HNF1.01	27	43	+	0.836	gGTTAatagctgagcag
V\$EVI1	V\$MEL1.02	38	54	+	0.995	gagcagtGATGagcatg
V\$P53F	V\$P53.02	36	58	+	0.956	ctgagcagtgatgagCATGtccc
V\$SRFF	V\$SRF.03	53	71	+	0.808	tgtccctctGTGGaattt
V\$STAT	V\$STAT6.01	54	72	-	0.896	taaaTTCCacagaaggac
V\$STAT	V\$STAT6.01	55	73	+	0.844	tcccTTCTgtggaatttat
V\$TEAF	V\$TEF1.01	61	73	-	0.84	ataAATTccacag
V\$HMTB	V\$MTBF.01	64	72	+	0.933	tggaATTTa
V\$HBOX	V\$EN1.01	61	79	+	0.793	ctgtggaaTTTAtctgcc
V\$GATA	V\$GATA1.03	66	78	-	0.977	ggcaGATAaattc
V\$CREB	V\$XBP1.01	75	95	-	0.906	caaggcctACGTgtcatggca
V\$HIFF	V\$HIF1.02	78	94	-	0.955	aaggcctaCGTGtcatg
V\$BRAC	V\$BRACH.01	79	99	+	0.665	atgacacgtAGGCcttgagaa
V\$CEBP	V\$CEBPA.01	89	103	+	0.948	ggcctgaGAAAagt
V\$KLFS	V\$GKLF.01	95	111	+	0.918	gagaaaagtAGGGtttg
V\$IRFF	V\$IRF3.01	102	122	-	0.857	ctacgaaagaGCAAaccctac
V\$P53F	V\$P53.03	114	136	+	0.952	ctttcgtagcccaggCAAGtcat
V\$XBBF	V\$XBOX.01	116	134	-	0.906	gacttGCCTgggctacgaa
V\$XBBF	V\$XBOX.01	117	135	+	0.941	tcgtaGCCCaggcaagtca
V\$CEBP	V\$CEBP.02	133	147	-	0.925	aaactgagGCAAatga
V\$PRDF	V\$BLIMP1.01	136	154	-	0.843	gagaggGAAActgaggcaa
V\$IRFF	V\$IRF2.01	138	158	-	0.863	tgacagagaggGAAActgaggc

V\$STAF	V\$STAF.01	144	166	+	0.772	gtttCCCTctctgcaccgtgatt
V\$ETSF	V\$ETS2.01	156	176	-	0.846	gtcatACAGGAatcacgggtgc
V\$MYBL	V\$CMYB.02	178	190	-	0.964	ttTAACTggcgga
V\$HNF1	V\$HNF1.04	177	193	+	0.853	ctccgcccaGTTAaaaag
V\$GFI1	V\$GFI1.02	190	204	-	0.904	ccgAATCtcagcttt
V\$MYBL	V\$CMYB.01	214	226	+	0.992	gcCAACcgtctgt
V\$E2FF	V\$E2F.02	224	240	-	0.91	aacaggcgaCAAAcaca
V\$STAT	V\$STAT3.02	235	253	+	0.943	cctgTTCctgggccacact
V\$XBBF	V\$MIF1.01	235	253	+	0.864	cctgttctctggGCCAact
V\$XBBF	V\$RFX1.01	235	253	-	0.945	agtggtggcccaGGAacagg tcagtaaatgcctagtgtggcccaggaaca
O\$TF2D	O\$INR_DPE.01	228	266	-	0.71	GGCGacaaa
V\$CP2F	V\$CP2.02	240	258	+	0.84	tCCTGggccacactaggca
V\$EBOX	V\$ATF6.01	244	256	+	0.932	gggCCACactagg
V\$SRFF	V\$SRF.02	243	261	+	0.854	tgggcCACActaggcattt
V\$CAAT	V\$NFY.02	273	287	-	0.834	ggcgCGAAtcagaga
V\$E2FF	V\$E2F.03	275	291	-	0.887	ctaggGCGCgaatcaga
V\$E2FF	V\$RB_E2F1_DP1.01	278	294	+	0.741	gattcGCGCcttaggtg
V\$GREF	V\$ARE.03	282	300	+	0.923	cgcgccctagggtGTTcttc
V\$GREF	V\$ARE.02	291	309	+	0.904	ggtgttctctgtGTCCgac
V\$P53F	V\$P53.05	311	333	+	0.834	tcttCAAGactaagacgagcctc
V\$SP1F	V\$SP1.01	335	349	-	0.966	cagGGGCgggcagtg
V\$KLFS	V\$KLF6.01	335	351	-	0.95	cgcaGGGGcgggcagtg
V\$ZBPF	V\$ZF9.01	334	356	+	0.898	tcactgcCCGCccctgcatcag
O\$MTEN	O\$DMTE.01	340	360	-	0.809	cctcctgATCGcagggggcggg
V\$ETSF	V\$ETS2.01	355	375	-	0.847	gggagacAGGAtctccctct
V\$CREB	V\$CREB.03	371	391	-	0.893	tgctgaTGATgtccacgggag
V\$PBXC	V\$PBX1_MEIS1.03	379	395	+	0.785	gacatcatCGACaggaa
V\$HEAT	V\$HSF2.01	380	404	+	0.899	acatcatcgacagGAACaatcacca
V\$HOXC	V\$PBX1.01	389	405	-	0.788	atggtGATTgttctctgt
V\$SORY	V\$SOX5.01	388	410	+	0.978	gacaggaaCAATcaccataacat
V\$OCT1	V\$OCT1.06	392	408	-	0.853	gttatggtGATTgttcc
V\$YY1F	V\$YY1.02	397	417	-	0.948	ctacaCCATgttatggtgatt
V\$STAT	V\$STAT5.01	434	452	-	0.938	tcgcTTCAGagaaagcgct
V\$STAT	V\$STAT5.01	436	454	+	0.926	cgctTTCtctgaagcgact
V\$HIFF	V\$HRE.01	451	467	-	0.934	agcaggaaCGTGcagtc
V\$EVI1	V\$EVI1.04	469	485	-	0.746	ctgatgagatcgGAGAg

V\$CLOX	V\$CPHX.01	472	490	-	0.847	actgtcTGATgagatcgga
V\$EVI1	V\$MEL1.02	474	490	-	0.995	actgtctGATGagatcg
V\$PCBE	V\$PREB.01	477	491	+	0.894	tctcaTCAGacagta
V\$TEAF	V\$TEF1.01	487	499	-	0.885	ctaCATTctactg
V\$IKRS	V\$IK3.01	495	507	+	0.843	tgtagGGAAaagc
V\$PERO	V\$PPARG.02	491	513	+	0.883	agaatgtagggaAAAGcttttgc
V\$NFAT	V\$NFAT5.01	497	515	+	0.841	tagGGAaagcttttgcc
V\$NR2F	V\$HNF4.02	497	521	-	0.771	tccatcgggcaAAAGctttcccta
V\$CLOX	V\$CLOX.01	508	526	-	0.812	caaaATCCatcgggcaaaa
V\$HOXC	V\$HOX_PBX.01	511	527	+	0.825	tgccCGATggatttga
V\$HNF6	V\$HNF6.01	513	529	-	0.864	ttcaaaaTCCAtcggg
V\$CEBP	V\$CEBPB.01	518	532	+	0.949	tgattttGAAAaca
V\$HOMF	V\$HMX2.02	520	538	+	0.84	gatttgaAAACatttaa
V\$HOMF	V\$HMX2.03	525	543	-	0.865	ttttTTAAatgtttca
V\$NKX6	V\$NKX61.02	527	541	-	0.902	tttTTAAatgttt
V\$HBOX	V\$EN1.01	528	546	-	0.772	ttttttTTAAatgttt
V\$GATA	V\$GATA1.06	552	564	-	0.99	acaGATAaggct
V\$EVI1	V\$EVI1.06	551	567	-	1	gccacaAGATaaggctt
V\$SRFF	V\$SRF.04	566	584	-	0.87	acaacctatTTTGgaaggc
V\$SRFF	V\$SRF.02	567	585	+	0.858	ccttcAAAataggtgtt
V\$FKHD	V\$HNF3.01	577	593	-	0.999	cacagcCAACaaccta
V\$DICE	V\$DICE.01	590	604	-	0.932	tggtGTCTccacaca
O\$XCPE	O\$XCPE1.01	605	615	+	0.825	gtGCGGgagtc cagccaGCACtcaggactcccgcactgtt
V\$NRSF	V\$NRSF.02	599	629	-	0.721	gt
V\$AP1R	V\$MARE.02	616	636	-	0.892	ggcTGCAcagccagcactcag
V\$AP1R	V\$MAFA.01	618	638	+	0.951	gagTGCTggctgtgcagccag
V\$RBP2	V\$PLU1_JARID1B.01	624	632	-	0.966	GCACagcca
V\$CAAT	V\$CAAT.01	631	645	+	0.907	gcagCCAGttaagtg
V\$HNF1	V\$HNF1.04	630	646	+	0.858	tgagccaGTTAagtgt
V\$HOMF	V\$HMX3.02	629	647	+	0.968	gtgcagccagTTAagtgtt
V\$OVOL	V\$OVOL1.01	632	646	+	0.809	cagccaGTTAagtgt
V\$HOMF	V\$HMX2.03	633	651	+	0.862	agccagTTAagtgtcatg
V\$PAX6	V\$PAX6.03	633	651	-	0.821	catgaACACttaactggct
V\$HOMF	V\$HMX3.02	634	652	-	0.974	acatgaacacTTAactggc
V\$PAX8	V\$PAX8.01	636	650	+	0.915	cagTTAagtgtcat
V\$NKXH	V\$NKX32.01	635	653	+	0.966	ccagttaAGTGttcatgtt



V\$GREF	V\$PRE.01	639	657	+	0.845	ttaagttcaTGTtctag
V\$HNF1	V\$HMBOX.01	649	665	+	0.835	atgttctaGTGAgcacg
V\$BRNF	V\$BRN4.01	682	700	+	0.91	aaactagaaTAATtgag
V\$HBOX	V\$GSH1.01	683	701	+	0.893	aactagaaTAATtgagc
V\$DLXF	V\$DLX1.01	684	702	+	0.934	aactagaatAATTgagca
V\$HOMF	V\$BARX2.01	686	704	+	0.962	actagaaTAATtgagcaga
V\$BCDF	V\$PCE1.01	688	704	+	0.926	tagaaTAATtgagcaga
V\$BRNF	V\$BRN3.01	687	705	-	0.815	ctctgctcaATTAttctag
V\$HBOX	V\$MEOX1.01	687	705	+	0.856	ctagaatAATTgagcagag
V\$ZFTR	V\$ZNF217.01	690	702	+	0.904	GAATaattgagca
V\$HOXF	V\$HOX1-3.01	688	706	+	0.907	tagaaTAATtgagcagagg
V\$NKXH	V\$NKX25.02	688	706	+	0.883	tagaaTAATtgagcagagg
V\$CART	V\$S8.01	688	708	+	1	tagaaTAATtgagcagaggct
V\$DLXF	V\$DLX2.01	689	707	-	0.929	gcctctgctcAATTattct
V\$EVI1	V\$EVI1.07	708	724	-	0.955	cacaaAAGAtgacccca
V\$RXRF	V\$PXR_RXR.01	709	733	-	0.837	ttctcgGGTCacaaaagatgacccc
V\$NFKB	V\$NFKAPPAB.02	728	740	-	0.832	ctGGGAttctcg
V\$GFI1	V\$GFI1.01	730	744	+	0.979	agaAATCccaggcca
V\$PAX6	V\$PAX6.02	728	746	+	0.895	cgagaaatCCAGgccaga
V\$ZFX	V\$ZFX.01	735	745	-	0.977	ctGGCCtgggga
V\$AP4R	V\$AP4.02	742	758	-	0.922	agctccAGCTgttctgg
V\$MYOD	V\$MYOGENIN.01	742	758	+	0.922	ccagaACAGctggagct
V\$RP58	V\$RP58.01	744	756	+	0.879	agaaCAGCtggag
V\$GREF	V\$GRE.02	742	760	+	0.84	ccaGAACagctggagctct
V\$GREF	V\$PRE.01	742	760	-	0.932	agagctccagcTGTtctgg
V\$MYOD	V\$MYOGENIN.02	743	759	-	0.971	gagctcCAGCtgttctg
V\$HOMF	V\$HMX2.01	750	768	+	0.834	gctggagctCTTAtgtagc
O\$VTBP	O\$ATATA.01	753	769	-	0.794	tgctacaTAAGagctcc
V\$GREF	V\$ARE.02	764	782	-	0.915	ttcgagccttgtGTGctac
V\$GREF	V\$GRE.02	764	782	+	0.831	gtaGCACacaaggctcgaa
V\$OAZF	V\$ROAZ.01	765	781	+	0.759	taGCACacaaggctcga
O\$TF3C	O\$TFIIC.01	774	784	-	0.959	GGTTCgagcct
V\$CP2F	V\$CP2.01	770	788	-	0.99	tgCTGGttcgagccttgtg
V\$MOKF	V\$MOK2.02	769	789	-	0.991	gtgctggttcgagCCTTgtgt
V\$P53F	V\$P53.05	768	790	+	0.845	cacaCAAGgctcgaaccagcacc
V\$CAAT	V\$NFY.03	786	800	+	0.825	gcacCGAAtcagccc
V\$MOKF	V\$MOK2.01	787	807	+	0.744	caccgaatcagccCCTCtgcc

V\$PLAG	V\$PLAG1.01	793	813	-	0.907	GGGGcgggcagaggggctgat
V\$SP1F	V\$SP1.01	801	815	-	0.955	gtgGGGCgggcagag
V\$GFI1	V\$GFI1.02	822	836	-	0.901	ttgAATCaaagtcac
V\$LEFF	V\$LEF1.02	821	837	-	0.968	cttgaatCAAAGtcaca
V\$BCL6	V\$BCL6.01	827	843	-	0.812	aacTTCCttgaatcaaa
V\$STAT	V\$STAT5.01	826	844	-	0.917	aaacTTCCttgaatcaaa
V\$STAT	V\$STAT.01	828	846	+	0.928	ttgattcaaGGAAGttgt
V\$ETSF	V\$PEA3.01	829	849	+	0.956	tgattcaAGGAagttgtgtg
V\$MYT1	V\$MYT1.02	836	848	+	0.886	aggAAGTttgtgt
V\$CREB	V\$TAXCREB.02	856	876	-	0.722	gaatttTGAGgcacacacaca
V\$HMTB	V\$MTBF.01	870	878	-	0.902	cggaATTTt
V\$ETSF	V\$ELK1.02	865	885	-	0.945	ccattcccGGAAtttgaggc
V\$HEAT	V\$HSF1.01	865	889	-	0.845	gtgcccattcccGGAAtttgaggc
V\$STAT	V\$STAT3.02	868	886	-	0.97	cccaTTCCcggaatttga
V\$BCL6	V\$BCL6.01	871	887	+	0.816	aaaTTCCgggaatgggc
V\$E2FF	V\$E2F4_DP2.01	871	887	+	0.836	aaattCCGggaatgggc
V\$HEAT	V\$HSF1.03	867	891	+	0.764	ctcaaaattccgGGAAtgggcacac
V\$STAT	V\$STAT.01	870	888	+	1	aaaattccgGGAAtgggca
V\$TEAF	V\$TEAD.01	875	887	-	0.904	gccCATTcccga
V\$HOXF	V\$NANOG.01	874	892	+	0.967	ttccgggAATGggcacaca
V\$DMRT	V\$DMRT1.01	886	906	-	0.774	cgggactgaaaaTTGTgtgc
O\$INRE	O\$DINR.01	896	906	+	0.963	ttTCAGtcccg
V\$EBOX	V\$USF.03	899	911	+	0.903	cagtccCGTGatc
V\$HESF	V\$HELT.01	898	912	-	0.914	tgatCACGggactga gattCAGGatctgatcacgggactgaaa
V\$NRSF	V\$NRSF.03	893	923	-	0.701	aat
V\$PDX1	V\$PDX1.01	903	921	-	0.784	ttcaggatcTGATcacggg
V\$RREB	V\$RREB1.01	922	936	+	0.804	tCCAaccccccaaga
V\$ZF35	V\$ZNF35.01	927	939	+	0.962	acccccAAGAcct
V\$NR2F	V\$TR2_TR4.01	928	952	-	0.779	tgacagaggcctcaGGTCttggggg
V\$RXRF	V\$RAR_RXR.01	930	954	-	0.815	gatgacagaggcctcAGGTcttggg
V\$KLFS	V\$KKLF.01	950	966	-	0.934	tggggatGGGgagatga
V\$AP2F	V\$AP2.01	958	972	-	0.952	ttaGCCTggggatgg
V\$HAML	V\$AML1.01	969	983	-	0.961	ggctGTGGttgttag
V\$KLFS	V\$KLF6.01	973	989	-	0.933	gtgaGGGctgtgggtg
V\$KLFS	V\$GKLF.01	978	994	-	0.864	taaaagtgaGGGctgt
O\$VTBP	O\$VTATA.02	983	999	-	0.907	atctcTAAAgtagggg

V\$BCDF	V\$PTX1.01	990	1006	-	0.945	tctcCTAAtctctaaaa
V\$SNAP	V\$PSE.01	989	1007	-	0.778	gTCTCctaatctctaaaag
V\$KLFS	V\$EKLF.01	1000	1016	-	0.911	ccacaaaGGGTctccta
V\$SORY	V\$SOX9.02	999	1021	-	0.956	ctctccACAAagggtctcctaa
V\$SRFF	V\$SRF.02	1002	1020	-	0.855	tcttcACAaagggtctcc
V\$CEBP	V\$CEBPA.01	1007	1021	+	0.961	ccctttgtGGAagag
V\$MYT1	V\$MYT1.01	1016	1028	+	0.775	gaaGAGTgaactt
V\$MYT1	V\$MYT1.01	1019	1031	-	0.799	gtgAAGTcactc
V\$MEF2	V\$MEF2.06	1021	1043	+	0.874	gtgaacttcacAAATagcacaag
V\$HMTB	V\$MTBF.01	1031	1039	-	0.953	tgctATTTg
V\$RUSH	V\$SMARCA3.02	1038	1048	-	0.986	ctgaACTTgtg
V\$RXRF	V\$LXRE.02	1034	1058	+	0.691	atagcaciaGTTcagaagacacaga
V\$KLFS	V\$EKLF.01	1052	1068	+	0.956	acacagaGGGTgtcttc
V\$SORY	V\$SOX9.03	1052	1074	-	0.847	gtgtgagaagacaccctCTGTgt
V\$EVI1	V\$EVI1.02	1056	1072	-	0.838	gtgagAAGAcaccctct
V\$AHRR	V\$AHR.01	1062	1086	-	0.788	tcacagtgtgGTGTgtgagaagaca
V\$SP1F	V\$TIEG.01	1067	1081	-	0.879	gtGTGGgtgtgaga
V\$HAML	V\$AML3.01	1069	1083	-	0.852	cagtGTGGgtgtgaga
V\$PAX3	V\$PAX3.01	1072	1090	-	0.873	cTCGTcacagtgtgtgtg
V\$DMRT	V\$DMRT5.01	1074	1094	-	0.828	gttcctcGTCAcagtgtgtg
V\$CREB	V\$ATF.01	1078	1098	+	0.924	acactgTGACgaggaactgcc
V\$ETSF	V\$SPI1_PU1.02	1082	1102	+	0.965	tgtgacgaGGAActgccattg
V\$NFKB	V\$NFKAPPAB65.01	1089	1101	-	0.87	aatggcagTTCCt
V\$PAX6	V\$PAX6.03	1095	1113	-	0.798	gattgACCCtgaatggca
V\$AP1R	V\$TCF11MAFG.01	1096	1116	-	0.834	ggtgatTGACcctgcaatggc
V\$HOXC	V\$PBX1.01	1102	1118	-	0.823	ctggtGATTgaccctgc
V\$PBXC	V\$PBX1_MEIS1.02	1102	1118	-	0.865	ctggTGATgaccctgc
V\$FXRE	V\$FXRE.01	1105	1117	+	0.88	GGGTcaatcacca
V\$FXRE	V\$FXRE.01	1105	1117	-	0.863	TGGTgattgacct
V\$CLOX	V\$CDP.02	1103	1121	+	0.955	cagggtCAATcaccaggca
V\$HOMF	V\$HMX3.01	1114	1132	-	0.89	acatgtgcAAGTgcctggt
V\$IRXF	V\$IRX5.01	1123	1135	-	0.946	tctaCATGtgca
V\$PAX2	V\$PAX2.01	1118	1140	+	0.782	ggcactgcacatgtagAAACct
V\$GZF1	V\$GZF1.01	1124	1136	+	0.759	TGCACatgtagaa
V\$IRXF	V\$IRX5.01	1124	1136	+	0.944	tgcaCATGtagaa
V\$GRHL	V\$GRHL1.01	1133	1145	-	0.883	tctacaGGTTtct
V\$BTBF	V\$KAISO.01	1151	1161	+	0.927	gttaCTGctat

V\$HNF1	V\$HNF1.03	1150	1166	+	0.809	gGTTActgctatattcc
V\$ZF35	V\$ZNF35.01	1158	1170	-	0.961	aaggggAATAtag
V\$MZF1	V\$MZF1.02	1160	1170	-	1	aaGGGaatat
V\$MOKF	V\$MOK2.01	1163	1183	+	0.758	ttccccttgagatCCTTgctg
V\$MITF	V\$MIT.01	1196	1210	+	0.938	gatttCATGtgaggg
V\$SNAP	V\$PSE.01	1196	1214	-	0.78	cTGGCcctcacatgaaatc
V\$PAX6	V\$PAX6.02	1202	1220	+	0.886	atgtgagggCCAGggatgc
V\$CP2F	V\$CP2.02	1208	1226	-	0.862	gTCTGtgcatccctggccc
V\$OCT1	V\$OCT3_4.02	1209	1225	-	0.89	tctgtGCATccctggcc
V\$RBP2	V\$PLU1_JARID1B.01	1219	1227	+	0.972	GCACagacc

## **Bibliografia**

Agren, Marie, Priit Kogerman, Marika I Kleman, Martina Wessling, and Rune Toftgård, 2004. Expression of the PTCH1 tumor suppressor gene is regulated by alternative promoters and a single functional Gli-binding site. *Gene* 330: 101-114.

Alberts, Bruce, Alexander Johnson, Julian Lewis, Martin Raff, Keith Roberts, and Peter Walter, 2002. *Molecular Biology of the cell*. 4th ed. New York: Garland Science.

Andresen, B., 2002. The role of phosphatidic acid in the regulation of the Ras/MEK/Erk signaling cascade. *FEBS Letters*, 531(1), 65-68.

Asplund, A., M. Gry Björklund, C. Sundquist, S. Strömberg, K. Edlund, A. Östman, P. Nilsson, F. Pontén, and J. Lundeberg. 2008. Expression profiling of microdissected cell populations selected from basal cells in normal epidermis and basal cell carcinoma. *British Journal of Dermatology*, 158(3), 527-538.

Barilà, D, M Plateroti, F Nobili, Ao Muda, Y Xie, T Morimoto, and G Perozzi., 1996. The Dri 42 gene, whose expression is up-regulated during epithelial differentiation, encodes a novel endoplasmic reticulum resident transmembrane protein. *The Journal of Biological Chemistry*, 271(47), 29928-29936.

Baumruker, T., Bornencin, F. and Billich, A., 2005. The role of sphingosine and ceramide kinases in inflammatory responses. *Immunology Letters*, 96(2), 175-185.

Brindley, D., 2002. Lipid phosphate phosphatases regulate signal transduction through glycerolipids and sphingolipids. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1582(1-3), 33-44.

Brindley, D.N., 2004. Lipid phosphate phosphatases and related proteins: signaling functions in development, cell division, and cancer. *Journal of Cellular Biochemistry*, 92(5), 900-12.

Chalfant, C.E. and Spiegel, S., 2005. Sphingosine 1-phosphate and ceramide 1-phosphate: expanding roles in cell signaling. *Journal of Cell Science*, 118-120, 4605-4612.

Choi, Ji Woong, Deron R. Herr, Kyoko Noguchi, Yun C. Yung, Chang Wook Lee, Tetsuji Mutoh, Mu En Lin, et al., 2010. LPA Receptors: Subtypes and Biological Actions. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 50(1), 157-186.

Contos, James J. A., Isao Ishii, Nobuyuki Fukushima, Marcy A. Kingsbury, Xiaoqin Ye, Shuji Kawamura, Joan Heller Brown, and Jerold Chun, 2002. Characterization of Ipa2 (Edg4) and Ipa1/Ipa2 (Edg2/Edg4) Lysophosphatidic Acid Receptor Knockout Mice: Signaling Deficits without Obvious Phenotypic Abnormality Attributable to Ipa2. *Molecular. Cell. Biology*, 22(19), 6921-6929.

Cross, M., 1996. Stimulation of actin stress fibre formation mediated by activation of phospholipase D. *Current Biology*, 6(5), 588-597.

Escalante-Alcalde, D., Hernandez, L., Le Stunff, H., Maeda R., Lee H-S S., Jr-Gang-Cheng, Sciorra, V. A., Daar I., Spiegel, S., Morris, A. J., Stewart, C. L., 2003. The lipid phosphatase LPP3 regulates extra-embryonic vasculogenesis and axis patterning. *Development*, 130(19), 4623-4637.

Escalante-Alcalde, D., Morales, S.L. and Stewart, C.L., 2009. Generation of a reporter-null allele of Ppap2b/Lpp3 and its expression during embryogenesis. *The International Journal of Developmental Biology*, 53(1), 139-147.

Fuccillo, M., Joyner, A.L. and Fishell, G., 2006. Morphogen to mitogen: the multiple roles of hedgehog signalling in vertebrate neural development. *Nature Reviews. Neuroscience*, 7(10), 772-783.

Gilbert, S.F., 2003. *Developmental Biology* 7 ed. Sinauer Associates

Gómez-Muñoz, A., 2006. Ceramide 1-phosphate/ceramide, a switch between life and death. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1758(12), 2049-2056.

Hahn, S., 2004. Structure and mechanism of the RNA polymerase II transcription machinery. *Nature Structural & Molecular Biology*, 11(5), 394-403.

Hait, Nitai C, Jeremy Allegood, Michael Maceyka, Graham M Strub, Kuzhuvilil B Harikumar, Sandeep K Singh, Cheng Luo, et al., 2009. Regulation of histone acetylation in the nucleus by sphingosine-1-phosphate. *Science (New York, N.Y.)*, 325(5945), 1254-1257.

Hooks, Shelley B., Webster L. Santos, Dong-Soon Im, Christopher E. Heise, Timothy L. Macdonald, and Kevin R. Lynch, 2001. Lysophosphatidic Acid-induced Mitogenesis Is Regulated by Lipid Phosphate Phosphatases and Is Edg-receptor Independent. *Journal of Biological Chemistry*, 276(7), 4611-4621.

Hsu, Jer-Yuan Y, Tamar Juven-Gershon, Michael T Marr, Kevin J Wright, Robert Tjian, and James T Kadonaga. 2008. TBP, Mot1, and NC2 establish a regulatory circuit that controls DPE-dependent versus TATA-dependent transcription. *Genes & Development*, 22(17), 2353-2358.

Humtsoe, J.O., R.A. Bowling Jr., S. Feng, and K.K. Wary. 2005. Murine lipid phosphate phosphohydrolase-3 acts as a cell-associated integrin ligand. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 335, no. 3: 906-919.

Humtsoe, Joseph O, Shu Feng, Geeta D Thakker, Jun Yang, Jun Hong, and Kishore K Wary. 2003. Regulation of cell-cell interactions by phosphatidic acid phosphatase 2b/VCIP. *The EMBO Journal* 22, no. 7: 1539-1554.

Ishida, T, A Iwai, M Hijikata, and K Shimotohno. 2007. The expression of phosphatidic acid phosphatase 2a, which hydrolyzes lipids to generate diacylglycerol, is regulated by p73, a member of the p53 family. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 353, no. 1: 74-79.

Ingram, W. J., McCue, K. I., Tran, T. H., Hallahan, a. R., and Wainwright, B. J. 2008. Sonic Hedgehog regulates Hes1 through a novel mechanism that is independent of canonical Notch pathway signalling. *Oncogene*, 27(10), 1489-1500.

Jackson, A., Vayssière, B., Garcia, T., Newell, W., Baron, R., Roman-Roman, S., et al., 2005. Gene array analysis of Wnt-regulated genes in C3H10T1/2 cells. *Bone*, 36(4), 585-598.

Jenkins, D., 2009. Hedgehog signalling: emerging evidence for non-canonical pathways. , *Cellular Signalling* 21(7), 1023-1034.

Juven-Gershon, T. and Kadonaga, J.T., 2010. Regulation of gene expression via the core promoter and the basal transcriptional machinery. *Developmental Biology*, 339(2), 225-229.

Kai, Masahiro, Fumio Sakane, Yan-Jun Jia, Shin-Ichi Imai, Satoshi Yasuda, and Hideo Kanoh, 2006. Lipid phosphate phosphatases 1 and 3 are localized in distinct lipid rafts. *Journal of Biochemistry*, 140(5), 677-686.

Katoh, Y. and Katoh, M., 2008. Hedgehog signaling, epithelial-to-mesenchymal transition and miRNA (review). *International Journal of Molecular Medicine*, 22(3), 271-275.

Kawaji, H., Frith, M., Katayama, S., Sandelin, A., Kai, C., Kawai, J., et al., 2006. Dynamic usage of transcription start sites within core promoters. *Genome Biology*, 7(12).

Lai, E, Vr Prezioso, Wf Tao, Ws Chen, and Je Darnell, 1991. Hepatocyte nuclear factor 3 alpha belongs to a gene family in mammals that is homologous to the Drosophila homeotic gene fork head. *Genes &Development*, 5(3), 416-427.

Lodish, Harvey;, Arnold; Berk, S. Lawrence; Zipursky, Paul; Matsudaira, David; Baltimore, and James E. Darnell., 1999. *Molecular Cell Biology* 4th., New York: W. H. Freeman.

Long, Jaclyn, Peter Darroch, Kah Fei Wan, Kok Choi Kong, Nicholas Ktistakis, Nigel J Pyne, and Susan Pyne, 2005. Regulation of cell survival by lipid phosphate phosphatases involves the modulation of intracellular phosphatidic acid and sphingosine 1-phosphate pools. *The Biochemical Journal*, 391(1), 25-32.

Long, J.S., Pyne, N.J. and Pyne, S., 2008. Lipid phosphate phosphatases form homo- and hetero-oligomers: catalytic and competency, subcellular distribution function. *The Biochemical Journal*, 411 (2).

Magder, S, Neculcea, J., Neculcea, V., Sladek, R., 2006. Lipopolysaccharide and TNF-alpha produce very similar changes in gene expression in human endothelial cells. *Journal of vascular research* 43(5), 447-461.

Malzkorn, B., M. Wolter, F. Liesenberg, M. Grzendowski, K. Stühler, H. E. Meyer, and G. Reifenberger, 2010. Identification and Functional Characterization of microRNAs Involved in the Malignant Progression of Gliomas. *Brain Pathology*, 20(3), 539-550

Maston, G.A., Evans, S.K. and Green, M.R., 2006. Transcriptional regulatory elements in the human genome. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, 7, 29-59.

McMahon, A., 2000. More Surprises in the Hedgehog Signaling Pathway. *Cell*, 100(2), 185-188.

McPhail, L.C., Qualliotine-Mann, D. and Waite, K.A., 1995. Cell-free activation of neutrophil NADPH oxidase by a phosphatidic acid-regulated protein kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(17), 7931-7935.

Mcdermott, M, Y Sigal, J Crump, and A Morris, 2006. Enzymatic analysis of lipid phosphate phosphatases. *Methods*, 39(2), 169-179.

Morris, K., Schang, L. and Brindley, D., 2006. Lipid phosphate phosphatase-2 activity regulates S-phase entry of the cell cycle in Rat2 fibroblasts. *Journal of Biological Chemistry*, 281(14).



Nishi, Yuichi, Hongkai Ji, Wing H. Wong, Andrew P. McMahon, and Steven A. Vokes. 2009. Modeling the spatio-temporal network that drives patterning in the vertebrate central nervous system. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms* 1789 (4) 299-305.

Park, Sun-Mi, Arti B. Gaur, Ernst Lengyel, and Marcus E. Peter. 2008. The miR-200 family determines the epithelial phenotype of cancer cells by targeting the E-cadherin repressors ZEB1 and ZEB2. *Genes & Development* 22 (7), 894-907.

Pasternack, Sandra M, Ivar von Kugelgen, Khalid Al Aboud, Young-Ae Lee, Franz Ruschendorf, Katrin Voss, Axel M Hillmer, et al., 2008. G protein-coupled receptor P2Y5 and its ligand LPA are involved in maintenance of human hair growth. *Nature Genetics* 40, (3), 329-334.

Perez-Balaguer, Ariadna, Eduardo Puelles, Wolfgang Wurst, and Salvador Martinez. 2009. Shh dependent and independent maintenance of basal midbrain. *Mechanisms of development* 126, (5-6), 301-313.

Pettus, Benjamin J., Alicja Bielawska, Sarah Spiegel, Patrick Roddy, Yusuf A. Hannun, and Charles E. Chalfant. 2003. Ceramide Kinase Mediates Cytokine- and Calcium Ionophore-induced Arachidonic Acid Release. *Journal of Biological Chemistry* 278, (40), 38206-38213.

Popovic, Jelena, Andrijana Klajn, Isidora Petrovic, and Milena Stevanovic. 2010. Tissue-specific Forkhead protein FOXA2 up-regulates SOX14 gene expression. *Biochimica et biophysica acta* 1799, (5-6) 411-418.

Pyne, S., Kong, K. and Darroch, P.I., 2004. Lysophosphatidic acid and sphingosine 1-phosphate biology: the role of lipid phosphate phosphatases. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 15(5), 491-501.

Ríobo, N.A. and Manning, D.R., 2007. Pathways of signal transduction employed by vertebrate Hedgehogs. *The Biochemical Journal*, 403(3), 369-379.

Roberts, R., Sciorra, V.A. and Morris, A.J., 1998. Human Type 2 Phosphatidic Acid Phosphohydrolases. Substrate Specificity of the type 2a, 2b, and 2c enzymes and cell surface activity of the 2a isoform. *Journal of Biological Chemistry*., 273(34), 22059-22067.

Roelink, H. J. A. Porter, C. Chiang, Y. Tanabe, D. T. Chang, P. A. Beachy, and T. M. Jessell, 1995. Floor plate and motor neuron induction by different concentrations of the amino-terminal cleavage product of sonic hedgehog autoproteolysis. *Cell*, 81(3), 445-455.

Rosen, Hugh, Pedro J Gonzalez-Cabrera, M Germana Sanna, and Steven Brown, 2009. Sphingosine 1-phosphate receptor signaling. *Annual Review of Biochemistry*, 78(1), 743-68.

Ruiz i Altaba, A., 1999. Gli proteins and Hedgehog signaling: development and cancer. *Trends Genet*, 15(10), 418-425.

Sanchez, R., Escalante-Alcalde, D. and Stewart, C.L., 2007. The role of LPP3 deficiency in neural development. *Developmental Biology*, 306(1).

Sanchez-Diaz, Patricia C, Tarea L Burton, Suzanne C Burns, Jaclyn Y Hung, and Luiz O Penalva. 2008. Musashi1 modulates cell proliferation genes in the medulloblastoma cell line Daoy. *BMC cancer* 8.

Sasaki, H., C. Hui, M. Nakafuku, and H. Kondoh. 1997. A binding site for Gli proteins is essential for HNF-3beta floor plate enhancer activity in transgenics and can respond to Shh in vitro. *Development* 124, (7): 1313-1322.

Sciorra, V.A. and Morris, A.J., 2002. Roles for lipid phosphate phosphatases in regulation of cellular signaling. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1582(1-3), 45-51.

Senda, K., K. Koizumi, O. Prangsaengtong, T. Minami, S. Suzuki, I. Takasaki, Y. Tabuchi, et al., 2009. Inducible capillary formation in lymphatic endothelial cells by blocking lipid phosphate phosphatase-3 activity. *Lymphatic Research and Biology*, 7(2), 69-74.

Simpson, F., Kerr, M.C. and Wicking, C., 2009. Trafficking, development and hedgehog. *Mechanisms of Development*, 126(5-6), 279-288.

Stegmaier, P., Kel, A.E. and Wingender, E., 2004. Systematic DNA-binding domain classification of transcription factors. *Genome informatics. International Conference on Genome Informatics*, 15(2), 276-286.

Tabata, Ken-ichi, Kiyoshi Baba, Akira Shiraishi, Masahiro Ito, and Norihisa Fujita, 2007. The orphan GPCR GPR87 was deorphanized and shown to be a lysophosphatidic acid receptor. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 363(3), 861-866.

Taipale, J., Chen, J. K., Cooper, M.K., Wang, B., Mann, R. K., Milenkovic, L., Scott M. P., Beachy P.A., 2000 Effects of oncogenic mutations in Smoothed and Patched can be reversed by cyclopamine. *Nature* 406(6799):1005-1009

Tanyi, J. L., Morris, A. J., Wolf, J. K., Fang, X., Hasegawa, Y., Lapushin, R., et al., 2003. The human lipid phosphate phosphatase-3 decreases the growth, survival, and tumorigenesis of ovarian cancer cells: validation of the

lysophosphatidic acid signaling cascade as a target for therapy in ovarian cancer. *Cancer research*, 63(5), 1073-1082.

Tigyi, G., 2003. Molecular mechanisms of lysophosphatidic acid action. *Progress in Lipid Research*, 42(6), 498-526.

Tomsig, J.L., A.H. Snyder, E.V. Berdyshev, A. Skobeleva, C. Mataya, V. Natarajan, D.N. Brindley, and K.R. Lynch, 2009. Lipid phosphate phosphohydrolase type 1 (LPP1) degrades extracellular lysophosphatidic acid in vivo. *The Biochemical journal*, 419(3), 611-618.

Ulrix, William, Johannes V. Swinnen, Walter Heyns, and Guido Verhoeven. 1998. Identification of the Phosphatidic Acid Phosphatase Type 2a Isozyme as an Androgen-regulated Gene in the Human Prostatic Adenocarcinoma Cell Line LNCaP. *Journal of Biological Chemistry* 273,(8), 4660-4665.

Waggoner, D W, J Xu, I Singh, R Jasinska, Q X Zhang, and D N Brindley. 1999. Structural organization of mammalian lipid phosphate phosphatases: implications for signal transduction. *Biochimica et Biophysica Acta* 1439, (2), 299-316.

Watson, James, Tania Baker, Stephen Bell, Alexander Gann, Michael Levine, and Richard Losick. 2004. *Molecular Biology of the gene*. 5th ed. Pearson.

Weinstein, Dc, A Ruiz i Altaba, Ws Chen, P Hoodless, Vr Prezioso, Tm Jessell, and Je Darnell. 1994. The winged-helix transcription factor HNF-3 beta is required for notochord development in the mouse embryo. *Cell* 78, (4), 575-588.

Zhang, Chunxiang, Daniel L. Baker, Satoshi Yasuda, Natalia Makarova, Louisa Balazs, Leonard R. Johnson, Gopal K. Marathe, et al., 2004. Lysophosphatidic Acid Induces Neointima Formation Through PPAR $\gamma$  Activation. *The Journal of Experimental Medicine* 199, (6), 763-774.

Zhang, N, J Zhang, Kj Purcell, Y Cheng, and K Howard. 1997. The Drosophila protein Wunen repels migrating germ cells. *Nature* 385,(6611), 64-67.

Zhang, N., Sundberg, J. and Gridley, T., 2000. Mice mutant for Ppap2c, a homolog of the germ cell migration regulator wunen, are viable and fertile. *Genesis*, 27(4), 137-140.

Zhang, Y., Scoumanne, A. and Chen, X., 2010. G Protein-Coupled Receptor 87: a Promising Opportunity for Cancer Drug Discovery. *Molecular and Cellular Pharmacology*, 2(3), 111-116.