

INSTITUTO DE BIOMEDICINA DE VALENCIA

CARACTERIAZACIÓN DE GENES REGULADOS POR EL
ÁCIDO RETINOICO IMPLICADOS EN LA
DIFERENCIACIÓN CELULAR DE CÉLULAS SH-SY5Y DE
NEUROBLASTOMA HUMANO

GRACIA M^a LÓPEZ CARBALLO

UNIVERSITAT DE VALENCIA
Servei de Publicacions
2002

Aquesta Tesi Doctoral va ser presentada a València el dia 15 de Març de 2002 davant un tribunal format per:

- Dr. D. Luis Franco Vera
- Dr. D. Luis Torres Asensi
- Dra. Dña. Ana M. Aranda Iriarte
- Dr. D. Rafael Pulido Murillo
- Dra. Dña. Isabel Fariñas Gómez

Va ser dirigida per:
Prof. Dr Domingo Baretino

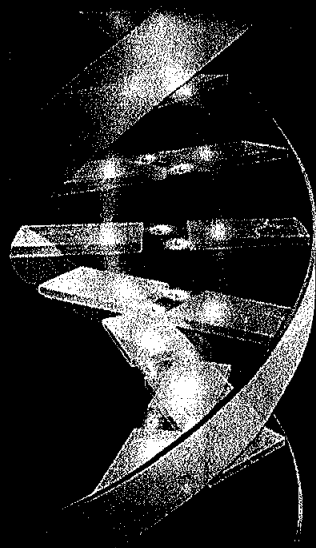
©Copyright: Servei de Publicacions
Gracia M^a López Carballo

Depòsit legal:

I.S.B.N.:84-370-5582-2

Edita: Universitat de València
Servei de Publicacions
C/ Artes Gráficas, 13 bajo
46010 València
Spain
Telèfon: 963864115

**Caracterización de genes regulados
por el ácido retinoico
implicados en la diferenciación celular de
células SH-SY5Y de neuroblastoma humano**



tesis doctoral

GRACIA M^o LOPEZ CARBALLO
Valencia, 2002

INSTITUTO DE BIOMEDICINA DE VALLE CASIA
Consejo Superior de Investigaciones Científicas

INSTITUTO DE BIOMEDICINA DE VALENCIA
(CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS)

**CARACTERIZACIÓN DE GENES REGULADOS
POR EL ÁCIDO RETINOICO IMPLICADOS EN LA
DIFERENCIACIÓN CELULAR DE CÉLULAS
SH-SY5Y DE NEUROBLASTOMA HUMANO.**

UNIVERSIDAD DE VALENCIA

*Memoria para optar al grado de
Doctora en Farmacia presentada por
Gracia M^a López Carballo*

Valencia 2002



Consejo Superior de Investigaciones Científicas

INSTITUTO DE BIOMEDICINA DE VALENCIA

Jaime Roig, 11

Tel. 34-96 339 17 60

Fax: 34-96 369 08 00 - 34-96 337 17 66

46010 Valencia. España

DOMINGO BARETTINO FRAILE, Científico Titular del Consejo Superior de Investigaciones Científicas,

CERTIFICO

Que la presente Tesis Doctoral titulada **Caracterización de genes regulados por el ácido retinoico implicados en la diferenciación celular de células SH-SY5Y de neuroblastoma humano**, ha sido realizada por la Licenciada en Farmacia D^a **Gracia M^a López Carballo**, bajo mi dirección y en mi laboratorio, en el Instituto de Biomedicina de Valencia del Consejo Superior de Investigaciones Científicas.

Valencia, a 13 de Diciembre de 2001

Fdo. Dr. Domingo Barettino Fraile

Este trabajo de tesis ha sido financiado por las ayudas PM96-0073 Y PM 1999-0112, del Programa Sectorial de Promoción General del Conocimiento (Dirección General de Investigación). La autora ha disfrutado de una beca predoctoral de FPI de la Consellería de Cultura, Educación Y Ciencia, y de una beca de estancia corta en el extranjero financiada por la Generalidad Valenciana.

a mi familia
a Sergio

AGRADECIMIENTOS

Llegado a este punto vital, son muchas las personas a las que tengo que agradecer su apoyo y que se han convertido en parte muy importante de mi vida.

Primero al jefe, el Dr. Domingo Baretino por darme la oportunidad de realizar mi tesis en su laboratorio, por todo lo que me ha enseñado y la paciencia que ha tenido conmigo (y por dejarnos decorar el despacho).

A mis compañeras de laboratorio, hoy en día increíbles amigas: a Lucre y Paz, por esos días de estudio tan divertidos en los albores del IBV, a Rosi y a Susi por ser tan buenas amigas, por hacerme siempre reír, por los expedientes X vividos en el laboratorio, por los viajes al sur, por tantos días compartidos que nunca podré olvidar, por ayudarme en mi ciencia y hacer divertido algo tan duro como trabajar en verano. A Paloma por sus sabios consejos, su apoyo incondicional y por ser tan divertida (y por las terapias del chino).

A Fernandín, por mimarme tanto, por las figuras, por las meriendas y sobre todo por aguantarme y ser mi amigo.

Al resto de la panda pro-viveros: a Amparillo, a Lidia, a Toni, a Belén... por las divertidas terapias de grupo que nos han ayudado a todos a mantenernos cuerdos (más o menos).

A los vecinos del cuarto: a JM (también conocido como Pikachu) por esa sangría que hace que despeja tanto la mente, a Salomé por su infinito optimismo, a Jordi por ser uno más.

A Nacho (más conocido como Nachín), por los cien litros, por hacerme reír y por enseñarme su original forma de ver la vida.

A Yoli, por esas charlas en el antiguo despachito y por los desayunos de fin de semana.

Y a todos los compañeros que siempre han tenido unas palabras de ánimo y de cariño cuando me encontraban pululando por los pasillos: al Poch (por sus serenatas), a Silvia, Carmen, Marta, Santi, Ana, Maribel, Leonor, Rafa, M^a Paz, M^a Luz, Clara, Santi, Chelo...

A todo el personal del IBV por hacer más fácil "sobrevivir" aquí: a las chicas de administración (Marita, Irene, Hilaria), a las chicas de la limpieza (Amparo, Susana, Pili, Luisa), a Amparo y su Biblioteca, a Manolo (y su indispensable apoyo informático) y a Clooney.

A mis amigos/as de toda la vida que he tenido últimamente abandonados debido a mi abducción científica y que a pesar de ello han seguido ahí, especialmente a Pilar.

A mis padres y a mi hermano, que solo me veían los rizos cuando iba a dormir, por soportar mis crisis científicas y mis cambios de humor, porque sin ellos y sin su apoyo no habría llegado tan lejos.

A Sergio, por estar siempre a mi lado, por rescatarme en las crisis informáticas, por animarme y ayudarme a desconectar cuando estaba "atacaaa".

Y por supuesto a Mishy.

(A Chucky por seguir funcionando y traerme puntualmente al trabajo).

"Jamás se descubriría nada si nos
considerásemos satisfechos con las cosas
descubiertas"

SENECA

INDICE

INTRODUCCIÓN.....	1
1. La vitamina A.....	1
1.1 Efectos morfogenéticos.....	4
1.2 Diferenciación neuronal.....	6
1.3 Aplicaciones terapéuticas.....	6
2. La superfamilia de Receptores Nucleares.....	9
2.1 Elementos de respuesta.....	10
2.2 Estructura de los receptores nucleares.....	11
2.3 Tipos de receptores nucleares.....	16
2.4 Mecanismos de regulación.....	18
2.4.1 Dimerización de los receptores nucleares.....	18
2.4.2 Cofactores.....	19
3. Acciones no genómicas de las hormonas esteroideas.....	20
4. Factores de transcripción HLH.....	26
4.1 La subfamilia de proteínas ID.....	28
OBJETIVOS.....	37
MATERIALES Y MÉTODOS.....	39
Materiales.....	39

1. Productos	39
1.1 Reactivos químicos.....	39
1.2 Productos de Biología Molecular.....	39
1.3 Material radiactivo.....	40
2. Cultivos celulares	40
2.1 Materiales.....	40
2.2 Líneas celulares.....	40
2.3 Tratamientos.....	41
3. Sondas	41
4. Anticuerpos	45
Métodos	45
1. Extracción de ARN	45
2. Técnica de Display Diferencial Ordenado	45
2.1 Síntesis de ADN complementario.....	46
2.2 Digestión del ADNc con Rsa I.....	46
2.3 Ligación con el adaptador.....	47
2.4 Amplificación por PCR de los fragmentos de interés.....	47
2.5 Amplificación de los subconjuntos.....	48
2.6 Electroforesis en geles de poliacrilamida.....	50
2.7 Recuperación y amplificación de las bandas de interés.....	51
2.8 Identificación de secuencias.....	53
3. Análisis por Northern Blot	54
3.1 Extracción de ARN.....	54
3.2 Transferencia a membrana.....	54
3.3 Sondas radiactivas.....	55
3.4 Hibridación y lavado de membranas.....	55
3.5 Autorradiografía.....	56
4. Inmunodetección de proteínas (Western Blot)	56
4.1 Obtención de extractos de proteínas.....	56
4.2 Geles de acrilamida y transferencia a membrana.....	56
4.3 Bloqueo e incubación con los anticuerpos.....	57

5. Ensayos de cambio de la movilidad electroforética en gel.....	57
5.1 Obtención de extractos de proteínas.....	57
5.2 Sonda radiactiva.....	58
5.3 Ensayo de movilidad electroforética.....	59
6. Transcripción Run on.....	59
6.1 Obtención de núcleos y marcado del ARN naciente.....	59
6.2 Preparación de filtros.....	60
6.3 Hibridación.....	61
7. Ensayo de actividad PI3-Kinasa.....	61
RESULTADOS.....	63
1. Caracterización de genes regulados por ácido retinoico implicados en la diferenciación de células de neuroblastoma.....	63
1.1 Diferenciación celular inducida por RA: cambios morfológicos.....	64
1.2 Análisis de genes regulados por RA mediante Display.....	
Diferencial Ordenado.....	65
1.3 Confirmación de los genes regulados por RA mediante.....	
Northern Blot.....	69
1.4 Recopilación sobre los resultados obtenidos por DDO.....	71
2. Regulación de factores HLH, subfamilia ID, por RA.....	72
2.1 El RA regula la expresión de ID3.....	73
2.2 La regulación de ID3 por RA es transcripcional.....	75
2.3 El RA regula coordinadamente la expresión de.....	
factores de la familia ID.....	76
2.4 Los cambios en la expresión de los IDs inducidos por.....	
RA se reflejan en los niveles de proteínas ID.....	78
2.5 La unión de factores HLH al ADN se incrementa con.....	
el tratamiento con RA.....	79
2.6 El RA produce cambios en la expresión de factores.....	
HLH y de los genes regulados por éstos.....	81
2.7 El TPA regula coordinadamente la expresión de IDs.....	83

3. El mecanismo molecular de la regulación negativa de los IDs por RA.....	84
3.1 La regulación negativa de los IDs requiere proteínas.....	
de nueva síntesis.....	85
3.2 La regulación negativa de los IDs requiere actividad.....	
Fosfatidil-Inositol-3-Kinasa.....	86
3.3 Una posibilidad: inducción por RA de RET, un receptor.....	
tirosina-kinasa y un activador de la PI3K.....	88
3.3.1 Inducción de RET por RA.....	89
3.3.2 La inducción de RET es directa y no requiere proteínas.....	
de nueva síntesis ni la actividad de la PI3K.....	91
3.3.3 La inducción de RET es específica de RA y no es inducida.....	
por TPA.....	93
3.3.4 Detección de GFRs y GLs en células SH-SY5Y.....	93
3.4 Inducción de la vía de señalización de PI3K en células.....	
SH-SY5Y por RA.....	96
3.4.1 El tratamiento con RA incrementa la actividad PI3K en las.....	
células SH-SY5Y.....	96
3.4.2 El tratamiento con RA incrementa la fosforilación de AKT.....	
en Ser 473.....	98
3.4.3 La inhibición de la vía PI3K/AKT por LY 294002 bloquea la.....	
diferenciación inducida por RA.....	99

DISCUSIÓN.....105

1. El DDO es una técnica útil para el estudio de la expresión.....	
diferencial de genes regulados por RA.....	107
2. Los genes expresados diferencialmente por RA identificados.....	
reflejan los cambios que se producen en la diferenciación.....	
celular.....	108
3. Regulación negativa de los factores de transcripción IDs por.....	
RA y TPA.....	113
4. El RA activa la vía de la PI3/AKT, y esta activación es.....	
requerida para la diferenciación neural.....	117

CONCLUSIONES.....125

BIBLIOGRAFÍA.....127

ANEXO

Abreviaturas

ADN	ácido deoxirribonucleico
ADNc	ácido deoxirribonucleico complementario
ARNm	mensajero de ácido ribonucleico
BSA	albúmina de suero bovino
CDK	kinasa dependiente de ciclinas
CHX	cicloheximida
CKI	inhibidor de las CDKs
DBD	dominio de unión a ADN
DEPC	dietil-pirocarbonato
DNasaI	deoxirribonucleasa I
E ₂	17β-Estradiol
EDTA	ácido etilendiaminotetracético
EGTA	ácido etilenglicol-bis (B-aminoetiléter)-N,N,N',N'tetra- acético
ER	receptor de estrógenos
GR	receptor de glucocorticoides
HEPES	N-(2-hidroxietil) piperazina N'(2-etanosulafanílico)
HRE	elemento de respuesta a hormona
IGF-1	factor de crecimiento similar a la insulina 1
JNK	kinasa amino terminal de c-jun
LBD	dominio de unión a ligando
MAPK	proteína kinasa asociada a microtúbulos

Abreviaturas

MCKE	<i>enhancer</i> de la creatina kinasa de músculo
NO	óxido nítrico
PBS	tampón fosfato salino
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
PI3K	fosfatidil inositol-3-kinasa
PMSF	fluoruro de fenil-metil sulfonilo
PPAR	receptor activador por proliferadores de peroxisoma
Pu	purina
9-cis RA	ácido 9-cis retinoico
RA	ácido todo-trans retinoico
RALDH2	enzima retinaldehído deshidrogenasa-2
RAR	receptor de ácido retinoico
RARE	elemento de respuesta a ácido retinoico
RNasa	riboendonucleasa
RXR	receptor del retinoide X
T3	3-5-3'-L-triyodotironina
T4	L-tiroxina
TAE	tampón tris-acético
TBE	tampón tris-borato-EDTA
TPA/PMA	forbol 12-miristato-13-acetato o tetradecanoil-forbol -13-acetato
TR	receptor de las hormonas tiroideas
VDR	receptor de vitamina D

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

1. LA VITAMINA A.

En 1913, Davis y Mc Collum y casi al mismo tiempo Osborn y Mendel, observaron que las ratas no podían desarrollarse de forma normal con una dieta purificada de hidratos de carbono, proteínas, grasas y minerales, a menos que se añadiera a ésta mantequilla, aceite de hígado de bacalao o extracto de yema de huevo. Dedujeron entonces que estas sustancias contenían un factor hasta el momento desconocido, que era indispensable para el crecimiento y el desarrollo normal. Este factor fue denominado liposoluble A.

Durante los años veinte, se llegó a establecer bien la importancia de su papel biológico. Se hallaron fuentes más ricas de vitamina A, como el aceite de hígado de halibut. Steenbock demostró que el caroteno,

componente normal de las plantas, puede reemplazar en la dieta a la vitamina A. En 1930, Moore demostró la conversión del β -caroteno en vitamina A en las ratas. Se estableció entonces el papel de ciertos carotenoides como provitaminas A. En 1931, Karrer propuso las fórmulas estructurales de ambos compuestos y en 1937 se aisló por primera vez la vitamina A en su forma cristalina. Isler sintetizó en 1947 la vitamina en forma pura cristalina, mientras que el β -caroteno fue sintetizado por primera vez en 1950.

La deficiencia de vitamina A es uno de los grandes problemas de la salud pública. En la actualidad la OMS (Organización Mundial de la Salud) estima que 250 millones de niños en edad pre-escolar tienen deficiencia subclínica y cerca de 3 millones padecen de xeroftalmia clínica. Aproximadamente un 10% del total de niños ciegos, lo son a causa de la deficiencia de vitamina A y cerca del 70% de estos niños mueren en el transcurso del primer año.

La vitamina A es un alcohol poliénico isoprenoide que se conoce también con otros nombres, como retinol, axeroftol, biosterol, vitamina anti-xeroftálmica y vitamina anti-infecciosa. Del retinol derivan los ésteres de retinol y por oxidación el retinal y el ácido retinoico, que es la forma activa de la vitamina A.

Los retinoides son moléculas hidrofóbicas de pequeño tamaño capaces de atravesar las membranas biológicas de modo pasivo. Se unen a receptores nucleares y regulan diferentes procesos celulares. Existen dos tipos de receptores a través de los cuales actúan los retinoides, el receptor de ácido retinoico RAR y el receptor de retinoides RXR. El RAR es

codificado por tres genes α , β y γ , y se generan varias isoformas de cada uno: RAR α 1 y RAR α 2, RAR β 1, RAR β 2, RAR β 3 y RAR β 4; RAR γ 1 y RAR γ 2. Del mismo modo existen tres genes del receptor RXR, que codifican para RXR α , RXR β y RXR γ . El ácido retinoico todo-trans es el ligando natural para el receptor RAR (Giguere y col., 1987; Petkovich y col., 1987) y el ácido retinoico 9-cis es el ligando natural del receptor RXR (Heyman y col., 1992; Levin y col., 1992).

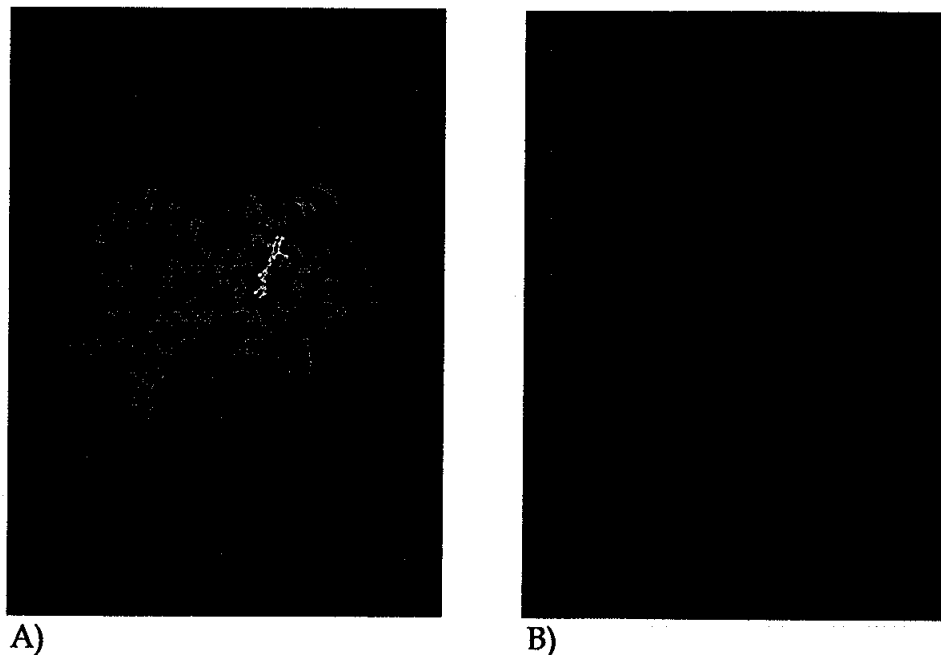


Figura 1. Dominio de unión al ligando de los receptores RAR y RXR.

A) Estructura cristalina del dominio de unión a ligando del receptor RAR γ (en verde) (PDB: 2lbd, Renaud y col., 1995) unido al ligando todo-trans ácido retinoico. B) Estructura cristalina del dominio de unión a ligando libre del receptor RXR α (en rojo) (PDB: 1lbd, Bourguet y col., 1995).

La vitamina A y sus derivados (los retinoides) son esenciales para el desarrollo embrionario, así como para la homeostasis en el organismo adulto (*para revisión: Ross y col., 2000; Zile, 2001*). Ya en los años treinta, se descubrió que un déficit materno de vitamina A producía importantes anomalías y malformaciones congénitas que ocasionaban la muerte del feto (*Mason, 1935; Hale, 1937*). Posteriormente Wilson y colaboradores definieron anomalías congénitas resultantes de un déficit de vitamina A durante el período de gestación (*Thomson y col., 1969; Wilson y col., 1953*). Un déficit de ácido retinoico en el desarrollo embrionario produce importantes anomalías en el sistema cardiovascular, en el sistema urogenital, en el sistema respiratorio, en la cabeza, en los ojos, en el sistema nervioso central, en órganos hematopoyéticos y en el tronco (*Dersch y Zile, 1993; Maden y col., 1996; Maden y col., 1998; Twal y col., 1995; Zile y col., 1998*). Además la vitamina A desempeña un importante papel como agente protector del daño oxidativo en mitocondrias (*Barber y col., 2000*). Por otro lado, un exceso de vitamina A, también produce teratogénesis (*Cohlan, 1953*) y es membranolítico y hepatóxico en el organismo adulto (*Tzimas y Nau, 2001*).

1.1 Efectos morfogenéticos.

El ácido retinoico (RA) desempeña un papel fundamental como regulador de la diferenciación durante la embriogénesis de los vertebrados (*Gudas, 1994; Means y Gudas, 1995; Conlon, 1995; Durston, 1997; Irving y col., 1998; Niederreither y col., 1999*, para revisión: *Ross y col., 2000*).

La importancia de la forma activa de la vitamina A en el desarrollo y diferenciación del sistema nervioso está demostrada por el hecho de que la exposición a un exceso de retinoides durante las primeras etapas del desarrollo, produce anomalías en el cerebro y en las células derivadas de la cresta neural (*Morriss-Kay y col., 1991*). Además, se han descrito estas alteraciones en las estructuras a las que contribuyen las células de la cresta neural en embriones humanos expuestos a un exceso de RA *in utero* en estadios tempranos del desarrollo (*Lammer y col., 1985*).

El RA actúa fundamentalmente en la determinación de los ejes de polaridad en el embrión. Estudios en *Xenopus laevis* revelan que el RA media una transformación anteroposterior en el sistema nervioso central en desarrollo (*Durston y col., 1989*). Por otro lado, la exposición a dosis teratogénicas de RA en embriones murinos causa transformaciones homeóticas en las que ciertas estructuras del sistema nervioso desaparecen o se modifican (*Kessel y Gruss, 1991*). Estudios en pollos muestran que la aplicación ectópica de RA altera la formación de las extremidades (*Izpisua-Belmonte y col., 1991*).

La enzima retinaldehído deshidrogenasa-2 (RALDH2) es una aldehído deshidrogenasa dependiente de NAD con una alta especificidad por el sustrato retinaldehído. Su patrón de expresión durante el desarrollo murino ha sugerido que puede ser responsable de la síntesis de RA en el embrión. Se han hecho estudios con ratones *Knock-outs* deficientes en RALDH2 que ponen de manifiesto la necesidad de esta enzima para la supervivencia y morfogénesis temprana del embrión (*Niederreither y col., 1999*).

1.2 Diferenciación neuronal.

El RA, además de su importancia en la morfogénesis del sistema nervioso, tiene un papel importante en el control de la diferenciación y la proliferación de células neuronales. Así, el RA aumenta la neuritogénesis en cultivos primarios de neuronas de la médula espinal (*Wuarin y Sidell, 1991*) y es capaz de diferenciar hacia fenotipo neuronal algunas líneas celulares establecidas de carcinoma embrionario (*Jones-Villeneuve y col., 1982; Andrews, 1984*). La diferenciación está acompañada de cambios en la expresión de genes implicados en diferenciación y proliferación (*Miller y col., 1990*). Por otra parte, se ha descrito que células madre embrionarias se pueden diferenciar en presencia de RA adquiriendo un fenotipo neuronal (*Slager y col., 1993; Bain y col., 1994; Bain y col., 1995*).

El RA también es capaz de inducir diferenciación neuronal en algunas líneas derivadas de neuroblastomas humanos. En estas células procedentes de tumores con origen en la cresta neural, el RA produce una parada de la proliferación en la fase G1 del ciclo celular (*Thiele y col., 1985*). La detención del crecimiento es debida a un incremento de los niveles de p27 y una inhibición de kinasas dependientes de ciclinas (CDKs) (*Matsuo y Thiele, 1998; Hsu y col., 2000; Matsuo y col., 2001*).

1.3 Aplicaciones terapéuticas.

En 1925 se observó que los retinoides eran necesarios para la homeostasis de los epitelios (*Wolbach y Howe, 1925*). Se ha visto que los retinoides son importantes agentes terapéuticos capaces de reducir la incidencia de tumores en pacientes que padecen cáncer de cabeza, cuello,

pulmón o hígado (para revisión: *Dragnev y col., 2000*). Una terapia combinada empleando retinoides y otros agentes en quimioprevención puede ser una atractiva estrategia farmacológica (*Hong y Sporn, 1997*).

En el caso del neuroblastoma, dependiendo del tipo y localización, el modo de combatirlo varía: cirugía, radioterapia, quimioterapia... Actualmente se está empleando con éxito el ácido retinoico como agente terapéutico para tratar niños afectados de neuroblastoma, en combinación con quimio- y radioterapia (*Matthay y col., 1999; para revisión: Reynolds, 2000*).

El Neuroblastoma es predominantemente un tumor de la primera infancia; dos tercios de los casos se presentan en niños menores de 5 años de edad (*para revisión : Alexander, 2000*). En casos raros el neuroblastoma puede diagnosticarse prenatalmente por ultrasonografía fetal (*Jennings y col., 1993*). Es un cáncer que procede de la cresta neural y se produce por desórdenes en procesos de diferenciación. En ocasiones se producen regresiones espontáneas del tumor vía apoptótica (*Iwata y col., 1995*). Está documentado que estas regresiones son mucho más frecuentes en neuroblastoma que en ningún otro tumor (*Evans y col, 1976*). También puede madurar hasta formar un ganglioneuroma benigno diferenciado. Ambos procesos pueden ocurrir espontáneamente y con tratamiento (*Griffin y Bolande, 1969; Aterman y Schueller, 1970*).

Los niños de cualquier edad con neuroblastoma localizado y los lactantes menores de un año con enfermedad avanzada y características favorables, tienen una alta probabilidad de sobrevivir a largo plazo sin enfermedad (*Brodeur y col., 1992; Adams y col., 1993*). Sin embargo, para

los niños de más edad con enfermedad en etapa avanzada, las posibilidades de curarse, aún con terapia intensiva, son considerablemente menores. La quimioterapia agresiva con fármacos múltiples, ha dado como resultado una tasa de supervivencia de dos años aproximadamente en el 20% de los niños mayores con neuroblastoma en etapas avanzadas (*Bowman, y col., 1991; McWilliams, 1995*). En adolescentes y adultos con neuroblastoma, el pronóstico a largo plazo es más precario, independientemente de la etapa y ubicación de la enfermedad y, en muchos casos, el curso de ésta es más prolongado (*Franks y col., 1997*).

El RA también se utiliza para el tratamiento de leucemias promielocíticas (*Fenaux y col, 2001; Douer col, 2001*) y para el acné nodulocístico recalcitrante y la psoriasis (*Peck y col., 1979; Jones y col., 1983; Orfanos y col., 1987*). El RA se emplea en cosmética para evitar el envejecimiento de la piel por su carácter regulador de la homeostasis de la piel y su capacidad de protección contra los daños producidos por la luz UV (*Epstein, 1981; Epstein y col., 1981; Tsukahara y col., 1999; Kligman y col., 1984; Chaqour y col., 1997*). Estudios *in vitro* han mostrado la actividad quimiopreventiva de los retinoides en células del epitelio bronquial humano, debido a una parada en el ciclo celular, concretamente en la fase G1, ocasionada por una disminución en la expresión de ciclinas (*Langenfeld y col., 1996; Langenfeld y col., 1997; Spinella y col., 1999*).

La quimiopreención con RA reduce el riesgo de carcinomas de pulmón, laringe, esófago y lengua en más del 50%. El tratamiento de estos tipos de cáncer se lleva a cabo aumentando la dosis de retinoico endógeno

mediante el bloqueo de agentes catabolizantes como el citocromo p450. Se emplean agentes bloqueantes del metabolismo del RA (RAMBAs) como es el Liarozole (*Miller, 1998*). La importancia que tiene el uso de RA en quimioprevención y/o tratamiento del cáncer radica en su capacidad para producir diferenciación y apoptosis.

2. LA SUPERFAMILIA DE RECEPTORES NUCLEARES.

Los receptores nucleares constituyen una superfamilia de factores de transcripción que regulan la expresión génica de forma dependiente de ligando, aunque algunos pueden hacerlo de forma independiente de ligando. Los miembros de la familia de receptores nucleares incluyen receptores para las hormonas esteroideas, tales como estrógenos (ER) y glucocorticoides (GR), así como receptores para hormonas no esteroideas, como la hormona tiroidea (TR), vitaminas como la 1,25-dihidroxi vitamina D y el ácido retinoico (RAR y RXR) o receptores que se unen a diversos productos del metabolismo lipídico, tales como ácidos grasos o prostaglandinas (PPAR) (para revisión: *Glass y Rosenfeld, 2000; Aranda y Pascual, 2001*). La familia de receptores nucleares, también incluye los llamados receptores huérfanos, cuyo ligando aún no ha sido identificado (*Mangelsdorf y Evans, 1995; Giguere, 1999*). Este tipo de receptores pueden estar regulados por mecanismos alternativos, tales como la fosforilación (*Hammer y col., 1999; Tremblay y col., 1999*).

Los receptores nucleares se originan a partir de un gen ancestral (*Laudet y col., 1992; Laudet, 1997; Escriva y col., 1997*). Se han encontrado receptores nucleares en todos los animales metazoos. En humanos se han

identificado más de 24 clases distintas de receptores nucleares (*Glass y Rosenfeld, 2000*).

Las hormonas tiroideas (T3 y T4), los retinoides (derivados de la vitamina A) y el calcitriol (derivado hidroxilado en las posiciones 1 y 25 de la vitamina D3) son compuestos de naturaleza lipofílica y bajo peso molecular capaces de difundir a través de la membrana plasmática. Estos compuestos controlan una gran variedad de procesos biológicos, como crecimiento, homeostasis, desarrollo, diferenciación y morfogénesis.

2.1 Elementos de respuesta.

Los receptores nucleares forman una superfamilia de factores de transcripción, que se unen a secuencias específicas de ADN, que se conocen con el nombre de elementos de respuesta a hormona (HRE) y regulan directamente la expresión de genes diana específicos. El análisis de secuencias ha revelado la existencia de un hexámero que constituye el motivo de reconocimiento por los receptores nucleares, conocido como hemisítio.

Han sido identificados dos motivos consenso: la secuencia AGAACA, que es reconocida preferentemente por los receptores de esteroides y la secuencia AGGTCA, que sirve como motivo de reconocimiento para el resto de los miembros de la superfamilia de receptores nucleares.

Los receptores nucleares se unen a estas secuencias como homodímeros, heterodímeros o monómeros. La especificidad de reconocimiento y la actividad transcripcional mediada por los

componentes de esta superfamilia vienen determinadas por pequeñas diferencias en la secuencia y orientación de los hemisitios, en el número de nucleótidos que conforman la secuencia espaciadora o en las características de la región adyacente a los elementos. En los HREs los hemisitios pueden estar dispuestos como palíndromes, palíndromes invertidos o repeticiones directas. Existe un modelo que se conoce como la regla 3 - 4 - 5, y por el cual los HREs a los que se unen preferentemente el receptor de la vitamina D (VDR), el receptor de la hormona tiroidea (TR) y el receptor del ácido todo trans-retinoico (RAR), están compuestos por repeticiones directas separadas por 3, 4 y 5 nucleótidos, respectivamente (*Umesono y col., 1991*).

2.2 Estructura de los receptores nucleares.

La estructura típica de un receptor nuclear consiste es una región amino-terminal A/B variable; un dominio conservado de unión a ADN, DBD o región C; una región D o dominio bisagra y una región E conservada, que contiene el dominio de unión a ligando (LBD) y dimerización (*figura 2*).

-El dominio A/B en el extremo amino terminal, es muy variable en longitud y en secuencia, y contiene el dominio AF-1, involucrado en activación transcripcional independiente de ligando (*Metzger y col., 1990; Nagpal y col., 1993*). Aunque se sabe poco acerca del mecanismo molecular por el que el AF-1 inicia la transcripción, se ha observado que la fosforilación de determinados residuos se correlaciona con un aumento de

la actividad independiente de ligando de determinados receptores (Thompson y Evans, 1989). Así, se ha visto que los RARs y otros receptores pueden ser fosforilados por Kinasas dependientes de ciclinas y esta fosforilación es importante para la transactivación dependiente e independiente de ligando (Rochette-Egly y col., 1997; Taneja y col., 1997; Rochette-Egly y col., 1992).

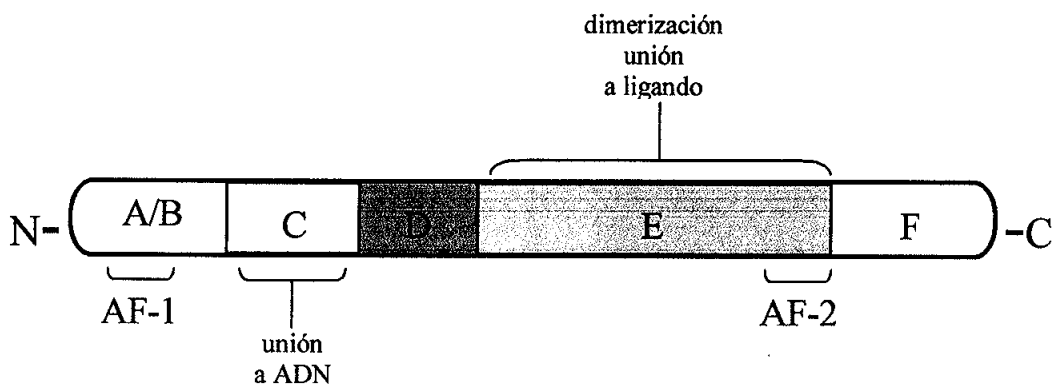


Figura. 2. Estructura modular de los receptores nucleares.

Los receptores nucleares se dividen en seis regiones. La región C contiene el dominio de unión al ADN, las regiones E/F contienen el dominio de unión a ligando. Además existe una región de dimerización en el dominio de unión a ligando y dos dominios de transactivación (denominados AF-1 y AF-2).

-El domino C, es la región más conservada entre los miembros de la superfamilia. Este dominio confiere al receptor la capacidad para reconocer secuencias diana específicas y modular la actividad génica. Contiene el dominio de unión a ADN, que es una región rica en aminoácidos básicos organizados en dos estructuras de dedos de zinc (Klug y Schwabe, 1995). En cada dedo de zinc existen cuatro cisteínas

conservadas, que coordinan tetrahédricamente un ion de Zn. Los motivos de reconocimiento de la secuencia del ADN están presentes en la base del primer dedo de zinc, y se conocen con el nombre de caja P o caja proximal. Otros residuos de la base del segundo dedo de zinc constituyen la caja D o caja distal, que está involucrada en la dimerización del receptor o median las interacciones proteína-proteína (*Luisi y col., 1991*). Este dominio contiene dos α hélices, una de ellas, la hélice de reconocimiento, ocupa el surco mayor del ADN en el HRE, estableciendo contactos con las bases que forman parte del motivo hexamérico (*Luisi y col., 1991*).

Estudios estructurales de los complejos ADN-DBD indican que la separación entre los motivos en el elemento de respuesta es un parámetro crítico para que los DBDs puedan heterodimerizar.

-El dominio D actúa como bisagra entre el dominio de unión al ADN y el dominio de unión al ligando proporcionando flexibilidad en la disposición de ambos sobre los elementos de respuesta. Esta región del receptor nuclear es altamente variable tanto en longitud como en secuencia. Contiene la señal de localización nuclear y la denominada caja A, que estabiliza el receptor sobre el ADN contactando con nucleótidos adicionales fuera del hemisitio consenso y extiende la secuencia de reconocimiento (*McBroom, 1995*).

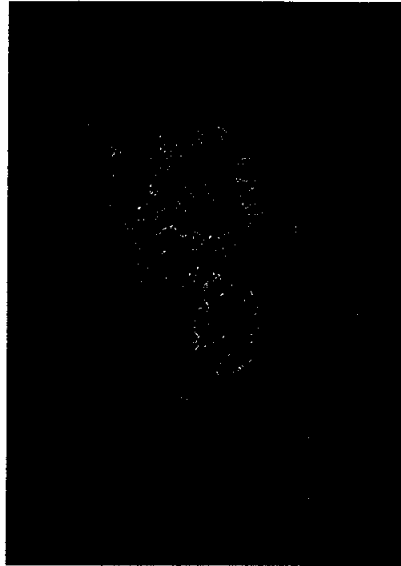


Figura.3 Unión del heterodímero RAR-RXR al ADN

Estructura cristalina del complejo de unión de los receptores RAR α y RXR α unidos al ADN sobre el elemento de respuesta DR1 (*Rastinejad y col., 2000*). (PDB: idsz). En verde se ha representado el dominio de unión al ADN del receptor RAR α y en rojo el dominio de unión al ADN de receptor RXR α .

-El dominio E/F, contiene el dominio de unión a ligando y está muy conservado entre receptores que poseen ligandos relacionados. Es un dominio multifuncional que, aparte de unir el ligando, media la homo- y heterodimerización (*figura 4*). Contiene las superficies de dimerización y la región AF-2, que está altamente conservada en el extremo C-terminal del LBD y posee actividad autónoma para activar la transcripción dependiente de ligando (*Danielian y col., 1992; Nagpal y col., 1993; Baretino y col., 1994; Durand y col., 1994*).

Los estudios cristalográficos del LBD, han permitido demostrar que la estructura global de los receptores nucleares es muy similar. El LBD está formado por α 12 hélices conservadas y numeradas de la 1 a la 12 (H1 a H12), excepto la H2 del RXR que no está presente ni en TR ni en RAR. Además el LBD está formado por dos mitades, una de ellas rígida, que estaría implicada en dimerización (H10 y H11) y en la interacción con correpresores, y otra región que contendría la cavidad de unión del ligando y la superficie de interacción con los coactivadores.

Entre las hélices, H5 y H6, existe una lámina β empaquetada entre las hebras antiparalelas que forman las hélices de la H1 a la H5 y de la H6 a la H12.

El estudio comparativo de las estructuras de los holo (unidos a ligando) y apo-LBD (vacío) receptores, ha permitido la propuesta de un modelo en el cual la unión del ligando induce cambios conformacionales en el LBD de los receptores nucleares, permitiendo la unión de coactivadores (*Renaud y col., 1995*). El LBD en presencia de ligando adquiere una estructura más compacta que cuando está vacío. Esto sugiere una función estructural del ligando en la configuración de la superficie de contacto proteína-proteína del LBD.



Figura 4. Dominios de unión a ligando del heterodímero RAR-RXR

Estructura cristalina del heterodímero formado por los dominios de unión a ligando de los receptores RAR α y RXR α (Bourguet y col., 2000). (PDBid: 1dkf). En verde se ha representado el dominio de unión del receptor RAR α unido al ligando BMS y en rojo el dominio de unión del receptor RXR α unido al ligando ácido oleico.

2.3 Tipos de receptores nucleares.

Los miembros de la superfamilia de receptores nucleares se caracterizan por una alta homología estructural y funcional, pero se pueden clasificar en cuatro grupos en función de sus características de unión al ADN y el modo en que forman dímeros:

-Clase I: a este grupo pertenecen los receptores de hormonas esteroideas: glucocorticoides, progesterona, mineralocorticoides, andrógenos. En ausencia de hormona se encuentran en el citoplasma de la célula en forma inactiva y asociados a otras proteínas, entre ellas, la proteína de choque térmico hsp90. En presencia de hormona se disocia

este complejo y el receptor unido al ligando se transloca al núcleo. Funcionan como homodímeros y se unen al ADN en elementos organizados formando palíndromes del motivo AGAACA con una separación de tres nucleótidos.

-Clase II: a este grupo pertenecen los receptores para hormona tiroidea, ácido retinoico, vitamina D₃ y el receptor activado por agentes que hacen proliferar a los peroxisomas (PPAR). Son receptores que heterodimerizan con el RXR (receptor del ácido 9-cis retinoico) y se unen a repeticiones directas del motivo PuGGTCA con espaciamiento variable, aunque también reconocen elementos palindrómicos.

-Clase III: se localizan en el núcleo unidos como homodímeros a elementos respuesta compuestos por repeticiones directas con espaciamiento variable o elementos palindrómicos del motivo AGGTCA. A esta clase pertenece el RXR.

-Clase IV: a esta clase pertenecen los receptores nucleares "huérfanos" que se unen al ADN como monómeros, al motivo consenso NNPuGGTCA, jugando los dos nucleótidos adyacentes un papel importante en la especificidad de unión. Algunos de estos receptores monoméricos, pueden funcionar también como heterodímeros con RXR, como ocurre con NGFI-B.

2.4 Mecanismos de regulación.

Los receptores nucleares pueden regular la expresión génica mediante HREs positivos o negativos, por mecanismos dependientes o independientes de ligando. También pueden hacerlo en ausencia de HREs específicos, compitiendo por factores comunes que se encuentran en la célula en cantidades limitantes (como RXR, coactivadores...) (*Barettino y col., 1993; Yen y Chin, 1994*) o interaccionando con complejos reguladores de la transcripción (como AP-1) (*Yang-Yen y col., 1991*) o proteínas necesarias para la funcionalidad de estos complejos (como CBP) (*Saatcioglu y col., 1993*).

2.4.1- Dimerización de los receptores nucleares.

Los receptores nucleares actúan principalmente formando dímeros (*figura 3 y 5*). Es fundamental la disposición que adoptan los dos componentes del dímero sobre el elemento respuesta, ya que afecta a la actividad transcripcional.

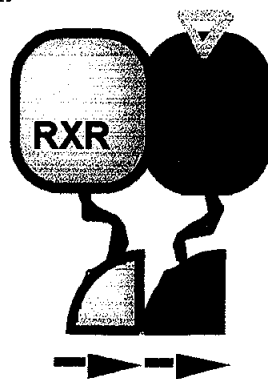


Figura 5. El receptor del RA dimeriza con RXR.

El receptor del RA (RAR) forma un heterodímero con el receptor de retinoides (RXR) y en esta conformación se une a secuencias específicas de ADN regulando la transcripción de genes.

2.4.2-Cofactores.

Son proteínas que interaccionan con los receptores nucleares, mediando la activación o represión de la transcripción de genes específicos (*Mangelsdorf y col, 1995*).

En ausencia de ligando, varios receptores son capaces de reprimir la transcripción basal formando interacciones funcionales con los corepresores nucleares SMRT y N-CoR (*Horlein y col, 1995; Chen y Evans, 1995, para revisión: Glass y Rosenfeld, 2000; McKenna y col., 1999*). Cuando el receptor se une al ligando se produce un cambio conformacional, de modo que el represor queda libre y permite la activación transcripcional. El extremo carboxilo terminal de estas proteínas correpressoras contiene un dominio de interacción con los receptores, mientras que en el extremo amino terminal se encuentran los dominios represores.

El mecanismo por el cual los receptores nucleares pueden silenciar la transcripción de genes diana en ausencia de ligando se puede explicar porque, en ausencia de ligando, el receptor vacío unido a su secuencia diana se encuentra interaccionando con proteínas correpressoras, que reclutan complejos con actividad desacetilasa al promotor. Estos complejos compactan la cromatina y la hacen inaccesible a la maquinaria basal de transcripción, produciendo la inhibición. El receptor cambia su conformación cuando se une su ligando y libera los correpresores (*Horlein y col., 1995; Kurokawa y col., 1995; Perissi y col., 1999*). En su lugar interacciona con coactivadores. Como coactivadores se han identificado SRC-1, TIF-1, TIF-2/GRIP1, P300/CBP, ERAP160, P/CIP, RIP160 y

TRAM1 (*Hong y col., 1996; Onate y col., 1995; Takeshita y col., 1996; Takeshita y col., 1997; Torchia y col., 1997; Voegel y col., 1996*).

Algunos coactivadores tienen actividad acetil transferasa intrínseca. Estos complejos acetilan histonas, lo cual produce la decompactación de la cromatina, haciéndola más accesible a la maquinaria basal de transcripción y dando lugar a la activación de la transcripción. Este es el caso de las proteínas p160 (*Chen y col., 1997; Spencer y col., 1997*), GCN5/PCAF y p300/CBP (*Yang y col., 1996; Bannister y Kouzarides, 1996; Ogryzko y col., 1996*) y/o los factores remodeladores de la cromatina dependientes de ATP SWI/SNF (*Hirschhorn y col., 1992; Kwon y col., 1994*).

Los coactivadores presentan un motivo LXXLL (X es un aminoácido cualquiera) altamente conservado, que se encuentra en la mayoría de los coactivadores identificados hasta el momento (*Heery y col., 2001*). Este motivo es necesario y suficiente para mediar la interacción dependiente de ligando con los receptores nucleares (*McInerney y col., 1998*) y también está involucrado en la interacción entre CBP y coactivadores de la familia p160 (*McInerney y col., 1998*).

3. ACCIONES NO GENÓMICAS DE LAS HORMONAS ESTEROIDEAS.

El mecanismo de acción hormonal clásico de los receptores nucleares es de tipo genómico. Las hormonas esteroideas se unen a receptores presentes en el núcleo o en el citosol, a continuación se transloca el complejo receptor-ligando al núcleo con la consiguiente modulación de la transcripción y síntesis de proteínas. Este es un proceso

de tipo genómico y es lento (>30min.). Sin embargo, en los últimos años se han descrito acciones no genómicas mediadas por hormonas a través de sus receptores (para revisión: *Falkenstein y col., 2000; Schmidt y col., 2000*). Estas acciones ocurren en pocos minutos después de la adición del agente y se han descrito en cuatro clases de esteroides y compuestos relacionados como la vitamina D₃ y la hormona tiroidea (*Wehling y col., 1997*). Por ejemplo, la aldosterona produce efectos rápidos en linfocitos y células de músculo liso, la vitamina D₃ sobre células epiteliales y los estrógenos producen efectos vasculares rápidos (*Wehling y col., 1997*).

Las acciones no genómicas implican activación de rutas de señalización intracelular, que pueden estar o no mediadas por receptores hormonales. Muchos de estos efectos no genómicos implican a la fosfolipasa C, al Calcio y pH intracelular, a la proteína kinasa C y tirosina kinasas. Aunque la relevancia fisiológica y patológica de estos efectos no está clara, se ha visto que los efectos rápidos a nivel cardiovascular, del sistema nervioso central y de reproducción, mediados por hormonas esteroideas pueden ocurrir *in vivo* (*Gilligan y col., 1994*).

Una acción típica no genómica es la producida por el 17β- Estradiol (E₂). El E₂ es un rápido activador de la síntesis de óxido nítrico endotelial (eNOS). El producto de esta activación, el NO, es un factor determinante de la homeostasis cardiovascular. Se ha demostrado que E₂ induce una rápida fosforilación y activación de eNOS a través de la vía de la fosfatidilinositol-3-kinasa (PIK3)/ AKT, este efecto está mediado por su receptor ER mediante un mecanismo no genómico (*Simoncini y col., 2000; Haynes y col., 2000; Hisamoto y col., 2001*). El E₂ tiene un efecto neuroprotectivo

también mediado por la cascada de señalización de la PI3K (*Honda y col., 2000; Honda y col., 2001*). Por otra parte, el gen de la prolactina también está regulado por E₂, entre otros factores, y se ha visto en células pituitarias de rata que la expresión de este gen requiere la vía de transducción de MAPK (*Watters y col., 2000*). Además E₂ produce una rápida activación de rutas de señalización que implican a c-src, MAPK y PI3K en células MCF-7 y Caco-2 (*Migliaccio y col., 1996; Di Domenico y col., 1996; Castoria y col., 2001*).

Otra vía implicada en acciones hormonales no genómicas es la de la c-Jun amino terminal kinasa (JNK). Además de actuar sobre la transcripción génica, la regulación de la actividad de la cascada JNK constituye una alternativa mediante la cual esteroides y retinoides pueden controlar el destino celular y ejercer sus acciones farmacológicas como inmunosupresivos, anti-inflamatorios y antineoplásicos (*Caelles y col., 1997*). Los receptores nucleares endógenos, como GR en células Hela o RAR en células F9, modulan la magnitud de la inducción de JNK. Además, glucocorticoides, RA y T3 pueden ejercer su acción homeostática regulando respuestas celulares a estímulos extracelulares a través de la vía de la JNK (*Caelles y col., 1997*).

La progesterona también produce acciones no genómicas mediante la activación de la vía de JNK. La JNK desempeña un papel importante en la maduración de oocitos y en la embriogénesis en *Xenopus laevis* (*Bagowski y col., 2001*).

La diferenciación de células mieloides inducida por $1\alpha,25$ -dihidroxitamina D_3 (D_3) está regulada por el receptor de vitamina D (VDR) y la vía de la PI3K (*Hmama y col., 1999*).

Existe una clasificación de acciones no genómicas conocida como clasificación Mannheim (*Falkenstein y col., 2000*).

1 \Rightarrow *Acciones no genómicas directas en las que los receptores no están implicados.*

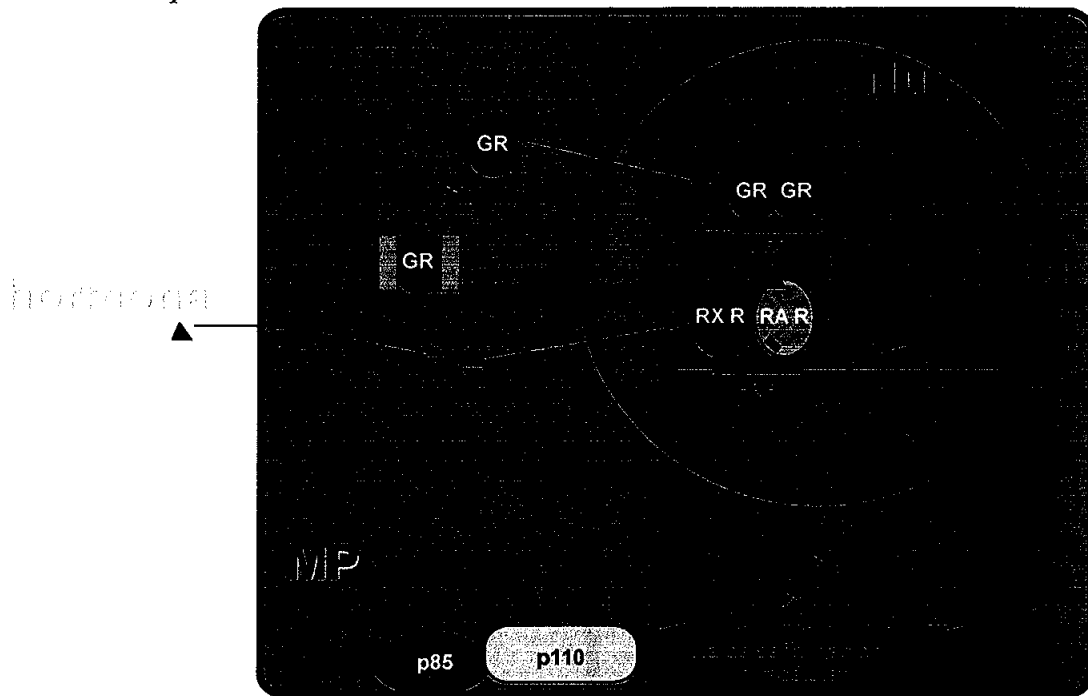


Figura 6. Vías de acción hormonal

Esquema de las posibles vías de acción hormonal. En el caso de los receptores de glucocorticoides la hormona entra en la célula y se une al receptor en el citoplasma, el complejo receptor-ligando pasa al núcleo donde en forma de homodímeros se unen a los HRE y activan la transcripción de genes diana específicos. Otras hormonas, como la T3 y el RA, se unen a receptores nucleares que en forma de heterodímeros reconocen los HRE específicos y producen la activación de la transcripción directamente (vía genómica) típica o bien a través de la activación de rutas de señalización intracelular (vía no genómica).

Los esteroides pueden inducir efectos no genómicos a altas concentraciones. En 1961, Willmer propuso que los esteroides podrían insertarse en las bicapas fosfolipídicas de las membranas alterando la fluidez de las mismas. Estos efectos no genómicos sobre las propiedades de las membranas han sido descritos en varios tipos de células como células de cáncer de pulmón (*Clarke y col., 1990*), células epiteliales vaginales (*Reddy y col., 1989*) y espermatozoides humanos (*Shivaji y Jagannadham, 1992*). Las acciones no específicas de los esteroides se producen a concentraciones supramicromolares, pero también pueden ocurrir a concentraciones mucho más bajas. El metabolito de la vitamina D₃, 1 α 25 (OH)₂D₃ influye en la fluidez de la membrana en condrocitos de rata a concentraciones del orden de nanomoles (*Swain y col., 1993*).

2 ► Acciones no genómicas directas por la vía clásica de receptores intracelulares.

Como hemos visto anteriormente, los estrógenos pueden ejercer acciones rápidas mediadas por el receptor ER α . En células endoteliales de arteria pulmonar fetal de ovejas se produce una estimulación de la actividad de la enzima óxido nítrico sintasa por efecto del 17 β -estradiol en cinco minutos (*Lantín-Hermoso y col., 1997*).

3 ► Acción no genómica directa por la vía no clásica de receptores.

La mayoría de los efectos rápidos de los esteroides sobre señalización celular y función parecen ser transmitidos por receptores de membrana no relacionados con los receptores esteroides intracelulares

clásicos. En leucocitos mononucleares humanos, la aldosterona se une a sitios de membrana a través de los cuales ejerce estas acciones rápidas. La unión saturable específica de la aldosterona a membranas microsomales se demostró con una K_d de ~ 0.1 nM para el radioligando (*Christ y col., 1994; Wehling y col., 1992*). Sin embargo, el antagonista del receptor mineralocorticoide canrenone y el cortisol son inactivos como ligandos a concentraciones micromolares. Estos datos sobre la rápida acción de la aldosterona y la unión a estos sitios son incompatibles con los receptores clásicos intracelulares ya que éstos no discriminan entre aldosterona y cortisol y se unen al antagonista canrenone con una afinidad más alta.

Además de estos efectos *in vitro*, también existen evidencias de acciones rápidas de la aldosterona *in vivo*. La aldosterona produce un incremento de la resistencia vascular periférica y de la presión sanguínea en humanos tras la aplicación de 0.5 mg y en 3 minutos (*Wehling y col., 1998*). La $1\alpha, 25$ (OH) $_2$ -vitamina D $_3$ produce efectos rápidos sobre una gran variedad de sistemas, produce una rápida estimulación del transporte intestinal de calcio (*Norman y col., 1997*), así como una activación rápida de la proteína kinasa C (*Wali y col., 1990; Sylvia y col., 1996; Sylvia y col., 1998*) y la MAPK (*de Boland y Norman, 1998; Song y col., 1998*).

4 ➤ *Acciones indirectas, los esteroides necesitan un ligando como coagonista.*

Los esteroides pueden actuar como coagonistas activando rápidamente la excitabilidad de las neuronas a través de la modulación de efectos GABA (*Nemere, 1995*).

4. FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN HLH.

La familia hélice-lazo-hélice (*helix-loop-helix*, HLH) está constituida por factores de transcripción que desempeñan un papel muy importante en muchos procesos de desarrollo. Hay aproximadamente 240 proteínas HLH que han sido identificadas en todo tipo de organismos, desde la levadura *Saccharomyces cerevisiae* a humanos (Atchley y Fitch, 1997). Estudios en *Xenopus laevis*, *Drosophila melanogaster* y ratones han demostrado convincentemente que las proteínas HLH están íntimamente implicadas en eventos de desarrollo como la diferenciación celular y la determinación del sexo. En levaduras, las proteínas HLH regulan vías metabólicas muy importantes, como la asimilación de fosfatos y biosíntesis de fosfolípidos (Hoshizaki y col., 1990; Berben y col., 1990; Nikoloff y col., 1992). En organismos multicelulares los factores HLH son necesarios para: la neurogénesis, miogénesis, hematopoyesis y desarrollo pancreático (Bain y col., 1994; Zhuang, y col., 1994; Lee y col., 1995).

Clasificación de las proteínas HLH.

Las proteínas HLH se pueden clasificar en función de su distribución, capacidad de dimerización y unión a ADN.

► Clase I: se conocen también con el nombre de proteínas E. En este grupo se encuentran las proteínas E12, E47, HEB y E2-2 entre otras. Estas proteínas se expresan en muchos tejidos y son capaces de formar homo- o heterodímeros (Murre y col., 1989). La especificidad de unión al ADN de las proteínas de clase I está limitada al sitio E-box.

► Clase II: a este grupo pertenecen las proteínas MYOD, Miogenina, atonal, NEURO D y ASCL entre otros. Muestran un patrón de expresión restringido a algunos tejidos. No suelen formar homodímeros y se unen preferentemente heterodimerizando con proteínas E.

► Clase III: a este grupo pertenecen MYC, TFE3, SREBP-1 y los factores de transcripción asociados a microftalmia. Las proteínas de esta clase contienen un motivo de dedo de leucina adyacente (*Henthorn y col., 1991; Zhao y col., 1993*).

► Clase IV: a este grupo pertenecen MAD, MAX y MXI que son capaces de dimerizar con las proteínas MYC o con algunas otras (*Blackwood y Eisenman, 1991; Ayer y col., 1993; Zervos y col., 1994*).

► Clase V: a este grupo pertenecen las proteínas HLH que carecen de dominio básico adyacente como son las IDs y EMC. Son reguladores negativos de las proteínas de clase I y II (*Benezra y col., 1990; Ellis y col., 1990; Garrell y Modolell, 1990*).

► Clase VI: son proteínas HLH que poseen una prolina en la región básica adyacente. A este grupo pertenecen las proteínas HAIRY y el *enhancer* de split de *Drosophila*. (*Klambt y col., 1989; Rushlow, 1989*).

► Clase VII: a este grupo pertenecen proteínas que tienen una estructura bHLH-PAS. Está formado por receptores aromáticos hidrocarbonados, el factor inducible por hipoxia 1 α , SIM y TRH (*Crews, 1998*).

Existe otra clasificación basada en las secuencias de aminoácidos de 242 proteínas HLH (*Atchley y Fitch, 1997*). Se ha creado un árbol filogenético de acuerdo a la relaciones existentes en la evolución de estas

proteínas. Se clasifican principalmente en cuatro grupos, que constituyen más de 24 familias de proteínas identificadas. Los grupos se hicieron en función de su especificidad de unión al ADN así como la conservación de aminoácidos en ciertas posiciones (*Atchley y Fitch, 1997*).

4.1 La subfamilia de proteínas ID

•Las proteínas IDs y el ciclo celular.

Las proteínas ID HLH (*helix-loop-helix*) funcionan en general como reguladores positivos de crecimiento celular y como reguladores negativos de diferenciación celular. Las funciones de las proteínas ID están implicadas en la regulación del ciclo celular, en Kinasas dependientes de ciclinas y en la proteína retinoblastoma. Una faceta que llama la atención de estas proteínas es su habilidad para promover el crecimiento celular e inhibir la diferenciación cuando se expresan ectópicamente en líneas celulares de mamíferos. En experimentos de transfección, los genes *IDs* actúan como cooperantes de oncogenes en la inmortalización de fibroblastos primarios y, bajo condiciones de poco suero, promueven apoptosis. Los IDs son necesarios para la transición de la fase G0 a la fase S en el ciclo celular, del mismo modo que otras proteínas bHLH como E47 y MYOD ejercen un papel antiproliferativo cuando se expresan ectópicamente en líneas celulares produciendo una parada en la fase G1. (*Crescenzi y col., 1990; Sorrentino y col., 1990; Peverali y col., 1994*). El modo en que las proteínas IDs están integradas en la maquinaria reguladora del ciclo celular implica mecanismos que no están directamente relacionados con el efecto antagónico que ejercen los factores

de transcripción bHLH. Concretamente la proteína ID2 se une al supresor de tumores pRb y revierte su efecto de un modo independiente del estado de fosforilación de pRb (*Iavarone y col., 1994; Lasorella y col., 2000*). Esto contrasta con el mecanismo de las CDKs que median la regulación negativa de pRb durante la transición de la fase G1 a la fase S del ciclo celular (*Bartek y col., 1996*). Consistente con esto, la actividad supresora de crecimiento que desempeñan las proteínas inhibidoras de CDK p16 y p21, también es antagonizada eficazmente por ID2, pero no por ID1 ni ID3 (*Lasorella y col., 1996*).

Durante la progresión del ciclo celular (final de la fase G1 e inicio de la fase S) las proteínas de mamífero ID2 e ID3 se fosforilan por ciclinas A y E dependientes de kinasas en un residuo de Serina (*Hara y col., 1997; Deed y col., 1997*). La forma fosforilada de estas proteínas se mantiene durante la fase S y parece que está relacionada con el papel que ejercen en la progresión del ciclo celular .

•Estructura de las proteínas IDs.

Poseen un dominio altamente conservado hélice-lazo-hélice con un papel esencial en la regulación del crecimiento celular y diferenciación (*figura 7*).

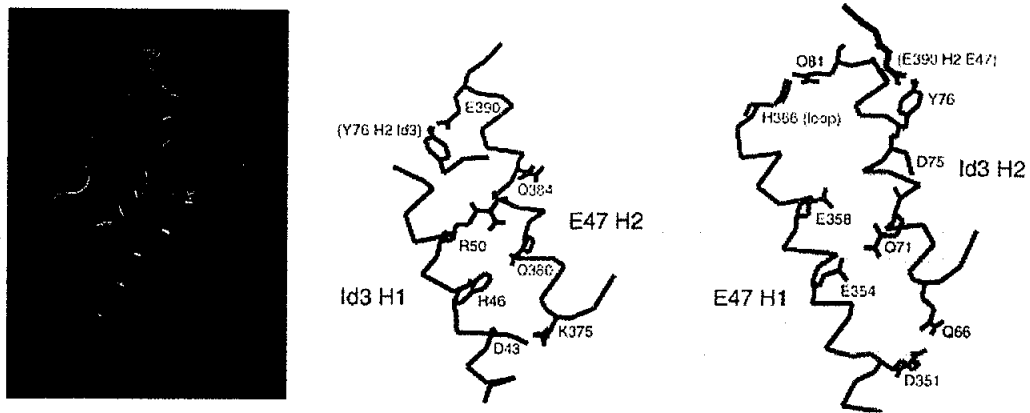


Figura 7. Estructura de las proteínas IDs.

Modelo estructural del dominio hélice-lazo-hélice de ID3. Heterodímero formado por E47 (verde) e ID3 (violeta) (Wibley y col., 1996). (Adaptado por Norton y col., 1998).

Estos factores de transcripción HLH no poseen dominio básico adyacente responsable de la especificidad de unión al ADN. Las proteínas IDs funcionan como reguladores dominante-negativos de algunos factores bHLH al formar heterodímeros no funcionales ID-bHLH que impiden a los bHLH unirse al ADN (figura 8). El prototipo de mamífero de una subfamilia de estas proteínas fue originalmente descrito por Benezra en 1990 (Benezra y col., 1990) y las llamó "Id" (posteriormente Id1), un término que alude a sus propiedades funcionales como "inhibidor de la unión de DNA" e "inhibidor de la diferenciación celular". Se conocen cuatro miembros de esta familia ID1, ID2, ID3 e ID4. Todos los IDs tienen un tamaño similar (13-20 KD). Al margen del dominio HLH altamente conservado (box 3 en la figura 9), sus secuencias divergen, excepto cuatro

dominios más pequeños que presentan homología y que probablemente estén implicados en su función. En el modelo propuesto para el heterodímero de ID3-bHLH los monómeros individuales de HLH se empaquetan formando una estructura de cuatro hélices α estabilizadas por una combinación de interacciones electrostáticas y polares (*figura 7*) (*Wibley y col., 1996*). La región variable del lazo también parece ser importante para la heterodimerización (*Pesce y Benezra, 1993*) y los dímeros ID-bHLH podrían estar estabilizados al adoptar un estado oligomérico múltiple altamente ordenado (*Fairman y col., 1993*).

Las cuatro IDs de mamífero son codificadas por genes individuales que en humanos se encuentran localizados en los cromosomas 20q11 (ID1), 2p25 (ID2), 1p36.1 (ID3) y 6p21-22 (ID4) (*Pagliuca y col., 1995; Mathew y col., 1995; Nehlin y col., 1997; Ellmeier y col., 1992; Deed y col., 1994*). Los genes de los diferentes IDs poseen una organización genómica muy similar, lo que parece indicar la existencia de un gen ancestral común (*Deed y col., 1994*).

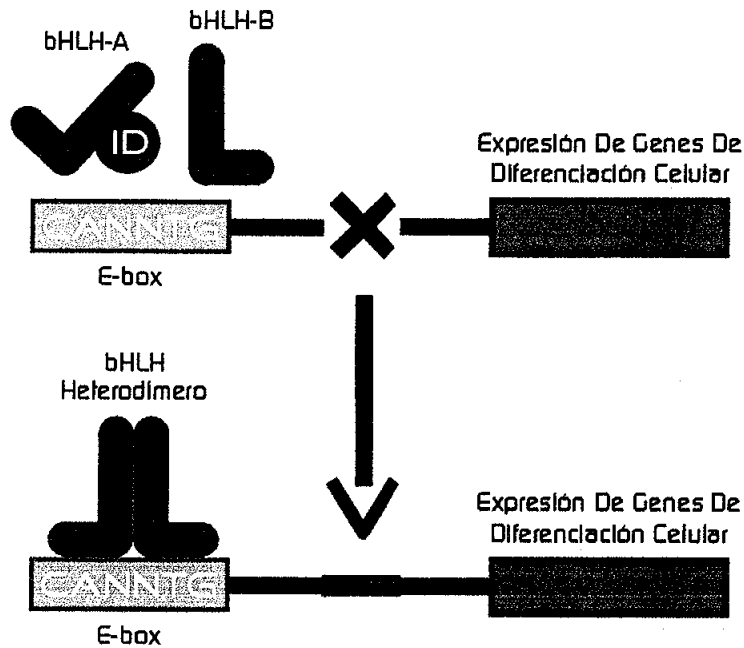


Figura 8. Las proteínas IDs bloquean la diferenciación celular.

Las proteínas IDs actúan como antagonistas dominante-negativos de factores de transcripción bHLH. Las proteínas bHLH se unen a secuencias reguladoras E-box en forma de heterodímeros que activan genes implicados en diferenciación celular. Estos heterodímeros están formados por proteínas de clase A bHLH que se encuentran expresadas ubicuamente, y proteínas de clase B bHLH, específicas de tipo celular (*Kadesch, 1993*). La presencia de un exceso de proteínas IDs, como puede ocurrir en caso de células que estén proliferando, impide la formación de heterodímeros AB y se forman heterodímeros que no son funcionales, entre las proteínas IDs y las A bHLH, porque las IDs no poseen dominio básico y no pueden unirse al ADN.

•Perfil de expresión de genes *IDs*

Como norma general, en líneas celulares, la expresión es alta en células proliferantes y baja o ausente en células quiescentes o diferenciadas totalmente. Una notable excepción es *ID2* que se encuentra regulado positivamente durante la diferenciación de monocitos-macrófagos (*Ishiguro y col., 1996; Cooper y col., 1997*) y está expresado constitutivamente en el resto de linfocitos T pero regulado negativamente en respuesta a la estimulación mitogénica (*Ishiguro y col., 1995*). Sin embargo, en muchos otros tipos celulares, la expresión de genes *IDs*, incluyendo a *ID2*, está fuertemente inducida en respuesta a estimulación de factores mitogénicos y de crecimiento, con un pico de expresión al cabo de 1-3 h, como ocurre en muchos genes tempranos (*Sun, 1994; Hara y col., 1994; Barone y col., 1994*). En órganos adultos se expresan múltiples transcritos (*Christy y col., 1991; Riechmann y Sablitzky, 1995; Pagliuca y col., 1995; Deed y col., 1994*). Durante la embriogénesis, análisis de hibridación *in situ* revelaron un complejo patrón de expresión temporal y específico de tejido en el cual se solapan en parte transcritos de *ID1*, *ID2* e *ID3* pero *ID4* se expresa de forma diferente (*Ellmeier y col., 1992; Jen y col., 1997; Jen y col., 1996; Riechmann y Sablitzky, 1995*).

En el cerebro en desarrollo, la expresión de *ID3* e *ID4* es mutuamente excluyente (*Riechmann y Sablitzky, 1995*).

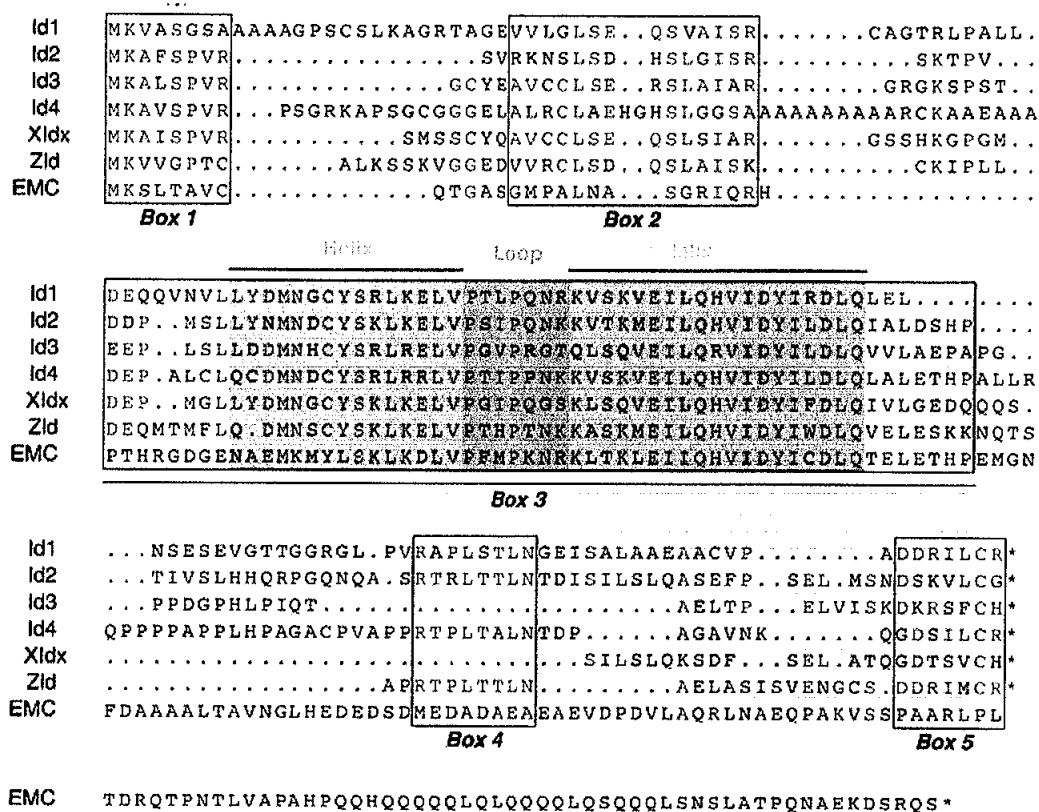


Figura 9 Alineamiento de las secuencias de proteínas IDs.

Se muestran las secuencias de ID1 de ratón (*Benezra y col., 1990*), ID2 (*Sun y col., 1991*), ID3 (*Christy y col., 1991*) e ID4 (*Riechmann y col., 1994*), de *Xenopus* (Xidx) (*Wilson y Mohun, 1995*), pez cebra (Zid) (*Sawai y Campos-Ortega, 1997*) y *Drosophila* (EMC) (*Ellis y col., 1990; Garrell y Modolell, 1990*). Las secuencias idénticas están marcadas en rojo. Las secuencias homólogas son las cajas 1-5. Se muestran en amarillo los sitios consenso (SPVR) para fosforilación (P) por ciclinas-E/A-CDK2 dentro de la caja 1. Los * indican los codones de parada. Se indica en verde las regiones correspondientes a la estructura de hélice y en morado a la estructura del lazo. (Adaptado por *Norton y col., 1998*).

•Funciones de las proteínas IDs

Las proteínas IDs están implicadas en muchos procesos del desarrollo biológico. Pueden actuar como reguladores de destino celular (*Ellis y col., 1990; Martinsen y Bronner-Fraser, 1998; Yokota y col., 1999; Rivera y col., 2000; Janatpour y col., 2000*). También intervienen en la embriogénesis y organogénesis (*Garrell y Modolell, 1990; Ellis y col., 1990, Yokota y col., 1999; Lyden y col., 1999*). Promueven el crecimiento celular y detienen la diferenciación (*Jen y col., 1992; Iavarone y col., 1994; Sun y col., 1994; Desprez y col., 1995; Atherton y col., 1996; Morrow y col., 1999; Kondo y Raff, 2000*) por lo que están implicados en la progresión del ciclo celular (*Barone y col., 1994; Hara y col., 1994; Peverali y col., 1994*). Las proteínas IDs pueden inducir apoptosis. ID2 induce la expresión del gen apoptótico *BAX* (*Norton y Atherton, 1998; Florio y col., 1998; Kim y col., 1999*). ID2 produce apoptosis en células precursoras de mieloides y osteosarcoma, el modo en que lleva a cabo este efecto es independiente de la dimerización con otros factores HLH a diferencia de lo que ocurre en procesos de proliferación y diferenciación. Este efecto apoptótico no es producido por ID3 sino que la capacidad de inducir apoptosis reside en el extremo amino terminal de ID2. Los cultivos primarios de astrocitos expresan todos los IDs. Estos cultivos en presencia de suero durante cuatro semanas elevan los niveles de ID4, la sobreexpresión de ID4 en estos cultivos induce apoptosis, sin embargo cuando se trata con cAMP se produce la diferenciación de astrocitos y una disminución dramática y selectiva de los niveles de ID4 (*Andres-Barquin y col., 1999*). Por otra

parte, *ID1* e *ID3* regulan negativamente la miogénesis de células musculares en cultivo. La sobreexpresión de *ID2* inhibe la diferenciación de mioblastos pero no ocurre así con *ID4* (Melnikova y col., 1999).

Pueden inmortalizar células primarias mediante la activación de la telomerasa (Alani y col., 1999) y funcionar como oncoproteínas *in vivo* (Wice y Gordon, 1998; Kim y col., 1999; Morrow y col., 1999), además son requeridas para la angiogénesis *in vivo* y promueven invasión de tumores (Desprez y col., 1998; Lyden y col., 1999; Lin y col., 2000).

Estudios con ratones *Knockout* han mostrado que se necesita al menos una copia de un gen *ID1* o *ID3* para evitar la muerte de estos embriones mutados, asociada con una diferenciación prematura y defectos angiogénicos en el cerebro (Lyden y col., 1999). La letalidad es debida, probablemente, a una hemorragia intraventricular lo que produce la muerte en humanos (Perlman y Volpe, 1986) y roedores (Bader y col., 1998).

Reducir la dosis de proteínas IDs podría tener efectos sobre el crecimiento y la metástasis de tumores. Además, los niveles de estas proteínas en tejidos adultos de humanos son extremadamente bajos. Por todo ello, las proteínas IDs podrían ser importantes dianas de drogas de diseño anti-angiogénicas extremadamente útiles en el tratamiento de tumores.

Objetivos:

Análisis y caracterización de los mecanismos moleculares a través de los cuales el ácido retinoico induce diferenciación en las células SH-SY5Y. Para ello llevaremos a cabo un análisis y caracterización de genes regulados por ácido retinoico en la línea celular de neuroblastoma humano SH-SY5Y e intentaremos estudiar el posible papel de alguno de los genes encontrados en la diferenciación neuronal.

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES

1. PRODUCTOS

1.1 Reactivos químicos.

Los productos y reactivos empleados en el laboratorio fueron suministrados por las siguientes casas comerciales: Amresco, Biorad, Biotools, Pharmacia, Prolabo, Gibco, Merck, Promega, Pronadisa, Scharlau, Serva y Sigma.

1.2 Productos de Biología Molecular.

Los enzimas fueron suministrados por: Roche, Life Technologies, Promega, Biotools. Los cebadores empleados fueron adquiridos a: Amersham Pharmacia Biotech, Isogen Bioscience y Genset Oligos.

1.3 Material radiactivo.

Los productos radiactivos empleados: [$\alpha^{32}\text{P}$]-dCTP (10mCi/ml), [$\alpha^{32}\text{P}$]-UTP (10mCi/ml), [$\gamma^{32}\text{P}$]-ATP (10mCi/ml) fueron suministrados por Amersham Pharmacia Biotech y New England Nuclear.

2. CULTIVOS CELULARES.

2.1 Materiales.

El material de plástico utilizado en cultivos celulares fue suministrado por Sarstedt. Los medios de cultivo RPMI, suero fetal de ternera, Glutamina y antibióticos fueron suministrados por Bio-Whittaker y Gibco. El ácido todo trans retinoico (RA), el forbol 12-miristato-13-acetato (TPA), el inhibidor de la PI3K LY294002 y la cicloheximida (CHX) se obtuvieron de Sigma.

2.2 Líneas celulares.

-Células SH-SY5Y: línea celular de neuroblastoma humano (ATCC: CRL 2266) cedida por los Dres. Angel Pascual y Ana Aranda (IIB, CSIC-UAM, Madrid). Se incuban a 37°C y 5% de CO₂. Medio de cultivo: RPMI 1640, 10% suero fetal bovino, glutamina 2 mM, gentamicina 0.2 mg/ml, fungizona 0.5 µg/ml. Se crecen hasta una densidad de 80-90% en placas de 100/150 mm y se diluyen 1:5 cada 2-3 días.

2.3 Tratamientos.

Las células SH-SY5Y se pasan un día antes de hacer el tratamiento. A las células consideradas control se les cambia el medio simultáneamente al cambio por medio tratado del resto de placas. Los tratamientos con RA y TPA se hicieron añadiendo 1 μM y 100 nM respectivamente al medio RPMI completo. Se hicieron pre-tratamientos con 10-50 μM LY294002 y 10 $\mu\text{g/ml}$ CHX, tras el transcurso de una hora se añadió directamente al medio pretratado 1 μM RA.

3. SONDAS.

Las sondas de cDNA para Northern Blot y Run-on se obtuvieron en su mayoría como clones de ADNc del Consorcio IMAGE (LLNL) (*Lennon y col., 1996*), a través del *Human Genome Mapping Program Resource Centre* del Reino Unido (UK HGMP RC).

Nombre	Símbolo	IMAGE clone ID	Acceso	Tamaño (Kb)
Achaete-Scute-like 1	<i>ASCL1</i>	1569301	AI793261 AA973580	0.8
Artemina	<i>ARTN</i>	2465029	AI935302	1.3
BCL2	<i>BCL2</i>	232714	H74208 H73130	1.3
CENP-F (Mitosina)	<i>CENPF</i>	122060	T98383 T98384	1.0
GAP43	<i>GAP43</i>	610197	AA171547 AA171875	1.2
GFR α -1	<i>GFRA1</i>	1700429	AI049675	1.5
GFR α -2	<i>GFRA2</i>	43207	H05619 H12981	1.2

Nombre	Símbolo	IMAGE clone ID	Acceso	Tamaño (Kb)
GFR α -3	<i>GFRA3</i>	2150100	AI887844	0.5
Hairy (HES-1)	<i>HRY</i>	299820	W05829 N77872	1.3
hsp89 α	<i>HSPCA</i>	995519	AA53012	0.8
HT036	<i>HT036</i>	433419	AA694184	0.8
ID1	<i>ID1</i>	235131	H79454 H79339	1.3
ID2	<i>ID2</i>	203370	H54369 H54291	0.7
ID3	<i>ID3</i>	148057	H13599 H13232	1.0
ID4	<i>ID4</i>	1032880	AA628493	0.3
NeuroD1	<i>NEUROD1</i>	2518343	AI878975	3.0
NeuroD6 (Hath2, Nex1)	<i>NEUROD6</i>	171864	H19169 H18504	0.8
Neurogenina1	<i>NEUROG1</i>	383463	AA074359	1.5
Neurturina	<i>NRTN</i>	2558497	AW050617	1.2
OCRL	<i>OCRL</i>	490412	AA122019 AA122020	1.2
PI3- Kinasa p110 α	<i>PIK3CA</i>	2286773	AI628512	2.3
PI3- Kinasa p110 β	<i>PIK3CB</i>	645170	AA206574	2.5
PI3- Kinasa p110 γ	<i>PIK3CG</i>	1471326	AA885030	1.0
Receptor de Laminina 37/67 KD	<i>LAMR1</i>	1271323	AA748648	1.0
RET tirosin kinasa	<i>RET</i>	4127655	BF311041	2.5
Ribonucleoprot. HnRNP R	<i>HRPR</i>	610945	AA173842 AA173790	0.8
RNP CGI-110	<i>LOC51639</i>	1007840	AA225897 AA226090	0.7
Sinaptotagmina IV	<i>SYT4</i>	632239	AA164770 AA166875	4.0
Espermidina sintetasa	<i>SRM</i>	485174	AA039409 AA039306	0.8
Ubiquitin-like 5	<i>UBL5</i>	714237	AA293612	0.9

Nombre	Símbolo	IMAGE clone ID	Acceso	Tamaño (Kb)
Zinc Finger FLJ12298	<i>FLJ12298</i>	915064	AA579152	0.8

Tabla1. Sondas

Se indica el nombre, el símbolo, la clave de *Image clone ID*, la clave de acceso y el tamaño en Kb de cada sonda empleada.

Algunas de las sondas fueron amablemente proporcionadas por otros investigadores:

- La sonda para el oncogen c-myc (*MYC*), que incluye un fragmento de 1.4 Kb correspondiente al exon 3 del ADN genómico de *MYC*, (pMC413RC, *Dalla-Favera y col., 1983*), fue donado por la Dra. Ana Aranda (IIB, CSIC-UAM, Madrid).
- El plásmido pG4PTA, que contiene el ADNc completo (0.6 Kb) de la Protimosina α (*PTMA*), fue donada por la Dra. Clara Alvarez (Depto. de Fisiología, Universidad de Santiago de Compostela).
- La sonda de ADNc de la Hidroxiacil-coA deshidrogenasa II (ERAB, *HADH2, Sambamurti y Lahiri, 1998*) (1.0 Kb) fue donada por el Dr. Kumar Sambamurti (Dept. of Pharmacology, Mayo Clinic. Jacksonville, Florida, USA).
- La sonda de ADNc del *GDNF* (0.4 Kb) fue donada por los Dres. Jens Pohl y Michael Hanke (Biopharm GmbH, Heidelberg, Alemania).

- La sonda de ADNc del RAR β 2 (*RARB*, de *The y col., 1987*) (1.5 Kb) fue donada por el Dr. Henk. G. Stunnenberg (Dept. of Molecular Biology. University of Nijmegen, Holanda)

Finalmente, otras sondas fueron generadas por PCR, utilizando como molde el ADNc (primera hebra) obtenido a partir de ARN total de células SH-SY5Y.

- La sonda de la Ciclofilina A (peptidil-prolil-isomerasa A, *PPIA*) (*Haendler y col., 1987*), se generó a partir de un fragmento de PCR de 415 bp, obtenido con los cebadores: HCYC-U 5'-CTG CTC CTT TGA GCT GTT TG-3' y HCYC-L 5'-GGT GAT CTT CTT GCT GGT CT-3'.
- La sonda de la β -actina (*ACTB*) (*Vandekerckhove y Weber, 1978*), se generó a partir de un fragmento de PCR de 183 bp, obtenido con los primers: HBACT-U 5'-AGC ACG GCA TCG TCA CCA ACT-3' y HBACT-L 5'-ACA TGG CTG GGG TGT TGA AGG-3'.
- La sonda para el Neuropeptido Y (*NPY*) (*Takeuchi y col., 1986*), se generó a partir de un fragmento de PCR de 403 bp, obtenido con los primers: NPY-U 5'-GCC AGC CAC CAT GCT AGG TAA-3' y NPY-L 5'-AGT GGC TGC ATG CAT TGG TAG-3'.

4. ANTICUERPOS.

Los anticuerpos monoclonales de ratón específicos para la fosfotirosina PY99, la fosfotirosina PY20 y la α -tubulina fueron suministrados por Santa Cruz Biotechnology. Los policlonales de conejo específicos para p110 α , p110 β , p110 γ , RET, ID1, ID2 e ID3 fueron suministrados por Santa Cruz Biotechnology.

MÉTODOS

1. EXTRACCIÓN DE ARN

Para la obtención de ARN total se utilizó el método de extracción con isotiocianato de guanidina-fenol-cloroformo (*Chomczynski y Sacchi, 1987*). Una vez extraído, se comprueba la integridad del ARN mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% en TAE. La concentración de ARN se estima espectrofotométricamente por absorbancia a 260 nm, conservando las muestras alicuotadas a - 80 °C hasta su utilización.

2. TÉCNICA DE DISPLAY DIFERENCIAL ORDENADO

Hemos empleado el Display Diferencial Ordenado (*Matz y col., 1997; Matz y Lukyanov, 1998*). Esta técnica es una modificación del Display Diferencial tradicional (*Liang y Pardee, 1992*) y consta de varias etapas (*figura 11*):

2.1 Síntesis de ADN complementario.

Se hace una transcripción reversa con la enzima *Superscript RT* partiendo de 1 µg de ARN total, extraído de células SH-SY5Y con el cebador T (*figura 11*) que hibrida con la cola de poli (A) y deja un extremo 3' libre que se extiende con la transcriptasa reversa. Se forma una molécula híbrida ARN-ADN. En este punto, el ARN se degrada con *RNasa H* creando unos huecos que permiten a la *DNA polimerasa I* copiar la segunda cadena incorporando los correspondientes nucleótidos. Finalmente la muestra se trata con *T4 DNA polimerasa* para producir extremos romos.

2.2 Digestión del ADNc con *Rsa I*.

Este ADNc de doble cadena, previamente purificado con fenol-cloroformo, se digiere con la enzima de restricción *Rsa I* que reconoce la secuencia GT/AC y corta con alta frecuencia produciendo fragmentos de unos 300-500 pares de bases y de extremos romos.

Comprobación de la digestión.

Para comprobar que la enzima de restricción ha cortado completamente, hemos diseñado un test en el que se realiza una reacción de PCR para el ADNc de actina con los cebadores correspondientes (*ver Materiales párrafo 3*). Entre los sitios de hibridación de los cebadores hay un sitio *Rsa I*, de modo que el ADN cortado no puede amplificarse. La

PCR se realiza con cantidades equivalentes de material de antes y después de la digestión. La reacción hay que hacerla de modo semicuantitativo, porque si se hacen muchos ciclos directamente (ej. 30 ciclos) la presencia de pequeñas cantidades de ADNc resistente al corte puede llevar a conclusiones equivocadas. Normalmente hacemos reacciones de 25 μ l, tomando alícuotas de 3 μ l a 16, 19, 22, 25, 28 ciclos que luego se cargan en un gel de agarosa al 1.5% en TAE. Ha de observarse una diferencia de al menos 4-5 ciclos en la aparición del producto de PCR entre la muestra no cortada y la digerida con *Rsa I*, lo que significa un 94-96 % de digestión.

2.3 Ligación con el adaptador.

Al ADNc digerido se le liga un adaptador. Se utilizan cantidades equimolares del adaptador U y L previamente anillado. El adaptador U+L utilizado es de pseudo-doble cadena, está formado por dos oligonucleótidos: uno de 43 pb y otro más pequeño de 12 pb complementario al lugar 3' del largo (*figura 10*). Sólo el oligo de mayor longitud se liga al ADNc ya que ambos carecen del grupo 5'fosfato, el pequeño sirve para orientar la hebra larga. La ligación se lleva a cabo con la enzima *T4 DNA ligasa*. Las ligaciones se diluyen 1:5 con 40 μ l de agua milli Q para el siguiente paso.

2.4 Amplificación por PCR de los fragmentos de interés.

Este ADNc cortado y ligado al adaptador se utiliza para hacer una PCR con la enzima *Platinum Taq DNA polimerasa* y con el cebador T y un cebador externo (cebador O) que hibrida con el adaptador a una

temperatura de anillamiento de 65°C (*figura 11*). Con esta PCR sólo se amplifican los fragmentos que contengan la cola de poli (A) y el adaptador. Este conjunto de ADNc es selectivamente amplificado con los cebadores T y O, mientras que la amplificación de los fragmentos internos de ADNc, así como la contaminación con ADN genómico o ARN ribosomal, es suprimida porque no hibridan con el cebador T. El cebador O no puede amplificar por sí sólo estos fragmentos porque durante la PCR se forman estructuras secundarias en forma de sartén que bloquean el lugar de hibridación (*figura 11*).

El número de ciclos de la PCR se determina empíricamente de la siguiente manera: se pone una reacción de PCR y se toman 3 µl de muestra a 15, 17, 19, 21 ciclos... Se cargan las alícuotas en un gel de agarosa al 1.5 % en TAE. Cuando se vea señal alrededor de 500 pb se ha alcanzado el número óptimo. En general, siempre hemos detectado la señal entre 17 y 20 ciclos. Luego se hace una PCR con el número de ciclos óptimo determinado, que se usará como base para la segunda PCR, después de diluir 100 veces con agua.

2.5 Amplificación de los subconjuntos.

El conjunto de fragmentos de ADNc 3', amplificados selectivamente en la primera reacción de PCR, es objeto de comparación, de modo que las moléculas de ARNm son discriminadas en base a la distancia entre la cola de poli (A) y el sitio Rsa I más cercano al extremo 3'. Para hacer más

sencilla la comparación, este conjunto de fragmentos de PCR, se subdivide en grupos amplificados con cebadores específicos diseñados en base a la secuencia que está adyacente a la cola poli (A) y el sitio de restricción *Rsa I*. Estos cebadores están diseñados con una extensión de dos bases en el extremo 3' (*figuras 10 y 11*). En los cebadores internos extendidos sólo las dos bases distales son relevantes en la especificidad de los subconjuntos amplificados, ya que las bases proximales (CC) que cubren el sitio *Rsa I* tienen una base cambiada (TG en la cadena complementaria); este cambio (*mismatch*) en la 4ª posición del extremo 3' del cebador contribuye a hacer el anillamiento más selectivo. De esta forma en cada PCR se selecciona 1/192 parte del conjunto total (existen 192 combinaciones, 16 posibles variaciones del adaptador específico IE y 12 de cebador TE). Los cebadores internos extendidos se marcan radiactivamente con [$\gamma^{32}\text{P}$]-ATP utilizando la enzima *T4 polinucleótido Kinasa*. Después de marcar, la enzima se inactiva calentando 20 segundos a 100°C. Tras enfriar se añaden 40 μl de agua y se separa la sonda mediante cromatografía de filtración en gel Sephadex G-50 (Amersham Pharmacia Biotech) en columnas preparadas en el laboratorio.

Para la segunda PCR se usa la cantidad adecuada de cebador correspondiente a 500.000 cpm añadiendo cebador frío hasta tener un total de 2 pmoles en la reacción. El número de ciclos óptimo para esta segunda PCR se calcula del mismo modo que para la anterior, pero utilizando en este caso cebadores internos extendidos fríos (no marcados radiactivamente). El número estimado fue de 20 ciclos y la temperatura de anillamiento empleada 69°C.

Secuencias de cebadores y adaptadores utilizados en el DDO:

5'- TGTAGCGTGAAGACGACAGAA	cebador O
5'- AGGGCGTGGTGCGGAGGGCGGT	cebador In
5'- AGGGCGTGGTGCGGAGGGCGGTCCXX	IE-XX
5'- AGGGCGTGGTGCGGAGGGCGGTCCTA	IE-TA (p.ej)

Adaptador U+L

5'- TGTAGCGTGAAGACGACAGAAAGGGCGTGGTGCGGAGGGCGGT
3'-CGCCTCCCGCCA- 5

5'- CGCAGTCGACCG(T)13	T-primer
5'- CGCAGTCGACCG(T)13XX	TE-XX
5'- CGCAGTCGACCG(T)13GC	TE-GC (p.ej.)

Figura 10.
Secuencias de los cebadores y el adaptador utilizados en el DDO.

2.6 Electroforesis en geles de poliacrilamida.

Para comparar los ADNc amplificados por PCR, se cargan en un gel de secuencia preparado con acrilamida al 6 % en TBE 2X. Al correr el gel se pone TBE 2X en la cubeta de electroforesis inferior y TBE 1X en la superior. Esto produce un gradiente de fuerza iónica que mejora la resolución de los fragmentos de alto peso molecular. El gel se precorre en un aparato de electroforesis vertical *Modelo S2001 de Life Technologies* durante 5 minutos a 2000 V, 30 mA y $W_{cte} = 25 W$ con una fuente *Power*

Pac 3000 de Biorad. Se toman 3 μ l de la 2ª PCR y se añaden 3 μ l de tampón de carga de secuencia (95% formamida, 20 mM EDTA, 0.05 % azul de bromofenol, 0.05 % Xyleno Cianol FF) y se denaturan 5 minutos a 95°C. Los pocillos del gel se lavan inmediatamente antes de cargar las muestras con TBE 0.4 X. En un carril del gel se cargan 30.000-50.000 cpm de marcador (MWM V, Roche) marcado radiactivamente del mismo modo que los cebadores. Finalmente se cargan las muestras y se corre a 2000 V, 30 mA y $W \text{ cte} = 25 \text{ W}$ durante tres horas aproximadamente, hasta que el marcador de xylene cyanol haya corrido unos 3/4 del gel.

2.7 Recuperación y amplificación de las bandas de interés.

Tras correr el gel, se seca en un aparato *Slab Gel Dryer SG-4050 de TDI* durante 1 h a 80 °C. Luego se coloca sobre un papel 3 MM en el que se hacen varias marcas con tinta radiactiva (1000 cpm/ μ l) para poder alinearlos correctamente con la película una vez revelada. La exposición se hace con una película autorradiográfica *Konica X-Ray film AX* (Sakura). Las películas se revelaron en un aparato *Curix-60* de Agfa. Tras revelar el film, las bandas expresadas diferencialmente entre las distintas poblaciones se cortan del gel y se extrae el ADN. Se hace una PCR con 5-10 μ l de muestra y los cebadores T e IN y 30-35 ciclos y se carga en un gel de agarosa al 1.5 % para comprobar el tamaño. El resto de muestra se purifica con unas columnas *CONCERT Rapid PCR purification Kit* (Life Technologies). Y finalmente se secuencian con el cebador IN (Servicio de Secuenciación del Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas-CSIC).

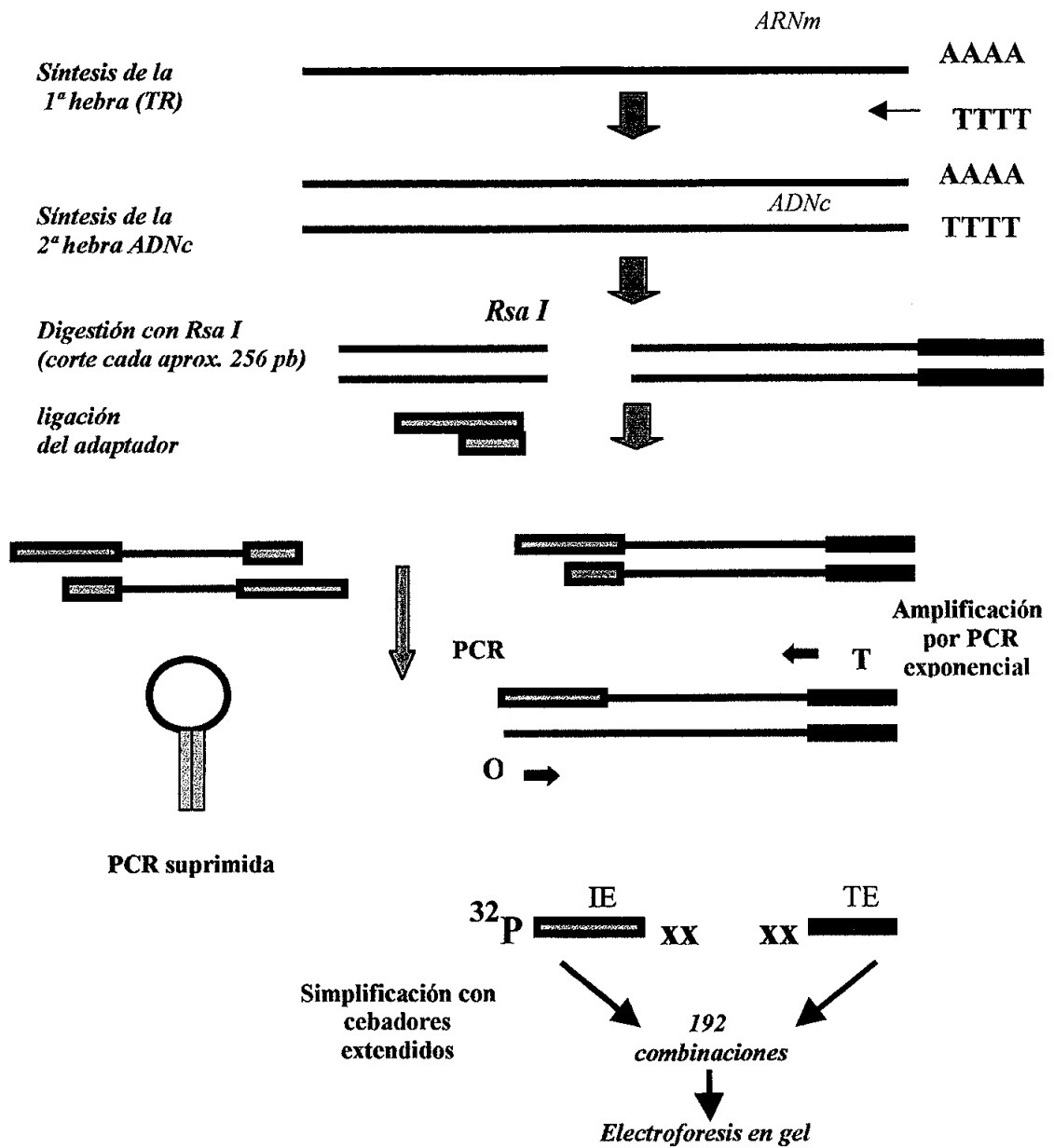


Figura 11.

Esquema de la técnica de Display Diferencial Ordenado.

2.8 Identificación de secuencias.

Las comparaciones de secuencias se realizaron con el programa BLAST® (*Basic Local Alignment Search Tool, Altschul y col., 1990*).

Para identificar los genes expresados diferencialmente se compararon las secuencias obtenidas con las siguientes bases de datos:

1. EMBL DNA sequence Databank. En el servidor del EBI:
<http://www2.ebi.ac.uk/blast2/>

2. TIGR (The Institute of Genome Research) Human Unique Gene Index (incluye Tentative Consensus and Singleton EST sequences y engloba la información pública sobre ESTs). En el servidor del TIGR:

http://www.tigr.org/cgi-bin/BlastSearch/blast_tgi.cgi?organism=Human

3. Ensembl Databases (genome golden path, ADNs complementarios confirmados y predichos). Proyecto conjunto del EMBL-EBI y el Sanger Centre. Incluye los datos públicos del Programa del Genoma Humano.

<http://www.ensembl.org/perl/blastview>

4. Blast the Human Genome (en el NCBI). Incluye los datos públicos del Proyecto del Genoma Humano (genoma, mRNAs y mRNAs predichos con gene_scan).

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/seq/HsBlast.html>

5. Celera Consensus Human Genome. Conjunto de bases de datos hechas públicas por Celera, utilizadas para el artículo publicado en 2001 (*Venter y col., 2001*). Incluye: transcritos, regiones que contienen genes, esqueleto del genoma, y regiones no ensambladas del genoma.

http://publication.celera.com/celerascience/homediscovery.cfm?object_name=Discovery%20System&parent_menu=Discovery%20System

3. ANÁLISIS POR NORTHERN BLOT.

3.1 Extracción de ARN

(*ver Métodos párrafo 1*)

3.2 Transferencia a membrana.

Las muestras de ARN (15 µg) obtenidas de las células SH-SY5Y se separaron por electroforesis en geles de agarosa-formaldehído y se transfirieron a membranas de nylon (Nytran N, Schleicher & Schuell) según protocolos estándar (*Sambrook y col., 1989; Ausubel y col., 2000*). El ARN se fijó a la membrana mediante irradiación con 120 mJ/cm² de luz UV a 254 nm en un aparato *Bio-Link BLX-254*. Para comprobar la eficiencia de la transferencia, así como la igualdad de carga de los diferentes carriles, los filtros se tiñeron con 0.04 % azul de metileno en 0.3 M acetato sódico pH=5.5.

3.3 Sondas radiactivas.

Las sondas se obtienen por PCR o bien por extracción del ADN plasmídico mediante una midiprep (Kit *Concert High Purity Plasmid Midiprep system* de Gibco), siendo posteriormente digerido con enzimas de restricción para extraer el fragmento de interés y purificarlo.

Las sondas de ADNc (10 ng) se marcaron utilizando el Kit *RadPrime DNA Labeling System* de Life Technologies. El ADN marcado con [$\alpha^{32}\text{P}$]-dCTP se separó de los nucleótidos no incorporados mediante cromatografía de filtración en gel Sephadex G-50 (Amersham Pharmacia Biotech) en columnas preparadas en el laboratorio.

3.4 Hibridación y lavado de membranas.

Las membranas se prehibridaron a 65°C, siguiendo una modificación del método de *Church y Gilbert (1984)*, durante al menos 30 minutos en solución de hibridación (14 % SDS, 500 nM fosfato sódico pH=7.2, 1 mM EDTA) en un horno de rotación *Combi-H de Finemould Precision Ind. Co.* Posteriormente se añadieron 10 ml de solución de hibridación nueva y la sonda radioactiva (10^6 cpm/ml de solución de hibridación) previamente desnaturalizada a 100°C durante 5 minutos. La hibridación se llevó a cabo durante al menos 16 horas a 65°C. A continuación se lavaron los filtros con una solución 0.5X SSC, 0.1% SDS durante 20-30 minutos a 65°C .

3.5 Autorradiografía.

Para detectar las señales radiactivas las membranas hibridadas se expusieron a una película autorradiográfica *Konica X-Ray film AX* (Sakura). Las exposiciones se hicieron a varios tiempos en casetes con pantallas intensificadoras a - 80°C. Las películas se revelaron en un aparato *Curix-60* de Agfa.

4. INMUNODETECCIÓN DE PROTEÍNAS (WESTERN BLOT)

4.1 Obtención de extractos de proteínas.

Se obtuvieron extractos totales de proteínas lisando las células SH-SY5Y sobre la placa con un tampón RIPA (50 mM Hepes pH=7.4, 150 mM NaCl, 10% glicerol, 1.5 mM MgCl₂, 1 mM EGTA, 100 mM NaF, 1% tritón X-100, 1% deoxicolato sódico, 0.1% SDS) al que previamente se añadieron inhibidores de proteasas y fosfatasas (10 µg/ml aprotinina, 10µg/ml leupeptina, 1mM PMSF, 1mM ortovanadato sódico). Con la ayuda de un rascador se recogió y centrifugó el lisado, el sobrenadante se pasó 10 veces por una aguja para romper el ADN. La concentración de proteínas se midió con un Kit *Biorad DC Protein Assay*.

4.2 Geles de acrilamida y transferencia a membrana.

Los geles de poliacrilamida-SDS para proteínas y la transferencia a membranas se hicieron según protocolos estándar (*Sambrook y col., 1989*).

Las proteínas se transfirieron mediante el sistema semiseco, con un aparato *Trans blot SD semi-dry transfer cell* de Biorad, a membranas de nitrocelulosa (Hybond ECL de Amersham Pharmacia Biotech) durante 1 hora a 0.8mA/cm² con una fuente *Power Pac 3000 de Biorad*. Posteriormente se comprobó la eficiencia de la transferencia de proteínas por tinción con rojo-Ponceau (0.5% rojo-ponceau, 1% ácido acético glacial).

4.3 Bloqueo e incubación con los anticuerpos.

Las membranas se bloquearon durante al menos dos horas con: PBS 1X, 0.1% Tween, 5 % leche desnatada en polvo, con agitación y a temperatura ambiente. A continuación se incubaron con el anticuerpo primario correspondiente disuelto en la solución de bloqueo (1:500-1:1000) durante 16 horas a 4°C. Finalmente y tras tres lavados de 8 minutos a temperatura ambiente con PBS 1X, Tween 0.1%, se incubaron con el anticuerpo secundario correspondiente, conjugado con peroxidasa, disuelto en la solución de bloqueo (1:1000) durante 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente se hicieron cuatro lavados de 8 minutos con PBS 1X, Tween 0.1% a temperatura ambiente. La detección de la señal se hizo por quimioluminiscencia (ECL, Amersham Pharmacia Biotech).

5. ENSAYOS DE CAMBIO EN LA MOVILIDAD ELECTROFORÉTICA EN GEL.

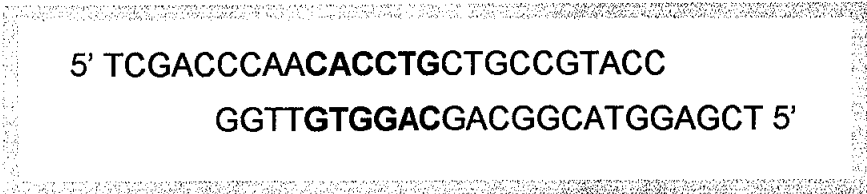
5.1 Obtención de extractos de proteínas.

Los extractos proteicos se obtuvieron de las células en cultivo tratadas con 1 µM RA a diferentes tiempos. Las células se lavan

previamente con PBS, se añaden 2 ml/placa de 100 mm de solución TEN (20 mM Tris, 10 mM EDTA, 100 mM NaCl) para levantar las células, se centrifugan y se guardan los precipitados congelados en nitrógeno líquido. Posteriormente se lisan en tampón de lisis (10mM HEPES pH 7.9, 0.1mM EDTA, 5% glicerol, 400 mM NaCl, 1 mM DTT, 1mM PMSF) y se estima la concentración con un Kit *Biorad Protein Assay*.

5.2 Sonda radiactiva.

El oligonucleótido de doble cadena MCKE que corresponde a la secuencia del E-box presente en el *enhancer* de la creatina kinasa de músculo fue marcado con [$\alpha^{32}\text{P}$]-dCTP. Este oligonucleótido posee extremos 5' protuberantes que se rellenan con la enzima *Klenow* de la *DNA polimerasa*. El ADN marcado se separó de los nucleótidos no incorporados mediante cromatografía de filtración en una columna Sephadex G-50 (Amersham Pharmacia Biotech) preparada en el laboratorio.



5' TCGACCCAACACCTGCTGCCGTACC
GGTTGTGGACGACGGCATGGAGCT 5'

Figura 12. Secuencia de la sonda MCKE

En negrita se marca la secuencia correspondiente a la caja E-box.

5.3 Ensayo de movilidad electroforética.

Los extractos proteicos (5-15 μg) se incuban 15 minutos en hielo en un volumen final de 12 μl (20 mM HEPES pH 7.9, 100 mM Na Cl, 0.1 mM EDTA, 1mM DTT, 20 % glicerol, 0.1 % Tritón X-100, 200 μg BSA, 2 μg poli (dI-dC)). Tras la adición de la sonda se incuban otros 10 minutos en hielo antes de cargarlos en el gel. El gel se precorre a un voltaje de 300V durante 1h y a 4 °C en un aparato *Power Pac 3000 de Biorad*. Las muestras se cargan en un gel de acrilamida-bis acrilamida 30:1 al 6% en TBE 0.5X, y se corre a un voltaje de 300V durante 2 horas y a 4°C. Posteriormente se seca durante 1 h a 80°C en un aparato *Gel Dryer (modelo 583)* de Bio-Rad. Finalmente se expone a una película autorradiográfica *Konica X-Ray film AX(Sakura)* a - 80°C y se revela en un aparato *Curix-60* de Agfa.

6. TRANSCRIPCION RUN ON.

6.1 Obtención de núcleos y marcado del ARN naciente.

Las células se levantan de las placas con tripsina y se centrifugan, el precipitado se resuspende en un tampón (600 mM KCl, 150 mM NaCl, 200 mM Tris/HCl pH=8, 5 mM Spermidina, 1.5 mM Spermina, 20 mM EDTA, 5 mM EGTA) al que se añade antes de usar 0.5 mM β -mercaptoetanol y 0.3 M sacarosa. Luego se adiciona tampón con 0.2% Igepal, se mezcla invirtiendo el tubo y se incuba en hielo 5 minutos. Se centrifuga a 640 g a 4°C durante 5 minutos y el precipitado se resuspende en tampón B (50 mM HEPES pH=8.0, 5 mM MgCl_2 , 0.5 mM DTT, 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ BSA, 25% glicerol). Se vuelve a centrifugar y el precipitado se resuspende en un

pequeño volumen del tampón B para tener una concentración de 10^7 núcleos/50 μ l de tampón B. Se congelan en Nitrógeno líquido y se conservan a -70°C . Posteriormente se marcaron con $[\alpha^{32}\text{P}]\text{-dUTP}$ (100 mCi) en un tampón (50 mM HEPES, 2mM MgCl_2 , 2mM MnCl_2 , 1 mg/ml BSA, 300 mM NH_4Cl) durante 20 minutos a 30°C en presencia de *RNasin* (40 u) y 400 μM de ATP, GTP y CTP. Luego se añade *DNasa RQ1* (10 u) y se incuba 10 minutos a 37°C . Finalmente se añade Solución D y tRNA (20 μg) y se purifica el ARN por extracción con fenol-cloroformo-isoamílico (*Chomczynski y Sacchi, 1987*).

6.2 Preparación de filtros.

Se preparan los filtros según protocolos estándar (*Ausubel y col., 1997; Marzluff, 1978; Marzluff y Huang, 1985*) con un aparato *Slot- Blot minifold II* (*Schleicher & Schuell*). Las muestras de ADN (5 μg de fragmentos procedentes de plásmidos o 1 μg si son fragmentos de PCR) se preparan en 50 μ l de 10 mM Tris-1mM EDTA y se denaturan con 5 μ l de 1 M NaOH durante 5 minutos a 37°C . Posteriormente se neutralizan con 150 μ l de SSC 10X y 100 μ l de H_2O . Los pocillos se lavan dos veces con SSC 5X y a continuación se cargan las muestras de ADN en las membranas (Nytran N, *Schleicher & Schuell*). El ADN se fija a la membrana mediante irradiación con luz UV de 254 nm ($120 \text{ mJ}/\text{cm}^2$) en un aparato *Bio-Link BL-254*.

6.3 Hibridación.

Los filtros se prehibridaron durante 2 horas con 2 ml de la solución de hibridación (200 mM NaPO₄ pH=7.2, 1 mM EDTA, 7% SDS, 45% formamida, 250 µg/ml E.coli tRNA) a 42°C. Las muestras de ARN marcadas se incubaron durante 5 minutos a 65°C, previa adición de 100 µl de formamida. Posteriormente se añadieron a 2 ml de la solución y se hibridaron durante un mínimo de 48h a 42°C. Para detectar las señales radiactivas las membranas hibridadas se expusieron a una película autorradiográfica *Konica X-Ray film AX* (Sakura) lavándolas previamente con 0.5X SSC, 0.1% SDS durante 30 minutos a 42°C. Las exposiciones se hicieron a varios tiempos en casetes con pantallas amplificadoras a - 80°C. Las películas se revelaron en un aparato *Curix-60* de Agfa.

7. ENSAYO DE ACTIVIDAD PI3-KINASA.

Se obtienen extractos totales de proteínas recogiendo las células SH-SY5Y con la ayuda de un rascador, en un tampón base (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 10 mM NaF) al que previamente se han añadido inhibidores de proteasas (10 µg/ml aprotinina, 10 µg/ml leupeptina, 100 µM PMSF) y un inhibidor de fosfatasa (1 mM ortovanadato sódico). Las células se lisan mediante sonicación (2 pulsos de 10 segundos, 80 %) con un sonicador modelo *MSE Soniprep 150 de Sanyo Gallenkamp PLC*. Posteriormente se centrifugan y la concentración de proteínas se estima con un Kit *Biorad Protein Assay*.

Las reacciones se hicieron mezclando 40 µg de los extractos de proteínas totales y 20 µl de 0.5 mg/ml L-α fosfatidil-inositol (*Sigma*) en

10 mM HEPES pH 7.4, 0.1 mM EGTA y 10 μ l de 50 mM HEPES pH 7.4, 25 mM MgCl₂ con 10 μ Ci de [γ ³²P]-ATP. Como control negativo se añadió en algunas muestras 30 μ M de LY29004. Las reacciones se incubaron 10 minutos a temperatura ambiente y se pararon adicionando 60 μ l de 2 M HCl. Los lípidos se extrajeron con 160 μ l de cloroformo:metanol (1:1). Se aplicó la fase orgánica a las placas TLC. Las placas son de gel de sílice (*Silica Gel 60 de Merck*) y se pretratan con 1% oxalato potásico en agua. La cromatografía en capa fina se lleva a cabo en cubetas de vidrio saturadas con cloroformo:metanol:H₂O:amonio 43:38:8:2 y se deja correr hasta un 80 % de la placa.

Para detectar las señales radioactivas las placas TLC se expusieron a una película autorradiográfica *Konica X-Ray film AX* (Sakura). Las exposiciones se hicieron a varios tiempos en casetes con pantallas amplificadoras a - 80°C. Las películas se revelaron en un aparato *Curix-60* de Agfa.

RESULTADOS

RESULTADOS

1. CARACTERIZACIÓN DE GENES REGULADOS POR ÁCIDO RETINOICO IMPLICADOS EN LA DIFERENCIACIÓN DE CÉLULAS DE NEUROBLASTOMA.

Las líneas celulares de neuroblastomas humanos son buenos modelos para el estudio *in vitro* de la diferenciación de células de linaje neuronal. Los neuroblastomas son tumores que tienen su origen en la cresta neural, en los cuales, alteraciones que afectan a su desarrollo normal deben estar implicadas en la tumorigénesis (para revisión: *Maris y Matthay, 1999; Schor, 1999; Alexander, 2000*). Sin embargo, algunas líneas de neuroblastoma mantienen la capacidad de diferenciarse como respuesta a diversos estímulos.

Algunas líneas de neuroblastoma se diferencian por tratamiento con ácido retinoico (*Sidell, 1982; Lovat y col., 1997; Irving y col., 1998*). Este es el caso de las células procedentes de un neuroblastoma humano denominadas SH-SY5Y que se utilizaron en este estudio.

1.1 Diferenciación celular inducida por RA: cambios morfológicos.

El tratamiento con 1 μM de ácido retinoico (RA) induce la diferenciación morfológica de las células SH-SY5Y dando lugar a la extensión de neuritas (*Pahlman y col., 1984*). A las 24 h de tratamiento ya se observa claramente un fenotipo neuronal siendo más notorio a las 48 h (*figura 13*).

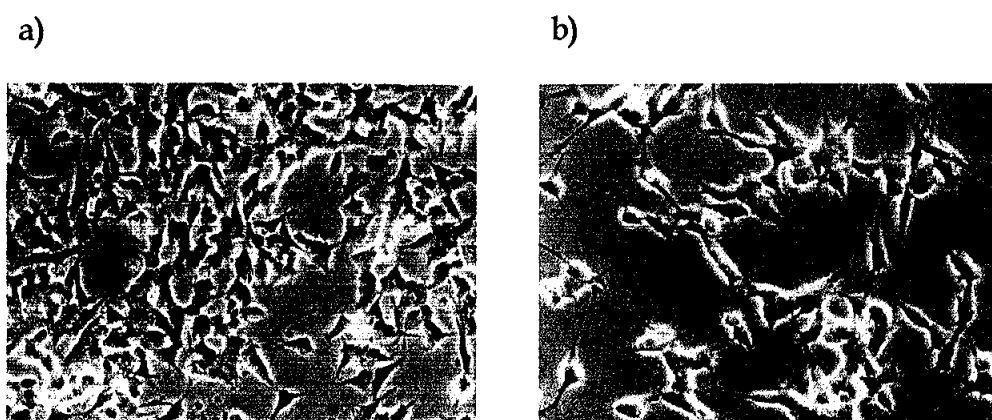


Figura 13. Diferenciación morfológica de las células SH-SY5Y en respuesta a RA. Microfotografías de contraste de fase de células SH-SY5Y. a) Control, b) tratadas 48 h con 1 μM RA.

1.2 Análisis de genes regulados por RA mediante Display Diferencial Ordenado.

El RA actúa regulando la expresión de genes a nivel transcripcional. Por ello, para caracterizar los mecanismos moleculares a través de los cuales el RA induce la diferenciación en las células SH-SY5Y, se analizaron los genes expresados diferencialmente mediante Display Diferencial Ordenado (DDO) (Matz y col., 1997). Se utilizó esta técnica porque presenta importantes ventajas respecto a otros métodos como la técnica original de Display Diferencial (Liang y Pardee, 1992) o la hibridación substractiva (Sargent y Dawid, 1983; Duguid y Dinauer, 1990; Diatchenko y col., 1996), que permiten también un estudio de expresión diferencial de genes. El DDO tiene una alta sensibilidad, puesto que tan sólo se necesita 1 µg de ARN de partida. Además, permite en un mismo experimento el estudio tanto de genes infraexpresados como sobreexpresados. La reproducibilidad es alta comparada con el Display Diferencial original, puesto que la generación del *fingerprint* se basa en un sitio de restricción, en vez de la hibridación arbitraria de cebadores. Asimismo, presenta una mayor simplificación de la muestra y menor redundancia, ya que cada ARN mensajero sólo origina una banda. Además posibilita un análisis sistemático del transcriptoma.

Se partió de ARN extraído de células SH-SY5Y control y células tratadas con 1 µM RA durante 8 y 24 h. Se obtuvieron 43 fragmentos de PCR (tabla 2) correspondientes a 33 genes conocidos y 10 secuencias no identificadas previamente. Los experimentos de DDO se llevaron a cabo con la siguiente combinación de cebadores: IE-AA, IE-AT, IE-AG, IE-AC,

IE-GC, IE-TA, IE-TT, IE-TG, IE-TC y TE-AG, TE-GT, TE-GC, TE-CA, que corresponde a un 18.8 % del total de combinaciones posibles.

Los 43 genes expresados diferencialmente se muestran en la tabla siguiente agrupados según la función que desempeñan:

1. Transcripción y Expresión Génica.

Nombre	Símbolo	Acceso	Reg.	Conf. NB	Observac.
Protimosina α	<i>PTMA</i>	M14630	+	SI	
ID3-HLH	<i>ID3</i>	BC003107	-	SI	
RNP CGI-110	<i>LOC51639</i>	AF151868	+	NO	Expresión muy abundante
Prot. Zinc Finger FLJ12298	<i>FLJ12298</i>	AK022360	+	NO?	Producto clonado sonda contiene. Alu
RuvB-like 2	<i>RUVBL2</i>	BC000428	-	n. r.	
hnRNP R	<i>HRPR</i>	AF000364	+	NO	producto clonado. No se observa señal en NB

2. Transducción de señales y ciclo celular

Nombre	Símbolo	Acceso	Reg.	Conf. NB	Observac.
Prot. G beta2-like1	<i>GB2L1</i>	BC000214	-	n.r.	
Receptor de Laminina de 37/67KD	<i>LAMR1</i>	BC005391	-	SI	
Spermidina sintetasa	<i>SRM</i>	BC000309	-	SI	
hsp 89 alfa	<i>HSPCA</i>	M27024	+	SI	
CENP-F (Mitosina)	<i>CENPF</i>	U30872	+	SI	
Fosfoprot. NUCKS	<i>NUCKS</i>	AK025133	-	n.r.	

3. Genes relacionados con funciones neuronales

Nombre	Símbolo	Acceso	Reg.	Conf. NB	Observac.
Sinaptotagmina IV	<i>SYT4</i>	D38522	+	SI	
OCRL (IPP-5'-Fosfatasa)	<i>OCRL</i>	Z73496	+	SI	
Receptor de acetilcolina alfa3 (nicot.)	<i>CHRNA3</i>	U62432	+	n.r.	
ATPasa vacuolar, subun. 1	<i>ATP6S1</i>	AL136851	+	n.r.	
Receptor de opiodes mu 1 (NPI-13)	<i>OPRM1</i>	AL136444	+	n.r.	producto clonado posible nueva variante de splicing.
Prot. de unión de Fosfatidil-Etanolamina	<i>PBP</i>	D16111	+	n.r.	producto clonado

4. Otros Genes

Nombre	Símbolo	Acceso	Reg.	Conf. NB	Observac.
Citocromo B mitocondrial	<i>MTCYB</i>	M28016	+	n.r.	
Ubiquitin-like 5	<i>UBL5</i>	AF313915	-	NO	RNA muy abundante
Citocromo C oxidasa II mitoc	<i>MTCO2</i>	M25171	+	n.r.	producto clonado
Hidroxiacil-coA deshidrogenasa II (ERAB)	<i>HADH2</i>	U73514	-	SI	
Factor eucariótico de iniciación de la traducción eIF3, sub. 4	<i>EIF3S4</i>	AF094850	-	n.r.	
Prot. ribosomal S2 (L1Rep3)	<i>RPS2</i>	BC001795	-	n.r.	
Prot. ribosomal L18	<i>RPL18</i>	BC000374	-	n.r.	
Prot. ribosomal S15a	<i>RPS15A</i>	X84407	-	n.r.	
Prot. ribosomal L31	<i>RPL31</i>	X69181	-	n.r.	
Prot. ribosomal S19	<i>RPS19</i>	BC000023	+	n.r.	
Prot. ribosomal L21	<i>RPS19</i>	BC001603	-	n.r.	producto clonado

5. ESTs y secuencias genómicas

Nombre	Símbolo	Acceso	Reg.	Conf. NB	Observac.
ZAP31 (NPI-5)		AF222023	-	n.r.	
YA61 (NPI-11)		AF220415	-	n.r.	
Secuencia genómica AL390878 del crs. 13 (NPI-10)		AL390878	+	n.r.	
HT036	<i>HTO36</i>	AF284751	+	NO	producto clonado No se observa señal en NB

6. Secuencias no identificadas previamente (NPIs)

Nombre	Símbolo	Acceso	Reg.	Conf. NB	Observac.
NPI-1			-	n.r.	316 pb
NPI-2			+	n.r.	53 bp
NPI-3			-	n.r.	106 bp
NPI-4			-	n.r.	105 bp
NPI-6			-	n.r.	67 bp
NPI-7			-	n.r.	87 bp
NPI-8			-	n.r.	183 bp
NPI-9			+	n.r.	355 bp
NPI-12			-	n.r.	580 bp
NPI-14			-	n.r.	136 bp

Tabla 2. Genes expresados diferencialmente por RA obtenidos por DDO.

En la tabla se indica el nombre de cada gen, el símbolo asignado, el número de acceso en las bases de datos, Reg. indica la regulación (positiva o negativa) por efecto de 1 μ M RA, si ha sido confirmado por Northern blot o no ha sido realizado (n.r.) y las observaciones pertinentes de algunos de ellos. Producto clonado indica que la secuencia se obtuvo de clones de un fragmento de PCR cuya secuencia no resultó de calidad suficiente para la identificación.

1.3 Confirmación de los genes regulados por RA mediante Northern Blot.

La técnica de DDO se caracteriza por una elevada reproducibilidad siendo muy bajo el porcentaje de resultados falsos (*Matz y col., 1997*). No obstante, se ha confirmado la expresión diferencial de los genes que se consideraron más interesantes. Se hicieron Northern Blots con ARN extraído de células SH-SY5Y tratadas diferentes tiempos con 1 μ M RA (0h-96h), que fueron hibridados con sondas radiactivas específicas de cada gen en estudio (*figura 14*). Los resultados obtenidos por Northern Blot coinciden, en su mayoría, con los datos de expresión génica del DDO (*tabla 2*). La regulación de algunos genes no pudo ser confirmada mediante Northern Blot. Las sondas RNP CGI-110 y Ubiquitin-like-5 dieron señales muy abundantes, pero no se observó regulación por RA y lo mismo ocurrió en el caso del gen FLJ12298 pero con menor intensidad de señal. En el caso del gen FLJ12298 la señal obtenida no es del peso molecular que se esperaría. Como este gen contiene una secuencia Alu (muy repetitiva) puede ser que la señal que vemos no sea la que corresponda. En otras ocasiones no se detectó una señal como fue el caso de hnRNP R y HT036.

Figura 14. Genes regulados por RA.

Northern Blots obtenidos con 15 μ g de ARN total extraído de células SH-SY5Y tratadas con 1 μ M RA durante los tiempos indicados. La señal de ARN ribosómico 28S teñida con azul de metileno se muestra como control de carga, salvo en el caso de *LAMR1*, donde se muestra la señal obtenida para *PPIA* (Ciclofilina A). En el margen izquierdo de los blots se muestra la posición de los fragmentos marcadores de peso molecular (en Kb). Se muestran los resultados obtenidos con sondas específicas de *LAMR1* (1.3 Kb), *ID3* (1.2 Kb), *PTMA* (1.4 Kb), *HSPCA* (hsp89 α , 4.0 Kb), *SYT4* (13.0, 10.0, 4.2 y 0.3 Kb), *CENPF* (mitosina, 12 Kb), *OCRL* (6.0 Kb), *SRM* (1.5 Kb), *HADH2* (1.3 Kb).

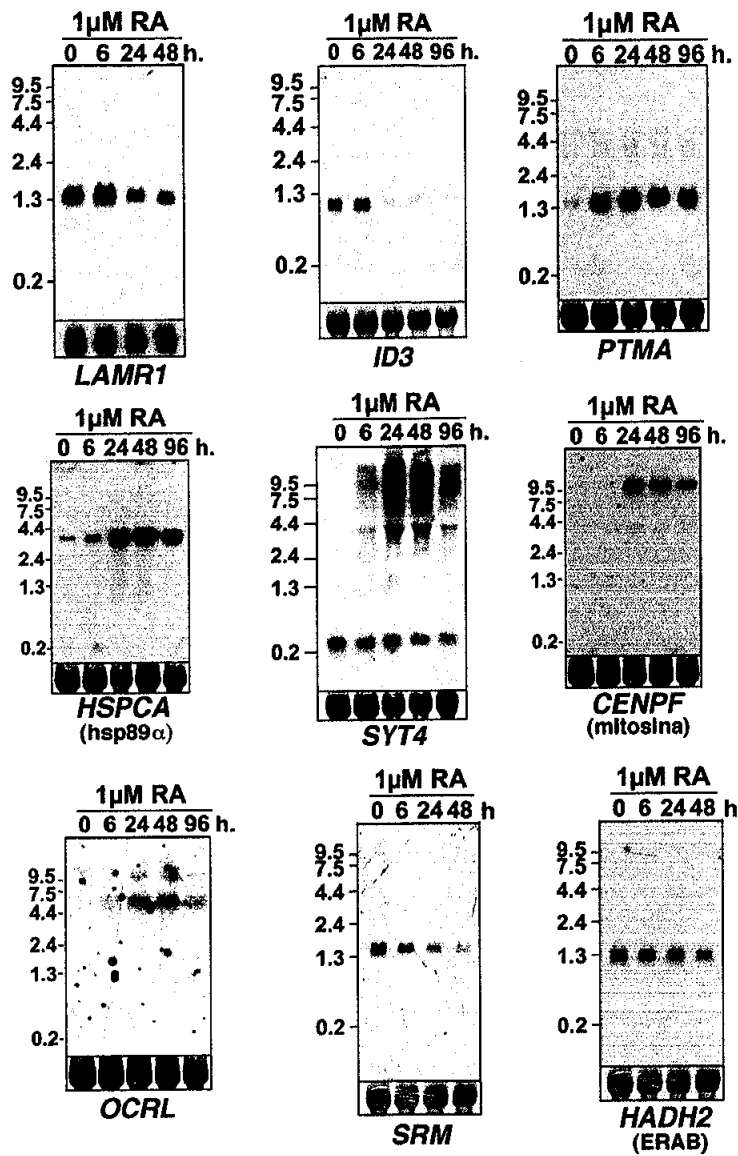


Figura 14. Genes regulados por RA.

1.4 Recopilación sobre los resultados obtenidos por DDO.

Para confirmar la fiabilidad del método mostramos una recopilación de los datos obtenidos mediante DDO. De las 48 bandas picadas del gel, una no pudo ser reamplificada. Del resto, de un 83 % de los casos se obtuvieron secuencias directamente, mientras que un 17 % dio secuencias de baja calidad. Trece de los fragmentos que pudieron ser secuenciados directamente se comprobaron por Northern Blot y en 11 casos se pudo confirmar la regulación diferencial.

Los fragmentos de PCR que dieron secuencias de baja calidad (7) fueron clonados y secuenciados. Tres de estas secuencias se probaron por Northern blot, pero no pudo confirmarse su regulación. Estos resultados indican que la fiabilidad de la técnica de DDO es muy alta siempre que las bandas obtenidas del gel den secuencias de alta calidad. Cuando la secuencia es de baja calidad, posiblemente se deba a una mezcla de productos de PCR, y al clonar y secuenciar no se puede distinguir bien si se ven las bandas reguladas o si son contaminaciones. Por eso en estos casos la fiabilidad es baja.

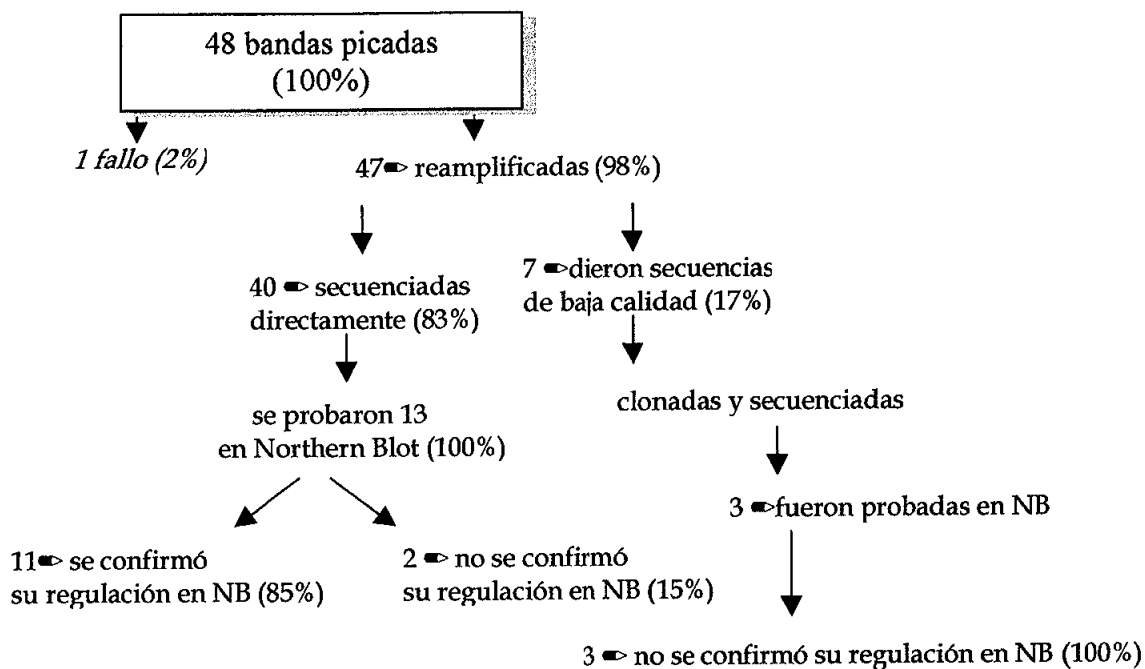


Figura 15. Esquema de los resultados obtenidos mediante DDO.

2. REGULACIÓN DE FACTORES HLH, SUBFAMILIA ID, POR RA.

Entre todos los genes regulados por RA identificados mediante DDO, nuestro interés se centró en *ID3* que pertenece a la subfamilia de los factores IDs. Éstos son factores de transcripción HLH que actúan como reguladores positivos del crecimiento celular y como reguladores negativos de la diferenciación (*ver Introducción párrafo 4*).

2.1 El RA regula la expresión de ID3.

Mediante DDO se observó una banda (n° 13) muy intensa en células SH-SY5Y no tratadas. La intensidad se mantenía tras 8 h de tratamiento con 1 μ M RA pero se produjo un notorio descenso tras 24 h de tratamiento (*figura 16*).

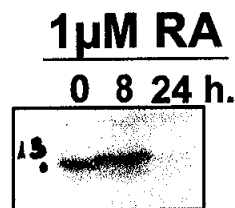


Figura 16. Regulación negativa de la banda n° 13 por efecto de RA.

Detalle de la autorradiografía del gel de poliacrilamida utilizado en el DDO, donde se observa el descenso en la intensidad de la banda n°13 tras 24 h de tratamiento con 1 μ M RA.

Una vez secuenciado, el ADN correspondiente a la banda n°13 fue identificado como *ID3*.

ID3 es un factor de transcripción de la familia HLH que actúa como inhibidor dominante negativo de otros factores bHLH. *ID3* se une a algunos factores de transcripción bHLH formando heterodímeros no funcionales que producen una inhibición de la expresión de genes implicados en diferenciación (*figura 8*).

Para confirmar la regulación negativa de *ID3* por RA se hizo un Northern Blot. Se utilizó ARN total extraído de células SH-SY5Y control y

de células tratadas durante 1, 6, 24 y 48 h con 1 μ M RA. El resultado obtenido confirmó la regulación negativa, ya que produce un descenso de los niveles de mensajero de *ID3* entre 6 y 24 h de tratamiento con RA. Este descenso se mantiene cuando el tratamiento se prolonga hasta 48 h (figura 17). Como control del experimento se hibridó el mismo blot con una sonda específica para *RARB*, cuya transcripción es inducida por tratamiento con RA (de The y col., 1987; Perez-Juste y Aranda, 1999). Del mismo modo se utilizó como control una sonda específica de *MYC*, cuya expresión se inhibe en presencia de RA (Thiele y col., 1985). Como control de carga se empleó una sonda específica de *PPIA* (Ciclofilina A) puesto que este gen se expresa en todas las células por igual.

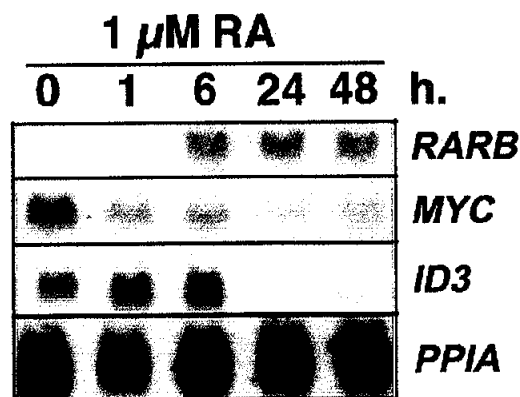


Figura 17. Regulación negativa de *ID3* por efecto de RA.

Northern Blot obtenido con 15 μ g de ARN total extraído de células SH-SY5Y tratadas con 1 μ M RA durante: 0 h, 1 h, 6 h, 24 h y 48 h. EL blot fue hibridado secuencialmente con sondas específicas para los ARNs mensajeros de *RARB* (3Kb), *MYC* (2.5Kb), *ID3* (1.2Kb), *PPIA* (Ciclofilina A, 1Kb).

2.2 La regulación de *ID3* por RA es transcripcional.

Para estudiar si la regulación de *ID3* por RA se produce a nivel transcripcional se llevó a cabo un experimento de transcripción Run-on con núcleos aislados de células SH-SY5Y control y de células tratadas durante 24 h con 1 μ M RA. El experimento de Run-on permite una comparación directa de la tasa de transcripción de los genes. El ARN naciente es marcado radiactivamente con una alta actividad específica en núcleos aislados (*Marzluff, 1978*) y se hibrida en filtros en los que se han fijado muestras de ADN de los genes que queremos estudiar. Los resultados demostraron que existe una severa reducción de la tasa de transcripción de *ID3*, (aproximadamente unas 3.5 veces) en consonancia con lo observado a nivel de expresión de ARN mensajero. Está documentado que el RA produce la inducción de *BCL2* regulada a nivel transcripcional (*Lasorella y col., 1995*), por ello lo utilizamos como control positivo. La tasa de transcripción de *PPIA* y *ACTB* no debe variar en presencia de RA puesto que estos genes se expresan igualmente en células control que en células tratadas, por ello se utilizaron como control. Como control negativo de especificidad se utilizó el plásmido pBS-KS (*figura 18*).

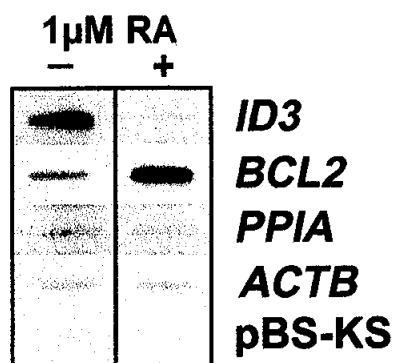


Figura 18. Regulación a nivel transcripcional

Run On. Los núcleos se aislaron de células control y células tratadas durante 24 h con 1 μM RA. La transcripción de los núcleos aislados fue analizada por hibridación de ARN marcado con ^{32}P -UTP con 5 μg de ADN de *ID3*, *BCL2*, *PPIA*, *ACTB* y *pBS-KS* inmovilizados en una membrana de Nylon. Autorradiografía del análisis por Run On. Se observa una inhibición de *ID3* por efecto de RA y una inducción de *BCL2*. *PPIA*, *ACTB* y *PB-KS* se utilizaron como controles.

2.3 El RA regula coordinadamente la expresión de factores de la familia ID.

Además de *ID3* existen otros IDs (ver *Introducción párrafo 4*) que se caracterizan por una alta homología en estructura y función. Actualmente son conocidos cuatro: *ID1*, *ID2*, *ID3* e *ID4* y constituyen la subfamilia ID (*Benezra y col., 1990*). Con la finalidad de ver si los otros IDs presentaban un perfil de expresión similar a *ID3* se hibridó un Northern Blot secuencialmente con sondas específicas para *ID3*, *ID1*, *ID2* e *ID4*. Los resultados obtenidos con las sondas de *ID1* e *ID2* son comparables con los

descritos para *ID3* (figura 19). Los niveles de expresión de *ID1* en células SH-SY5Y son similares a los observados para *ID3*. El tratamiento con 1 μ M RA produce un descenso drástico de la expresión de *ID1* entre 6 y 24 h. Los niveles del ARNm de *ID2* son menores que los de *ID1* e *ID3*, pero también descendieron por efecto de RA con una cinética comparable a la de *ID3* e *ID1*. Sin embargo no se detecta expresión de *ID4* en células SH-SY5Y control, ni después del tratamiento con RA.

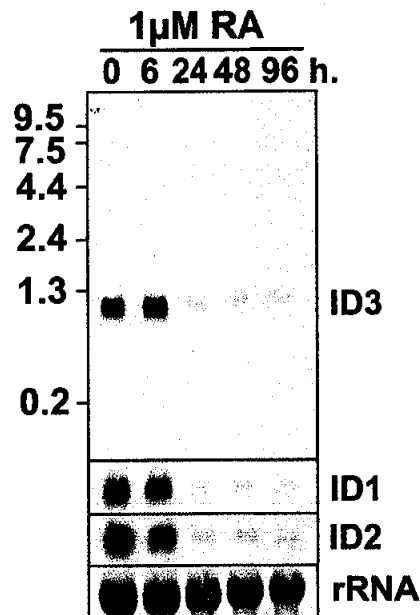


Figura 19. Regulación negativa de los *IDs* por RA

Northern Blot obtenido con 15 μ g de ARN total extraído de células SH-SY5Y tratadas con 1 μ M RA durante: 0 h, 6 h, 24 h, 48 h y 96 h. El blot fue hibridado secuencialmente con sondas específicas de *ID3* (1.2 kb), *ID1* (1.2 kb) e *ID2* (1.2 kb). La señal de ARN ribosómico 28S teñido con azul de metileno se muestra como control de carga. Se indica en el margen izquierdo los pesos moleculares del marcador de ARN.

2.4 Los cambios en la expresión de los IDs inducidos por RA se reflejan en los niveles de proteínas ID.

Una vez conocidos los cambios de expresión a nivel de ARN mensajero, se procedió al estudio de los niveles de proteínas de los IDs, mediante Western Blot con anticuerpos específicos (*figura 20*). Los niveles de proteínas ID1, ID2 e ID3 disminuyeron de manera notoria, tras 24 h de tratamiento con RA, en paralelo a lo observado a nivel de ARN mensajero (*ver figura 19*).

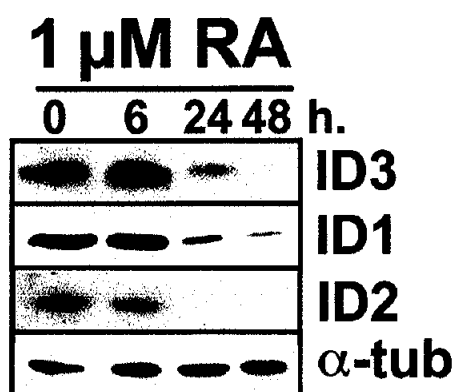


Figura 20. Disminución de los niveles de proteínas IDs por efecto de RA.

Western Blot obtenido con 20 μg de extracto de proteínas de células SH-SY5Y tratadas con 1 μM RA durante 0 h, 6 h, 24 h y 48 h y anticuerpos específicos para cada proteína ID. Como control de carga se utilizó α-tubulina.

2.5 La unión de factores HLH al ADN se incrementa con el tratamiento con RA.

Los productos de los genes *ID* actúan como inhibidores dominante-negativos de la diferenciación, al impedir la unión de otros factores de transcripción con dominio básico bHLH a las secuencias de DNA, llamadas E-boxes (para revisión: *Norton y col., 1998*). Para estudiar la posible formación de complejos E-box/bHLH, se realizó un ensayo de movilidad electroforética con un elemento de unión E-box presente en el *enhancer* del gen de la creatina kinasa muscular (MCK E-box) marcado radiactivamente y extractos de proteínas de células control y células tratadas durante diferentes períodos de tiempo con 1 μ M RA. Se observó que el tratamiento de las células SH-SY5Y con RA produjo un incremento de la unión de proteínas al elemento E-box (*figura 21*).

Este incremento en la unión de complejos al E-box sería compatible con la reducción observada en los niveles de proteínas ID, ya que habría más factores de transcripción bHLH libres, que podrían formar heterodímeros funcionales y unirse al elemento E-box.

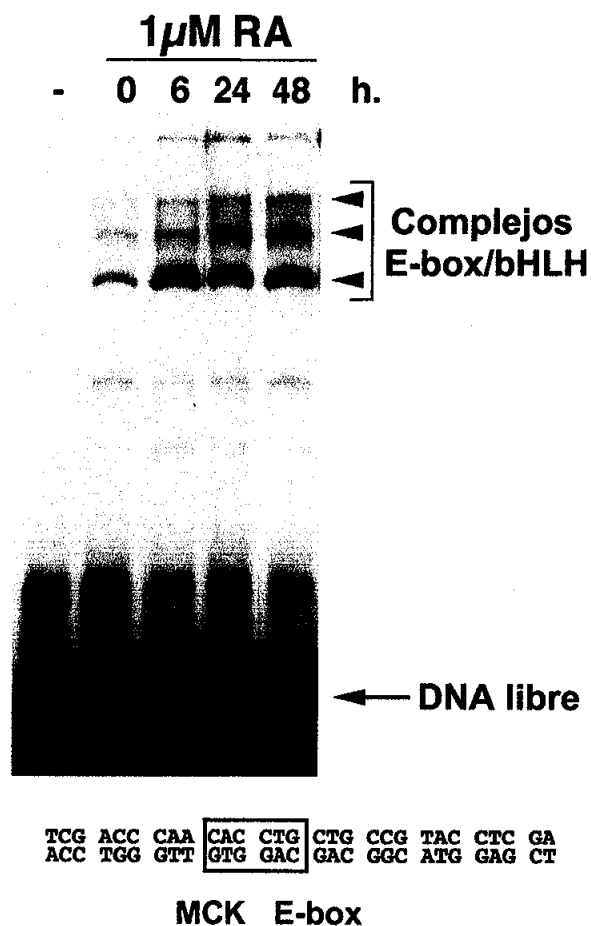


Figura 21. Incremento de la formación de complejos E-box/bHLH por RA. Retardo en gel con una sonda que contiene un elemento E-box del gen creatina kinasa muscular (MCK), marcado radiactivamente y extractos de proteínas de células SH-SY5Y tratadas con 1 μ M RA como se indica en la figura.

2.6 El RA produce cambios en la expresión de factores HLH y de los genes regulados por éstos.

Los IDs actúan regulando la actividad de otros factores de la familia bHLH. Pensamos que sería posible que el tratamiento con RA afectara a la expresión génica de alguno de estos factores HLH, que están implicados en el control del destino celular y diferenciación en células neuronales (para revisión: *Kageyama y col., 1997; Lee, 1997*). Hicimos Northern Blots con ARN extraído de células SH-SY5Y tratadas con 1 μ M RA durante 0, 6, 24 y 48 h y utilizamos sondas específicas de algunos genes bHLH (*figura 22*). El ARN mensajero de *ASCL1*, un gen expresado en algunas poblaciones del SNC y SNP (*Guillemot y col., 1993; Cau y col., 1997; Soderholm y col., 1999*), disminuyó tras 6 h de tratamiento. Por otro lado, los genes *NEUROD* están implicados en diferenciación en el Sistema Nervioso (*Rostomily y col., 1997; Cho y col., 2001*). Hemos visto que los niveles de ARN mensajero de *NEUROD6* (*NEX1, HATH2*) son abundantes y aumentan muy rápidamente tras 6 h de tratamiento con RA. Asimismo, se detectan niveles de ARN mensajero de *NEUROD1* en células tratadas aunque su inducción es retardada. Los mensajeros de otros factores de transcripción bHLH como neurogenina y *ATOH1* no fueron detectados. Como marcador de diferenciación neuronal se utilizó *GAP43* (*Pfenninger y col., 1991*). Está documentado que *GAP43* se encuentra regulado por factores HLH (*Chiaramello y col., 1996*). Se ha visto que los niveles de expresión de *GAP43* son muy bajos en células SH-SY5Y no tratadas y se ha observado un fuerte incremento durante la diferenciación inducida por RA, alcanzándose un valor máximo tras 24 h de tratamiento.

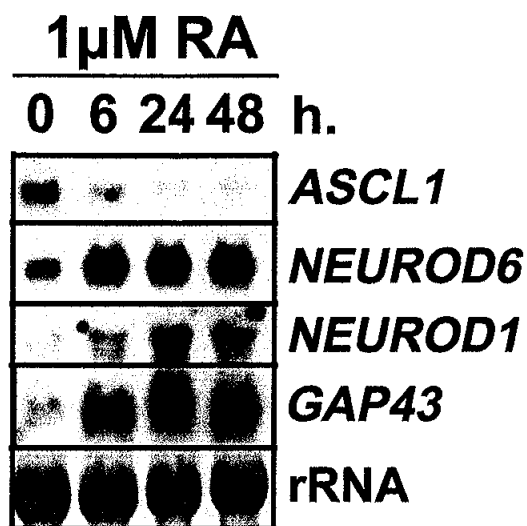


Figura 22. Regulación de factores de transcripción HLH por RA.

Northern Blot obtenido con 15 μ g de ARN total extraído de células SH-SY5Y tratadas con 1 μ M RA durante: 0 h, 6 h, 24 h y 48 h. EL blot fue hibridado secuencialmente con sondas específicas de *ASCL1* (2.6 kb), *NEUROD6* (1.4 kb), *NEUROD1* (4.2 kb) y *GAP43* (1.4 kb). La señal del ARN ribosómico 28S teñido con azul de metileno se muestra como control de carga.

Estos resultados indican que el tratamiento con RA inhibe la expresión de genes implicados en la determinación como *ASCL1* e induce la expresión de genes implicados en la diferenciación neural como *NEUROD1*, *NEUROD6* y genes específicos de neuronas.

2.7 El TPA regula coordinadamente la expresión de IDs.

Otro de los compuestos que inducen diferenciación neuronal en líneas celulares de neuroblastoma son los ésteres de forbol (*Pahlman y col., 1981; Ota y col., 1989; Parrow y col., 1992; Perez Juste y Aranda, 1999; Soderholm y col., 2001*). Hemos estudiado si los tratamientos con TPA en la línea SH-SY5Y producen cambios en los niveles de expresión de los IDs, de un modo análogo a los que produce el tratamiento con RA. El tratamiento con 100 nM TPA durante 48 h altera la morfología de las células SH-SY5Y, dando lugar a la extensión de neuritas muy similares a las observadas con RA y a un fenotipo neuronal. Los resultados obtenidos indican que los niveles de ARN mensajero de *ID1*, *ID2* e *ID3* se mantienen después de 6 h de tratamiento y disminuyen rápidamente entre 6-24 h de diferenciación, siguiendo una cinética similar a la observada durante el tratamiento con RA. Además se observó una inducción transitoria de *ID4*, cuyos ARNs mensajeros se detectan a las 6 h de tratamiento y disminuyen de un modo similar a los otros IDs tras 24 h (*figura 23*). Como controles de diferenciación por TPA se utilizaron sondas específicas para Neuropéptido Y (*NPY*), cuya expresión es inducida por tratamiento con TPA en células SH-SY5Y (*Lerchen y col., 1995; Wernersson y col., 1998*) y para *MYC* que se regula negativamente (*Hammerling y col., 1987*).

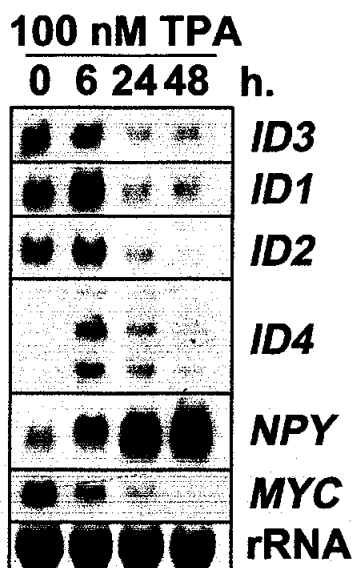


Figura 23. Regulación negativa de los IDs por TPA.

Northern Blot obtenido con 15 μ g de ARN total extraído de células SH-SY5Y tratadas con 100 nM TPA durante: 0 h, 6 h, 24 h, 48 h. EL blot fue hibridado secuencialmente con sondas específicas de *ID3* (1.2 kb), *ID1* (1.2 kb), *ID2* (1.2 kb), *ID4* (4.0, 2.8, 1.7 kb), *NPY* (1 kb) y *MYC* (2.5 kb). La señal de ARN ribosómico 28S teñido con azul de metileno se muestra como control de carga.

3. EL MECANISMO MOLECULAR DE LA REGULACIÓN NEGATIVA DE LOS IDs POR RA.

Hemos visto que se produce una regulación negativa de los ARNm de los IDs en células SH-SY5Y por efecto de RA (*figura 19*) y que esta regulación ocurre a nivel transcripcional (*figura 18*). El TPA también produce una regulación negativa de los mensajeros de los genes IDs en

células SH-SY5Y (*figura 23*). Aunque tanto el RA como el TPA producen la diferenciación de células de neuroblastoma (*Pahlman y col., 1984*), su mecanismo de acción es muy diferente y generalmente producen efectos opuestos en cuanto a la activación transcripcional. El hecho de que tanto en la diferenciación inducida por RA como por TPA, se produzca una regulación negativa coordinada de los genes ID resalta su papel en la diferenciación celular. Sin embargo, también nos indica que el mecanismo molecular por el que el RA regula negativamente la expresión de los IDs no debe ser sencillo, sino complejo. El siguiente paso fue estudiar los posibles mecanismos moleculares implicados en esta inhibición producida en los *IDs* por el tratamiento con RA.

3.1 La regulación negativa de los IDs requiere proteínas de nueva síntesis.

La regulación negativa de la transcripción de los IDs por el tratamiento con RA requiere síntesis de nuevas proteínas, puesto que no se produce en presencia de 10 µg/ml de cicloheximida (CHX), un potente inhibidor de la síntesis de proteínas (*figura 24*). El tratamiento con CHX produce un incremento de los niveles de ARNm y se ha visto que este es un efecto característico sobre mensajeros con una alta tasa de recambio y en cuya degradación son importantes proteínas de vida media muy corta (*Sadouk y col., 1991*).

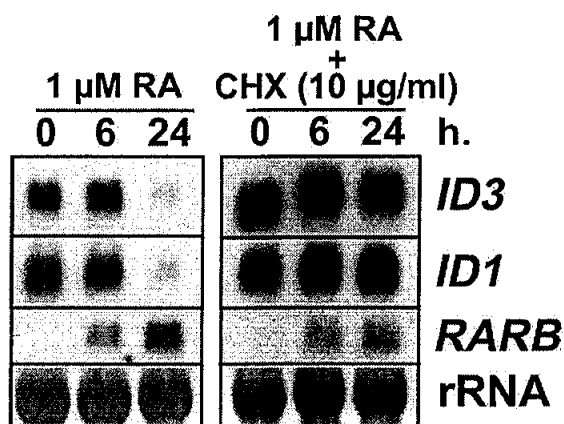


Figura 24. La regulación negativa de los IDs requiere síntesis de nuevas proteínas.

Northern Blot obtenido con 15 μ g de ARN total extraído de células SH-SY5Y tratadas con 1 μ M RA durante: 0 h, 6 h y 24 h en ausencia y en presencia de 10 μ g/ml de CHX, como se indica. El blot fue hibridado secuencialmente con sondas específicas de *ID3* (1.2 Kb), *ID1* (1.2 Kb) y *RARB* (3 Kb). La presencia de CHX anula el efecto inhibitor del RA sobre la transcripción de *ID3* e *ID1*. La inducción de *RARB* no se ve tan afectada por el inhibidor de la síntesis de proteínas. La señal del ARN ribosómico 28S teñido con azul de metileno se muestra como control de carga.

3.2 La regulación negativa de los IDs requiere actividad Fosfatidil-Inositol-3-Kinasa.

La vía de señalización de la PI3K está implicada en diferenciación en muchos tipos de células (para revisión: *Stein y Waterfield, 2000*). Nos llamó la atención el paralelismo entre lo que sucede en la diferenciación de

células musculares y las células de neuroblastoma. En ambos casos intervienen proteínas de la familia bHLH. En células musculares los efectores de la diferenciación son los factores IGF-I e IGF-II y resulta en la activación de NF- κ B y la producción de NO, que también se producen en la diferenciación de células de neuroblastoma (*Florini y col., 1996; Kaliman y col., 1998, Kaliman y col., 1999; Feng y Porter, 1999*). En la diferenciación de mioblastos desempeña un papel muy importante la activación de la vía de señales de la PI3K/AKT y la inhibición de la PI3K mediante su inhibidor selectivo LY294002 produce un bloqueo en la diferenciación. Basándonos en estos datos, planteamos la posibilidad de que la vía de PI3K/AKT estuviera implicada en la diferenciación celular de células de neuroblastoma mediante RA, y por lo tanto en la regulación negativa de la expresión de los IDs. Para comprobar esta hipótesis se ha utilizado un inhibidor específico de la PI3K, LY 294002. Se hicieron Northern blots con ARN extraído de células SH-SY5Y tratadas simultáneamente con 10/50 μ M LY 294002 y 1 μ M RA. Los resultados obtenidos indican que la regulación negativa de los IDs por el tratamiento con RA requiere actividad PI3K, puesto que esta regulación no se produce en presencia de 10/50 μ M de LY 294002 (*figura 25*).



Figura 25. La regulación negativa de los IDs requiere actividad PI3-Kinasa

Northern Blot obtenido con 15 μ g de ARN total extraído de células SH-SY5Y tratadas con 1 μ M RA durante: 0 h, 6 h, 24 h y 48 h en ausencia y en presencia de 10 μ M y 50 μ M de LY294002, como se indica. El blot fue hibridado secuencialmente con sondas específicas de *ID3* (1.2 Kb) e *ID1* (1.2 Kb). La presencia de LY294002 bloquea parcialmente la regulación negativa de los *IDs* producida por RA. La señal del ARN ribosómico 28S teñido con azul de metileno se muestra como control de carga.

3.3 Una posibilidad: inducción por RA de RET, un receptor tirosina-kinasa y un activador de la PI3K.

Hemos mostrado que la regulación negativa de la expresión de los IDs por RA requiere actividad PI3K. Para explicar esto se plantearon dos posibilidades:

- 1) El RA induce algún factor que activa la PI3K, y en consecuencia se produce una disminución de la expresión de los IDs.

- 2) El RA produce la activación de la PI3K y esto a su vez provoca la inducción de un factor que hace que disminuya la expresión de los IDs.

El estudio se siguió con la primera hipótesis porque el mecanismo de acción típico del RA es la regulación de genes. Entre los posibles factores que podrían resultar de la activación de la PI3K encontramos RET.

RET es un receptor tirosina-kinasa que se localiza en la membrana celular. La expresión del mensajero de *RET* es relativamente frecuente en tumores y líneas celulares de neuroblastoma (*Ikeda y col., 1990; Nagao y col., 1990; Tahira y col., 1990; Borrello y col., 1993*). Pensamos en RET como un posible candidato en la vía de actuación del RA porque se induce en presencia de RA (*Tahira y col., 1991*) y además es un activador de la ruta de la PI3K (*Worby y col., 1996; Hayashi y col., 2000*) que como se ha visto anteriormente es necesaria para la regulación negativa de los IDs por efecto del RA (*figura 25*).

3.3.1 Inducción de RET por RA.

En primer lugar se estudiaron los niveles de expresión de mensajero y de proteína de RET. Los niveles de los ARNs mensajeros de RET se incrementan tras 6 h de tratamiento con RA, alcanzando su máximo tras 24 h y se mantienen cuando se prolonga el tratamiento hasta las 48 h (*figura 26*).

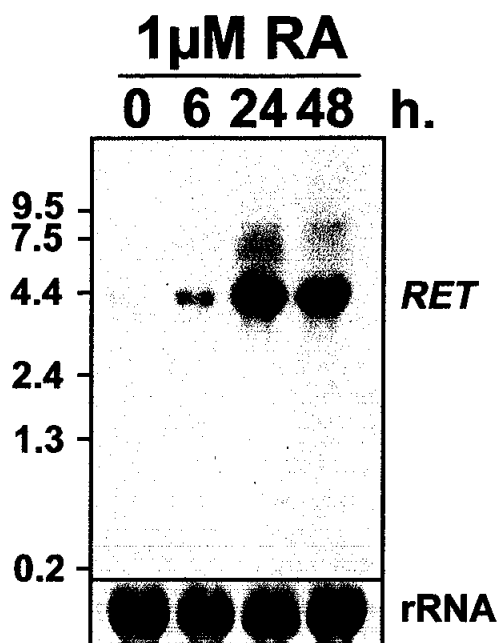


Figura 26. Regulación positiva de *RET* por RA.

Northern Blot obtenido con 15 μ g de ARN total extraído de células SH-SY5Y tratadas con 1 μ M RA durante: 0 h, 6 h, 24 h, 48 h. EL blot fue hibridado con una sonda específica de *RET* (4.2 y 6.0 Kb). La señal del ARN ribosómico 28S teñido con azul de metileno se muestra como control de carga. Se muestran en el margen izquierdo los pesos moleculares del marcador de ARN.

El estudio de los niveles de proteína mediante Western Blot con un anticuerpo específico contra *RET* demostró la inducción producida por RA, dando lugar a una cinética de expresión paralela a la del mensajero (figura 27).

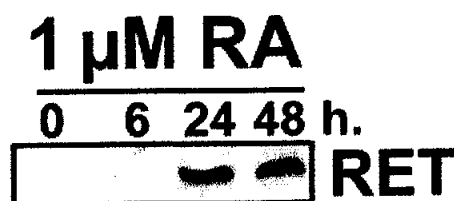


Figura 27. Incremento de la expresión de proteína RET por RA.

Western Blot obtenido con 20 μ g de extracto de proteínas de células SH-SY5Y tratadas con 1 μ M RA durante 0 h, 6 h, 24 h y 48 h y un anticuerpo específico contra RET (170 KD).

3.3.2 La inducción de RET es directa y no requiere proteínas de nueva síntesis ni la actividad de la PI3K.

A continuación se estudió el efecto de la inhibición de la síntesis de proteínas con CHX en la expresión de ARNm de RET. La regulación positiva producida por el RA no se vio afectada ante la presencia de 10 μ g/ml del inhibidor (*figura 28*). Asimismo, el tratamiento con LY 294002 no alteró la regulación positiva inducida por RA (*figura 29*). Esto parece indicar que la expresión de RET está mediada por un efecto directo del RA.

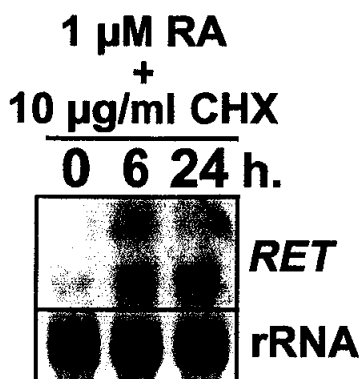


Figura 28. La regulación de *RET* no requiere síntesis de nuevas proteínas.

Northern Blot obtenido con 15 μ g de ARN total extraído de células SH-SY5Y tratadas con 10 μ g/ml CHX + 1 μ M RA durante: 0 h, 6 h y 24 h. EL blot fue hibridado con una sonda específica de *RET* (4.2, 6.0 Kb). La presencia de CHX no afecta a la regulación positiva de *RET* inducida por RA. La señal del ARN ribosómico 28S teñido con azul de metileno se muestra como control de carga.

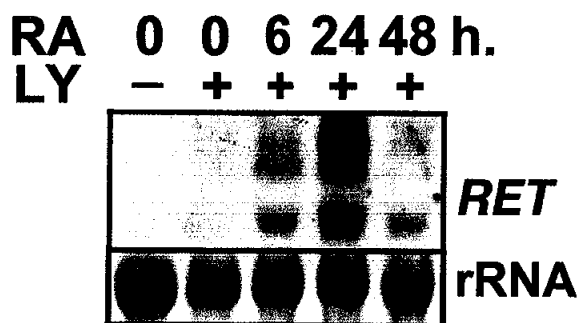


Figura 29. La regulación de *RET* no requiere actividad PI3K.

Northern Blot obtenido con 15 μ g de ARN total extraído de células SH-SY5Y tratadas con 10 μ M LY 294002 + 1 μ M RA durante: 0 h, 6 h y 24 h. EL blot fue hibridado con una sonda específica de *RET* (4.2, 6.0 kb). La presencia de LY 294002 no afecta a la regulación positiva de *RET* inducida por RA. La señal del ARN ribosómico 28S teñido con azul de metileno se muestra como control de carga.

3.3.3 La inducción de RET es específica de RA y no es inducida por TPA.

Con la finalidad de ver si el efecto del TPA era similar al del RA y producía una regulación positiva de *RET*, se trataron células SH-SY5Y con 100 nM de TPA durante 0, 6, 24 y 48 h y se utilizó una sonda específica de *RET* en un Northern Blot (figura 30). Se observó que en presencia de TPA no se produce un incremento notorio en la expresión de *RET*. Esto quiere decir que la inducción de *RET* es específica de RA y no es inducida por ésteres de forbol.

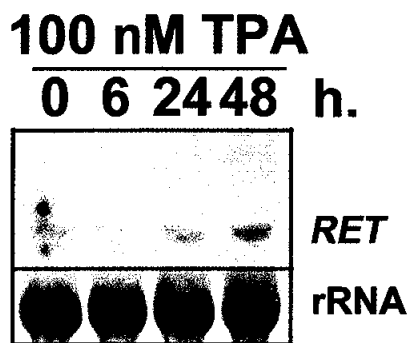


Figura 30. El tratamiento con TPA no induce *RET*

Northern Blot obtenido con 15 μ g de ARN total extraído de células SH-SY5Y tratadas con 100 nM TPA durante: 0 h, 6 h, 24 h, 48 h. El blot fue hibridado con una sonda específica de *RET*. La señal del ARN ribosómico 28S teñido con azul de metileno se muestra como control de carga.

3.3.4 Detección de GFRs y GFLs en células SH-SY5Y.

RET forma parte del complejo receptor de los factores neurotróficos de la familia del GDNF (para revisión: *Airaksinen y col., 1999*). *RET* es un receptor transmembrana con actividad tirosina-kinasa y requiere para su

activación de un co-receptor perteneciente a la familia de los GFRs. Estos co-receptores son proteínas de la cara externa de la membrana plasmática, a la que se anclan mediante un resto de Glicosil-fosfatidil-inositol. La familia GDNF está constituida por varios factores neurotróficos: factor neurotrófico derivado de glia (GDNF), Neurturina (NRTN), Artemina (ARTN) y Persepina (PSPN). Los miembros de la familia GDNF interactúan preferentemente con sus receptores proporcionando especificidad de ligando: GDNF se une preferentemente a GFR α 1, NRTN a GFR α 2, ARTN a GFR α 3 y PSPN a GFR α 4 (*Buj-Bello y col., 1997; Klein y col., 1997; Baloh y col., 1998; Enokido y col., 1998*) aunque existe algún grado de promiscuidad (para revisión: *Airaksinen y col., 1999; Encinas y col., 2001*). Hemos visto que RET se induce en presencia de RA tanto a nivel de mensajero como de proteínas (*figuras 26 y 27*). Para la inducción transcripcional de RET por RA resultara en su activación requeriría la expresión de alguno(s) de los co-receptores, así como la expresión y liberación al medio de alguno(s) de los ligandos de la familia de GDNF, que pudieran activar el complejo RET-GFR de un modo autocrino/paracrino. Por este motivo, estudiamos la expresión de GFRs y GFLs durante la diferenciación inducida por RA, mediante Northern Blot y RT-PCR. Sólo pudimos detectar la expresión de GFR α 2 (*figura 31*) entre los GFRs y de ninguno de los GFLs.

La activación de RET por ligandos de la familia de GDNF y sus co-receptores da lugar a su autofosforilación en residuos tirosina. De acuerdo

con estos resultados, no hemos podido detectar fosforilación en residuos de tirosina, en experimentos de inmunoprecipitación con anticuerpos específicos contra RET y fosfotirosina PY99.

Estos resultados indican que la expresión de RET se induce directamente por RA sin necesidad de síntesis de nuevas proteínas ni actividad PI3K (*figuras 28 y 29*). Este incremento de los niveles de RET por efecto del tratamiento con RA no da lugar, sin embargo, a su activación, posiblemente por falta de un ligando de la familia del GDNF.

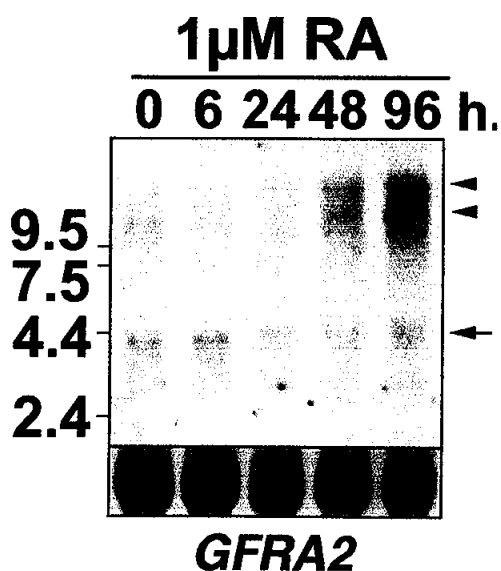


Figura 31. Inducción de GFRA2 por RA

Northern Blot obtenido con 15 μg de ARN total extraído de células SH-SY5Y tratadas con 1 μM RA durante: 0 h, 6 h, 24 h, 48 y 96 h. EL blot fue hibridado con una sonda específica de *GFRA2* (4.2 Kb). La señal de *GFRA2* aparece marcada con una flecha. Las señales de alto peso molecular (>12 Kb), marcadas con triángulos, corresponden, posiblemente, a transcritos no procesados. La señal del ARN ribosómico 28S teñido con azul de metileno se muestra como control de carga. Se muestran en el margen izquierdo los pesos moleculares del marcador de ARN.

3.4 Inducción de la vía de señalización de PI3-Kinasa en células SH-SY5Y por RA.

3.4.1 El tratamiento con RA incrementa la actividad PI3K en las células SH-SY5Y.

La segunda posibilidad es que el RA active la vía PI3K/AKT directamente, a través de una acción atípica no genómica de su receptor. En los últimos años se han documentado acciones no genómicas de los receptores nucleares involucradas en diversos procesos biológicos, como la proliferación celular, la relajación de los capilares, etc... (para revisión: *Gerdes y col., 2000; Rouayrenc y col., 2000; Schmidt y col., 2000*). En primer lugar estudiamos si el tratamiento con RA da lugar a un incremento de la actividad PI3K, mediante un ensayo kinasa *in vitro* en el que se cuantifica la generación de fosfatidilinositol-3-fosfato a partir de fosfatidil inositol y [γ 32 P]-ATP.

Los resultados obtenidos muestran que el tratamiento con RA da lugar a un incremento de cerca de 4 veces en la actividad PI3K. Este incremento no se observa en presencia del inhibidor específico de la PI3K LY 294002 (*figura 32*). El incremento en la actividad PI3K es estable durante un largo tiempo, al menos 48 h. A ello pudiera contribuir que el tratamiento con RA produce un incremento en los niveles de proteína p110 β , la subunidad catalítica de la PI3K, como se detecta en Western Blot con anticuerpos específicos (*figura 33*). Este incremento no se debe a una

acción transcripcional, ya que no se ha observado un incremento en los niveles del ARNm de la p110 β (datos no mostrados).

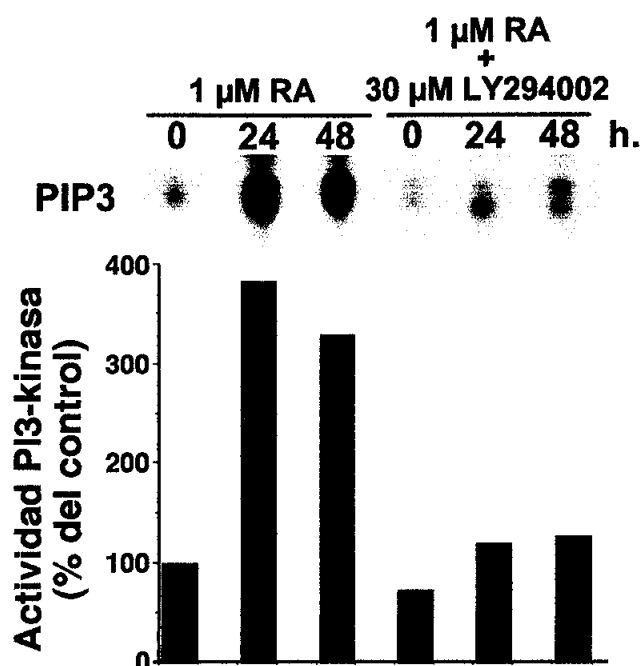


Figura 32. Incremento de la actividad PI3-Kinasa por RA.

Se presenta un detalle de la autorradiografía de la placa de TLC, donde se observa la generación de Fosfatidil-Inositol-3-Fosfato *in vitro* por extractos totales de células tratadas con 1 μ M RA durante 0, 24 y 48 h. En paralelo se llevó a cabo un ensayo en presencia de 30 μ M LY 294002. En la parte de debajo de la figura se muestra la cuantificación de la radiactividad presente en las señales mostradas expresada como porcentaje de la actividad observada en condiciones control. El experimento fue repetido 4 veces con distintas cantidades de proteína, y se obtuvieron resultados equivalentes. La figura muestra un experimento representativo.

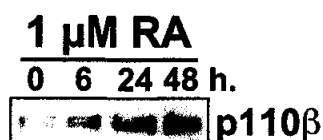


Figura 33. Incremento de la expresión de proteína p110β por RA.

Western Blot obtenido con 20 μg de extracto de proteínas de células SH-SY5Y tratadas con 1 μM RA durante 0, 6, 24 y 48 h y un anticuerpo específico contra p110β (110 KD).

3.4.2 El tratamiento con RA incrementa la fosforilación de AKT en Ser 473.

AKT es una proteína diana de la PI3K. Se piensa que AKT desempeña un importante papel en la protección de células frente a la apoptosis y promueve su supervivencia (para revisión: *Eves y col., 1998; Downward, 1998*). La forma activa de AKT está fosforilada en Thr 308 y Ser 473 por la PDK-1 en respuesta a niveles altos de fosfatidil-inositol-3-fosfato (*Alessí y col., 1997; Sato y col., 2000*). Para comprobar si el RA induce la fosforilación de AKT se hizo un Western Blot con extractos de proteínas de células SH-SY5Y tratadas: 0 h, 30 min, 1 h, 2 h, 3 h, 4 h y 6h y un anticuerpo específico de AKT-fosforilado. Tras media hora de tratamiento con 1 μM RA ya se detecta fosforilación de AKT que alcanza un máximo a las 2-3 h (*figura 34*). El blot se reveló a continuación con un anticuerpo contra AKT.

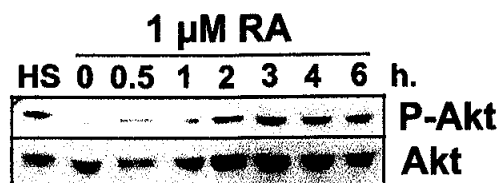


Figura 34. El RA induce fosforilación de AKT.

Western Blot obtenido con 20 μ g de extracto de proteínas de células SH-SY5Y tratadas con 1 μ M RA durante 0 h, 0.5 h, 1 h, 2 h, 3 h, 4 h y 6 h y anticuerpos específicos contra AKT fosforilado en Ser 473 (P-AKT) y contra AKT (60 KD). Como control se incluye el extracto de células SH-SY5Y sometidas a un shock térmico (HS, 45°C, 30 min.) un conocido inductor de la fosforilación (Bijur y Jope, 2001).

3.4.3 La inhibición de la vía PI3K/AKT por LY294002 bloquea la diferenciación inducida por RA.

Queremos verificar la importancia de la activación de la vía de señalización PI3K/AKT por RA en la diferenciación celular. Para ello hemos comprobado el efecto de la inhibición de la PI3K mediante su inhibidor selectivo LY294002 en la diferenciación celular inducida por RA. En primer lugar, hemos estudiado el efecto sobre los cambios morfológicos que el RA produce sobre las células SH-SY5Y.

Consideramos que una célula está diferenciada cuando posee neuritas con una longitud igual o superior a dos veces la de su cuerpo celular. Con este criterio, observamos que el tratamiento con 1 μ M RA durante 24 h produce un notable incremento en el porcentaje de células diferenciadas (figura 35). Este incremento no se produce en presencia de 10 μ M LY 294002. El tratamiento con el inhibidor incluso reduce el

porcentaje de células que se diferencian espontáneamente en ausencia de RA.

Como criterio bioquímico de diferenciación neuronal hemos tomado la expresión del gen *GAP43*. Es una proteína que interviene en el crecimiento del axón y cuya expresión se asocia con las primeras fases de la diferenciación neuronal. Mediante Northern Blot hemos observado que la expresión de *GAP43* se incrementa fuertemente durante la diferenciación inducida por RA 1 μM . En presencia del inhibidor selectivo LY 294002 se produce un incremento de los niveles basales del ARNm de *GAP43*, producido posiblemente por un efecto colateral del inhibidor. Sin embargo, no se observa un incremento en la expresión de *GAP43* por el tratamiento simultáneo con RA y LY 294002 (*figura 36*).

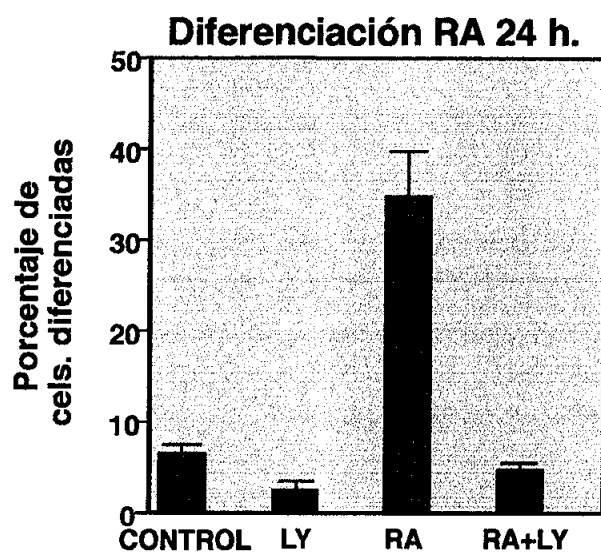


Figura 35. La diferenciación inducida por RA requiere actividad PI3K.

Gráfica que representa el porcentaje de células SH-SY5Y diferenciadas morfológicamente después de un tratamiento con 50 μM LY 294002 durante 0 h y 24 h y en ausencia y presencia de 1 μM RA tal como se indica en la figura. Los resultados corresponden a la media \pm desviación estándar de una determinación realizada por triplicado.

El tratamiento con RA también da lugar al incremento de la expresión del gen anti-apoptótico *BCL2*. En paralelo a lo observado para *GAP43*, se observa un pequeño incremento en el nivel basal de *BCL2* por efecto del inhibidor LY 294002. Sin embargo, no se produce una inducción de *BCL2* por el tratamiento con RA en presencia del inhibidor (*figura 37*).

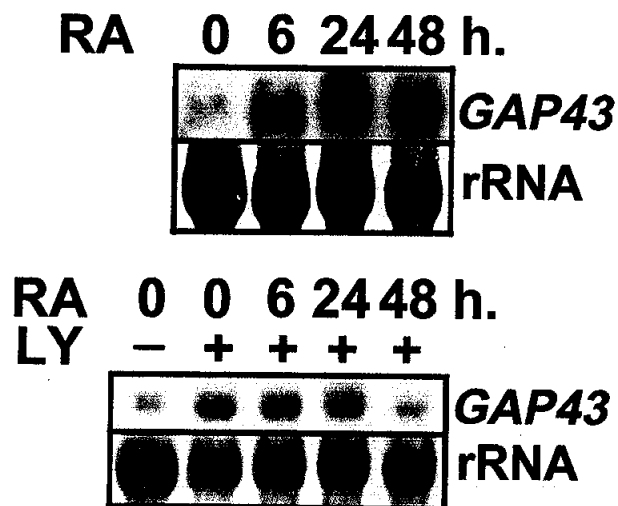


Figura 36. La regulación positiva de *GAP43* por RA requiere actividad PI3K.

Northern Blot obtenido con 15 μ g de ARN total extraído de células SH-SY5Y tratadas con 1 μ M RA durante: 0 h, 6 h, 24 h y 48 h en ausencia y en presencia de 10 μ M LY294002, como se indica. El blot fue hibridado con una sonda específica de *GAP43* (1.4 Kb). La señal del ARN ribosómico 28S teñido con azul de metileno se muestra como control de carga.

En resumen, la inhibición de la PI3K mediante el inhibidor selectivo LY 294002 evita la diferenciación celular producida por RA, como hemos mostrado según criterios morfológicos y moleculares. Además, el tratamiento con LY 294002 bloquea la activación de la expresión del gen anti-apoptótico *BCL2* y probablemente abole los efectos del RA sobre la supervivencia celular.

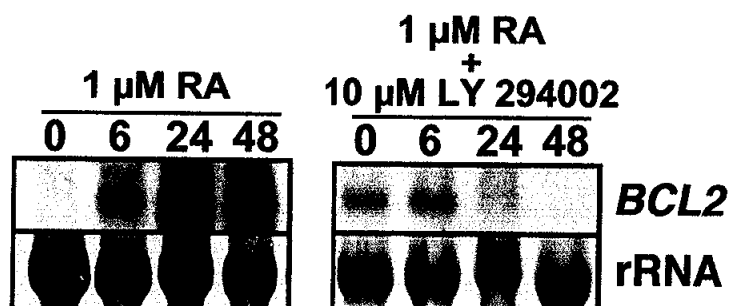


Figura 37. La regulación positiva de *BCL2* por RA requiere actividad PI3K.

Northern Blot obtenido con 15 μg de ARN total extraído de células SH-SY5Y tratadas con 1 μM RA durante: 0 h, 6 h, 24 h y 48 h en ausencia y en presencia de 10 μM LY294002, como se indica. El blot fue hibridado con una sonda específica de *BCL2* (7.6 kb). La señal del ARN ribosómico 28S teñido con azul de metileno se muestra como control de carga.

DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

El objetivo del presente trabajo es analizar y caracterizar los mecanismos moleculares a través de los cuales el ácido retinoico induce diferenciación en las células de neuroblastoma humano SH-SY5Y.

Como el papel del RA en la diferenciación de células del Sistema Nervioso es conocido, (para revisión: *Maden y Holder, 1992*), pensamos que las células de neuroblastoma SH-SY5Y podrían ser un buen modelo para llevar a cabo dicho análisis. En células de neuroblastoma SH-SY5Y, el tratamiento con 1 μM de RA induce la diferenciación morfológica y bioquímica (*Sidell, 1982; Irving y col., 1998*) y se observa un fenotipo neuronal ya a las 24 h de tratamiento.

Estudiar el mecanismo molecular a través del cual, actúa el RA, también resulta interesante desde un punto de vista biomédico, puesto

que los retinoides y sus derivados sintéticos son utilizados en terapia de neuroblastoma y también de otros tipos de cánceres (*ver párrafo 1.3 de Introducción*). El estudio de los genes regulados diferencialmente por RA, así como de los mecanismos por los que se producen estos cambios en la expresión génica, puede ayudar a mejorar la eficiencia de los tratamientos existentes y contribuir a detectar nuevas dianas terapéuticas en la lucha contra el cáncer.

Mediante DDO hemos identificado una serie de genes que están regulados por RA en el proceso de la diferenciación celular. Aunque sólo hemos explorado una pequeña parte de los cambios de expresión génica que produce el RA en estas células, este rastreo ha sido suficiente para encontrar genes que estimamos muy relevantes en el proceso de diferenciación celular. Esto nos indica que la estrategia empleada es útil.

No obstante, el objetivo de esta tesis no es hacer un listado más o menos detallado de genes regulados diferencialmente por RA, sino profundizar en los posibles mecanismos moleculares de acción del RA, partiendo de esta primera búsqueda. A través del estudio de la regulación de uno de los genes identificados, hemos descrito un nuevo mecanismo involucrado en la regulación de la diferenciación por RA. Hemos demostrado que el RA induce la activación de la vía de señalización de la PI3K/AKT. La activación de esta vía es necesaria para la diferenciación celular, y probablemente tiene una gran relevancia a nivel fisiológico, puesto que acopla procesos vitales como son la diferenciación y la supervivencia celular. Aunque el mecanismo molecular por el cual el RA activa la vía PI3K/AKT no está todavía definido, los resultados obtenidos

indican que, probablemente, podría tratarse de una acción extragenómica del RAR, entre otras razones por la rapidez con la que se produce. No obstante, hasta ahora no ha sido posible demostrar que exista una interacción directa entre el RAR y la subunidad reguladora de la PI3K.

1. El DDO es una técnica útil para el estudio de la expresión diferencial de genes regulados por RA.

El DDO constituye una técnica válida, que ha resultado de gran utilidad como estrategia para identificar genes expresados diferencialmente por RA, lo que constituye nuestro primer objetivo. El DDO se caracteriza por una alta sensibilidad y además permite en un mismo experimento el estudio tanto de genes regulados positivamente como negativamente (*Matz y col., 1997*). Además, ha presentado una elevada fiabilidad, ya que se ha confirmado por Northern Blot la regulación diferencial de un alto porcentaje (83%) de las secuencias de alta calidad obtenidas. Tras estos resultados, consideramos que es un método útil, fiable, versátil y flexible. Sin embargo, esta técnica presenta algunos inconvenientes: es bastante laboriosa, y requiere mucho tiempo y esfuerzo para llegar a analizar una fracción significativa del genoma, y por lo tanto no resulta adecuada para el estudio de la totalidad del mismo. En la actualidad el uso de *microchips* permite un análisis de la expresión diferencial de genes de un modo mucho más rápido, eficiente y menos laborioso, aunque requiere un equipo mucho más sofisticado y su coste actual resulta muy elevado. Por lo tanto, el empleo de los *microchips* no resulta práctico para las fases iniciales de un proyecto, en las que no se

dispone de un conocimiento importante del fenómeno a estudiar. Lo más correcto quizás, sería combinar ambas técnicas: primero realizar una búsqueda orientativa con el DDO, para caracterizar inicialmente el fenómeno en cuanto a cinética y complejidad de la respuesta, y una vez conocidos estos parámetros, emplear los *microchips* para un análisis masivo.

2. Los genes expresados diferencialmente por RA identificados reflejan los cambios que se producen en la diferenciación celular.

Hemos observado que el RA afecta a la expresión de genes implicados en múltiples procesos dentro de la célula, y hemos agrupado los genes identificados según su supuesta función: transcripción y expresión génica, transducción de señales y ciclo celular, genes relacionados con funciones neuronales etc... (*ver tabla 2*).

En un proceso como la diferenciación celular, hay que pensar que se produzcan cambios en la expresión de un altísimo número de genes. Esto explicaría la presencia entre los genes identificados de proteínas relacionadas con la expresión génica en sentido amplio. Factores de transcripción o factores asociados a estos, como *ID3* o *RUVBL2* son regulados diferencialmente por tratamiento con RA. Lo mismo ocurre con la *PTMA*, cuya función es controvertida, pero que se ha implicado en la remodelación de la cromatina (*Gómez-Márquez y Rodríguez, 1998; Karetsou y col., 1998*) y con el *HRNP* que pudiera estar implicado en el procesamiento del ARN (*Min y col., 1995*). La helicasa *RUVBL2* está regulada negativamente por RA. Se trata de una proteína de la matriz

nuclear que interacciona con *MYC* (Wood y col., 2000), y esto se podría correlacionar con la disminución paralela observada en la expresión de este gen por efecto del RA.

En células derivadas de linaje hematopoyético se ha descrito que la expresión de *PTMA* está elevada en células en proliferación y su expresión disminuye durante la diferenciación. Además, su transcripción es estimulada por mitógenos (Gómez-Márquez y col., 1989; Bustelo y col., 1991) y en respuesta a niveles altos de *MYC* (Eilers y col., 1991). Nuestros resultados en células SH-SY5Y no coinciden con estos datos, puesto que hemos encontrado que el RA incrementa los niveles de *PTMA* y a su vez reduce la expresión de *MYC* (Thiele y col., 1985; ver figura 14). Los resultados indican que la expresión de *PTMA* estaría controlada por otros mecanismos adicionales a la simple regulación directa por *MYC*. En este sentido, en células de neuroblastoma SK-ER3, que expresan el receptor de estrógenos, se ha descrito también una regulación positiva de *PTMA* durante la diferenciación celular (Garnier y cols., 1997), lo que podría implicar mecanismos de regulación específicos de tejido en la regulación de este gen. Es de destacar que en el promotor de *PTMA* se ha localizado un E-box (Szabo y col., 1993), secuencia a la cual se pueden unir tanto el heterodímero *MYC/MAX*, como factores bHLH, cuya expresión también se incrementa durante la diferenciación inducida por RA (figura 22).

El tratamiento con RA también induce cambios en genes implicados en transducción de señal y en genes relacionados con la regulación del ciclo celular. Este es el caso de *SRM*, que codifica la Espermidina sintetasa, una enzima implicada en la biosíntesis de poliaminas que son necesarias

para la proliferación de células animales (Janne y col., 1991). También hemos observado la inducción de *HSPCA*, que codifica para la proteína de respuesta a shock térmico hsp89 α , una chaperona que interacciona con múltiples proteínas involucradas en la regulación transcripcional y la transducción de señal (Hickey y col., 1986). La Mitosina (*CENPF*) es una fosfoproteína nuclear de 350 KD que se une a la proteína de retinoblastoma y que se ha implicado en la progresión del ciclo celular en la fase de mitosis (Zhu y col., 1995). *CENPF* se expresa durante la fase S y las fases G₂/M y desaparece rápidamente cuando finaliza la mitosis. Se ha postulado que desempeñe un papel en carcinogénesis, debido a su localización en el cromosoma 1q32-41, una región que está alterada en multitud de cánceres de pecho, de pulmón y leucemias (Lemoine, 1994; Minna, 1993; Hawkins y col., 1992). Otro de los genes identificados es *NUCKS*, una fosfoproteína nuclear que sirve como sustrato de CDK1 *in vivo* y se encuentra fosforilada durante la mitosis en residuos de treonina (Ostvoid y col., 2001).

El gen *LAMR1* es un receptor de laminina no integrina, que recientemente se ha demostrado que es el receptor de priones (Gauczynski y col., 2001; Hundt y col., 2001). Lo más destacado de este gen, es su papel en la progresión y metástasis de diversos tipos de cáncer, y se ha asociado a su expresión una mayor agresividad e invasividad del tumor (Menard y col., 1998). Este receptor puede ser una importante diana para el tratamiento del cáncer, ya que la inhibición de su expresión podría disminuir la agresividad del tumor. Aunque no hay ningún dato experimental que lo sustente, es tentador especular con que la

disminución de la expresión de *LAMR1* provocada por RA puede estar relacionada con el efecto terapéutico del RA en el tratamiento del neuroblastoma.

De acuerdo con la idea de que con la diferenciación la célula de neuroblastoma inicia su transición a una neurona madura, hemos encontrado genes relacionados con funciones neuronales que están regulados positivamente por RA, como son el receptor de opioides $\mu 1$ (*OPRM1*) (*Chen y col., 1993*), el receptor de acetil-colina $\alpha 3$ (*CHRNA3*) (*Fornasari y col., 1990*) y la proteína de unión de fosfatidil-etanolamina (*PBP*) (*Hori y col., 1994*). Otros genes regulados positivamente por RA, como el *OCRL*, *SYT4* o *ATP6S1* están implicados en el tráfico de vesículas sinápticas. Las sinaptotagminas son proteínas de membrana de vesículas sinápticas que sirven como sensores de Ca^{2+} en el proceso de tráfico vesicular y exocitosis (*Wang y col., 2001*). La *SYT4*, que detectamos que se inducía con RA, se expresa en muchas regiones del sistema nervioso principalmente en el hipocampo, pero es indetectable en tejidos extraneurales (*Ferguson y col., 2000*). La *SYT4* es crítica para el correcto funcionamiento del cerebro, puesto que mutaciones en este gen afectan a la capacidad de aprendizaje y memoria del hipocampo, así como a la coordinación motora (*Ferguson y col., 2000*). El gen *OCRL* codifica para una inositol polifosfato-5-fosfatasa, que controla los niveles celulares del metabolito fosfatidil-inositol-4,5-bisfosfato, y cuyo déficit provoca el síndrome oculocerebral de Lowe, que es un desorden del desarrollo asociado al cromosoma X (*Zhang y col., 1995*). La *ATP6S1* forma parte de la ATPasa vacuolar, que establece un gradiente electroquímico de

protones y sistemas de transporte específicos para cargar los neurotransmisores en las vesículas sinápticas (para revisión: *Moriyama y col., 1992*).

Entre los genes identificados también hemos encontrado genes relacionados con la síntesis de proteínas, como las proteínas ribosomales y otras. Cabe especular que este fenómeno esté relacionado con la parada de la división celular que produce el tratamiento con RA.

Además, hemos detectado secuencias reguladas por RA de cuya función no se tienen datos, como ESTs y secuencias genómicas. También se han obtenido secuencias nuevas, que no han sido identificadas previamente y no aparecen en las bases de datos. Algunas de estas secuencias no identificadas, son cortas, y si su calidad es baja pudiera resultar difícil encontrar homologías significativas en las bases de datos. Sin embargo, también hemos obtenido secuencias largas y de alta calidad para las que no hemos obtenido una identificación positiva. Aunque se ha popularizado la idea de que la secuencia del genoma humano se conoce completamente, todavía hay una parte significativa de la secuencia del genoma humano que no ha podido ser obtenida o no se ha hecho pública. Aunque el análisis de estas secuencias podría resultar interesante, su estudio detallado se alejaba de nuestro objetivo inicial.

3. Regulación negativa de los factores de transcripción IDs por RA y por TPA.

Entre los genes obtenidos expresados diferencialmente por RA, nos llamó la atención un factor de transcripción denominado *ID3*, puesto que es un inhibidor de la diferenciación (para revisión: *Benezra y col., 1990; Norton, 2000*), que es regulado negativamente durante la diferenciación celular inducida por RA (*figura 17*). Planteamos como hipótesis, que el RA permitiría el inicio de la diferenciación a través de la reducción de la expresión de un inhibidor de la diferenciación como *ID3*.

Hemos observado, que el tratamiento con RA provoca un descenso de los niveles de ARN mensajero de *ID3*, siguiendo una cinética diferida, ya que tiene lugar tras 6-24 h de tratamiento (*figura 17*). El estudio mediante ensayo de transcripción *Run on*, indica que el tratamiento con RA produce una severa reducción de la tasa de transcripción de *ID3*, en consonancia con lo observado en el nivel de expresión del ARN mensajero (*figura 18*).

La familia de los IDs está constituida por cuatro genes relacionados en estructura y función (para revisión: *Norton y col., 2000*). La expresión de los genes *ID1* e *ID2* es regulada por RA con una cinética paralela a la de *ID3* (*figura 19*). No detectamos la expresión de *ID4* en células SH-SY5Y. Los niveles de proteínas *ID1*, *ID2* e *ID3* disminuyeron de manera notoria tras 24 h de tratamiento con RA, en paralelo a lo observado a nivel de ARN mensajero (*figura 20*). Los resultados obtenidos indican que el RA produce una regulación negativa coordinada de los genes *ID*.

Los factores ID actúan impidiendo la formación de heterodímeros funcionales entre factores de transcripción HLH con dominio básico, lo que impide su unión a secuencias específicas de ADN y la activación transcripcional de genes implicados en diferenciación celular (*figura 8*). La inhibición de la expresión de los genes *ID* por RA, dejaría libres a factores de transcripción bHLH capaces de formar heterodímeros funcionales que activaran la diferenciación celular. El ensayo de retardo en gel apoya esta idea y muestra un incremento en la formación de complejos sobre un elemento E-box en las células tratadas con RA, a pesar de que el ensayo de EMSA que planteamos no demuestra estrictamente que los complejos formados sobre el elemento E-box sean entre factores de transcripción bHLH (*figura 21*). La regulación negativa de los IDs daría lugar a un incremento de factores bHLH libres capaces de formar heterodímeros funcionales y unirse a secuencias E-box. Adicionalmente, la activación de la expresión de factores bHLH observada durante la diferenciación inducida por RA también debería contribuir a contrarrestar el efecto inhibitorio de los factores ID. Es de notar que la expresión de los factores bHLH implicados en diferenciación neural, como *NEUROD1* y *NEUROD6*, es regulada a través de secuencias E-box presentes en su región promotora (*Miyachi y col., 1999; Bartholomä y Nave, 1994*), y por lo tanto el descenso en los niveles de los factores ID producido por el RA permitiría quizás una inducción auto-regulatoria. La expresión de estos genes de la subfamilia *atonal* podría ser suficiente para iniciar el proceso de diferenciación neural, ya que se ha demostrado que su expresión ectópica es suficiente para producir la diferenciación (*Lee, 1995; Cho y col.,*

2001). Del mismo modo, se podría explicar la inducción de la expresión de *GAP43*, un conocido marcador neuronal, durante el tratamiento con RA (figura 22). Está documentado que *GAP43* se encuentra regulado por factores bHLH y en su promotor posee secuencias E-box que podrían ser diana de los factores bHLH (Chiaramello y col., 1996).

También se observan otros tipos de regulación en genes involucrados en determinación y diferenciación neuronal, como la rápida regulación negativa de *ASCL1*, que es un gen de determinación típico de neuroblastos no diferenciados (figura 22). Esta regulación negativa de *ASCL1* en la diferenciación de células SH-SY5Y inducida por RA (y por TPA) ha sido descrita por otros autores mientras este trabajo estaba en preparación (Soderholm y col., 1999; Grynfeld y col., 2000). Estos autores también han detectado la expresión en células SH-SY5Y de factores bHLH ubicuos, como E2-2 (Persson y col., 2000).

Vistos en su conjunto, los resultados obtenidos indicarían que los genes bHLH neurogénicos actúan como genes efectores de la señal de diferenciación iniciada por RA.

También hemos estudiado el efecto del TPA, otro de los compuestos que inducen diferenciación neuronal en líneas celulares de neuroblastoma, sobre la expresión de los genes *IDs*. El TPA produce una regulación negativa coordinada de los genes *IDs* similar a la inducida por RA (figura 23). A diferencia del RA, el tratamiento con TPA resulta en una inducción transitoria de *ID4*. Esta inducción transitoria podría deberse al solapamiento de dos mecanismos de regulación, por un lado la activación

directa y a corto plazo de *ID4* por TPA y por otro lado una regulación negativa conjunta diferida de los genes *IDs*.

Nos parece que hay que destacar la importancia de que estímulos diferenciadores que actúan a través de mecanismos muy distintos, como es el caso de TPA y RA, convergen en la regulación negativa y coordinada de los genes *IDs*. Esto indica que la regulación negativa de los genes *IDs* desempeña un importante papel en la regulación de la diferenciación.

Por otro lado, estos resultados también sugieren que el mecanismo a través del cual el RA produce la regulación negativa coordinada de los genes *IDs* debe ser complejo. Intentando profundizar en este mecanismo de regulación, hemos demostrado que la regulación negativa coordinada de los genes *ID* requiere proteínas de nueva síntesis (*figura 24*). Además hemos descrito que en esta regulación está implicada una importante ruta de señalización intracelular: la vía de la PI3K, ya que la represión transcripcional de los genes *IDs* por el tratamiento con RA no se produce en presencia de LY294002, un inhibidor específico de la PI3K (*figura 25*). La vía de señalización de la PI3K está implicada en diferenciación en muchos tipos de células y de hecho nos llamó la atención el notable paralelismo entre lo que sucede en la diferenciación de células musculares y de células de neuroblastoma. En ambos casos intervienen proteínas de la familia bHLH, y durante la diferenciación se produce la activación de NF- κ B y la producción de NO, que también se producen en la diferenciación de células de neuroblastoma (*Florini y col., 1996; Kaliman y col., 1998, Kaliman y col., 1999; Feng y Porter, 1999*). En la diferenciación de mioblastos desempeña un papel muy importante la activación de la vía

de señales de la PI3K/AKT y la inhibición de la PI3K mediante su inhibidor selectivo LY294002 produce un bloqueo en la diferenciación (Kaliman y col., 1998, Kaliman y col., 1999).

4. El RA activa la vía de PI3K/AKT, y esta activación es requerida para la diferenciación neural.

El hecho de que sea necesaria la vía de la PI3K/AKT para la regulación negativa de los IDs puede deberse a un requerimiento de una actividad enzimática basal, o bien porque se produzca una activación de PI3K por RA. Los resultados obtenidos en el ensayo de actividad PI3K revelan que existe una intensa inducción (unas cuatro veces) de la actividad PI3K a las 24 h de tratamiento con RA, que se mantiene hasta las 48 h (*figura 32*). El hecho de que esta inducción sea tan sostenida en el tiempo, puede ser debido al incremento observado de los niveles de la subunidad catalítica p110 β de la PI3K (*figura 33*). Esta inducción de p110 β no se produce a nivel transcripcional, puesto que no hemos detectado incremento de su ARN mensajero, sino que posiblemente se debe a un efecto sobre la estabilidad de la proteína. Otros autores han observado un incremento similar de p110 β durante la diferenciación de adipocitos de ratón (Asano y col., 2000). La proteína kinasa AKT es una de las dianas de la PI3K, y es activada por la PDK1 en respuesta a niveles altos de Fosfatidil-inositol. AKT desempeña un importante papel en la protección de las células frente a la apoptosis y por lo tanto promueve la supervivencia celular (para revisión: Brunet y col., 2001). Hemos demostrado que AKT se encuentra en su forma activa, fosforilada en Ser

473, tras sólo 30 minutos de tratamiento con RA (*figura 34*). Estos resultados indican que el RA activa la ruta de la PI3K/AKT, que es clave en la regulación de la supervivencia celular. Además, nuestros resultados revelan que la vía de la PI3K/AKT es necesaria para que se produzca la diferenciación ya que si se impide su activación mediante el inhibidor LY294002, no se produce diferenciación de acuerdo a criterios morfológicos ni bioquímicos. La extensión de neuritas típica de la diferenciación celular inducida por RA no se observa en células SH-SY5Y tratadas con RA en presencia del inhibidor LY29004 (*figura 35*). También hemos descrito que la activación transcripcional del marcador neuronal *GAP43* por RA no se produce en ausencia de actividad PI3K (*figura 36*).

Los resultados obtenidos indican que la activación de la vía de señalización de la PI3K/AKT es necesaria para la diferenciación de células de neuroblastoma SH-SY5Y. Sin embargo, no pensamos que la activación de la vía de señalización de la PI3K/AKT sea suficiente para iniciar el proceso de diferenciación neural. Recientemente, otros autores han expresado transitoriamente en células SH-SY5Y una PI3K-p110 mutante de actividad constitutiva y han observado que únicamente se produce una extensión de neuritas muy incipiente (*F. Wandosell, datos no publicados*). En este mismo sentido el IGF-I, un potente activador de la PI3K, no sólo no induce diferenciación sino que es mitogénico en células SH-SY5Y (*Pérez-Juste y Aranda, 1999*). Sin embargo, el IGF-I coopera fuertemente con RA en la inducción de la diferenciación, lo que ahora se explica más claramente a la luz de nuestros resultados.

Una importante cuestión que se deriva de los resultados obtenidos es el mecanismo molecular por el que el RA activa la PI3K. Los activadores típicos de la PI3K son los que actúan a través de receptores de tirosina-kinasa: IGF, PDGF, FGF... Además muchos factores de este tipo favorecen la diferenciación de células de neuroblastoma (*Lavenius y col., 1994*). Basándonos en estos datos y puesto que el mecanismo de acción típico del RA es la regulación génica, pensamos en un principio que el RA podría activar la PI3K a través de la inducción de la expresión de un receptor tirosina-kinasa. Un posible candidato para esta acción es el receptor tirosina-kinasa RET, que se localiza en la membrana celular y cuya expresión es relativamente frecuente en tumores y líneas de neuroblastoma y en células derivadas de la cresta neural (*Tahira y col., 1991*). La expresión de *RET* se detecta tras 6 h de tratamiento con RA, su inducción no requiere síntesis de nuevas proteínas ni actividad PI3K (*figuras 26, 27, 28 y 29*). RET es el receptor de los factores neurotróficos de la familia del GDNF. El complejo receptor de factores de la familia GDNF requiere además de RET, que es la subunidad tirosina-kinasa, un co-receptor denominado $GFR\alpha$, del que existen cuatro isoformas con distintas especificidades de ligando (*Airaksinen y col., 1999*). Por lo tanto, para que la inducción transcripcional de RET por RA resultara en la activación de su actividad kinasa requeriría la expresión de alguno(s) de los co-receptores, así como la expresión y liberación al medio de alguno(s) de los ligandos de la familia de GDNF, que pudieran activar el complejo RET- $GFR\alpha$ de un modo autocrino/paracrino. Hemos detectado la expresión del co-receptor $GFR\alpha 2$ en las células SH-SY5Y (*figura 31*), pero no hemos

detectado ninguno de los ligandos de la familia del GDNF. Tampoco hemos detectado fosforilación en residuos tirosina en RET, lo que indicaría que aunque aumenta su expresión, RET no está activado y por lo tanto no podría ser responsable de activar la PI3K. La inducción de RET por RA, resulta de este modo, en la generación de la capacidad para responder a factores neurotróficos de la familia de GDNF, y curiosamente ésta parece ser una acción específica del RA, ya que los tratamientos con TPA no conducen a la activación transcripcional de *RET* (figura 30).

Aunque no se pueden excluir otros mecanismos, parece probable que el RA active la vía PI3K/AKT directamente a través de una acción atípica extragenómica de su receptor. Además no hemos podido detectar activación de la PI3K por RA a partir de inmunoprecipitados de extractos celulares con anticuerpos anti-fosfotirosina, lo que argumentaría en contra de una activación mediada por tirosina-kinasas. Pensamos en una acción no genómica porque la respuesta se produce de una forma muy rápida, y ya detectamos fosforilación de AKT a los 30 minutos de tratamiento. Se han descrito un número creciente de acciones extragenómicas de los receptores nucleares en los últimos años, que han sido involucradas en diversos procesos biológicos (para revisión: *Falkenstein y col., 2000; Schmidt y col., 2000*). En el caso concreto de la PI3K, se ha descrito su activación por Estradiol en células endoteliales, a través de una acción extragenómica del ER. Esta activación tendría como resultado la producción de NO y la relajación del endotelio (*Haynes y col., 2000; Simoncini y col., 2000*). Además se ha postulado que los efectos neuroprotectivos de los estrógenos en células nerviosas se deberían a la

activación de la vía PI3K por ER a través de acciones extragenómicas (Honda y col., 2000; Honda y col., 2001). Finalmente, se ha descrito una activación de la PI3K a través de una acción extragenómica del receptor de Vitamina D3, que estaría implicada en la diferenciación de células mieloides (Hmama y col., 1999). En estos casos se ha podido establecer la formación de un complejo entre el receptor nuclear y la subunidad reguladora p85 de la PI3K (Hmama y col., 1999; Simoncini y col., 2000; Castoria y col., 2001). Sin embargo, en nuestro caso, no hemos podido demostrar hasta el momento una interacción directa entre p85 y RAR α mediante co-inmunoprecipitación.

Los resultados obtenidos, nos llevan a postular, que el RA desempeña un papel muy importante en la regulación de la supervivencia de las células neurales. La regulación positiva del gen anti-apoptótico *BCL2* durante la diferenciación inducida por RA en células de neuroblastoma es un hecho conocido desde hace tiempo (Hanada y col., 1993), y la diferenciación incrementa la resistencia a la apoptosis inducida por drogas (Lombet y col., 2001, Lasorella y col., 1995). También se han descrito efectos del RA sobre la supervivencia celular en cultivos primarios de neuroblastos de médula espinal (Wuarin y col., 1990; Wuarin y Sidell, 1991) y en neuronas derivadas de células madre neurales (Takahashi y col., 1999). Los resultados presentados aquí proporcionan un mecanismo molecular para explicar estos efectos.

Además, pensamos que el fenómeno aquí descrito en células de neuroblastoma pudiera ser relevante en la diferenciación neural en general. La coordinación de las acciones genómicas y extragenómicas del

RA da lugar al acoplamiento entre la diferenciación y la supervivencia celular (*figura 38*). Por una parte el RA regula la transcripción de genes específicos implicados en diferenciación celular. Por otra parte, a través de una acción extragenómica, el RA activa la vía de PI3K/AKT, que está implicada en la supervivencia celular. Los dos tipos de acciones no se producen de un modo independiente, sino que están entrelazados. La activación extragenómica de la vía PI3K/AKT también está implicada en la regulación transcripcional de genes decisivos para la diferenciación, como hemos demostrado en el caso de la regulación negativa coordinada de los genes *IDs*. Recíprocamente, el RA puede contribuir a la supervivencia celular a través de la regulación transcripcional positiva de receptores de neurotrofinas, como RET y de *trkB* (*Tahira y col., 1991; Kaplan y col., 1993; Lucarelli y col., 1995*). Este acoplamiento entre diferenciación y supervivencia es un fenómeno novedoso. En otro sistema modelo muy utilizado de diferenciación neural, las células de feocromocitoma PC12, la diferenciación y la supervivencia parecen estar reguladas independientemente. La diferenciación de células PC12 mediante NGF requiere la actividad de la vía RAS/ERK, pero su inhibición no afecta a la supervivencia que produce NGF. Recíprocamente, la inhibición de la vía PI3K afecta a la supervivencia celular pero no a la diferenciación (*Klesse y col., 1999; Ashcroft y col., 1999*).

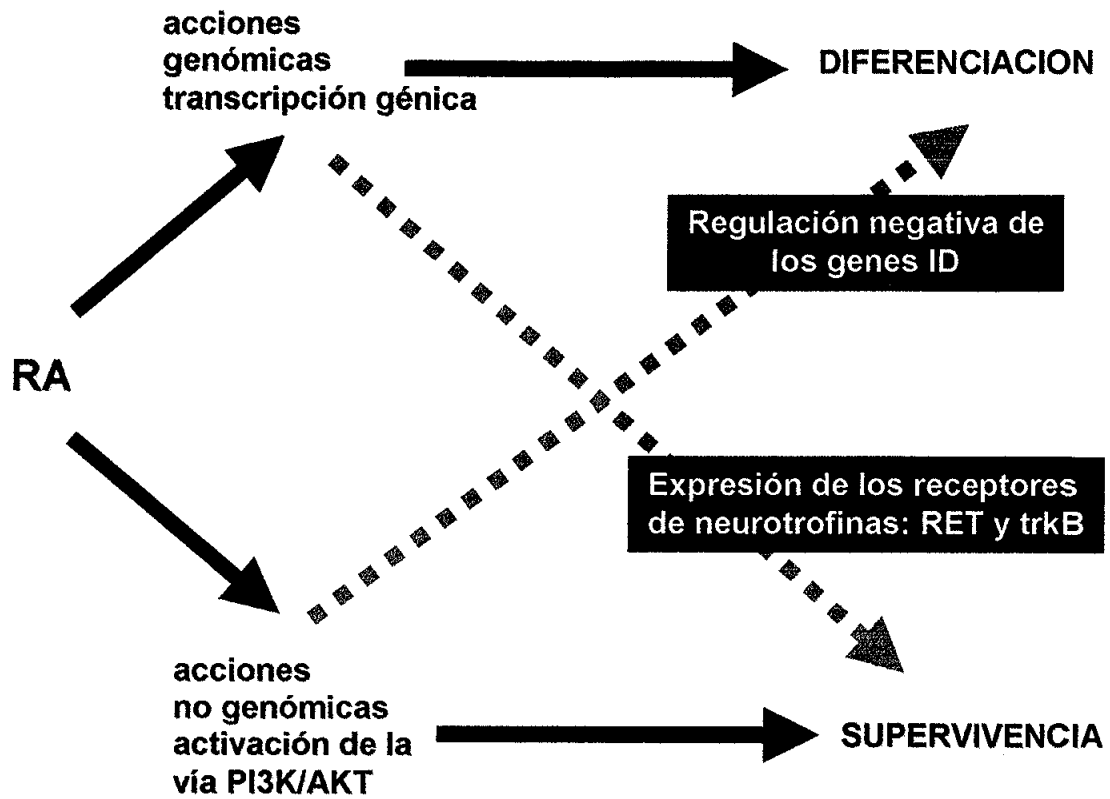


Figura 38 Acciones genómicas y no genómicas del RA

Esquema que representa las dos vías de acción del RA. Una vía genómica típica por la que regula transcripción de genes implicados en diferenciación (y supervivencia). Otra vía no genómica atípica, que implica la activación de la ruta PI3K/AKT que está vinculada a procesos de supervivencia (y diferenciación).

La regulación conjunta de la diferenciación y la supervivencia a través de RA pudiera desempeñar un importante papel fisiológico. En el caso de las neuronas, se genera un número mucho mayor de células que las que se requieren, para asegurar que se produzcan todas las conexiones necesarias. Las células que establecen la conexión con su célula diana reciben de ella factores de supervivencia, mientras que las que no logran conectar con su célula diana sufren muerte celular por apoptosis, en un proceso que se ha denominado "estrategia neurotrófica" (*Pettmann y Henderson, 1998*). El acoplamiento entre diferenciación celular y supervivencia, permitiría evitar una muerte celular prematura, permitiendo la supervivencia de la neurona recién diferenciada por un período limitado de tiempo, hasta que eventualmente estableciera contacto con su célula diana que le aporte factores neurotróficos.

El RA y los retinoides sintéticos son utilizados cada vez más frecuentemente en la terapia del neuroblastoma y otros tipos de tumores. Otra consecuencia que se deriva de los resultados aquí presentados es que una activación de la vía PI3K/AKT que resulte en un incremento de la resistencia a la muerte celular puede ser un efecto poco deseable en el tratamiento del cáncer. Por lo tanto es necesario tener en cuenta este tipo de efectos al diseñar la terapia, si se ha de combinar con tratamientos anti-cancerosos cuya base sea la inducción de muerte celular, como la quimioterapia o la radioterapia. Una posible solución sería obtener retinoides sintéticos que no tuvieran la capacidad de activar la vía PI3K/AKT, y que deberían de ser ventajosos como terapia anti-cancerosa.

CONCLUSIONES

① Hemos identificado 43 genes regulados diferencialmente por RA durante la diferenciación de células de neuroblastoma humano. De ellos, 33 corresponden a genes o secuencias conocidos/as y 10 corresponden a secuencias para las que no se han encontrado homologías en las bases de datos.

② El tratamiento con RA produce una regulación negativa del ARN mensajero de *ID3*, a través de un descenso en su tasa de transcripción.

③ El RA produce una regulación negativa coordinada de los genes *ID1*, *ID2* e *ID3*. En paralelo, el RA produce una reducción en los niveles de las proteínas *ID1*, *ID2* e *ID3*. *ID4* no se expresa en células SH-SY5Y ni en condiciones control, ni tras el tratamiento con RA.

④ Tratamientos con ésteres de forbol (TPA), que conducen a la diferenciación de células SH-SY5Y, también producen la regulación negativa coordinada de la expresión de los genes *IDs*. En este caso se produce una activación transitoria de la expresión de *ID4*.

⑤ El RA produce cambios en los niveles de expresión de los factores bHLH involucrados en la especificación de destino y la diferenciación neural. El gen *ASCL1*, un gen de determinación neural típico de precursores en proliferación, es regulado negativamente. El RA activa la expresión de los genes *NEUROD6* y *NEUROD1*, que promueven la diferenciación neural terminal.

⑥ El mecanismo a través del cual el RA produce la regulación negativa de los genes IDs es complejo, y requiere proteínas de nueva síntesis y la actividad de la vía PI3K/AKT.

⑦ El RA activa la vía de transducción de señal de la PI3K/AKT. El mecanismo por el cual el RA activa la vía de PI3K/AKT no ha podido ser establecido, pero probablemente intervenga una acción extragenómica del receptor RAR.

⑧ La activación de la vía de transducción de señal PI3K/AKT es requerida para la diferenciación celular inducida por RA.

BIBLIOGRAFÍA

Adams, G. A., Shochat, S. J., Smith, E. I., Shuster, J. J., Joshi, V. V., Altshuler, G., Hayes, F. A., Nitschke, R., McWilliams, N. and Castleberry, R. P. (1993). Thoracic neuroblastoma: a Pediatric Oncology Group study. *J Pediatr Surg* 28, 372-377; discussion 377-378.

Airaksinen, M. S., Titievsky, A. and Saarma, M. (1999). GDNF family neurotrophic factor signaling: four masters, one servant? *Mol Cell Neurosci* 13, 313-325.

Alani, R. M., Hasskarl, J., Grace, M., Hernandez, M. C., Israel, M. A. and Munger, K. (1999). Immortalization of primary human keratinocytes by the helix-loop-helix protein, Id-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 9637-9641.

Alessi, D. R., James, S. R., Downes, C. P., Holmes, A. B., Gaffney, P. R., Reese, C. B. and Cohen, P. (1997). Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase Balph. *Curr Biol* 7, 261-269.

Alexander, F. (2000). Neuroblastoma. *Urol Clin North Am* 27, 383-392, vii.

Andres-Barquin, P. J., Hernandez, M. C. and Israel, M. A. (1999). Id4 expression induces apoptosis in astrocytic cultures and is down-regulated by activation of the cAMP-dependent signal transduction pathway. *Exp Cell Res* 247, 347-355.

Andrews, P. W. (1984). Retinoic acid induces neuronal differentiation of a cloned human embryonal carcinoma cell line in vitro. *Dev Biol* 103, 285-293.

Aranda, A. and Pascual, A. (2001). Nuclear hormone receptors and gene expression. *Physiol Rev* 81, 1269-1304.

Asano, T., Kanda, A., Katagiri, H., Nawano, M., Ogihara, T., Inukai, K., Anai, M., Fukushima, Y., Yazaki, Y., Kikuchi, M. et al. (2000). p110beta is up-regulated during differentiation of 3T3-L1 cells and contributes to the highly insulin-responsive glucose transport activity. *J Biol Chem* 275, 17671-17676.

Ashcroft, M., Stephens, R. M., Hallberg, B., Downward, J. and Kaplan, D. R. (1999). The selective and inducible activation of endogenous PI 3-kinase in PC12 cells results in efficient NGF-mediated survival but defective neurite outgrowth. *Oncogene* 18, 4586-4597.

Atchley, W. R. and Fitch, W. M. (1997). A natural classification of the basic helix-loop-helix class of transcription factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 5172-5176.

Aterman, K. and Schueller, E. F. (1970). Maturation of neuroblastoma to ganglioneuroma. *Am J Dis Child* 120, 217-222.

Atherton, G. T., Travers, H., Deed, R. and Norton, J. D. (1996). Regulation of cell differentiation in C2C12 myoblasts by the Id3 helix-loop-helix protein. *Cell Growth Differ* 7, 1059-1066.

Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Seidman, J.G., Smith, J.A., Struhl, K. (2000). In Current protocols in Molecular Biology. Jon Wiley and Sons, INC. New York.

Ayer, D. E., Kretzner, L. and Eisenman, R. N. (1993). Mad: a heterodimeric partner for Max that antagonizes Myc transcriptional activity. *Cell* 72, 211-222.

Bader, B. L., Rayburn, H., Crowley, D. and Hynes, R. O. (1998). Extensive vasculogenesis, angiogenesis, and organogenesis precede lethality in mice lacking all alpha v integrins. *Cell* 95, 507-519.

Bagowski, C. P., Xiong, W. and Ferrell, J. E., Jr. (2001). c-Jun N-terminal kinase activation in *Xenopus laevis* eggs and embryos. A possible non-genomic role for the JNK signaling pathway. *J Biol Chem* 276, 1459-1465.

Bain, G., Kitchens, D., Yao, M., Huettner, J. E. and Gottlieb, D. I. (1995). Embryonic stem cells express neuronal properties in vitro. *Dev Biol* 168, 342-357.

Bain, G., Maandag, E. C., Izon, D. J., Amsen, D., Kruisbeek, A. M., Weintraub, B. C., Krop, I., Schlissel, M. S., Feeney, A. J., van Roon, M. et al. (1994). E2A proteins are required for proper B cell development and initiation of immunoglobulin gene rearrangements. *Cell* 79, 885-892.

Bain, G., Ray, W. J., Yao, M. and Gottlieb, D. I. (1996). Retinoic acid promotes neural and represses mesodermal gene expression in mouse embryonic stem cells in culture. *Biochem Biophys Res Commun* 223, 691-694.

Baloh, R. H., Tansey, M. G., Lampe, P. A., Fahrner, T. J., Enomoto, H., Simburger, K. S., Leitner, M. L., Araki, T., Johnson, E. M., Jr. and Milbrandt, J. (1998). Artemin, a novel member of the GDNF ligand family, supports peripheral and central neurons and signals through the GFRalpha3-RET receptor complex. *Neuron* 21, 1291-1302.

Bannister, A. J. and Kouzarides, T. (1996). The CBP co-activator is a histone acetyltransferase. *Nature* 384, 641-643.

Barber, T., Borrás, E., Torres, L., García, C., Cabezuelo, F., Lloret, A., Pallardo, F. V. and Vina, J. R. (2000). Vitamin A deficiency causes oxidative damage to liver mitochondria in rats. *Free Radic Biol Med* 29, 1-7.

Barettino, D., Bugge, T. H., Bartunek, P., Vivanco Ruiz, M. D., Sonntag-Buck, V., Beug, H., Zenke, M. and Stunnenberg, H. G. (1993). Unliganded T3R, but not its oncogenic variant, v-erbA, suppresses RAR-dependent transactivation by titrating out RXR. *Embo J* 12, 1343-1354.

Barettino, D., Vivanco Ruiz, M. M. and Stunnenberg, H. G. (1994). Characterization of the ligand-dependent transactivation domain of thyroid hormone receptor. *Embo J* 13, 3039-3049.

Barone, M. V., Pepperkok, R., Peverali, F. A. and Philipson, L. (1994). Id proteins control growth induction in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 4985-4988.

Bartek, J., Bartkova, J. and Lukas, J. (1996). The retinoblastoma protein pathway and the restriction point. *Curr Opin Cell Biol* 8, 805-814.

- Bartholoma, A. and Nave, K. A. (1994). NEX-1: a novel brain-specific helix-loop-helix protein with autoregulation and sustained expression in mature cortical neurons. *Mech Dev* 48, 217-228.
- Benezra, R., Davis, R. L., Lockshon, D., Turner, D. L. and Weintraub, H. (1990). The protein Id: a negative regulator of helix-loop-helix DNA binding proteins. *Cell* 61, 49-59.
- Berben, G., Legrain, M., Gilliquet, V. and Hilger, F. (1990). The yeast regulatory gene PHO4 encodes a helix-loop-helix motif. *Yeast* 6, 451-454.
- Bijur, G. N. and Jope, R. S. (2000). Opposing actions of phosphatidylinositol 3-kinase and glycogen synthase kinase-3beta in the regulation of HSF-1 activity. *J Neurochem* 75, 2401-2408.
- Blackwood, E. M. and Eisenman, R. N. (1991). Max: a helix-loop-helix zipper protein that forms a sequence-specific DNA-binding complex with Myc. *Science* 251, 1211-1277.
- Borrello, M. G., Bongarzone, I., Pierotti, M. A., Luksch, R., Gasparini, M., Collini, P., Pilotti, S., Rizzetti, M. G., Mondellini, P., De Bernardi, B. et al. (1993). trk and ret proto-oncogene expression in human neuroblastoma specimens: high frequency of trk expression in non-advanced stages. *Int J Cancer* 54, 540-545.
- Bourguet, W., Andry, V., Iltis, C., Klaholz, B., Potier, N., Van Dorsselaer, A., Chambon, P., Gronemeyer, H. and Moras, D. (2000). Heterodimeric complex of RAR and RXR nuclear receptor ligand-binding domains: purification, crystallization, and preliminary X-ray diffraction analysis. *Protein Expr Purif* 19, 284-288.
- Bourguet, W., Ruff, M., Chambon, P., Gronemeyer, H. and Moras, D. (1995). Crystal structure of the ligand-binding domain of the human nuclear receptor RXR-alpha. *Nature* 375, 377-382.
- Bowman, L. C., Hancock, M. L., Santana, V. M., Hayes, F. A., Kun, L., Parham, D. M., Furman, W. L., Rao, B. N., Green, A. A. and Crist, W. M. (1991). Impact of intensified therapy on clinical outcome in infants and children with neuroblastoma: the St Jude Children's Research Hospital experience, 1962 to 1988. *J Clin Oncol* 9, 1599-1608.
- Brodeur, G. M., Azar, C., Brother, M., Hiemstra, J., Kaufman, B., Marshall, H., Moley, J., Nakagawara, A., Saylor, R., Scavarda, N. et al. (1992). Neuroblastoma. Effect of genetic factors on prognosis and treatment. *Cancer* 70, 1685-1694.
- Brunet, A., Datta, S. R. and Greenberg, M. E. (2001). Transcription-dependent and -independent control of neuronal survival by the PI3K-Akt signaling pathway. *Curr Opin Neurobiol* 11, 297-305.
- Buj-Bello, A., Adu, J., Pinon, L. G., Horton, A., Thompson, J., Rosenthal, A., Chinchetru, M., Buchman, V. L. and Davies, A. M. (1997). Neurturin responsiveness requires a GPI-linked receptor and the Ret receptor tyrosine kinase. *Nature* 387, 721-724.
- Bustelo, X. R., Otero, A., Gomez-Marquez, J. and Freire, M. (1991). Expression of the rat prothymosin alpha gene during T-lymphocyte proliferation and liver regeneration. *J Biol Chem* 266, 1443-1447.
- Caelles, C., Gonzalez-Sancho, J. M. and Munoz, A. (1997). Nuclear hormone receptor antagonism with AP-1 by inhibition of the JNK pathway. *Genes Dev* 11, 3351-3364.

Castoria, G., Migliaccio, A., Bilancio, A., Di Domenico, M., de Falco, A., Lombardi, M., Fiorentino, R., Varricchio, L., Barone, M. V. and Auricchio, F. (2001). PI3-kinase in concert with Src promotes the S-phase entry of oestradiol-stimulated MCF-7 cells. *Embo J* 20, 6050-6059.

Cau, E., Gradwohl, G., Fode, C. and Guillemot, F. (1997). Mash1 activates a cascade of bHLH regulators in olfactory neuron progenitors. *Development* 124, 1611-1621.

Chambon, P. (1994). The retinoid signaling pathway: molecular and genetic analyses. *Semin Cell Biol* 5, 115-125.

Chaour, B., Bellon, G., Seite, S., Borel, J. P. and Fourtanier, A. (1997). All-trans-retinoic acid enhances collagen gene expression in irradiated and non-irradiated hairless mouse skin. *J Photochem Photobiol B* 37, 52-59.

Chen, H., Lin, R. J., Schiltz, R. L., Chakravarti, D., Nash, A., Nagy, L., Privalsky, M. L., Nakatani, Y. and Evans, R. M. (1997). Nuclear receptor coactivator ACTR is a novel histone acetyltransferase and forms a multimeric activation complex with P/CAF and CBP/p300. *Cell* 90, 569-580.

Chen, J. D. and Evans, R. M. (1995). A transcriptional co-repressor that interacts with nuclear hormone receptors. *Nature* 377, 454-457.

Chen, Y., Mestek, A., Liu, J., Hurley, J. A. and Yu, L. (1993). Molecular cloning and functional expression of a mu-opioid receptor from rat brain. *Mol Pharmacol* 44, 8-12.

Chiaromello, A., Neuman, T., Peavy, D. R. and Zuber, M. X. (1996). The GAP-43 gene is a direct downstream target of the basic helix-loop-helix transcription factors. *J Biol Chem* 271, 22035-22043.

Cho, J. H., Kwon, I. S., Kim, S., Ghil, S. H., Tsai, M. J., Kim, Y. S., Lee, Y. D. and Suh-Kim, H. (2001). Overexpression of BETA2/NeuroD induces neurite outgrowth in F11 neuroblastoma cells. *J Neurochem* 77, 103-109.

Chomczynski, P. and Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162, 156-159.

Christ, M., Sippel, K., Eisen, C. and Wehling, M. (1994). Non-classical receptors for aldosterone in plasma membranes from pig kidneys. *Mol Cell Endocrinol* 99, R31-34.

Christy, B. A., Sanders, L. K., Lau, L. F., Copeland, N. G., Jenkins, N. A. and Nathans, D. (1991). An Id-related helix-loop-helix protein encoded by a growth factor-inducible gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 1815-1819.

Clarke, R., van den Berg, H. W. and Murphy, R. F. (1990). Reduction of the membrane fluidity of human breast cancer cells by tamoxifen and 17 beta-estradiol. *J Natl Cancer Inst* 82, 1702-1705.

Cohlan, S. Q. (1953). Excessive intakes of vitamin A as a cause of congenital anomalies in the rat. *Science* 117, 535-536.

Conlon, R. A. (1995). Retinoic acid and pattern formation in vertebrates. *Trends Genet* 11, 314-319.

- Cooper, C. L., Brady, G., Bilia, F., Iscove, N. N. and Quesenberry, P. J. (1997). Expression of the Id family helix-loop-helix regulators during growth and development in the hematopoietic system. *Blood* 89, 3155-3165.
- Crescenzi, M., Fleming, T. P., Lassar, A. B., Weintraub, H. and Aaronson, S. A. (1990). MyoD induces growth arrest independent of differentiation in normal and transformed cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 8442-8446.
- Crews, S. T. (1998). Control of cell lineage-specific development and transcription by bHLH- PAS proteins. *Genes Dev* 12, 607-620.
- Dalla-Favera, R., Westin, E., Gelmann, E. P., Martinotti, S., Bregni, M., Wong-Staal, F. and Gallo, R. C. (1983). The human onc gene c-myc: structure, expression, and amplification in the human promyelocytic leukemia cell line HL-60. *Hamatol Bluttransfus* 28, 247-254.
- Danielian, P. S., White, R., Lees, J. A. and Parker, M. G. (1992). Identification of a conserved region required for hormone dependent transcriptional activation by steroid hormone receptors. *Embo J* 11, 1025-1033.
- de Boland, A. R. and Norman, A. W. (1998). 1 α ,25(OH) $_2$ -vitamin D $_3$ signaling in chick enterocytes: enhancement of tyrosine phosphorylation and rapid stimulation of mitogen-activated protein (MAP) kinase. *J Cell Biochem* 69, 470-482.
- de The, H., Marchio, A., Tiollais, P. and Dejean, A. (1987). A novel steroid thyroid hormone receptor-related gene inappropriately expressed in human hepatocellular carcinoma. *Nature* 330, 667-670.
- Deed, R. W., Hara, E., Atherton, G. T., Peters, G. and Norton, J. D. (1997). Regulation of Id3 cell cycle function by Cdk-2-dependent phosphorylation. *Mol Cell Biol* 17, 6815-6821.
- Deed, R. W., Hirose, T., Mitchell, E. L., Santibanez-Koref, M. F. and Norton, J. D. (1994). Structural organisation and chromosomal mapping of the human Id-3 gene. *Gene* 151, 309-14.
- Dersch, H. and Zile, M. H. (1993). Induction of normal cardiovascular development in the vitamin A- deprived quail embryo by natural retinoids. *Dev Biol* 160, 424-433.
- Desprez, P. Y., Hara, E., Bissell, M. J. and Campisi, J. (1995). Suppression of mammary epithelial cell differentiation by the helix- loop-helix protein Id-1. *Mol Cell Biol* 15, 3398-3404.
- Di Domenico, M., Castoria, G., Bilancio, A., Migliaccio, A. and Auricchio, F. (1996). Estradiol activation of human colon carcinoma-derived Caco-2 cell growth. *Cancer Res* 56, 4516-4521.
- Diatchenko, L., Lau, Y. F., Campbell, A. P., Chenchik, A., Moqadam, F., Huang, B., Lukyanov, S., Lukyanov, K., Gurskaya, N., Sverdlov, E. D. et al. (1996). Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 6025-6030.
- Douer, D., Estey, E., Santillana, S., Bennett, J. M., Lopez-Bernstein, G., Boehm, K. and Williams, T. (2001). Treatment of newly diagnosed and relapsed acute promyelocytic leukemia with intravenous liposomal all-trans retinoic acid. *Blood* 97, 73-80.

Downward, J. (1998). Mechanisms and consequences of activation of protein kinase B/Akt. *Curr Opin Cell Biol* 10, 262-267.

Dragnev, K. H., Rigas, J. R. and Dmitrovsky, E. (2000). The retinoids and cancer prevention mechanisms. *Oncologist* 5, 361-368.

Dudek, H., Datta, S. R., Franke, T. F., Birnbaum, M. J., Yao, R., Cooper, G. M., Segal, R. A., Kaplan, D. R. and Greenberg, M. E. (1997). Regulation of neuronal survival by the serine-threonine protein kinase Akt. *Science* 275, 661-665.

Duguid, J. R. and Dinauer, M. C. (1990). Library subtraction of in vitro cDNA libraries to identify differentially expressed genes in scrapie infection. *Nucleic Acids Res* 18, 2789-92.

Durand, B., Saunders, M., Gaudon, C., Roy, B., Losson, R. and Chambon, P. (1994). Activation function 2 (AF-2) of retinoic acid receptor and 9-cis retinoic acid receptor: presence of a conserved autonomous constitutive activating domain and influence of the nature of the response element on AF-2 activity. *Embo J* 13, 5370-5382.

Durston, A. J., Timmermans, J. P., Hage, W. J., Hendriks, H. F., de Vries, N. J., Heideveld, M. and Nieuwkoop, P. D. (1989). Retinoic acid causes an anteroposterior transformation in the developing central nervous system. *Nature* 340, 140-144.

Durston, A. J., van der Wees, J., Pijnappel, W. W., Schilthuis, J. G. and Godsave, S. F. (1997). Retinoid signalling and axial patterning during early vertebrate embryogenesis. *Cell Mol Life Sci* 53, 339-349.

Eilers, M., Schirm, S. and Bishop, J. M. (1991). The MYC protein activates transcription of the alpha-prothymosin gene. *Embo J* 10, 133-141.

Ellis, H. M., Spann, D. R. and Posakony, J. W. (1990). extramacrochaetae, a negative regulator of sensory organ development in *Drosophila*, defines a new class of helix-loop-helix proteins. *Cell* 61, 27-38.

Ellmeier, W., Aguzzi, A., Kleiner, E., Kurzbauer, R. and Weith, A. (1992). Mutually exclusive expression of a helix-loop-helix gene and N-myc in human neuroblastomas and in normal development. *Embo J* 11, 2563-2571.

Encinas, M., Tansey, M. G., Tsui-Pierchala, B. A., Comella, J. X., Milbrandt, J. and Johnson, E. M., Jr. (2001). c-Src is required for glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) family ligand-mediated neuronal survival via a phosphatidylinositol-3 kinase (PI-3K)-dependent pathway. *J Neurosci* 21, 1464-1472.

Enokido, Y., de Sauvage, F., Hongo, J. A., Ninkina, N., Rosenthal, A., Buchman, V. L. and Davies, A. M. (1998). GFR alpha-4 and the tyrosine kinase Ret form a functional receptor complex for persephin. *Curr Biol* 8, 1019-1022.

Epstein, J. H. (1981). Effects of retinoids on ultraviolet-induced carcinogenesis. *J Invest Dermatol* 77, 144-146.

- Epstein, J. H. and Grekin, D. A. (1981). Inhibition of ultraviolet-induced carcinogenesis by all-trans retinoic acid. *J Invest Dermatol* 76, 178-180.
- Escriva, H., Safi, R., Hanni, C., Langlois, M. C., Saumitou-Laprade, P., Stehelin, D., Capron, A., Pierce, R. and Laudet, V. (1997). Ligand binding was acquired during evolution of nuclear receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 6803-6808.
- Evans, A. E., Gerson, J. and Schnauffer, L. (1976). Spontaneous regression of neuroblastoma. *Natl Cancer Inst Monogr* 44, 49-54.
- Eves, E. M., Xiong, W., Bellacosa, A., Kennedy, S. G., Tschlis, P. N., Rosner, M. R. and Hay, N. (1998). Akt, a target of phosphatidylinositol 3-kinase, inhibits apoptosis in a differentiating neuronal cell line. *Mol Cell Biol* 18, 2143-2152.
- Fairman, R., Beran-Steed, R. K., Anthony-Cahill, S. J., Lear, J. D., Stafford, W. F., 3rd, DeGrado, W. F., Benfield, P. A. and Brenner, S. L. (1993). Multiple oligomeric states regulate the DNA binding of helix-loop-helix peptides. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 10429-10433.
- Falkenstein, E., Norman, A. W. and Wehling, M. (2000). Mannheim classification of nongenomically initiated (rapid) steroid action(s). *J Clin Endocrinol Metab* 85, 2072-2075.
- Feinberg, A. P. and Vogelstein, B. (1983). A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal Biochem* 132, 6-13.
- Fenaux, P., Chomienne, C. and Degos, L. (2001). All-trans retinoic acid and chemotherapy in the treatment of acute promyelocytic leukemia. *Semin Hematol* 38, 13-25.
- Feng, Z. and Porter, A. G. (1999). NF-kappaB/Rel proteins are required for neuronal differentiation of SH-SY5Y neuroblastoma cells. *J Biol Chem* 274, 30341-30344.
- Ferguson, G. D., Anagnostaras, S. G., Silva, A. J. and Herschman, H. R. (2000a). Deficits in memory and motor performance in synaptotagmin IV mutant mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 5598-5603.
- Ferguson, G. D., Chen, X. N., Korenberg, J. R. and Herschman, H. R. (2000b). The human synaptotagmin IV gene defines an evolutionary break point between syntenic mouse and human chromosome regions but retains ligand inducibility and tissue specificity. *J Biol Chem* 275, 36920-36926.
- Florini, J. R., Ewton, D. Z. and Coolican, S. A. (1996). Growth hormone and the insulin-like growth factor system in myogenesis. *Endocr Rev* 17, 481-517.
- Florio, M., Hernandez, M. C., Yang, H., Shu, H. K., Cleveland, J. L. and Israel, M. A. (1998). Id2 promotes apoptosis by a novel mechanism independent of dimerization to basic helix-loop-helix factors. *Mol Cell Biol* 18, 5435-5444.
- Fornasari, D., Chini, B., Tarroni, P. and Clementi, F. (1990). Molecular cloning of human neuronal nicotinic receptor alpha 3-subunit. *Neurosci Lett* 111, 351-356.

Franks, L. M., Bollen, A., Seeger, R. C., Stram, D. O. and Matthay, K. K. (1997). Neuroblastoma in adults and adolescents: an indolent course with poor survival. *Cancer* 79, 2028-2035.

Gaetano, C., Matsumoto, K. and Thiele, C. J. (1992). In vitro activation of distinct molecular and cellular phenotypes after induction of differentiation in a human neuroblastoma cell line. *Cancer Res* 52, 4402-7.

Garnier, M., Di Lorenzo, D., Albertini, A. and Maggi, A. (1997). Identification of estrogen-responsive genes in neuroblastoma SK-ER3 cells. *J Neurosci* 17, 4591-4599.

Garrell, J. and Modolell, J. (1990). The Drosophila extramacrochaetae locus, an antagonist of proneural genes that, like these genes, encodes a helix-loop-helix protein. *Cell* 61, 39-48.

Gauczynski, S., Peyrin, J. M., Haik, S., Leucht, C., Hundt, C., Rieger, R., Krasemann, S., Deslys, J. P., Dormont, D., Lasmezas, C. I. et al. (2001). The 37-kDa/67-kDa laminin receptor acts as the cell-surface receptor for the cellular prion protein. *Embo J* 20, 5863-5875.

Gerdes, D., Christ, M., Haseroth, K., Notzon, A., Falkenstein, E. and Wehling, M. (2000). Nongenomic actions of steroids--from the laboratory to clinical implications. *J Pediatr Endocrinol Metab* 13, 853-878.

Giguere, V. (1999). Orphan nuclear receptors: from gene to function. *Endocr Rev* 20, 689-725.

Giguere, V., Ong, E. S., Segui, P. and Evans, R. M. (1987). Identification of a receptor for the morphogen retinoic acid. *Nature* 330, 624-629.

Gilligan, D. M., Quyyumi, A. A. and Cannon, R. O., 3rd. (1994). Effects of physiological levels of estrogen on coronary vasomotor function in postmenopausal women. *Circulation* 89, 2545-2551.

Glass, C. K. and Rosenfeld, M. G. (2000). The coregulator exchange in transcriptional functions of nuclear receptors. *Genes Dev* 14, 121-141.

Gomez-Marquez, J. and Rodriguez, P. (1998). Prothymosin alpha is a chromatin-remodelling protein in mammalian cells. *Biochem J* 333, 1-3.

Gomez-Marquez, J., Segade, F., Dosil, M., Pichel, J. G., Bustelo, X. R. and Freire, M. (1989). The expression of prothymosin alpha gene in T lymphocytes and leukemic lymphoid cells is tied to lymphocyte proliferation. *J Biol Chem* 264, 8451-8454.

Griffin, M. E. and Bolande, R. P. (1969). Familial neuroblastoma with regression and maturation to ganglioneurofibroma. *Pediatrics* 43, 377-382.

Grynfeld, A., Pahlman, S. and Axelson, H. (2000). Induced neuroblastoma cell differentiation, associated with transient HES-1 activity and reduced HASH-1 expression, is inhibited by Notch1. *Int J Cancer* 88, 401-410.

Gudas, L. J. (1994). Retinoids and vertebrate development. *J Biol Chem* 269, 15399-15402.

- Guillemot, F., Lo, L. C., Johnson, J. E., Auerbach, A., Anderson, D. J. and Joyner, A. L. (1993). Mammalian achaete-scute homolog 1 is required for the early development of olfactory and autonomic neurons. *Cell* 75, 463-476.
- Haendler, B., Hofer-Warbinek, R. and Hofer, E. (1987). Complementary DNA for human T-cell cyclophilin. *Embo J* 6, 947-950.
- Hale, F. (1937). Relation of maternal vitamin A deficiency to microphthalmia in pigs. *Texas State J Med* 33, 228-232.
- Hammer, G. D., Krylova, I., Zhang, Y., Darimont, B. D., Simpson, K., Weigel, N. L. and Ingraham, H. A. (1999). Phosphorylation of the nuclear receptor SF-1 modulates cofactor recruitment: integration of hormone signaling in reproduction and stress. *Mol Cell* 3, 521-526.
- Hammerling, U., Bjelfman, C. and Pahlman, S. (1987). Different regulation of N- and c-myc expression during phorbol ester- induced maturation of human SH-SY5Y neuroblastoma cells. *Oncogene* 2, 73-77.
- Hanada, M., Krajewski, S., Tanaka, S., Cazals-Hatem, D., Spengler, B. A., Ross, R. A., Biedler, J. L. and Reed, J. C. (1993). Regulation of Bcl-2 oncoprotein levels with differentiation of human neuroblastoma cells. *Cancer Res* 53, 4978-4986.
- Hara, E., Hall, M. and Peters, G. (1997). Cdk2-dependent phosphorylation of Id2 modulates activity of E2A-related transcription factors. *Embo J* 16, 332-342.
- Hara, E., Yamaguchi, T., Nojima, H., Ide, T., Campisi, J., Okayama, H. and Oda, K. (1994). Id-related genes encoding helix-loop-helix proteins are required for G1 progression and are repressed in senescent human fibroblasts. *J Biol Chem* 269, 2139-2145.
- Hawkins, J. M., Wood, M., Wright, F. and Secker-Walker, L. M. (1992). Isochromosome 1q in acute monocytic leukemia: a new nonrandom association. *Genes Chromosomes Cancer* 5, 181-183.
- Hayashi, H., Ichihara, M., Iwashita, T., Murakami, H., Shimono, Y., Kawai, K., Kurokawa, K., Murakumo, Y., Imai, T., Funahashi, H. et al. (2000). Characterization of intracellular signals via tyrosine 1062 in RET activated by glial cell line-derived neurotrophic factor. *Oncogene* 19, 4469-4475.
- Haynes, M. P., Sinha, D., Russell, K. S., Collinge, M., Fulton, D., Morales-Ruiz, M., Sessa, W. C. and Bender, J. R. (2000). Membrane estrogen receptor engagement activates endothelial nitric oxide synthase via the PI3-kinase-Akt pathway in human endothelial cells. *Circ Res* 87, 677-682.
- Heery, D. M., Hoare, S., Hussain, S., Parker, M. G. and Sheppard, H. (2001). Core LXXLL motif sequences in CREB-binding protein, SRC1, and RIP140 define affinity and selectivity for steroid and retinoid receptors. *J Biol Chem* 276, 6695-6702.
- Henthorn, P. S., Stewart, C. C., Kadesch, T. and Puck, J. M. (1991). The gene encoding human TFE3, a transcription factor that binds the immunoglobulin heavy-chain enhancer, maps to Xp11.22. *Genomics* 11, 374-378.
- Heyman, R. A., Mangelsdorf, D. J., Dyck, J. A., Stein, R. B., Eichele, G., Evans, R. M. and Thaller, C. (1992). 9-cis retinoic acid is a high affinity ligand for the retinoid X receptor. *Cell* 68, 397-406.

- Hickey, E., Brandon, S. E., Sadis, S., Smale, G. and Weber, L. A. (1986). Molecular cloning of sequences encoding the human heat-shock proteins and their expression during hyperthermia. *Gene* **43**, 147-154.
- Hirschhorn, J. N., Brown, S. A., Clark, C. D. and Winston, F. (1992). Evidence that SNF2/SWI2 and SNF5 activate transcription in yeast by altering chromatin structure. *Genes Dev* **6**, 2288-2298.
- Hisamoto, K., Ohmichi, M., Kurachi, H., Hayakawa, J., Kanda, Y., Nishio, Y., Adachi, K., Tasaka, K., Miyoshi, E., Fujiwara, N. et al. (2001). Estrogen induces the Akt-dependent activation of endothelial nitric-oxide synthase in vascular endothelial cells. *J Biol Chem* **276**, 3459-3467.
- Hmama, Z., Nandan, D., Sly, L., Knutson, K. L., Herrera-Velitz, P. and Reiner, N. E. (1999). 1 α ,25-dihydroxyvitamin D(3)-induced myeloid cell differentiation is regulated by a vitamin D receptor-phosphatidylinositol 3-kinase signaling complex. *J Exp Med* **190**, 1583-1594.
- Honda, K., Sawada, H., Kihara, T., Urushitani, M., Nakamizo, T., Akaike, A. and Shimohama, S. (2000). Phosphatidylinositol 3-kinase mediates neuroprotection by estrogen in cultured cortical neurons. *J Neurosci Res* **60**, 321-327.
- Honda, K., Shimohama, S., Sawada, H., Kihara, T., Nakamizo, T., Shibasaki, H. and Akaike, A. (2001). Nongenomic antiapoptotic signal transduction by estrogen in cultured cortical neurons. *J Neurosci Res* **64**, 466-475.
- Hong, H., Kohli, K., Trivedi, A., Johnson, D. L. and Stallcup, M. R. (1996). GRIP1, a novel mouse protein that serves as a transcriptional coactivator in yeast for the hormone binding domains of steroid receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 4948-4952.
- Hong, W. K. and Sporn, M. B. (1997). Recent advances in chemoprevention of cancer. *Science* **278**, 1073-1077.
- Hori, N., Chae, K. S., Murakawa, K., Matoba, R., Fukushima, A., Okubo, K. and Matsubara, K. (1994). A human cDNA sequence homologue of bovine phosphatidylethanolamine-binding protein. *Gene* **140**, 293-294.
- Horlein, A. J., Naar, A. M., Heinzl, T., Torchia, J., Gloss, B., Kurokawa, R., Ryan, A., Kamei, Y., Soderstrom, M., Glass, C. K. et al. (1995). Ligand-independent repression by the thyroid hormone receptor mediated by a nuclear receptor co-repressor. *Nature* **377**, 397-404.
- Hoshizaki, D. K., Hill, J. E. and Henry, S. A. (1990). The *Saccharomyces cerevisiae* INO4 gene encodes a small, highly basic protein required for derepression of phospholipid biosynthetic enzymes. *J Biol Chem* **265**, 4736-4745.
- Hsu, S. L., Hsu, J. W., Liu, M. C., Chen, L. Y. and Chang, C. D. (2000). Retinoic acid-mediated G1 arrest is associated with induction of p27(Kip1) and inhibition of cyclin-dependent kinase 3 in human lung squamous carcinoma CH27 cells. *Exp Cell Res* **258**, 322-331.
- Hundt, C., Peyrin, J. M., Haik, S., Gauczynski, S., Leucht, C., Rieger, R., Riley, M. L., Deslys, J. P., Dormont, D., Lasmezas, C. I. et al. (2001). Identification of interaction domains of the prion protein with its 37- kDa/67-kDa laminin receptor. *Embo J* **20**, 5876-5886.

- Iavarone, A., Garg, P., Lasorella, A., Hsu, J. and Israel, M. A. (1994). The helix-loop-helix protein Id-2 enhances cell proliferation and binds to the retinoblastoma protein. *Genes Dev* 8, 1270-1284.
- Ikeda, I., Ishizaka, Y., Tahira, T., Suzuki, T., Onda, M., Sugimura, T. and Nagao, M. (1990). Specific expression of the ret proto-oncogene in human neuroblastoma cell lines. *Oncogene* 5, 1291-1296.
- Irving, H., Lovat, P. E., Hewson, Q. C., Malcolm, A. J., Pearson, A. D. and Redfern, C. P. (1998). Retinoid-induced differentiation of neuroblastoma: comparison between LG69, an RXR-selective analogue and 9-cis retinoic acid. *Eur J Cancer* 34, 111-117.
- Ishiguro, A., Spirin, K., Shiohara, M., Tobler, A., Norton, J. D., Rigolet, M., Shimbo, T. and Koeffler, H. P. (1995). Expression of Id2 and Id3 mRNA in human lymphocytes. *Leuk Res* 19, 989-996.
- Ishiguro, A., Spirin, K. S., Shiohara, M., Tobler, A., Gombart, A. F., Israel, M. A., Norton, J. D. and Koeffler, H. P. (1996). Id2 expression increases with differentiation of human myeloid cells. *Blood* 87, 5225-5231.
- Iwata, M., Koshinaga, T., Okabe, I., Kurosu, Y. and Esumi, M. (1995). Biological characteristics of neuroblastoma with spontaneous tumor reduction: a case report. *J Pediatr Surg* 30, 722-723.
- Izpisua-Belmonte, J. C., Tickle, C., Dolle, P., Wolpert, L. and Duboule, D. (1991). Expression of the homeobox Hox-4 genes and the specification of position in chick wing development. *Nature* 350, 585-589.
- Janatpour, M. J., McMaster, M. T., Genbacev, O., Zhou, Y., Dong, J., Cross, J. C., Israel, M. A. and Fisher, S. J. (2000). Id-2 regulates critical aspects of human cytotrophoblast differentiation, invasion and migration. *Development* 127, 549-558.
- Janne, J., Alhonen, L. and Leinonen, P. (1991). Polyamines: from molecular biology to clinical applications. *Ann Med* 23, 241-259.
- Jen, Y., Manova, K. and Benezra, R. (1996). Expression patterns of Id1, Id2, and Id3 are highly related but distinct from that of Id4 during mouse embryogenesis. *Dev Dyn* 207, 235-252.
- Jen, Y., Manova, K. and Benezra, R. (1997). Each member of the Id gene family exhibits a unique expression pattern in mouse gastrulation and neurogenesis. *Dev Dyn* 208, 92-106.
- Jen, Y., Weintraub, H. and Benezra, R. (1992). Overexpression of Id protein inhibits the muscle differentiation program: in vivo association of Id with E2A proteins. *Genes Dev* 6, 1466-1479.
- Jennings, R. W., LaQuaglia, M. P., Leong, K., Hendren, W. H. and Adzick, N. S. (1993). Fetal neuroblastoma: prenatal diagnosis and natural history. *J Pediatr Surg* 28, 1168-1174.
- Jones, D. H., King, K., Miller, A. J. and Cunliffe, W. J. (1983). A dose-response study of 13-cis-retinoic acid in acne vulgaris. *Br J Dermatol* 108, 333-343.

- Jones-Villeneuve, E. M., McBurney, M. W., Rogers, K. A. and Kalnins, V. I. (1982). Retinoic acid induces embryonal carcinoma cells to differentiate into neurons and glial cells. *J Cell Biol* **94**, 253-62.
- Kadesch, T. (1993). Consequences of heteromeric interactions among helix-loop-helix proteins. *Cell Growth Differ* **4**, 49-55.
- Kageyama, R., Ishibashi, M., Takebayashi, K. and Tomita, K. (1997). bHLH transcription factors and mammalian neuronal differentiation. *Int J Biochem Cell Biol* **29**, 1389-99.
- Kaliman, P., Canicio, J., Shepherd, P. R., Beeton, C. A., Testar, X., Palacin, M. and Zorzano, A. (1998). Insulin-like growth factors require phosphatidylinositol 3-kinase to signal myogenesis: dominant negative p85 expression blocks differentiation of L6E9 muscle cells. *Mol Endocrinol* **12**, 66-77.
- Kaliman, P., Canicio, J., Testar, X., Palacin, M. and Zorzano, A. (1999). Insulin-like growth factor-II, phosphatidylinositol 3-kinase, nuclear factor-kappaB and inducible nitric-oxide synthase define a common myogenic signaling pathway. *J Biol Chem* **274**, 17437-17444.
- Kaplan, D. R., Matsumoto, K., Lucarelli, E. and Thiele, C. J. (1993). Induction of TrkB by retinoic acid mediates biologic responsiveness to BDNF and differentiation of human neuroblastoma cells. Eukaryotic Signal Transduction Group. *Neuron* **11**, 321-231.
- Karetsou, Z., Sandaltzopoulos, R., Frangou-Lazaridis, M., Lai, C. Y., Tsolas, O., Becker, P. B. and Papamarcaki, T. (1998). Prothymosin alpha modulates the interaction of histone H1 with chromatin. *Nucleic Acids Res* **26**, 3111-3118.
- Kessel, M. and Gruss, P. (1991). Homeotic transformations of murine vertebrae and concomitant alteration of Hox codes induced by retinoic acid. *Cell* **67**, 89-104.
- Kim, D., Peng, X. C. and Sun, X. H. (1999). Massive apoptosis of thymocytes in T-cell-deficient Id1 transgenic mice. *Mol Cell Biol* **19**, 8240-8253.
- Klamt, C., Knust, E., Tietze, K. and Campos-Ortega, J. A. (1989). Closely related transcripts encoded by the neurogenic gene complex enhancer of split of *Drosophila melanogaster*. *Embo J* **8**, 203-210.
- Klein, R. D., Sherman, D., Ho, W. H., Stone, D., Bennett, G. L., Moffat, B., Vandlen, R., Simmons, L., Gu, Q., Hongo, J. A. et al. (1997). A GPI-linked protein that interacts with Ret to form a candidate neurturin receptor. *Nature* **387**, 717-721.
- Klesse, L. J., Meyers, K. A., Marshall, C. J. and Parada, L. F. (1999). Nerve growth factor induces survival and differentiation through two distinct signaling cascades in PC12 cells. *Oncogene* **18**, 2055-2068.
- Kligman, L. H., Duo, C. H. and Kligman, A. M. (1984). Topical retinoic acid enhances the repair of ultraviolet damaged dermal connective tissue. *Connect Tissue Res* **12**, 139-150.
- Klug, A. and Schwabe, J. W. (1995). Protein motifs 5. Zinc fingers. *Faseb J* **9**, 597-604.
- Kondo, T. and Raff, M. (2000). The Id4 HLH protein and the timing of oligodendrocyte differentiation. *Embo J* **19**, 1998-2007.

- Kurokawa, R., Soderstrom, M., Horlein, A., Halachmi, S., Brown, M., Rosenfeld, M. G. and Glass, C. K. (1995). Polarity-specific activities of retinoic acid receptors determined by a co-repressor. *Nature* 377, 451-454.
- Kwon, H., Imbalzano, A. N., Khavari, P. A., Kingston, R. E. and Green, M. R. (1994). Nucleosome disruption and enhancement of activator binding by a human SW1/SNF complex. *Nature* 370, 477-481.
- Lammer, E. J., Chen, D. T., Hoar, R. M., Agnish, N. D., Benke, P. J., Braun, J. T., Curry, C. J., Fernhoff, P. M., Grix, A. W., Jr., Lott, I. T. et al. (1985). Retinoic acid embryopathy. *N Engl J Med* 313, 837-841.
- Langenfeld, J., Kiyokawa, H., Sekula, D., Boyle, J. and Dmitrovsky, E. (1997). Posttranslational regulation of cyclin D1 by retinoic acid: a chemoprevention mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 12070-12074.
- Langenfeld, J., Lonardo, F., Kiyokawa, H., Passalaris, T., Ahn, M. J., Rusch, V. and Dmitrovsky, E. (1996). Inhibited transformation of immortalized human bronchial epithelial cells by retinoic acid is linked to cyclin E down-regulation. *Oncogene* 13, 1983-1990.
- Lantin-Hermoso, R. L., Rosenfeld, C. R., Yuhanna, I. S., German, Z., Chen, Z. and Shaul, P. W. (1997). Estrogen acutely stimulates nitric oxide synthase activity in fetal pulmonary artery endothelium. *Am J Physiol* 273, L119-126.
- Lasorella, A., Iavarone, A. and Israel, M. A. (1995). Differentiation of neuroblastoma enhances Bcl-2 expression and induces alterations of apoptosis and drug resistance. *Cancer Res* 55, 4711-4716.
- Lasorella, A., Iavarone, A. and Israel, M. A. (1996). Id2 specifically alters regulation of the cell cycle by tumor suppressor proteins. *Mol Cell Biol* 16, 2570-2578.
- Lasorella, A., Nosedà, M., Beyna, M., Yokota, Y. and Iavarone, A. (2000). Id2 is a retinoblastoma protein target and mediates signalling by Myc oncoproteins. *Nature* 407, 592-598.
- Laudet, V. (1997). Evolution of the nuclear receptor superfamily: early diversification from an ancestral orphan receptor. *J Mol Endocrinol* 19, 207-226.
- Laudet, V., Hanni, C., Coll, J., Catzeflis, F. and Stehelin, D. (1992). Evolution of the nuclear receptor gene superfamily. *Embo J* 11, 1003-1013.
- Lavenius, E., Parrow, V., Nanberg, E. and Pahlman, S. (1994). Basic FGF and IGF-I promote differentiation of human SH-SY5Y neuroblastoma cells in culture. *Growth Factors* 10, 29-39.
- Lee, J. E. (1997). Basic helix-loop-helix genes in neural development. *Curr Opin Neurobiol* 7, 13-20.
- Lee, J. E., Hollenberg, S. M., Snider, L., Turner, D. L., Lipnick, N. and Weintraub, H. (1995). Conversion of *Xenopus* ectoderm into neurons by NeuroD, a basic helix-loop-helix protein. *Science* 268, 836-844.
- Leid, M., Kastner, P. and Chambon, P. (1992). Multiplicity generates diversity in the retinoic acid signalling pathways. *Trends Biochem Sci* 17, 427-433.

- Lemoine, N. R. (1994). Molecular biology of breast cancer. *Ann Oncol* 5, 31-37.
- Lennon, G., Auffray, C., Polymeropoulos, M. and Soares, M. B. (1996). The I.M.A.G.E. Consortium: an integrated molecular analysis of genomes and their expression. *Genomics* 33, 151-152.
- Lerchen, R. A., Yum, D. Y., Krajcik, R. and Minth-Worby, C. A. (1995). Transcriptional vs. posttranscriptional control of neuropeptide Y gene expression. *Endocrinology* 136, 833-841.
- Levin, A. A., Sturzenbecker, L. J., Kazmer, S., Bosakowski, T., Huselton, C., Allenby, G., Speck, J., Kratzeisen, C., Rosenberger, M., Lovey, A. et al. (1992). 9-cis retinoic acid stereoisomer binds and activates the nuclear receptor RXR alpha. *Nature* 355, 359-361.
- Liang, P., Averboukh, L., Keyomarsi, K., Sager, R. and Pardee, A. B. (1992). Differential display and cloning of messenger RNAs from human breast cancer versus mammary epithelial cells. *Cancer Res* 52, 6966-6968.
- Liang, P. and Pardee, A. B. (1992). Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science* 257, 967-971.
- Lin, C. Q., Singh, J., Murata, K., Itahana, Y., Parrinello, S., Liang, S. H., Gillett, C. E., Campisi, J. and Desprez, P. Y. (2000). A role for Id-1 in the aggressive phenotype and steroid hormone response of human breast cancer cells. *Cancer Res* 60, 1332-40.
- Lombet, A., Zujovic, V., Kandouz, M., Billardon, C., Carvajal-Gonzalez, S., Gompel, A. and Rostene, W. (2001). Resistance to induced apoptosis in the human neuroblastoma cell line SK-N-SH in relation to neuronal differentiation. Role of Bcl-2 protein family. *Eur J Biochem* 268, 1352-1362.
- Lovat, P. E., Annicchiarico-Petruzzelli, M., Corazzari, M., Dobson, M. G., Malcolm, A. J., Pearson, A. D., Melino, G. and Redfern, C. P. (1999). Differential effects of retinoic acid isomers on the expression of nuclear receptor co-regulators in neuroblastoma. *FEBS Lett* 445, 415-419.
- Lucarelli, E., Kaplan, D. R. and Thiele, C. J. (1995). Selective regulation of TrkA and TrkB receptors by retinoic acid and interferon-gamma in human neuroblastoma cell lines. *J Biol Chem* 270, 24725-24731.
- Luisi, B. F., Xu, W. X., Otwinowski, Z., Freedman, L. P., Yamamoto, K. R. and Sigler, P. B. (1991). Crystallographic analysis of the interaction of the glucocorticoid receptor with DNA. *Nature* 352, 497-505.
- Lyden, D., Young, A. Z., Zagzag, D., Yan, W., Gerald, W., O'Reilly, R., Bader, B. L., Hynes, R. O., Zhuang, Y., Manova, K. et al. (1999). Id1 and Id3 are required for neurogenesis, angiogenesis and vascularization of tumour xenografts. *Nature* 401, 670-677.
- Maden, M., Gale, E., Kostetskii, I. and Zile, M. (1996). Vitamin A-deficient quail embryos have half a hindbrain and other neural defects. *Curr Biol* 6, 417-426.
- Maden, M., Gale, E. and Zile, M. (1998). The role of vitamin A in the development of the central nervous system. *J Nutr* 128, 471S-475S.

- Maden, M. and Holder, N. (1992). Retinoic acid and development of the central nervous system. *Bioessays* 14, 431-438.
- Mangelsdorf, D. J. and Evans, R. M. (1995). The RXR heterodimers and orphan receptors. *Cell* 83, 841-850.
- Mangelsdorf, D. J., Thummel, C., Beato, M., Herrlich, P., Schutz, G., Umesono, K., Blumberg, B., Kastner, P., Mark, M., Chambon, P. et al. (1995). The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell* 83, 835-839.
- Maris, J. M. and Matthay, K. K. (1999). Molecular biology of neuroblastoma. *J Clin Oncol* 17, 2264-2279.
- Martinsen, B. J. and Bronner-Fraser, M. (1998). Neural crest specification regulated by the helix-loop-helix repressor Id2. *Science* 281, 988-991.
- Marzluff, W. F., Jr. (1978). Transcription of RNA in isolated nuclei. *Methods Cell Biol* 19, 317-332.
- Mason, K. E. (1935). Foetal death, prolonged gestation, and difficult parturition in the rat as a result of vitamin A deficiency. *Am J Anat* 57, 303-349.
- Mathew, S., Chen, W., Murty, V. V., Benezra, R. and Chaganti, R. S. (1995). Chromosomal assignment of human ID1 and ID2 genes. *Genomics* 30, 385-387.
- Matsuo, T., Seth, P. and Thiele, C. J. (2001). Increased expression of p27Kip1 arrests neuroblastoma cell growth. *Med Pediatr Oncol* 36, 97-99.
- Matsuo, T. and Thiele, C. J. (1998). p27Kip1: a key mediator of retinoic acid induced growth arrest in the SMS-KCNR human neuroblastoma cell line. *Oncogene* 16, 3337-3343.
- Matthay, K. K., Villablanca, J. G., Seeger, R. C., Stram, D. O., Harris, R. E., Ramsay, N. K., Swift, P., Shimada, H., Black, C. T., Brodeur, G. M. et al. (1999). Treatment of high-risk neuroblastoma with intensive chemotherapy, radiotherapy, autologous bone marrow transplantation, and 13-cis-retinoic acid. Children's Cancer Group. *N Engl J Med* 341, 1165-1173.
- Matz, M., Usman, N., Shagin, D., Bogdanova, E. and Lukyanov, S. (1997). Ordered differential display: a simple method for systematic comparison of gene expression profiles. *Nucleic Acids Res* 25, 2541-2542.
- Matz, M. V. and Lukyanov, S. A. (1998). Different strategies of differential display: areas of application. *Nucleic Acids Res* 26, 5537-5543.
- McBroom, L. D., Flock, G. and Giguere, V. (1995). The nonconserved hinge region and distinct amino-terminal domains of the ROR alpha orphan nuclear receptor isoforms are required for proper DNA bending and ROR alpha-DNA interactions. *Mol Cell Biol* 15, 796-808.
- McInerney, E. M., Rose, D. W., Flynn, S. E., Westin, S., Mullen, T. M., Kronen, A., Inostroza, J., Torchia, J., Nolte, R. T., Assa-Munt, N. et al. (1998). Determinants of coactivator LXXLL motif specificity in nuclear receptor transcriptional activation. *Genes Dev* 12, 3357-68.

McKenna, N. J., Xu, J., Nawaz, Z., Tsai, S. Y., Tsai, M. J. and O'Malley, B. W. (1999). Nuclear receptor coactivators: multiple enzymes, multiple complexes, multiple functions. *J Steroid Biochem Mol Biol* 69, 3-12.

McWilliams, N. B., Hayes, F. A., Green, A. A., Smith, E. I., Nitschke, R., Altshuler, G. A., Shuster, J. J., Castleberry, R. P. and Vietti, T. J. (1995). Cyclophosphamide/doxorubicin vs. cisplatin/teniposide in the treatment of children older than 12 months of age with disseminated neuroblastoma: a Pediatric Oncology Group Randomized Phase II study. *Med Pediatr Oncol* 24, 176-180.

Means, A. L. and Gudas, L. J. (1995). The roles of retinoids in vertebrate development. *Annu Rev Biochem* 64, 201-233.

Melnikova, I. N., Bounpheng, M., Schatteman, G. C., Gilliam, D. and Christy, B. A. (1999). Differential biological activities of mammalian Id proteins in muscle cells. *Exp Cell Res* 247, 94-104.

Menard, S., Tagliabue, E. and Colnaghi, M. I. (1998). The 67 kDa laminin receptor as a prognostic factor in human cancer. *Breast Cancer Res Treat* 52, 137-45.

Merry, D. E. and Korsmeyer, S. J. (1997). Bcl-2 gene family in the nervous system. *Annu Rev Neurosci* 20, 245-267.

Metzger, S., Leff, T. and Breslow, J. L. (1990). Nuclear factors AF-1 and C/EBP bind to the human ApoB gene promoter and modulate its transcriptional activity in hepatic cells. *J Biol Chem* 265, 9978-9983.

Migliaccio, A., Di Domenico, M., Castoria, G., de Falco, A., Bontempo, P., Nola, E. and Auricchio, F. (1996). Tyrosine kinase/p21ras/MAP-kinase pathway activation by estradiol-receptor complex in MCF-7 cells. *Embo J* 15, 1292-1300.

Milbrandt, J., de Sauvage, F. J., Fahrner, T. J., Baloh, R. H., Leitner, M. L., Tansey, M. G., Lampe, P. A., Heuckeroth, R. O., Kotzbauer, P. T., Simburger, K. S. et al. (1998). Persephin, a novel neurotrophic factor related to GDNF and neurturin. *Neuron* 20, 245-253.

Miller, W. H., Jr. (1998). The emerging role of retinoids and retinoic acid metabolism blocking agents in the treatment of cancer. *Cancer* 83, 1471-1482.

Miller, W. H., Jr., Moy, D., Li, A., Grippo, J. F. and Dmitrovsky, E. (1990). Retinoic acid induces down-regulation of several growth factors and proto-oncogenes in a human embryonal cancer cell line. *Oncogene* 5, 511-517.

Min, H., Chan, R. C. and Black, D. L. (1995). The generally expressed hnRNP F is involved in a neural-specific pre-mRNA splicing event. *Genes Dev* 9, 2659-2671.

Minna, J. D. (1993). The molecular biology of lung cancer pathogenesis. *Chest* 103, 449S-456S.

Miyachi, T., Maruyama, H., Kitamura, T., Nakamura, S. and Kawakami, H. (1999). Structure and regulation of the human NeuroD (BETA2/BHF1) gene. *Brain Res Mol Brain Res* 69, 223-231.

- Mograbli, B., Bocciardi, R., Bourget, I., Busca, R., Rochet, N., Farahi-Far, D., Juhel, T. and Rossi, B. (2001). GDNF-stimulated PI3K and Akt activities exert opposing effects on the ERK pathway. Importance for the rescue of neuroectodermic cells. *J Biol Chem* **4**, 4.
- Moriyama, Y., Maeda, M. and Futai, M. (1992). The role of V-ATPase in neuronal and endocrine systems. *J Exp Biol* **172**, 171-178.
- Morriss-Kay, G. M., Murphy, P., Hill, R. E. and Davidson, D. R. (1991). Effects of retinoic acid excess on expression of Hox-2.9 and Krox-20 and on morphological segmentation in the hindbrain of mouse embryos. *Embo J* **10**, 2985-2995.
- Morrow, M. A., Mayer, E. W., Perez, C. A., Adlam, M. and Siu, G. (1999). Overexpression of the Helix-Loop-Helix protein Id2 blocks T cell development at multiple stages. *Mol Immunol* **36**, 491-503.
- Murre, C., McCaw, P. S., Vaessin, H., Caudy, M., Jan, L. Y., Jan, Y. N., Cabrera, C. V., Buskin, J. N., Hauschka, S. D., Lassar, A. B. et al. (1989). Interactions between heterologous helix-loop-helix proteins generate complexes that bind specifically to a common DNA sequence. *Cell* **58**, 537-544.
- Nagao, M., Ishizaka, Y., Nakagawara, A., Kohno, K., Kuwano, M., Tahira, T., Itoh, F., Ikeda, I. and Sugimura, T. (1990). Expression of ret proto-oncogene in human neuroblastomas. *Jpn J Cancer Res* **81**, 309-312.
- Nagpal, S., Friant, S., Nakshatri, H. and Chambon, P. (1993). RARs and RXRs: evidence for two autonomous transactivation functions (AF-1 and AF-2) and heterodimerization in vivo. *Embo J* **12**, 2349-2360.
- Naumovski, L. and Cleary, M. L. (1994). Bcl2 inhibits apoptosis associated with terminal differentiation of HL-60 myeloid leukemia cells. *Blood* **83**, 2261-2267.
- Nehlin, J. O., Hara, E., Kuo, W. L., Collins, C. and Campisi, J. (1997). Genomic organization, sequence, and chromosomal localization of the human helix-loop-helix Id1 gene. *Biochem Biophys Res Commun* **231**, 628-634.
- Nemere, I. (1995). Nongenomic effects of 1,25-dihydroxyvitamin D3: potential relation of a plasmalemmal receptor to the acute enhancement of intestinal calcium transport in chick. *J Nutr* **125**, 1695S-1698S.
- Niederreither, K., Subbarayan, V., Dolle, P. and Chambon, P. (1999). Embryonic retinoic acid synthesis is essential for early mouse post-implantation development. *Nat Genet* **21**, 444-448.
- Nikoloff, D. M., McGraw, P. and Henry, S. A. (1992). The INO2 gene of *Saccharomyces cerevisiae* encodes a helix-loop-helix protein that is required for activation of phospholipid synthesis. *Nucleic Acids Res* **20**, 3253.
- Norman, A. W., Okamura, W. H., Hammond, M. W., Bishop, J. E., Dormanen, M. C., Bouillon, R., van Baelen, H., Ridall, A. L., Daane, E., Khoury, R. et al. (1997). Comparison of 6-s-cis- and 6-s-trans-locked analogs of 1 α ,25-dihydroxyvitamin D3 indicates that the 6-s-cis conformation is preferred for rapid nongenomic biological responses and that neither 6-s-cis- nor 6-s-trans-locked analogs are preferred for genomic biological responses. *Mol Endocrinol* **11**, 1518-1531.

Norton, J. D. (2000). ID helix-loop-helix proteins in cell growth, differentiation and tumorigenesis. *J Cell Sci* **113**, 3897-3905.

Norton, J. D. and Atherton, G. T. (1998). Coupling of cell growth control and apoptosis functions of Id proteins. *Mol Cell Biol* **18**, 2371-2381.

Ogryzko, V. V., Schiltz, R. L., Russanova, V., Howard, B. H. and Nakatani, Y. (1996). The transcriptional coactivators p300 and CBP are histone acetyltransferases. *Cell* **87**, 953-959.

Omate, S. A., Tsai, S. Y., Tsai, M. J. and O'Malley, B. W. (1995). Sequence and characterization of a coactivator for the steroid hormone receptor superfamily. *Science* **270**, 1354-1357.

Orfanos, C. E., Ehlert, R. and Gollnick, H. (1987). The retinoids. A review of their clinical pharmacology and therapeutic use. *Drugs* **34**, 459-503.

Ostvoid, A. C., Norum, J. H., Mathiesen, S., Wanvik, B., Sefland, I. and Grundt, K. (2001). Molecular cloning of a mammalian nuclear phosphoprotein NUCKS, which serves as a substrate for Cdk1 in vivo. *Eur J Biochem* **268**, 2430-2440.

Ota, A., Shen-Orr, Z., Roberts, C. T., Jr. and LeRoith, D. (1989). TPA-induced neurite formation in a neuroblastoma cell line (SH-SY5Y) is associated with increased IGF-I receptor mRNA and binding. *Brain Res Mol Brain Res* **6**, 69-76.

Pagliuca, A., Bartoli, P. C., Saccone, S., Della Valle, G. and Lania, L. (1995). Molecular cloning of ID4, a novel dominant negative helix-loop-helix human gene on chromosome 6p21.3-p22. *Genomics* **27**, 200-203.

Pahlman, S., Odelstad, L., Larsson, E., Grotte, G. and Nilsson, K. (1981). Phenotypic changes of human neuroblastoma cells in culture induced by 12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate. *Int J Cancer* **28**, 583-589.

Pahlman, S., Ruusala, A. I., Abrahamsson, L., Mattsson, M. E. and Esscher, T. (1984). Retinoic acid-induced differentiation of cultured human neuroblastoma cells: a comparison with phorbol ester-induced differentiation. *Cell Differ* **14**, 135-144.

Parrow, V., Nanberg, E., Heikkila, J., Hammerling, U. and Pahlman, S. (1992). Protein kinase C remains functionally active during TPA induced neuronal differentiation of SH-SY5Y human neuroblastoma cells. *J Cell Physiol* **152**, 536-544.

Peck, G. L., Olsen, T. G., Yoder, F. W., Strauss, J. S., Downing, D. T., Pandya, M., Butkus, D. and Arnaud-Battandier, J. (1979). Prolonged remissions of cystic and conglobate acne with 13-cis-retinoic acid. *N Engl J Med* **300**, 329-333.

Perez-Juste, G. and Aranda, A. (1999). Differentiation of neuroblastoma cells by phorbol esters and insulin-like growth factor 1 is associated with induction of retinoic acid receptor beta gene expression. *Oncogene* **18**, 5393-5402.

Perissi, V., Staszewski, L. M., McInerney, E. M., Kurokawa, R., Kronos, A., Rose, D. W., Lambert, M. H., Milburn, M. V., Glass, C. K. and Rosenfeld, M. G. (1999). Molecular determinants of nuclear receptor-corepressor interaction. *Genes Dev* **13**, 3198-3208.

Perlman, J. M. and Volpe, J. J. (1986). Intraventricular hemorrhage in extremely small premature infants. *Am J Dis Child* **140**, 1122-1124.

Persson, P., Jogi, A., Grynfeld, A., Pahlman, S. and Axelson, H. (2000). HASH-1 and E2-2 are expressed in human neuroblastoma cells and form a functional complex. *Biochem Biophys Res Commun* **274**, 22-31.

Pesce, S. and Benezra, R. (1993). The loop region of the helix-loop-helix protein Id1 is critical for its dominant negative activity. *Mol Cell Biol* **13**, 7874-7880.

Petkovich, M., Brand, N. J., Krust, A. and Chambon, P. (1987). A human retinoic acid receptor which belongs to the family of nuclear receptors. *Nature* **330**, 444-450.

Pettmann, B. and Henderson, C. E. (1998). Neuronal cell death. *Neuron* **20**, 633-647.

Peverali, F. A., Ramqvist, T., Saffrich, R., Pepperkok, R., Barone, M. V. and Philipson, L. (1994). Regulation of G1 progression by E2A and Id helix-loop-helix proteins. *Embo J* **13**, 4291-4301.

Pfenninger, K. H., de la Houssaye, B. A., Helmke, S. M. and Quiroga, S. (1991). Growth-regulated proteins and neuronal plasticity. A commentary. *Mol Neurobiol* **5**, 143-151.

Ponthan, F., Borgstrom, P., Hassan, M., Wassberg, E., Redfern, C. P. and Kogner, P. (2001). The vitamin A analogues: 13-cis retinoic acid, 9-cis retinoic acid, and Ro 13-6307 inhibit neuroblastoma tumour growth in vivo. *Med Pediatr Oncol* **36**, 127-131.

Rastinejad, F., Wagner, T., Zhao, Q. and Khorasanizadeh, S. (2000). Structure of the RXR-RAR DNA-binding complex on the retinoic acid response element DR1. *Embo J* **19**, 1045-1054.

Reddy, A. G., Shivaji, S. and Gupta, P. D. (1989). Effect of estradiol on the membrane fluidity of the rat vaginal epithelial cells. *J Steroid Biochem* **33**, 1229-1233.

Renaud, J. P., Rochel, N., Ruff, M., Vivat, V., Chambon, P., Gronemeyer, H. and Moras, D. (1995). Crystal structure of the RAR-gamma ligand-binding domain bound to all-trans retinoic acid. *Nature* **378**, 681-689.

Reynolds, C. P. (2000). Differentiating agents in pediatric malignancies: retinoids in neuroblastoma. *Curr Oncol Rep* **2**, 511-518.

Riechmann, V. and Sablitzky, F. (1995). Mutually exclusive expression of two dominant-negative helix-loop-helix (dnHLH) genes, Id4 and Id3, in the developing brain of the mouse suggests distinct regulatory roles of these dnHLH proteins during cellular proliferation and differentiation of the nervous system. *Cell Growth Differ* **6**, 837-843.

Rivera, R. R., Johns, C. P., Quan, J., Johnson, R. S. and Murre, C. (2000). Thymocyte selection is regulated by the helix-loop-helix inhibitor protein, Id3. *Immunity* **12**, 17-26.

Rochette-Egly, C., Adam, S., Rossignol, M., Egly, J. M. and Chambon, P. (1997). Stimulation of RAR alpha activation function AF-1 through binding to the general transcription factor TFIID and phosphorylation by CDK7. *Cell* **90**, 97-107.

Rochette-Egly, C., Gaub, M. P., Lutz, Y., Ali, S., Scheuer, I. and Chambon, P. (1992). Retinoic acid receptor-beta: immunodetection and phosphorylation on tyrosine residues. *Mol Endocrinol* 6, 2197-2209.

Rodriguez-Tebar, A. and Rohrer, H. (1991). Retinoic acid induces NGF-dependent survival response and high-affinity NGF receptors in immature chick sympathetic neurons. *Development* 112, 813-820.

Ross, S. A., McCaffery, P. J., Drager, U. C. and De Luca, L. M. (2000). Retinoids in embryonal development. *Physiol Rev* 80, 1021-1054.

Rostomily, R. C., Bermingham-McDonogh, O., Berger, M. S., Tapscott, S. J., Reh, T. A. and Olson, J. M. (1997). Expression of neurogenic basic helix-loop-helix genes in primitive neuroectodermal tumors. *Cancer Res* 57, 3526-3531.

Rouayrenc, J. F., Vignon, F., Bringer, J. and Pujol, P. (2000). [Non-genomic steroid effects: estrogen action revisited]. *Ann Endocrinol (Paris)* 61, 517-523.

Rushlow, C. A., Hogan, A., Pinchin, S. M., Howe, K. M., Lardelli, M. and Ish-Horowicz, D. (1989). The Drosophila hairy protein acts in both segmentation and bristle patterning and shows homology to N-myc. *Embo J* 8, 3095-3103.

Saatcioglu, F., Bartunek, P., Deng, T., Zenke, M. and Karin, M. (1993). A conserved C-terminal sequence that is deleted in v-ErbA is essential for the biological activities of c-ErbA (the thyroid hormone receptor). *Mol Cell Biol* 13, 3675-85.

Sadouk, M. B., Rajzbaum, G., Vaquero, C., Amor, B. and Toubert, A. (1991). The defective in vitro expression of interferon-gamma messenger RNA in rheumatoid arthritis is recovered by cycloheximide. *Cell Immunol* 137, 239-244.

Sambamurti, K. and Lahiri, D. K. (1998). ERAB contains a putative noncleavable signal peptide. *Biochem Biophys Res Commun* 249, 546-549.

Sambrook, J.C., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. (1989) in *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.

Sato, S., Fujita, N. and Tsuruo, T. (2000). Modulation of Akt kinase activity by binding to Hsp90. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 10832-10837.

Sawai, S. and Campos-Ortega, J. A. (1997). A zebrafish Id homologue and its pattern of expression during embryogenesis. *Mech Dev* 65, 175-185.

Schmidt, B. M., Gerdes, D., Feuring, M., Falkenstein, E., Christ, M. and Wehling, M. (2000). Rapid, nongenomic steroid actions: A new age? *Front Neuroendocrinol* 21, 57-94.

Schor, N. F. (1999). Neuroblastoma as a neurobiological disease. *J Neurooncol* 41, 159-166.

Shivaji, S. and Jagannadham, M. V. (1992). Steroid-induced perturbations of membranes and its relevance to sperm acrosome reaction. *Biochim Biophys Acta* 1108, 99-109.

- Sidell, N. (1982). Retinoic acid-induced growth inhibition and morphologic differentiation of human neuroblastoma cells in vitro. *J Natl Cancer Inst* 68, 589-596.
- Simoncini, T., Hafezi-Moghadam, A., Brazil, D. P., Ley, K., Chin, W. W. and Liao, J. K. (2000). Interaction of oestrogen receptor with the regulatory subunit of phosphatidylinositol-3-OH kinase. *Nature* 407, 538-541.
- Slager, H. G., Van Inzen, W., Freund, E., Van den Eijnden-Van Raaij, A. J. and Mummery, C. L. (1993). Transforming growth factor-beta in the early mouse embryo: implications for the regulation of muscle formation and implantation. *Dev Genet* 14, 212-224.
- Soderholm, H., Olsson, A., Lavenius, E., Ronnstrand, L. and Nanberg, E. (2001). Activation of Ras, Raf-1 and protein kinase C in differentiating human neuroblastoma cells after treatment with phorbol ester and NGF. *Cell Signal* 13, 95-104.
- Soderholm, H., Ortoft, E., Johansson, I., Ljungberg, J., Larsson, C., Axelson, H. and Pahlman, S. (1999). Human achaete-scute homologue 1 (HASH-1) is downregulated in differentiating neuroblastoma cells. *Biochem Biophys Res Commun* 256, 557-563.
- Song, X., Bishop, J. E., Okamura, W. H. and Norman, A. W. (1998). Stimulation of phosphorylation of mitogen-activated protein kinase by 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ in promyelocytic NB4 leukemia cells: a structure-function study. *Endocrinology* 139, 457-465.
- Sorrentino, V., Pepperkok, R., Davis, R. L., Ansorge, W. and Philipson, L. (1990). Cell proliferation inhibited by MyoD1 independently of myogenic differentiation. *Nature* 345, 813-815.
- Spencer, T. E., Jenster, G., Burcin, M. M., Allis, C. D., Zhou, J., Mizzen, C. A., McKenna, N. J., Onate, S. A., Tsai, S. Y., Tsai, M. J. et al. (1997). Steroid receptor coactivator-1 is a histone acetyltransferase. *Nature* 389, 194-198.
- Spinella, M. J., Freemantle, S. J., Sekula, D., Chang, J. H., Christie, A. J. and Dmitrovsky, E. (1999). Retinoic acid promotes ubiquitination and proteolysis of cyclin D1 during induced tumor cell differentiation. *J Biol Chem* 274, 22013-22018.
- Sporn, M. B., Roberts, A. B., Roche, N. S., Kagechika, H. and Shudo, K. (1986). Mechanism of action of retinoids. *J Am Acad Dermatol* 15, 756-764.
- Stein, R. C. and Waterfield, M. D. (2000). PI3-kinase inhibition: a target for drug development? *Mol Med Today* 6, 347-357.
- Sun, X. H. (1994). Constitutive expression of the Id1 gene impairs mouse B cell development. *Cell* 79, 893-900.
- Sun, X. H., Copeland, N. G., Jenkins, N. A. and Baltimore, D. (1991). Id proteins Id1 and Id2 selectively inhibit DNA binding by one class of helix-loop-helix proteins. *Mol Cell Biol* 11, 5603-5611.
- Swain, L. D., Schwartz, Z., Caulfield, K., Brooks, B. P. and Boyan, B. D. (1993). Nongenomic regulation of chondrocyte membrane fluidity by 1,25-(OH)₂D₃ and 24,25-(OH)₂D₃ is dependent on cell maturation. *Bone* 14, 609-617.

- Sylvia, V. L., Hughes, T., Dean, D. D., Boyan, B. D. and Schwartz, Z. (1998a). 17beta-estradiol regulation of protein kinase C activity in chondrocytes is sex-dependent and involves nongenomic mechanisms. *J Cell Physiol* 176, 435-444.
- Sylvia, V. L., Schwartz, Z., Curry, D. B., Chang, Z., Dean, D. D. and Boyan, B. D. (1998b). 1,25(OH)₂D₃ regulates protein kinase C activity through two phospholipid-dependent pathways involving phospholipase A₂ and phospholipase C in growth zone chondrocytes. *J Bone Miner Res* 13, 559-569.
- Sylvia, V. L., Schwartz, Z., Ellis, E. B., Helm, S. H., Gomez, R., Dean, D. D. and Boyan, B. D. (1996). Nongenomic regulation of protein kinase C isoforms by the vitamin D metabolites 1 alpha,25-(OH)₂D₃ and 24R,25-(OH)₂D₃. *J Cell Physiol* 167, 380-393.
- Szabo, P., Panneerselvam, C., Clinton, M., Frangou-Lazaridis, M., Weksler, D., Whittington, E., Macera, M. J., Grzeschik, K. H., Selvakumar, A. and Horecker, B. L. (1993). Prothymosin alpha gene in humans: organization of its promoter region and localization to chromosome 2. *Hum Genet* 90, 629-34.
- Tahira, T., Ishizaka, Y., Itoh, F., Nakayasu, M., Sugimura, T. and Nagao, M. (1991). Expression of the ret proto-oncogene in human neuroblastoma cell lines and its increase during neuronal differentiation induced by retinoic acid. *Oncogene* 6, 2333-2338.
- Takahashi, J., Palmer, T. D. and Gage, F. H. (1999). Retinoic acid and neurotrophins collaborate to regulate neurogenesis in adult-derived neural stem cell cultures. *J Neurobiol* 38, 65-81.
- Takeshita, A., Cardona, G. R., Koibuchi, N., Suen, C. S. and Chin, W. W. (1997). TRAM-1, A novel 160-kDa thyroid hormone receptor activator molecule, exhibits distinct properties from steroid receptor coactivator-1. *J Biol Chem* 272, 27629-27634.
- Takeshita, A., Yen, P. M., Misiti, S., Cardona, G. R., Liu, Y. and Chin, W. W. (1996). Molecular cloning and properties of a full-length putative thyroid hormone receptor coactivator. *Endocrinology* 137, 3594-3597.
- Takeuchi, T., Gumucio, D. L., Yamada, T., Meisler, M. H., Minth, C. D., Dixon, J. E., Eddy, R. E. and Shows, T. B. (1986). Genes encoding pancreatic polypeptide and neuropeptide Y are on human chromosomes 17 and 7. *J Clin Invest* 77, 1038-1041.
- Taneja, R., Rochette-Egly, C., Plassat, J. L., Penna, L., Gaub, M. P. and Chambon, P. (1997). Phosphorylation of activation functions AF-1 and AF-2 of RAR alpha and RAR gamma is indispensable for differentiation of F9 cells upon retinoic acid and cAMP treatment. *Embo J* 16, 6452-6465.
- Thiele, C. J., Reynolds, C. P. and Israel, M. A. (1985). Decreased expression of N-myc precedes retinoic acid-induced morphological differentiation of human neuroblastoma. *Nature* 313, 404-406.
- Thompson, C. C. and Evans, R. M. (1989). Trans-activation by thyroid hormone receptors: functional parallels with steroid hormone receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 3494-3498.

- Thompson, J. N., Howell, J. M., Pitt, G. A. and McLaughlin, C. I. (1969). The biological activity of retinoic acid in the domestic fowl and the effects of vitamin A deficiency on the chick embryo. *Br J Nutr* **23**, 471-490.
- Tremblay, G. B., Bergeron, D. and Giguere, V. (2001). 4-Hydroxytamoxifen Is an Isoform-Specific Inhibitor of Orphan Estrogen- Receptor-Related (ERR) Nuclear Receptors beta and gamma. *Endocrinology* **142**, 4572-4575.
- Tsukahara, K., Takema, Y., Fujimura, T., Moriwaki, S., Kitahara, T., Imayama, S. and Imokawa, G. (1999). All-trans retinoic acid promotes the repair of tortuosity of elastic fibres in rat skin. *Br J Dermatol* **140**, 1048-1053.
- Twal, W., Roze, L. and Zile, M. H. (1995). Anti-retinoic acid monoclonal antibody localizes all-trans-retinoic acid in target cells and blocks normal development in early quail embryo. *Dev Biol* **168**, 225-234.
- Tzimas, G. and Nau, H. (2001). Vitamin A teratogenicity and risk assessment in the macaque retinoid model. *Reprod Toxicol* **15**, 445-447.
- Umesono, K., Murakami, K. K., Thompson, C. C. and Evans, R. M. (1991). Direct repeats as selective response elements for the thyroid hormone, retinoic acid, and vitamin D3 receptors. *Cell* **65**, 1255-1266.
- Vandekerckhove, J. and Weber, K. (1978). Mammalian cytoplasmic actins are the products of at least two genes and differ in primary structure in at least 25 identified positions from skeletal muscle actins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **75**, 1106-1110.
- Venter, J. C. Adams, M. D. Myers, E. W. Li, P. W. Mural, R. J. Sutton, G. G. Smith, H. O. Yandell, M. Evans, C. A. Holt, R. A. et al. (2001). The sequence of the human genome. *Science* **291**, 1304-1351.
- Voegel, J. J., Heine, M. J., Zechel, C., Chambon, P. and Gronemeyer, H. (1996). TIF2, a 160 kDa transcriptional mediator for the ligand-dependent activation function AF-2 of nuclear receptors. *Embo J* **15**, 3667-3675.
- Wali, R. K., Baum, C. L., Sitrin, M. D. and Brasitus, T. A. (1990). 1,25(OH)₂ vitamin D₃ stimulates membrane phosphoinositide turnover, activates protein kinase C, and increases cytosolic calcium in rat colonic epithelium. *J Clin Invest* **85**, 1296-1303.
- Wang, C. T., Grishanin, R., Earles, C. A., Chang, P. Y., Martin, T. F., Chapman, E. R. and Jackson, M. B. (2001). Synaptotagmin modulation of fusion pore kinetics in regulated exocytosis of dense-core vesicles. *Science* **294**, 1111-1115.
- Watters, J. J., Chun, T. Y., Kim, Y. N., Bertics, P. J. and Gorski, J. (2000). Estrogen modulation of prolactin gene expression requires an intact mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway in cultured rat pituitary cells. *Mol Endocrinol* **14**, 1872-1881.
- Wehling, M. (1997). Specific, nongenomic actions of steroid hormones. *Annu Rev Physiol* **59**, 365-393.

- Wehling, M., Christ, M. and Theisen, K. (1992). Membrane receptors for aldosterone: a novel pathway for mineralocorticoid action. *Am J Physiol* **263**, E974-979.
- Wehling, M., Spes, C. H., Win, N., Janson, C. P., Schmidt, B. M., Theisen, K. and Christ, M. (1998). Rapid cardiovascular action of aldosterone in man. *J Clin Endocrinol Metab* **83**, 3517-3522.
- Wernersson, J., Johansson, I., Larsson, U., Minth-Worby, C., Pahlman, S. and Andersson, G. (1998). Activated transcription of the human neuropeptide Y gene in differentiating SH-SY5Y neuroblastoma cells is dependent on transcription factors AP-1, AP-2alpha, and NGFI. *J Neurochem* **70**, 1887-1897.
- Wibley, J., Deed, R., Jasiok, M., Douglas, K. and Norton, J. (1996). A homology model of the Id-3 helix-loop-helix domain as a basis for structure-function predictions. *Biochim Biophys Acta* **1294**, 138-146.
- Wice, B. M. and Gordon, J. I. (1998). Forced expression of Id-1 in the adult mouse small intestinal epithelium is associated with development of adenomas. *J Biol Chem* **273**, 25310-25319.
- Wilson, J. G., Roth, C. B. and Warkany, J. (1953). An analysis of the syndrome of malformations induced by maternal vitamin A deficiency. *Am J Anat* **92**, 189-217.
- Wilson, R. and Mohun, T. (1995). Xldx, a dominant negative regulator of bHLH function in early Xenopus embryos. *Mech Dev* **49**, 211-22.
- Wolbach, S. B. and Howe, P. R. (1925). Tissue changes following deprivation of fat-soluble vitamin A. *J. Exp. Med.* **42**, 753-777.
- Wood, M. A., McMahon, S. B. and Cole, M. D. (2000). An ATPase/helicase complex is an essential cofactor for oncogenic transformation by c-Myc. *Mol Cell* **5**, 321-30.
- Worby, C. A., Vega, Q. C., Zhao, Y., Chao, H. H., Seasholtz, A. F. and Dixon, J. E. (1996). Glial cell line-derived neurotrophic factor signals through the RET receptor and activates mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem* **271**, 23619-23622.
- Wuarin, L. and Sidell, N. (1991). Differential susceptibilities of spinal cord neurons to retinoic acid-induced survival and differentiation. *Dev Biol* **144**, 429-435.
- Wuarin, L., Sidell, N. and de Vellis, J. (1990). Retinoids increase perinatal spinal cord neuronal survival and astroglial differentiation. *Int J Dev Neurosci* **8**, 317-326.
- Yang, X. J., Ogryzko, V. V., Nishikawa, J., Howard, B. H. and Nakatani, Y. (1996). A p300/CBP-associated factor that competes with the adenoviral oncoprotein E1A. *Nature* **382**, 319-324.
- Yang-Yen, H. F., Zhang, X. K., Graupner, G., Tzukerman, M., Sakamoto, B., Karin, M. and Pfahl, M. (1991). Antagonism between retinoic acid receptors and AP-1: implications for tumor promotion and inflammation. *New Biol* **3**, 1206-1219.
- Yen, P. M. and Chin, W. W. (1994). Molecular mechanisms of dominant negative activity by nuclear hormone receptors. *Mol Endocrinol* **8**, 1450-1454.

Yeung, K., Seitz, T., Li, S., Janosch, P., McFerran, B., Kaiser, C., Fee, F., Katsanakis, K. D., Rose, D. W., Mischak, H. et al. (1999). Suppression of Raf-1 kinase activity and MAP kinase signalling by RKIP. *Nature* **401**, 173-177.

Yokota, Y., Mansouri, A., Mori, S., Sugawara, S., Adachi, S., Nishikawa, S. and Gruss, P. (1999). Development of peripheral lymphoid organs and natural killer cells depends on the helix-loop-helix inhibitor Id2. *Nature* **397**, 702-706.

Yokoyama, M., Nishi, Y., Miyamoto, Y., Nakamura, M., Akiyama, K., Matsubara, K. and Okubo, K. (1996). Molecular cloning of a human neuroD from a neuroblastoma cell line specifically expressed in the fetal brain and adult cerebellum. *Brain Res Mol Brain Res* **42**, 135-139.

Zervos, A. S., Gyuris, J. and Brent, R. (1994). Mxi1, a protein that specifically interacts with Max to bind Myc-Max recognition sites. *Cell* **79**, following 388.

Zhang, X., Jefferson, A. B., Auethavekiat, V. and Majerus, P. W. (1995). The protein deficient in Lowe syndrome is a phosphatidylinositol-4,5- bisphosphate 5-phosphatase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 4853-4856.

Zhao, G. Q., Zhao, Q., Zhou, X., Mattei, M. G. and de Crombrughe, B. (1993). TFEC, a basic helix-loop-helix protein, forms heterodimers with TFE3 and inhibits TFE3-dependent transcription activation. *Mol Cell Biol* **13**, 4505-4512.

Zhu, X., Mancini, M. A., Chang, K. H., Liu, C. Y., Chen, C. F., Shan, B., Jones, D., Yang-Feng, T. L. and Lee, W. H. (1995). Characterization of a novel 350-kilodalton nuclear phosphoprotein that is specifically involved in mitotic-phase progression. *Mol Cell Biol* **15**, 5017-5029.

Zhuang, Y., Soriano, P. and Weintraub, H. (1994). The helix-loop-helix gene E2A is required for B cell formation. *Cell* **79**, 875-884.

Zile, M. H. (1998). Vitamin A and embryonic development: an overview. *J Nutr* **128**, 455S-458S.

Zile, M. H. (2001). Function of vitamin A in vertebrate embryonic development. *J Nutr* **131**, 705-708.

ANEXO

1. Ribonucleoproteína CGI-110

SECUENCIA

```
CTTATAATGNCCACAGGCATTTGCGAAGATGGGCACAAAGAAGAAGGAGGAACAGTTGA
AGCTTCTTAAGGAGAAATATGGCATCAACACAGATCCACCAAATAAATGTTTTCTACAT
TTTCATTTGGACTAAATCCCACGAATGACAAC TACCACCTTTTTTCTTTTTAATTAAT
ACTAAATATTGTGATTTCTATTGAGGTTCAAAATGACCTGCTTGAACTTTGATACAT
ATTGGAATACATTATGTTAATAAACTTGTAGCTTTTTGTGAAAAAAAAAAAAAA
```

BLAST

```
EM_HUM:AF151868 AF151868 Homo sapiens CGI-110 protein mR... 1352 1.4e-54 1
EM_HUM:AF184213 AF184213 Homo sapiens ht006 protein mRNA... 1352 1.4e-54 1
EM_HUM:AK000621 AK000621 Homo sapiens cDNA FLJ20614 fis,... 1352 1.6e-54 1
```

ALINEAMIENTO

```
>EM_HUM:AF151868 AF151868 Homo sapiens CGI-110 protein mRNA, complete cds.
Length = 808
```

Plus Strand HSPs:

Score = 1152 (178.9 bits), Expect = 1.5e-45, P = 1.5e-45
Identities = 234/239 (97%), Positives = 234/239 (97%), Strand = Plus / Plus

```
Query:      3  TATAATGNCCACAGGCATTTGCGAAGATGGGCACAAAGAAGAAGGAGGAACAGTTGAAG 62
           ||||| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
Sbjct:     485 TATAATGCCAACAGGCATTTGAGGATGGGCACAAAGAAGAAGGAGGAACAGTTGAAG 544

Query:      63  CTTCCTTAAGGAGAAATATGGCATCAACACAGATCCACCAAATAAATGTTTTCTACATTT 122
           ||||| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
Sbjct:     545 CTTCCTTAAGGAGAAATATGGCATCAACACAGATCCACCAAATAAATGTTTTCTACATTT 604

Query:     123  TCATTTGGACTAAATCCCACGAATGACAAC TACCACCTTTTTTCTTTTTAATTAATAC 182
           ||||| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
Sbjct:     605 TCATTTGGACTAAATCCCACGAATGACAAC TACCACCTTTTTTCTTTTTAATTAATAC 664

Query:     183  TAAATATTGTGATTTCTATTGAGGTTCAAAATGACCTGCTTGAACTTTGATACATAT 242
           ||||| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
Sbjct:     665 TAAATATTGTGATTTCTATTGAGGTTCAAAATGACCTGCTTGAACTTTGATACATAT 724

Query:     243  TGGAATACATTATGTTAATAAACTTGTAGCTTTTTGTGA 281
           ||||| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
Sbjct:     725 TGGAATACATTATGTTAATAAACTTGTAGCTTTTTGTGA 763
```

Anexo II

2. Protimosina alfa

SECUENCIA

TCTTATAAGTACTTGGTTTGTATGCGATGGTTAAAAAGGCCAAAGATAAAAGGTTTCTTT
TTTTTTCCTTTTTTGTCTATGAAGTTGCTGTTATTTTTTTGGCCTGTTGATGTATGT
GTGAAACAATGTTGTCCAACAATAAACAGGAATTTATTTTGCTGAGTTGTTCCAAAAA
AAAAAA

BLAST

EM_HUM:HSTHYMA	M14630 Human prothymosin alpha mRNA, com...	824	6.6e-31	1
EM_HUM:S41694	S41694 {pseudogene} PTMAP2=prothymosin a...	824	6.7e-31	1
EM_HUM:BC005228	BC005228 Homo sapiens, clone MGC:12250, ...	814	1.9e-30	1
EM_HUM:BC003510	BC003510 Homo sapiens, prothymosin, alph...	809	3.1e-30	1
EM_HUM:HSPORAC	J04799 Human prothymosin-alpha pseudogen...	809	3.5e-30	1
EM_HUM:HSPROAA2	M67480 Human prothymosin-alpha gene, com...	824	4.6e-30	1

ALINEAMIENTO

>EM_HUM:HSTHYMA M14630 Human prothymosin alpha mRNA, complete cds.
Length = 1200

Plus Strand HSPs:

Score = 833 (131.0 bits), Expect = 2.6e-31, P = 2.6e-31
Identities = 169/172 (98%), Positives = 169/172 (98%), Strand = Plus / Plus

Query: 4 TATAAGTACTTGGTTTGTATGCGATGGTTAAAAAGGCCAAAGATAAAAGGTTTCTTTTTT 63
|||||
Sbjct: 1029 TATAAGTAGTTGGTTTGTATGAGATGGTTAAAAAGGCCAAAGATAAAAGGTTTCTTTTTT 1088

Query: 64 TTTCTTTTTTGTCTATGAAGTTGCTGTTATTTTTTTGGCCTGTTGATGTATGTGTG 123
|||||
Sbjct: 1089 TTTCTTTTTTGTCTATGAAGTTGCTGTTATTTTTTTGGCCTGTTGATGTATGTGTG 1148
Query: 124 AAACAATGTTGTCCAACAATAAACAGGAATTTATTTTGCTGAGTTGTTCCA 175
|||||
Sbjct: 1149 AAACAATGTTGTCCAACAATAAACAGGAATTTATTTTGCTGAGTTGTTCTA 1200

3. NPI-1

SECUENCIA

NCTTTTCTTGCCGAGGAGCAATAGGTGTAGCTATTTTCTCCATACCTGAGGTTATAAATA
TCGCAAGATTCAAGAGAACTCATCATTTAAATAAAATTTATTATTATTTTGTTTTTAG
CATCATATGTTTTTTTGTTCAGGTGTTTATTCTGTATTAAATCCACTGAAGTAGCAT
TTCAAGCAGCTGTACTACAGCAAACGGTATTTCAATGCTTTCTCTGGTTTCATTTAG
TTCAAAAATTCTGAAACATTTCATAACGCTAAAAAATTAGGAATTACAGAAGCTGAATTG
CACAAAAA

4. Proteina G beta 2-like 1

SECUENCIA

TCTT~~NAGCAGCGGCNCAGAACCC~~CAATGCACCTCCCTGGCCTGGTCTGCTGATGGC
 CAGACTCTGTTTGGCTGGCTACACGGACAACCTGGTGGAGTGTGGCAGGTGACCATTGGC
 ACACGCTAGAAGTTTATGGCAGAGCTTTACAAAAAAAAAAAAA

BLAST

EM_HUM:BC000214	BC000214	Homo sapiens, guanine nucleotide...	672	5.1e-24	1
EM_HUM:BC000366	BC000366	Homo sapiens, guanine nucleotide...	672	5.2e-24	1
EM_HUM:HSMHB123	M24194	Human MHC protein homologous to ch...	663	1.4e-23	1
EM_HUM:BC000672	BC000672	Homo sapiens, guanine nucleotide...	672	3.7e-23	1

ALINEAMIENTO

>EM_HUM:BC000214 BC000214 Homo sapiens, guanine nucleotide binding protein (G protein), beta polypeptide 2-like 1, clone MGC:2416, mRNA, complete cds.

Length = 1137

Plus Strand HSPs:

Score = 672 (106.9 bits), Expect = 5.1e-24, P = 5.1e-24

Identities = 140/146 (95%), Positives = 140/146 (95%), Strand = Plus / Plus

```

Query:      6 AGCAGCGGCNCAGAACCCCAATGCACCTCCCTGGCCTGGTCTGCTGATGGCCAGAC 65
  |||||
Sbjct:    956 AGCAGCAAGGCAGAACCCCCAG-TGCACCTCCCTGGCCTGGTCTGCTGATGGCCAGAC 1014

Query:      66 TCTGTTTGCTGGCTACACGGACAACCTGGTGGAGTGTGGCAGGTGACCATTGGCACACG 125
  |||||
Sbjct:    1015 TCTGTTTGCTGGCTACACGGACAACCTGGTGGAGTGTGGCAGGTGACCATTGGCACACG 1074

Query:      126 CTAGAAGTTTATGGCAGAGCTTTACA 151
  |||||
Sbjct:    1075 CTAGAAGTTTATGGCAGAGCTTTACA 1100

```


7. Sinaptotagmina IV (KIAA0080)**SECUENCIA**

TTNTTATGGNGGCCACAGTGGCTTGGCGTCACGATGACTGTCACGACATAGTGGTTGTC
 TGTCTTTACAGTGTGTCTTCACATGTTAAAGATGAAACTCAGGAATAAAATAAATGTGTC
 AAATTTTGAAAAAAAAAAAAA

BLAST

EM_HUM:HSORF002 D38522 Human mRNA for KIAA0080 gene, part... 368 4.0e-09 1
 EM_HUM:AK026178 AK026178 Homo sapiens cDNA: FLJ22525 fis,... 368 2.6e-09 1

ALINEAMIENTO

>EM_HUM:HSORF002 D38522 Human mRNA for KIAA0080 gene, partial cds.
 Length = 4001

Plus Strand HSPs:

Score = 419 (68.9 bits), Expect = 1.9e-11, P = 1.9e-11
 Identities = 105/127 (82%), Positives = 105/127 (82%), Strand = Plus / Plus

Query: 16 ACAGTGGC-TTGGCGTCACGATGACTGTCACGACATAGTGGTTGTCTGTCTTTACAGTGT 74
 ||||| | ||| | |||| | ||| | | | | ||||| ||||| ||||| |||||
 Sbjct: 1125 ACAGTGACATTGCCCTCACCATGA-TCCCTCTCCAAAGTGGTTGTCTTTCTTTACCTTGT 1183
 Query: 75 GTCTTACATGTTAAAGATGAAACTCAGGAATAAAATAAATGTGTCAAATTTGA 129
 ||||| | ||| | |||| | ||| | | | | ||||| ||||| ||||| |||||
 Sbjct: 1184 GTCTTCTCTGTAAAA-ATGAAACTCAAAAATAAAATAAATGTGTCAAATTTGA 1237

8. OCRL**SECUENCIA**

CTTATTGNGGNNCGCCGCTCTGANTTCGTGGATTCGGATTCAGCAGGTTAGGAAAATT
 CTGAAGCCGGCTGTCCTAAGGAAGGTATGGGTCAAAGCCAAGGAGTGACATTGCATGAAT
 CTCCCTTACACCGATTTCTGAGTCTGTGGTTGATGGTGATGTTCCCAATGTACGACCTG
 ATCACTATATGCAAATCTGCTATTGGGAGTCTACCTTTTCAGGCCATCTTCTCATAAAG
 CATTAGTGCAAACATCTTACTGACAATATACATGTTCTGTAAAAAAAAAAAAA

BLAST

EM_HUM:HSU120E2 Z73496 Human DNA sequence from cosmid cU1... 692 1.1e-23 1
 EM_HUM:HS454M7 AL022162 Homo sapiens DNA sequence from PA... 692 1.1e-23 1
 EM_HUM:HSU57627 U57627 Human fetal brain oculocerebrorena... 652 5.5e-22 1

ALINEAMIENTO

>EM_HUM:HSU120E2 Z73496 Human DNA sequence from cosmid cU120E2, on chromosome X
 contains Lowe oculocerebrorenal syndrome (OCRL) ESTs and STS.
 Length = 43,902

Plus Strand HSPs:

Score = 692 (109.9 bits), Expect = 1.1e-23, P = 1.1e-23
 Identities = 200/267 (74%), Positives = 200/267 (74%), Strand = Plus / Plus

Anexo VI

Query: 15 GCCGCTCTGANTTCGTGGATTTCGGATTACAGAGTTAGGAAAATTCTGAAGCCGGCTGT 74
Sbjct: 4891 GCTGCTCTGAAGTAA-GGATTTCGGATTACAGCTGGTNA--AAGACTCTGTCACCTGCTGT 4947

Query: 75 CCTAAGG-AAGGTATGGGTCAAAGCCAAGGAGTGACATTGCATGAATCTCCCTTACACCG 133
Sbjct: 4948 CTCAGGGAAGAAATGGTTCAAATCCATGTGGTGACATTGCATTAGTCTCCCTTCACTG 5007

Query: 134 ATTTCTGAGTCTGTGGTTGATGGTGATGTTCCCAATGTACGACCTGATCACTATATGCA 193
Sbjct: 5008 TTTTCTTATTCTGTAATTGTTGTTATATTCCCAAAA-ACGCTTGATCACTA-A-GCA 5064

Query: 194 AATCTGCTATTGGGAGTCTACCTTTCAGGCCATCTTCTCATTAAAGCATTAGTGCAAAC 253
Sbjct: 5065 AAGCTGCTAGTGGCATTCTATATTTTCGTGCATCTTTTTTATTATAAT-TTATTGCAAAT 5123

Query: 254 ATCTTACTGACAATATACATGTTCTGT 280
Sbjct: 5124 TTTTTTCTGAATAAATATATGTTGTGT 5150

9. NPI-3

SECUENCIA

TCTTAAACNGCNCGCAATTAATGTACGTTTCAAATCAGGAACTACAATTGAACCAGCA
ATTGCTTTTAGAGAATTTAGAAAGCTTTTGGAACTAAAAAAAAA

10. Citocromo B mitochondrial

SECUENCIA

CTTATACTTCACAACAATCCTAATCCTAATACCAACTATCTCCCTAATGAAAACAAAAT
ACTCAAATGGGCCTAAAAAAAAA

BLAST

EM_OR:MIHSUMMIT M28016 Human mitochondrial cytochrome b g...	360	2.1e-09	1
EM_OR:MTHSLA114 X89847 H.sapiens mitochondrial DNA for lo...	360	3.3e-09	1
EM_HUM:BC007851 BC007851 Homo sapiens, clone MGC:14302, m...	365	4.3e-09	1
EM_HUM:BC005845 BC005845 Homo sapiens, clone MGC:2724, mR...	365	4.4e-09	1
EM_OR:AF254896 AF254896 Homo sapiens cytochrome b gene, ...	360	5.8e-09	1
EM_OR:MIHSSU095 U09500 Human mitochondrion cytochrome b g...	355	8.4e-09	1

ALINEAMIENTO

>EM_OR:MIHSUMMIT M28016 Human mitochondrial cytochrome b gene, partial cds.
Length = 337

Plus Strand HSPs:

Score = 360 (60.1 bits), Expect = 2.1e-09, P = 2.1e-09
Identities = 72/72 (100%), Positives = 72/72 (100%), Strand = Plus / Plus

Query: 3 TATACTTCACAACAATCCTAATCCTAATACCAACTATCTCCCTAATGAAAACAAAATAC 62
Sbjct: 266 TATACTTCACAACAATCCTAATCCTAATACCAACTATCTCCCTAATGAAAACAAAATAC 325

Query: 63 TCAAATGGGCCT 74
Sbjct: 326 TCAAATGGGCCT 337

11. Receptor nicotínico de acetil-colina, subunidad alfa3

SECUENCIA

TCCTTTTTCCNGGCTGGCCCAAGCTACCAGCTTTGTTTTGGCATTTCGAGGTTTACT
TATTTTCCACTTATCTTGGAAATCATGCAAAAAAAAAAAAAA

BLAST

EM_HUM:HSU62432	U62432	Human nicotinic acetylcholine rece...	335	1.0e-07	1
EM_HUM:BC002996	BC002996	Homo sapiens, cholinergic recept...	335	1.2e-07	1
EM_HUM:BC000513	BC000513	Homo sapiens, cholinergic recept...	335	1.2e-07	1
EM_HUM:BC001642	BC001642	Homo sapiens, Similar to choline...	335	1.2e-07	1

ALINEAMIENTO

>EM_HUM:HSU62432 U62432 Human nicotinic acetylcholine receptor alpha3 subunit precursor, mRNA, complete cds.
Length = 1908

Plus Strand HSPs:

Score = 335 (56.3 bits), Expect = 1.0e-07, P = 1.0e-07
Identities = 67/67 (100%), Positives = 67/67 (100%), Strand = Plus / Plus

```

Query:      22 CAAGCTACCAGCTTTGTTTTGGCATTTCGAGGTTTACTTATTTTCCACTTATCTTGGAA 81
             |||
Sbjct:    1791 CAAGCTACCAGCTTTGTTTTGGCATTTCGAGGTTTACTTATTTTCCACTTATCTTGGAA 1850

Query:      82 TCATGCA 88
             |||
Sbjct:    1851 TCATGCA 1857
    
```

Anexo VIII

12. ID3-HLH

SECUENCIA

CCTTTTTTTACAGGAAGGTGACTTTCTGTAGCAGTGCGCACTGTATATTAACTTTT
 AAAGCGTTAACATTTTGCATAATAAACGATTTTTAAACAAAAAAAAAAAAAA

BLAST

EM_HUM:BC003107 BC003107 Homo sapiens, inhibitor of DNA b... 400 4.9e-11 1
 EM_HUM:HS1D3HLH X73428 H.sapiens Id3 gene for HLH type tr... 400 1.2e-10 1
 EM_HUM:HS15005 AL021154 Homo sapiens DNA sequence from PA... 400 1.7e-10 1

ALINEAMIENTO

>EM_HUM:BC003107 BC003107 Homo sapiens, inhibitor of DNA binding 3, dominant
 negative helix-loop-helix protein, clone MGC:1988, mRNA, complete
 cds.
 Length = 976

Plus Strand HSPs:

Score = 400 (66.1 bits), Expect = 4.9e-11, P = 4.9e-11
 Identities = 90/98 (91%), Positives = 90/98 (91%), Strand = Plus / Plus

Query: 2 CTTTTTTTACAGGAAGGTGACTTTCTGTAGCAGTGCGCACTGTATATTAACTTTT 61
 ||| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
 Sbjct: 859 CCTTTTTTACAGGAAGGTGACTTTCTGTACCAATGCG-A-TGTATATTAACTTTTATA 916

Query: 62 AAGCGTTAACATTTTGCATAATAAACGATTTTTAAACA 99
 ||| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
 Sbjct: 917 AAA-GTTAACATTTTGCATAATAAACGATTTTTAAACA 953

13. NPI-14

SECUENCIA

TTCTTNGGGAGCGNCCTTCACAATGACCTGTGTCAACTCTTTAGTCTTAGCATATATTTTC
 TTTTAGCCTTTTGAATAATTTGAATAATCACTATTTTTATCAAAGCCTTTGAATTTGAA
 GACAAAAAAAAAAAAA

14. Hidroxiacil-coA deshidrogenasa II (ERAB)

SECUENCIA

CCTNCTCTCGGACCTTGAGGAGGAAGCCAGTAGCCATTTTGTAACTGCCTACCAGTCCG
 CCGTCTGTGCCTAATAAAGTCTCTTTTCTCACAATAAAAAAAAAA

BLAST

EM_HUM:HSU73514 U73514 Human short-chain alcohol dehydrog... 395 7.9e-11 1
 EM_PAT:AX069385 AX069385 Sequence 49 from Patent W00102600. 395 7.9e-11 1
 EM_HUM:BC000829 BC000829 Homo sapiens, hydroxyacyl-Coenzy... 395 8.2e-11 1
 EM_HUM:AF069134 AF069134 Homo sapiens cDNA selection clon... 395 8.3e-11 1
 EM_HUM:BC000372 BC000372 Homo sapiens, hydroxyacyl-Coenzy... 395 8.4e-11 1
 EM_HUM:U96132 U96132 Homo sapiens amyloid beta-peptide ... 395 8.8e-11 1

ALINEAMIENTO

>EM_HUM:HSU73514 U73514 Human short-chain alcohol dehydrogenase (XH98G2) mRNA,
complete cds.
Length = 947

Plus Strand HSPs:

Score = 395 (65.3 bits), Expect = 7.9e-11, P = 7.9e-11
Identities = 87/93 (93%), Positives = 87/93 (93%), Strand = Plus / Plus

```
Query:    2 CTNCTCTCGGACCTTGAGGAGGAAGCCCAGTAGCCATTTTGTAAGTGCCTACCAGTCGCC 61
          || ||||| | |||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct:   855 CTACTCTCC-AGCTTG-GGAGGAAGCCCAGTAGCCATTTTGTAAGTGCCTACCAGTCGCC 912
```

```
Query:    62 CGTCTGTGCCTAATAAAGTCTCTTTTCTCACA 94
          | ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct:   913 C-TCTGTGCCTAATAAAGTCTCTTTTCTCACA 944
```

Anexo X

15. Proteína Ribosomal L18

SECUENCIA

CTTNAGCACGNNCGCAAGGCCNAACTGACCCCGCACAGCCACACCAAACCCTACGTCCG
CTCCAAGGGCCCGAAGTTCGAGCGTGCCAAAGGCCGACGGGCCATTCCGAGGCTACAAA
GATCGTAACCCATGGATCCTACTCTTATTAAAAAGATTTTTGCTGACAAAAA
AA

BLAST

EM_HUM:BC000374 BC000374 Homo sapiens, ribosomal protein ... 643 1.8e-22 1
EM_HUM:AK026558 AK026558 Homo sapiens cDNA: FLJ22905 fis,... 643 1.8e-22 1
EM_HUM:HSRPL18A L11566 Homo sapiens ribosomal protein L18... 643 1.9e-22 1

ALINEAMIENTO

>EM_HUM:BC000374 BC000374 Homo sapiens, ribosomal protein L18, clone MGC:8373,
mRNA, complete cds.
Length = 657

Plus Strand HSPs:

Score = 643 (102.5 bits), Expect = 1.8e-22, P = 1.8e-22
Identities = 145/157 (92%), Positives = 145/157 (92%), Strand = Plus / Plus

Query: 14 GCAAGGCCNAACTGACCCCGCACAGCCACACCAAACCCTACGTCCGCTCCAAGGGCCGG 73
||||||||| | |||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct: 474 GCAAGGCCCCAGGA-ACCCCGCACAGCCACACCAAACCCTACGTCCGCTCCAAGGGCCGG 532

Query: 74 AAGTTCGAGCGTGCCAAAGGCCGACGGGCCATTCCGAGGCTACAAAAGATCGTAACCCAT 133
||||||||| ||||||||||||| ||||||||||||| ||||||||||| | ||||||| |
Sbjct: 533 AAGTTCGAGCGTGCCAGAGGCCGACGGGCCAG-CCGAGGCTACAAAA-A-C-TAACCC-T 587

Query: 134 GGATCCTACTCTTATTAAAAAGATTTTTGCTGACA 170
||||||||| ||||||||||||| ||||||||||||| |||||||||||
Sbjct: 588 GGATCCTACTCTTATTAAAAAGATTTTTGCTGACA 624

16. Proteína Ribosomal S15a**SECUENCIA**

CTCTAACAANGGTCAGCTGGCATCAAGAGACCATGAAGAAGCAAGACGAAAACACACAGG
AGGGAAAATCCTGGGATTCTTTTCTAGGGATGTAATACATATATTTACAAATAAAATGC
CTCATGGACAAAAA

BLAST

EM_HUM:HSRPS15A X84407 H.sapiens mRNA for ribosomal prote... 571 4.7e-19 1
EM_HUM:BC001697 BC001697 Homo sapiens, Similar to ribosom... 567 6.1e-19 1

ALINEAMIENTO

>EM_HUM:HSRPS15A X84407 H.sapiens mRNA for ribosomal protein S15a
Length = 450

Plus Strand HSPs:

Score = 571 (91.7 bits), Expect = 4.7e-19, P = 4.7e-19
Identities = 121/127 (95%), Positives = 121/127 (95%), Strand = Plus / Plus

Query: 3 CTACAANGGTCAGCTGGCATCAAGAGACCATGAAGAAGCAAGACGAAAACACACAGGAG 62
|| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct: 310 CTGACAACC-TCAGCTGGCATCATG-GACCATGAAGAAGCAAGACGAAAACACACAGGAG 367

Query: 63 GGAAAATCCTGGGATTCTTTTCTAGGGATGTAATACATATATTTACAAATAAAATGCCT 122
||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct: 368 GGAAAATCCTGGGATTCTTTTCTAGGGATGTAATACATATATTTACAAATAAAATGCCT 427

Query: 123 CATGGAC 129
|||||
Sbjct: 428 CATGGAC 434

Anexo XII

17. Proteína Ribosomal L31

SECUENCIA

TTCTTNTTACNGGACTTCAAAAATCTATGNGACAGTCAATGTGGATGAGAACTAATCGC
TGATCGTCAGATCAAATAAAGTTATAAAATTGCAAAAAAAAAAAAAA

BLAST

EM_HUM:HSL31 X69181 H.sapiens mRNA for ribosomal protein L31 355 3.0e-09 1

ALINEAMIENTO

>EM_HUM:HSL31 X69181 H.sapiens mRNA for ribosomal protein L31
Length = 403

Plus Strand HSPs:

Score = 355 (59.3 bits), Expect = 3.0e-09, P = 3.0e-09
Identities = 81/89 (91%), Positives = 81/89 (91%), Strand = Plus / Plus

```
Query:        6 TTTACNGGACTT-CAAAAATCTATGNGACAGTCAATGTGGATGAGAACTAATCGCTGAT 64
               | |||||  ||||  ||||||||| | ||||||||| ||||| ||||| ||||| |||
Sbjct:       318 TGTTACC--ACTTTCAAAAATCTAC-AGACAGTCAATGTGGATGAGAACTAATCGCTGAT 374

Query:        65 CGTCAGATCAAATAAAGTTATAAAATTGC 93
               ||||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct:       375 CGTCAGATCAAATAAAGTTATAAAATTGC 403
```

18. NPI-4

SECUENCIA

CTTTNAGGNCCCCACTGTAAANAGAACTTCATTGCTGCACCTTGAATTACAAGA
AAAGTTGCGTTTAAATTCATATTTTAGGCTTACCAAGAGAATTAGCAAAAGCTTTGATA
ATTGATTCTGCTATTAGTTGACAAAAAAAAAAAAA

19. Proteína Gástrica no caracterizada ZAP31 (NPI-5)**SECUENCIA**

AGAACTAATTTTGTGGATTACTTCAAATTGAAGGAACCTTTTAGGTTTGTGAAAT
 AGTAAAAGAAATTCGATTAGTAATCAATCAAAGAATAATGAATTGACAAATCTGACAT
 AAAACAGCCAAAGAATATCATTTAGAACAATAAGAGCGCTTAAAAAACTTCAAATTA
 ACAATATAATTTATAATTTATTGCACTATGAAAAAAAAAAAA

BLAST

EM_HUM:AF222023 AF222023 Homo sapiens uncharacterized gas... 1041 2.3e-40 1

ALINEAMIENTO

>EM_HUM:AF222023 AF222023 Homo sapiens uncharacterized gastric protein ZA31P
 mRNA, partial cds.
 Length = 549

Plus Strand HSPs:

Score = 1041 (162.2 bits), Expect = 2.3e-40, P = 2.3e-40
 Identities = 211/213 (99%), Positives = 211/213 (99%), Strand = Plus / Plus

Query: 1 AGAACTAATTTTGTGGATTACTTCAAATTGAAGGAACCTTTTAGGTTTGTGAAAT 60
 |||
 Sbjct: 325 AGAACTAATTTTGTGGATTACTTCAAATTGAAGGAACCTTTTAGGTTTGTGAAAT 384

Query: 61 AGTAAAAGAAATTCGATTAGTAATCAATCAAAGAATAATGAATTGACAAATCTGACAT 120
 |||
 Sbjct: 385 AGTAAAAGAAATTCGATTAGTAATCAATCAAAGAATAATGAATTGACAAATCTGACAT 444

Query: 121 AAAACAGCCAAAGAATATCATTTAGAACAATAAGAGCGCTTAAAAAA-CTTCAAATT 179
 |||
 Sbjct: 445 AAAACAGCCAAAGAATATCATTTAGAACAATAAGATCGCTTAAAAAACTTCAAATT 504

Query: 180 AACAAATATAATTTATAATTTATTGCACTATGA 212
 |||
 Sbjct: 505 AACAAATATAATTTATAATTTATTGCACTATGA 537

21. Proteina Ribosomal S19

SECUENCIA

```

CTTCANGNCGGGCAGCTGGGGTTGGCTCCATGACGAACTATCTATGGGGGACGTCAGACT
AAACGGCGTCATGCCAGCCACTTCAACCGATGCTCCATTAGTGTGGTCCGCCGGGTCTCT
CCAAGCCCTGGAGGGGCTTAAAATGGTGGAAAAGGATCATGATGGTGGACGCAAACTGAC
ACCTCAGGGACAGAGAAATCTGGACATGAATCGCCGGACACAGTGGCATCTGCCAATAAC
GAACGCATTATAACAGACCATGCTGGGTAAAACATTGCCTCATTCTACTCTGAAAAA
AAAAAAAA
  
```

BLAST

```

EM_HUM:BC000023 BC000023 Homo sapiens, ribosomal protein ... 1087 1.8e-42 1
EM_HUM:BC007615 BC007615 Homo sapiens, ribosomal protein ... 1087 2.0e-42 1
EM_HUM:HSS19RP M81757 H.sapiens S19 ribosomal protein mRN... 1087 2.1e-42 1
  
```

ALINEAMIENTO

```

>EM_HUM:BC000023 BC000023 Homo sapiens, ribosomal protein S19, clone MGC:1630,
      mRNA, complete cds.
      Length = 578
  
```

Plus Strand HSPs:

```

Score = 1087 (169.1 bits), Expect = 1.8e-42, P = 1.8e-42
Identities = 247/275 (89%), Positives = 247/275 (89%), Strand = Plus / Plus
  
```

```

Query:  15  GCTGGGGTTGGCTCCATGACGAACTATCTATGGGGGACGTCAGACTAAACGGCGTCATGC 74
      |
Sbjct:  286 GCTGGGGTTGGCTCCATGACCAAG-ATCTATGGGGGACGTCAGAG-AAACGGCGTCATGC 343

Query:  75  CCAGCCACTTCAACCGATGCTCCATTAGTGTGGTCCGCCGGTCCCTCCAAGCCCTGGAGG 134
      |
Sbjct:  344 CCAGCCACTTCAGCCGAGGCTCCAAGAGTGTGGCCCGCCGGTCCCTCCAAGCCCTGGAGG 403

Query:  135 GGCTTAAAATGGTGGAAAAGGATCATGATGGTGGACGCAAACTGACACCTCAGGGACAGA 194
      |
Sbjct:  404 GGCTGAAAATGGTGGAAAAGGACCAAGATGGCGGCCGCAAACTGACACCTCAGGGACAAA 463

Query:  195 GAAATCTGGACATGAATCGCCGGACACAGTGGCATCTGCCAATAACGAACGCATTATAAC 254
      |
Sbjct:  464 GAGATCTGGACA-GAATCGCCGGACAG-GTGGCAGCTGCCAACA-GAA-GCATTAGAAC 519

Query:  255 AGACCATGCTGGGTAAAACATTGCCTCATTTCGTA 289
      |
Sbjct:  520 AAACCATGCTGGGTAAATAAATTGCCTCATTTCGTA 554
  
```

Anexo XVI

22. Receptor de Laminina de 37/67 KD

SECUENCIA

CTNGGTGCCGCTGTGCCTATTTCAGCAATTCCTACTGAAGACTGGAGCGCTCAGCCTGC
CACGGAAGACTGGTCTGCAGCTCCCCTGCTCAGGCCACTGAATGGGTAGGAGCAACCAC
TGACTGGTCTTAAGCTGTTCTTGCATAGGCTCTTAAGCAGCATGGAAAAATGGTTGATGG
AAAATAAACATCAGTTTCTAAAAAAAAAAAAA

BLAST

EM_HUM:BC005391	BC005391 Homo sapiens, laminin receptor ...	967	2.6e-37	1
EM_PAT:I02029	I02029 Nucleotide sequence 1 from patent...	967	3.3e-37	1
EM_HUM:BC002533	BC002533 Homo sapiens, laminin receptor ...	967	4.3e-37	1
EM_HUM:HSLBP	X15005 Human mRNA for potential laminin-...	962	4.5e-37	1
EM_HUM:HSLAMB	J03799 Human colin carcinoma laminin-bin...	962	4.7e-37	1
EM_HUM:HSLAMR	M14199 Human laminin receptor (2H5 epito...	967	5.8e-37	1
EM_HUM:HS389791	U38979 Human PMS2 related (hPMSR3) gene,...	939	6.7e-36	1

ALINEAMIENTO

>EM_HUM:BC005391 BC005391 Homo sapiens, laminin receptor 1 (67kD, ribosomal protein SA), clone MGC:12521, mRNA, complete cds.
Length = 1065

Plus Strand HSPs:

Score = 967 (151.1 bits), Expect = 2.6e-37, P = 2.6e-37
Identities = 195/197 (98%), Positives = 195/197 (98%), Strand = Plus / Plus

Query: 4 GGTGCCGCTGTGCCTATTTCAGCAATTCCTACTGAAGACTGGAGCGCTCAGCCTGCCAC 63
|||||
Sbjct: 840 GGTGCCCTCTGTGCCTATTTCAGCAATTCCTACTGAAGACTGGAGCGCTCAGCCTGCCAC 899

Query: 64 GGAAGACTGGTCTGCAGCTCCCCTGCTCAGGCCACTGAATGGGTAGGAGCAACCCTGA 123
|||||
Sbjct: 900 GGAAGACTGGTCTGCAGCTCCCCTGCTCAGGCCACTGAATGGGTAGGAGCAACCCTGA 959

Query: 124 CTGGTCTTAAGCTGTTCTTGCATAGGCTCTTAAGCAGCATGGAAAAATGGTTGATGGAAA 183
|||||
Sbjct: 960 CTGGTCTTAAGCTGTTCTTGCATAGGCTCTTAAGCAGCATGGAAAAATGGTTGATGGAAA 1019

Query: 184 ATAAACATCAGTTTCTA 200
|||||
Sbjct: 1020 ATAAACATCAGTTTCTA 1036

23. NPI-6

SECUENCIA

TCTTCAATCNCCCATTGCTAAGTATCTCTGTCTATTATGGAACATTTATTGTATGAAAAA
AAAAAAA

24. Factor eucariótico de de iniciación de la traducción 3 (eIF3), subunidad 4

SECUENCIA

CTCGGTCCGGGACCCTTGGCGACAGAAGACAGCCTCCGAGAGCGCGGGCTCCAAGGGCAAT
AAAGCAGCTCCACTCTCTCTAAAAAAAAAAAAA

BLAST

EM_HUM:AC020931	AC020931	Homo sapiens chromosome 19 clone...	395	2.8e-10	1
EM_HUM:AF094850	AF094850	Homo sapiens eukaryotic translat...	386	3.1e-10	1
EM_HUM:AF092453	AF092453	Homo sapiens eukaryotic translat...	385	7.2e-10	1
EM_HUM:AF020833	AF020833	Homo sapiens eukaryotic translat...	375	9.3e-10	1
EM_HUM:U96074	U96074	Human translation initiation facto...	375	9.5e-10	1
EM_HUM:BC000733	BC000733	Homo sapiens, eukaryotic transla...	375	9.6e-10	1

ALINEAMIENTO

>EM_HUM:AF094850 AF094850 Homo sapiens eukaryotic translation initiation factor
3 subunit p42/p44 mRNA, complete cds.
Length = 1174

Plus Strand HSPs:

Score = 386 (64.0 bits), Expect = 3.1e-10, P = 3.1e-10
Identities = 80/82 (97%), Positives = 80/82 (97%), Strand = Plus / Plus

Query: 1 CTCGGTC-GGGACCCTTGGCGACAGAAGACAGCCTCCGAGAGCGCGGGCTCCAAGGGCAA 59
||||| |
Sbjct: 1023 CTCGGTCCGGGACCCTTGGCGACAGAAGACAGCCTCCGAGAGCGCGGGCTCCAAGGGCAA 1082

Query: 60 TAAAGCAGCTCCACTCTCTCTA 81
||||| |
Sbjct: 1083 TAAAGCAGCTCCACTCTCTCCA 1104

25. ATPasa Vacuolar, subunidad 1

SECUENCIA

```
CAGGGTTATCCTGTNGCGTTC AAGAAGGANTANNANACATGTGGGCTGGGTACATCTCCG
GCTGTCAGGCATGTTCTCACC GGGGAGTGCCTAGGCAGGAGCATAGGCGTGGTTGGTTGTT
TCCTTCTTACATTTATAAAC CCGTGGTCGCCATGCAAAAAAAAAAAAA
```

BLAST

EM_HUM:HSM801819	AL136851	Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZp43...	427	6.5e-12	1
EM_PAT:AX086813	AX086813	Sequence 765 from Patent WO0112659.	427	6.5e-12	1
EM_HUM:HSFLNG6PD	L44140	Homo sapiens chromosome X region ...	422	1.7e-11	1
EM_HUM:HSXQC	D16469	Human mRNA for ORF, Xq terminal portion.	417	2.1e-11	1
EM_HUM:AK026519	AK026519	Homo sapiens cDNA: FLJ22866 fis,...	407	4.8e-11	1
EM_HUM:BC000724	BC000724	Homo sapiens, Similar to ATPase,...	407	5.4e-11	1

ALINEAMIENTO

>EM_HUM:HSM801819 AL136851 Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZp434B0535 (from clone DKFZp434B0535); complete cds
Length = 2043

Plus Strand HSPs:

Score = 427 (70.1 bits), Expect = 6.5e-12, P = 6.5e-12
Identities = 125/162 (77%), Positives = 125/162 (77%), Strand = Plus / Plus

```
Query:      1 CAGGGTTATC-CTGTNGCGTTC-AAG-AAGG-ANTANNAN-ACATGTGGGCTGGGTAC-A 54
      ||| | | | || | | | | || | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
Sbjct:    1876 CGGGTTTATTTCTGTGGCCTGAGAAGGAAGGGACCTCCACGACAGGTGGGCTGGGTGCGA 1935

Query:      55 TCTCCGGCTGTCAGGCATGTTCTCACC GGGGAGTGCCTAGGCAGGAGCATAGGCGTGGTTG 114
      || | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
Sbjct:    1936 TCGCCGGCTGTTTGGCATGTTCCCACCGGAGTGCCG-GGCAGGAGCATGGG-GTGCTTG 1993

Query:     115 GTTGTTTCTTCTTACATTTA-TAAACCCTGGTCGCCATGCA 155
      || | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
Sbjct:    1994 GTTGTTTCTTCTTA-TAAAATAAACGCGGGTCGCCATGCA 2034
```

26. NPI-7

SECUENCIA

```
NNCCAAAGCTATTTTTTGGGAGTACAAGGAATTGATAAACCGTGAGTTGGTGAATTAGC
TGACATCTTAGACAAAAAAAAAAAA
```

27. Spermidina Sintetasa

SECUENCIA

ANGATTACGCTTTTTTATGCGGCCGTCTTCTGTGTCTCTCACTACCACACACGTGTAT
TTATAGCAAAAAAAAAAAAAA

BLAST

EM_HUM:BC000309 BC000309 Homo sapiens, spermidine synthas...	185	0.48	1
EM_HUM:HSSPERSYN M64231 Human spermidine synthase gene, c...	185	0.57	1

ALINEAMIENTO

>EM_HUM:BC000309 BC000309 Homo sapiens, spermidine synthase, clone MGC:8422,
mRNA, complete cds.
Length = 1268

Plus Strand HSPs:

Score = 185 (33.8 bits), Expect = 0.65, P = 0.48
Identities = 41/46 (89%), Positives = 41/46 (89%), Strand = Plus / Plus

Query: 23 CCGTCTTCTGTTGTCTCTCACTACCACACACGTGTATTTATAGCA 68
| | ||| |||| ||| | ||| ||||| ||| ||| ||||| |||||
Sbjct: 1204 CTGCCTTCTGTTGCCCTCACTACCAAACACGTGTATTTATAGCA 1249

28. NPI-8

SECUENCIA

CACCATTTCTAAGCGTATCGTATAAATCTTGANNNCATGGAAGATTTAAGTATGAAAGAA
AGAAAACACATAAAGTTGAAAAAGAAAAACAATCTTTCACAAACAATATAGAAATTCGTT
TATCTATTGGAATCAATTTAAATGATATAAAAATCAAAGCAAAAAAAAAAAAAA

29. Proteína Heat shock hsp89-alfa

SECUENCIA

```
GNNTGNNNNNNNNNNNCTCATTNNNNNNNNCGGAGCACATGCTTGGCACACCATCCAC
GAATGCACACGACATGTATCCCCTGTGTCCATCTGTTACATGTGTTCTCTTAGTGCCAC
GTGTTTATGGTGTATTTCATGGAATACCTTCTGTGCTAAATACAGTCACTTAATTCCTTG
GCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
```

BLAST

EM_HUM:HSHP89KD M27024 Homo sapiens heat shock protein (588 4.7e-19 1

ALINEAMIENTO

>EM_HUM:HSHP89KD M27024 Homo sapiens heat shock protein (HSP89-alpha) gene,
complete cds.
Length = 7393

Plus Strand HSPs:

Score = 588 (94.3 bits), Expect = 4.7e-19, P = 4.7e-19
Identities = 134/150 (89%), Positives = 134/150 (89%), Strand = Plus / Plus

```
Query: 34 GGAGCACATGCTTGGCACACCATCCAGAAATGCACACGACATGTATCCCCTGTGTCCATC 93
      ||| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
Sbjct: 6437 GGAGCACATG-TAGGCACAGAAAACAGGAATGCAGACAACATGCATCCCCTGCGTCCATG 6495

Query: 94 TGTTACATGTGTTCTCTTAGTGTCACGT-GTTTATGGTGTATTTCATGGAATACCTTCT 152
      ||| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
Sbjct: 6496 AGTTACATGTGTTCTCTTAGTGTCACGTGTTT-TGATGTTATTTCATGGAATACCTTCT 6554

Query: 153 GTGCTAAATACAGTCACTTAATTCCTGGC 182
      ||| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
Sbjct: 6555 GTGCTAAATACAGTCACTTAATTCCTGGC 6584
```

30. Proteína cinetocórica CENP-F (Mitosina)

SECUENCIA

TCTTTTANGCGGNCATGTGTAGGTATGGAAAAAGTTTGGGAAGCACTGATCACCTGTTAGC
 ATTGCCATTCCTCTACTGCAATGTAAATAGTATAAAGCTATGTATATAAAGCTTTTGGT
 AATATGTTACAATTAATGACAAGCACTATATCACAACAAAAAAAAAAAA

BLAST

EM_HUM:HS308721 U30872 Human mitosin mRNA, complete cds. 717 7.2e-25 1
 EM_HUM:HS197691 U19769 Human CENP-F kinetochore protein m... 697 5.7e-24 1

ALINEAMIENTO

>EM_HUM:HS308721 U30872 Human mitosin mRNA, complete cds.
 Length = 10,211

Plus Strand HSPs:

Score = 717 (113.6 bits), Expect = 7.2e-25, P = 7.2e-25
 Identities = 149/157 (94%), Positives = 149/157 (94%), Strand = Plus / Plus

Query: 1 TCTTTTANGCGGNCATGTGTAGGTATGGAAAAAGTTTGGGAAGCACTGATCACCTGTTAGC 60
 ||||| | |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
 Sbjct: 9555 TCTTTAGATCTCCCATGTGTAGGTATTGAAAAAGTTTGGGAAGCACTGATCACCTGTTAGC 9614
 Query: 61 ATTGCCATTCCTCTACTGCAATGTAAATAGTATAAAGCTATGTATATAAAGCTTTTGGT 120
 |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
 Sbjct: 9615 ATTGCCATTCCTCTACTGCAATGTAAATAGTATAAAGCTATGTATATAAAGCTTTTGGT 9674
 Query: 121 AATATGTTACAATTAATGACAAGCACTATATCACA 157
 |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
 Sbjct: 9675 AATATGTTACAATTAATGACAAGCACTATATCACA 9711

31. NPI-9

SECUENCIA

CCAGGTTTGTGCAGCCAGAGCTCAGGATAAAAATTTAGAAATTTGTGATGCTAAAAGTATT
 ATTGCAAATTATGATAAAAATCAAATACAGAGAAATTGTAGATGATTGTATCGATACA
 ATAGCAAGAACAATTGCTACAACAATTGGTATGTTAAATCCAATTTAATTGTTTTGGT
 GGTCTGTAGCAGAATATAATTATTGAATCATTGAAAAAGCAATTAATAAAGCAAACTC
 TGAACCAATCAAGATCAATGAACTGTGTAGAGTTCAAAAAGATGTTTTGGTGATGAT
 CTCGCTTTATTTGGTTTTGTATTATTAAATGTGGAAAAACTAAAAAAAAAAAA

32. Proteína Ribosomal S2 (LLRep3)

SECUENCIA

CACTTNTANGGCCACCANNGGCACTGTGCATCGTCTCCCCACCTGTGCCTAAGAACTGC
 TCATAATGGCTGGTATCGATGACTGCTACACCTCACCCCGGGGCTGCACTGCCACCCTGG
 GCAACTTCGCCAAGGGGACCTTTGATGCCATTTCTAAGACCTACAGCTACCTGACCCCGG
 ACCTCTGGAAGGAGACTGTGTTACCAAGTCTCCCTATCAGGAGTTCCTGACCACCTCG
 CCAAGACCCACACCAGAGTCTCCGTGCAGCGGACTCAGGCTCCAGCTGTGGCTACAACAT
 AGGGTTTTTATACAAGAAAAATAAAGTGAATTATGCGTGAAAAAAAAAAAAA

BLAST

EM_HUM:BC001795 BC001795 Homo sapiens, Similar to ribosom... 1522 2.4e-62 1
 EM_HUM:BC004520 BC004520 Homo sapiens, clone IMAGE:393897... 1522 6.6e-62 1
 EM_HUM:HSLREP3 X17206 Human mRNA for LLRep3 1481 1.8e-60 1

ALINEAMIENTO

>EM_HUM:BC001795 BC001795 Homo sapiens, Similar to ribosomal protein S2, clone
 MGC:3141, mRNA, complete cds.
 Length = 978

Plus Strand HSPs:

Score = 1522 (234.4 bits), Expect = 2.4e-62, P = 2.4e-62
 Identities = 316/330 (95%), Positives = 316/330 (95%), Strand = Plus / Plus

Query: 11 GCCACCANNGGCACTGTGCATCGTCTCCCCACCTGTGCCTAAGAACTGCTCATAATGGC 70
 || ||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
 Sbjct: 603 GCACCCAGGGGCACTG-GCATCGTCTCCGCACCTGTGCCTAAGAAGCTGCTCATGATGGC 661

Query: 71 TGGTATCGATGACTGCTACACCTCACCCCGGGGCTGCACTGCCACCCTGGGCAACTTCGC 130
 ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
 Sbjct: 662 TGGTATCGATGACTGCTACACCTCAGCCCGGGGCTGCACTGCCACCCTGGGCAACTTCGC 721

Query: 131 CAAGGGGACCTTTGATGCCATTTCTAAGACCTACAGCTACCTGACCCCGACCTCTGGAA 190
 ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
 Sbjct: 722 CAAGGCCACCTTTGATGCCATTTCTAAGACCTACAGCTACCTGACCCCGACCTCTGGAA 781

Query: 191 GGAGACTGTGTTACCAAGTCTCCCTATCAGGAGTTCCTGACCACCTCGCCAAGACCCA 250
 ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
 Sbjct: 782 GGAGACTGTATTACCAAGTCTCCCTATCAGGAGTTCCTGACCACCTCGTCAAGACCCA 841

Query: 251 CACCAGAGTCTCCGTGCAGCGGACTCAGGCTCCAGCTGTGGCTACAACATAGGGTTTTTA 310
 ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
 Sbjct: 842 CACCAGAGTCTCCGTGCAGCGGACTCAGGCTCCAGCTGTGGCTACAACATAGGGTTTTTA 901

Query: 311 TACAAGAAAAATAAAGTGAATTATGCGTGA 340
 ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
 Sbjct: 902 TACAAGAAAAATAAAGTGAATTAAGCGTGA 931

33. Secuencia Genómica AL390878 del cromosoma 13 (NPI-10)

SECUENCIA

CACACATCACGGAGTACTTTATAAATTAATCTTTATTATTTAAAATAGATACAAAAACA
AAACAAACAAAAA

BLAST

AL390878.6.1.209794 178 0.83 1

ALINEAMIENTO

>AL390878.6.1.209794
Length = 209,794

Plus Strand HSPs:

Score = 178 (26.7 bits), Expect = 1.8, P = 0.83
Identities = 46/55 (83%), Positives = 46/55 (83%), Strand = Plus / Plus

Query: 15 TACTT-TATAAATTAATCTTTATTATTTAAAATAGATA-CAAAAAACAAAACA 69
||||| ||||||||| ||| ||||||||| | ||| ||||| ||||||||| |
Sbjct: 96068 TACTTGTATAATTACTCTCAATTATTTAAAAACATAGCAAAA--CAAAACAAAA 96122

34. Proteína gástrica no caracterizada YA61 (NPI-11)

SECUENCIA

GGGGCAGCAAAGCTATTGGTTTAGTTGTCCTTCATTAAGTGGAAAATTAGACGGAATTG
 CTATTAGAGTTCAGTTATTACAGGGTCATTTGTTGACTTATCTGTTGAATTAATCAA
 ATCCAAGCGTTGAAGAAGTTAATGCCGAAATGAAAAGAGTTCAAATGAATCATTCCAAT
 ACAACGAAGATCAAGTTGTTTCTTCAGATATTGTTAACAATACACATGGTTCCATTTTGG
 ATGCAACATTAAGTAAATTTATAGATGTAAATGGAAAAGATTATACAACTCTATGCTT
 GATATGACAATGAATCTTCACTTGTGCTCAATATGTAAGAAGTTGCTTTACACTTTGCA
 AAAAAAAAAAAAA

BLAST

EM_HUM:AF220415 AF220415 Homo sapiens gastric-associated ... 1816 2.3e-75 1

ALINEAMIENTO

>EM_HUM:AF220415 AF220415 Homo sapiens gastric-associated
 differentially-expressed protein YA61P (YA61) mRNA, complete cds.
 Length = 530

Plus Strand HSPs:

Score = 1816 (278.5 bits), Expect = 2.3e-75, P = 2.3e-75
 Identities = 368/371 (99%), Positives = 368/371 (99%), Strand = Plus / Plus

Query: 1 GGGGCAGCAAAGCTATTGGTTTAGTTGT-CCTTCATTAAGTGGAAAATTAGACGGAATT 59
 |||
 Sbjct: 161 GGGGCAGCAAAGCTATTGGTTTAGTTGTTCTTCATTAAGTGGAAAATTAGACGGAATT 220

Query: 60 GCTATTAGAGTTCAGTTATTACAGGGTCATTTGTTGACTTATCTGTTGAATTAATCAA 119
 |||
 Sbjct: 221 GCTATTAGAGTTCAGTTATTACAGGGTCATTTGTTGACTTATCTGTTGAATTAATCAA 280

Query: 120 AATCCAAGCGTTGAAGAAGTTAATGCCGAAATGAAAAGAGTTCAAATGAATCATTCCA 179
 |||
 Sbjct: 281 AATCCAAGCGTTGAAGAAGTTAATGCCGAAATGAAAAGAGTTCAAATGAATCATTCCA 340

Query: 180 TACAACGAAGATCAAGTTGTTTCTTCAGATATTGTTAACAATACACATGGTTCCATTTT 239
 |||
 Sbjct: 341 TACAACGAAGATCAAGTTGTTTCTTCAGATATTGTTAACAATACACATGGTTCCATTTT 400

Query: 240 GATGCAACATTAAGTAAATTTATAGATGTAAATGGAAAAGATTATACAACTCTATGCT 299
 |||
 Sbjct: 401 GATGCAACATTAAGTAAATTTATAGATGTAAATGGAAAAGATTATACAACTCTATGCT 460

Query: 300 TGATATGACAATGAATCTTCACTTGTGCTCAATATGTAAGAAGTTGCTTTACACTTTGC 359
 |||
 Sbjct: 461 TGATATGACAATGAATCTTCACTTGTGCTCAATATGTAAGA-GTTGCTTTACACTTTGC 519

Query: 360 AAAAAAAAAA 370
 |||
 Sbjct: 520 AAAAAAAAAA 530

35. Ubiquitin-like 5**SECUENCIA**

```
CCACGTTTTTTAGNCCCACGTGTCTCTGTGGGGACTATGACCATCCACGATGGGATGAAC
CTGGAGCTTTATTATCAATAGATGAGAATCCTCATCTTCTGCCCCGCTTCTCTCCCA
TCCTCATCCCCACACTGGGATAGATGCTTGTGTTGTAAAAACTCACCTTAATAAAGACTT
AGATGTTGCAAAAAAAAAAAAA
```

BLAST

```
EM_HUM:AF313915 AF313915 Homo sapiens ubiquitin-like 5 pr... 922 7.2e-35 1
EM_HUM:BC007053 BC007053 Homo sapiens, ubiquitin-like 5, ... 913 1.4e-34 1
```

ALINEAMIENTO

```
>EM_HUM:AF313915 AF313915 Homo sapiens ubiquitin-like 5 protein (UBL5) mRNA,
complete cds.
Length = 413
```

Plus Strand HSPs:

Score = 862 (135.4 bits), Expect = 3.7e-32, P = 3.7e-32
Identities = 182/190 (95%), Positives = 182/190 (95%), Strand = Plus / Plus

```
Query:      2 CACGTTTTTTA-GNCCCACGTGTCTCTGTGGGGACTATGACCATCCACGATGGGATGAAC 60
            ||||| ||||| | ||||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct:    209 CACGATTTTAAAGACCACGTGTCTCTG-GGGACTATGAA-ATCCACGATGGGATGAAC 266

Query:     61 CTGGAGCTTTATTATCAATAGATGAGAATCCTCATCTTCTGCCCCGCTTCTCTCCCA 120
            ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| |||||||
Sbjct:    267 CTGGAGCTTTATTATCAATAGATGAGAATCCTCATCTTCTGCCCCGCTTCTCTCCCA 326

Query:    121 TCCTCATCCCCACACTGGGATAGATGCTTGTGTTGTAAAAACTCACCTTAATAAAGACTT 180
            ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| |||||||
Sbjct:    327 TCCTCATCCCCACACTGGGATAGATGCTTGTGTTGTAAAAACTCACCTTAATAAAGACTT 386

Query:    181 AGATGTTGCA 190
            ||||| |
Sbjct:    387 AGATGTTGAA 396
```

36. NPI-12

SECUENCIA

GNNNNNNNTGNNNNNNNNNCACAATGACAGTTGCTAAAAATCTTGGTTTATGGAAAATTT
AAGTATGAAAGAAAGAAAAACAAAAAGTTGAAAAGAAAAACAATCTTTCACAAACAAT
AGAGAAATTCGTTTATCTTTTGAATCAATTTAAATGATATAAAAAATCAAAGCAAAAAA
GCCAAAGAATTTTATTAGATAACGACAGAGTAAAAGTGGCTCTTCGTCTTAGAGGGCGT
GAAAATACAAGACCTGAACAAGGTAAATTAATTTAAATCTTTTTTGGATGAAGTAAAA
TCGATTGCAAAATTAAGTAAAGAAATGCAATCAGTTGGTAATTTTTTAACTCTTCATATT
GAACGTGATAAGAAAAATTACCCAAATTTACTTCTTCAAAACAAATAAAGGAATTAATT
GATTTTAAAAAATAAAAGGAAGAAGAACTAATGCCTAAAGCAAAACAAAATCAGC
ACTTAAAAAAGAATTAAGTAACTGCTTCTGGAAAAATCAAACACAAACATGCATATCG
TTCTCATTAGCACAAAATAAATCTACAAAAA

37. Proteína Zinc-Finger FLJ12298

SECUENCIA

ACGCCTTATCCGACACCAAAGAATTCATCAAATAAAGTGTGTCGGCTGGGCGTGGTGG
 CTCACGCCTATAATCCCAGCACTTTGGGAGGCCAAGGCAGGCAGATCATTGAGATCAGG
 AGTTTGAAACCAGCCTGGCCAACATGGTAAATCCTGTCTCTACTAAAAATACAAAAATG
 AGCCGGGCATGGTGGTGCATGCCTGTAAGCCAGCTATTTCGGGAGGCTGAGGTAGGAGAA
 TCACTTGAACCCAGGAGCGGAAGTTGCAGTGAGCTGAGATCATGTCACTGCACTCCAGC
 CTGGGCAACAGAGCGAGACTCCATCTCAAAAAAGAATAAAGTGTGTCATTTGAAAAA
 AAAAAAAA

BLAST

EM_HUM:AK022360 AK022360 Homo sapiens cDNA FLJ12298 fis, ... 1734 2.9e-72 1

ALINEAMIENTO

>EM_HUM:AK022360 AK022360 Homo sapiens cDNA FLJ12298 fis, clone MAMMA1001837,
 weakly similar to ZINC FINGER PROTEIN 29.
 Length = 2180

Plus Strand HSPs:

Score = 1734 (266.2 bits), Expect = 2.9e-72, P = 2.9e-72
 Identities = 352/357 (98%), Positives = 352/357 (98%), Strand = Plus / Plus

Query: 1 ACGCCTTATCCGACACCAAAGAATTCATCAAATAAAGTGTGTCGGCTGGGCGTGGTGG 60
 |||
 Sbjct: 1818 ACACCTTATCCGACACCAAAGAATTCATCAAATAAAGTGTGTCGGCTGGGCGTGGTGG 1877

Query: 61 CTCACGCCTATAATCCCAGCACTTTGGGAGGCCAAGGCAGGCAGATCATTGAGATCAGG 120
 |||
 Sbjct: 1878 CTCACGCCTATAATCCCAGCACTTTGGGAGGCCAAGGCAGGCAGATCATTGAGATCAGG 1937

Query: 121 AGTTTGAAACCAGCCTGGCCAACATGGTAAATCCTGTCTCTACTAAAAATACAAAAATG 180
 |||
 Sbjct: 1938 AGTTTGAAACCAGCCTGGCCAACATGGTAAATCCTGTCTCTACTAAAAATACAAAAATG 1997

Query: 181 AGCCGGGCATGGTGGTGCATGCCTGTAAGCCAGCTATTTCGGGAGGCTGAGGTAGGAGAA 240
 |||
 Sbjct: 1998 AGCCGGGCATGGTGGTGCATGCCTGTAAGCCAGCTATTTCGGGAGGCTGAGGTAGGAGAA 2057

Query: 241 TCACTTGAACCCAGGAGCGGAAGTTGCAGTGAGCTGAGATCATGTCACTGCACTCCAGC 300
 |||
 Sbjct: 2058 TCACTTGAACCCAGGAGCGGAAGTTGCAGTGAGCTGAGATCATGCCACTGCACTCCAGC 2117

Query: 301 CTGGGCAACAGAGCGAGACTCCATCTCAAAAAA-GAAATAAAGTGTGTCATTTTGA 356
 |||
 Sbjct: 2118 CTGGGCAACAGAGCGAGACTCCATCTCAAAAAAAGAATAAAGTGTGTCATTTTGA 2174

38. Receptor de Opiodes mu 1 OPRM1 (NPI-13)

SECUENCIA

TCCTCTCAACACTGCCATGTTACCCGCACTGCGCTGTAACATCTAACACACCATTTAGAA
ATCGCTTGGTTCTGGTTTGTGCGCCAGACTTAGGAGAGATATATCTCACTGTAGAACCAGT
GCCTATCATGTGCTTGGCAAAAAAAAAAAAA

BLAST

EM_HUM:AL136444 AL136444 Human DNA sequence from clone RP... 696 7.1e-24 1

ALINEAMIENTO

>EM_HUM:AL136444 AL136444 Human DNA sequence from clone RP3-366F13 on
chromosome 6 Contains ESTs, STSs, GSSs and a CpG island. Contains
the OPRM1 gene encoding opioid receptor mu 1.
Length = 96,310

Minus Strand HSPs:

Score = 686 (109.0 bits), Expect = 2.0e-23, P = 2.0e-23
Identities = 138/139 (99%), Positives = 138/139 (99%), Strand = Minus / Plus

Query: 139 TGCCAAGCACATGATAGGCACTGGTTCTACAGTGAGATATATCTCTCCTAAGTCTGGCGA 80
|||||
Sbjct: 41517 TGCCAAGCACATGATAGGCACTGGTTCTACAGTGAGATATATCTCTCCTAAGTCTGGTGA 41576

Query: 79 CAAACCAGAACCAAGCGATTCTAAATGGTGTGTTAGATGTTACAGCGCAGTGCCGGTAA 20
|||||
Sbjct: 41577 CAAACCAGAACCAAGCGATTCTAAATGGTGTGTTAGATGTTACAGCGCAGTGCCGGTAA 41636

Query: 19 CATGGCAGTCTTGAGAGGA 1
|||||
Sbjct: 41637 CATGGCAGTCTTGAGAGGA 41655

39. mRNA HT036

SECUENCIA

```
TTCCTGGACACGCCCCAGCAGGCGGCAGCCATCTTACAGAAGGTAGGAAGACCCAACCTC
CAATTACAAATGGACATATCCACTGGCAGATCATGGATGGGAACCTGACAGGAAACATC
CGGGAGTTCCTGCCATTGTTGGGCATGTGCAGGTGGCACAGGTCCCAGGCCGAGGGGAG
CCCAGCAGCCCCGGAGAGCTGAATTTCCCTATCTGTTTCAACTGCTGGAAGATGAAGGC
TACAAAGGCTTCGTGGGCTGAGACACAGTAGAGGGCTTGAGTTGGCTACGTTTCATACTGG
GATAGGCGGGGCCACCCAGAGGCTGGCCAGTGGGGCCCGCACACCACCCACGTGCCTCC
AGACAGCGAGTGACATCCCATCTCCTCCTCTGCATTAAGATGACCGGCTGAAAAAAAAA
AAAA
```

BLAST

```
EM_HUM:AF284751 AF284751 Homo sapiens HT036 (HT036) mRNA,... 2051 3.1e-86 1
EM_HUM:AF284750 AF284750 Homo sapiens HT036-ISO (HT036-IS... 1306 1.0e-84 2
```

ALINEAMIENTO

```
>EM_HUM:AF284751 AF284751 Homo sapiens HT036 (HT036) mRNA, complete cds.
Length = 981
```

Plus Strand HSPs:

```
Score = 2051 (313.8 bits), Expect = 3.1e-86, P = 3.1e-86
Identities = 411/412 (99%), Positives = 411/412 (99%), Strand = Plus / Plus
```

```
Query:      1 TTCCTGGACACGCCCCAGCAGGCGGCAGCCATCTTACAGAAGGTAGGAAGACCCAACCTC 60
  |||
Sbjct:     555 TTCCTGGACACGCCCCAGCAGGCGGCAGCCATCTTACAGAAGGTAGGAAGACCCAACCTC 614

Query:      61 CAATTACAAATGGACATATCCACTGGCAGATCATGGATGGGAACCTGACAGGAAACATC 120
  |||
Sbjct:     615 CAATTACAAATGGACATATCCACTGGCAGATCATGGATGGGAACCTGACAGGAAACATC 674

Query:     121 CGGGAGTTCCTGCCATTGTTGGGCATGTGCAGGTGGCACAGGTCCCAGGCCGAGGGGAG 180
  |||
Sbjct:     675 CGGGAGTTCCTGCCATTGTTGGGCATGTGCAGGTGGCACAGGTCCCAGGCCGAGGGGAG 734

Query:     181 CCCAGCAGCCCCGGAGAGCTGAATTTCCCTATCTGTTTCAACTGCTGGAAGATGAAGGC 240
  |||
Sbjct:     735 CCCAGCAGCCCCGGAGAGCTGAATTTCCCTATCTGTTTCAACTGCTGGAAGATGAAGGC 794

Query:     241 TACAAAGGCTTCGTGGGCTGAGACACAGTAGAGGGCTTGAGTTGGCTACGTTTCATACTGG 300
  |||
Sbjct:     795 TACAAAGGCTTCGTGGGCTGAGACACAGTAGAGGGCTTGAGTTGGCTACGTTTCATACTGG 854

Query:     301 GATAGGCGGGGCCACCCAGAGGCTGGCCAGTGGGGCCCGCACACCACCCACGTGCCTCC 360
  |||
Sbjct:     855 GATAGGCGGGGCCACCCAGAGGCTGGCCAGTGGGGCCCGCACACCACCCACGTGCCTCC 914

Query:     361 AGACAGCGAGTGACATCCCATCTCCTCCTCTGCATTAAGATGACCGGCTGA 412
  |||
Sbjct:     915 AGACAGCGAGTGACATCCCATCTCCTCCTCTGCATTAAGATGACCGGCTGA 966
```

40. Proteína ribosomal L21

SECUENCIA

TGGGTTCAACTAAAGCGCCAGCCTGCTCCACCTAGAGAAGCACACTTTGTGAGAACCAAT
GGGAAGGAGCCTGAGCTGCTGGAACCTATTCCTATGAATTCATGGCATAATAGGTGTTA
AAAAAAAAATAAAGGACCTCTGGGCTACAAAAAAAAAAAAA

BLAST

EM_HUM:BC001603	BC001603	Homo sapiens, Similar to ribosom...	726	3.8e-26	1
EM_HUM:HSL21PROT	X89401	H.sapiens mRNA for large subunit ...	726	3.9e-26	1
EM_HUM:AF086172	AF086172	Homo sapiens full length insert ...	726	4.5e-26	1
EM_HUM:HS257891	U25789	Human ribosomal protein L21 mRNA, ...	722	5.7e-26	1
EM_HUM:HS14967	U14967	Human ribosomal protein L21 mRNA, c...	717	9.8e-26	1
EM_HUM:HSLRP	L38826	Homo sapiens L21 ribosomal protein ge...	712	1.2e-25	1

ALINEAMIENTO

>EM_HUM:BC001603 BC001603 Homo sapiens, Similar to ribosomal protein L21, clone
MGC:2150, mRNA, complete cds.
Length = 564

Plus Strand HSPs:

Score = 726 (115.0 bits), Expect = 3.8e-26, P = 3.8e-26
Identities = 148/150 (98%), Positives = 148/150 (98%), Strand = Plus / Plus

Query: 1 TGGGTTCAACTAAAGCGCCAGCCTGCTCCACCTAGAGAAGCACACTTTGTGAGAACCAAT 60
|||||
Sbjct: 398 TGGGTTCAACTAAAGCGCCAGCCTGCTCCACCCAGAGAAGCACACTTTGTGAGAACCAAT 457

Query: 61 GGG AAGGAGCCTGAGCTGCTGGAACCTATTCCTATGAATTCATGGCATAATAGGTGTTA 120
|||||
Sbjct: 458 GGG AAGGAGCCTGAGCTGCTGGAACCTATTCCTATGAATTCATGGCATAATAGGTGTTA 517

Query: 121 AAAAAAAAA-TAAAGGACCTCTGGGCTACA 149
|||||
Sbjct: 518 AAAAAAAAAATAAAGGACCTCTGGGCTACA 547

41. Ribonucleoproteína hnRNP R**SECUENCIA**

TCTGGCGTGCAACCTGGAATTGGAACGGAGGTATTTGTAGGCAAATACCAATGGATTA
 TATGAGGATGAGTTGGTGCCCTTTTTGAGAAGGCCGGACCCATTTGGGATCTACGTCTT
 ATGATGGATCCACTGTCCGGTCAGAATAGAGGGTATGCATTTATCACCTTCTGTGGAAAG
 GAAGCTGCACAGGAAGCCGTGAAACTGTGTGACAGCTATGAAATTCGCCCTGGTAAACAC
 CTTGGAGTGTGCATTTCTGTGGCAAACAACAGACTTTTTGTTGGATCCATTCCGAAGAAT
 AAGACTAAAGAAAACATTTTGAAGAATTCACTAAAGTCACAGAGGGTTTGGTGGACGTT
 ATTCTCTATCATCAACCCGATGACAAAAAAAAAAAAAAAA

BLAST

EM_HUM:AF000364 AF000364 Homo sapiens heterogeneous nucle... 1948 5.1e-82 1

ALINEAMIENTO

>EM_HUM:AF000364 AF000364 Homo sapiens heterogeneous nuclear ribonucleoprotein
 R mRNA, complete cds.
 Length = 2644

Plus Strand HSPs:

Score = 1916 (293.5 bits), Expect = 1.4e-80, P = 1.4e-80
 Identities = 384/385 (99%), Positives = 384/385 (99%), Strand = Plus / Plus

Query: 1 TCTGGCGTGCAACCTGGAATTGGAACGGAGGTATTTGTAGGCAAATACCAATGGATTA 60
 |||
 Sbjct: 530 TCTGGCGTGCAACCTGGAATTGGAACGGAGGTATTTGTAGGCAAATACCAAGGGATTA 589

Query: 61 TATGAGGATGAGTTGGTGCCCTTTTTGAGAAGGCCGGACCCATTTGGGATCTACGTCTT 120
 |||
 Sbjct: 590 TATGAGGATGAGTTGGTGCCCTTTTTGAGAAGGCCGGACCCATTTGGGATCTACGTCTT 649

Query: 121 ATGATGGATCCACTGTCCGGTCAGAATAGAGGGTATGCATTTATCACCTTCTGTGGAAAG 180
 |||
 Sbjct: 650 ATGATGGATCCACTGTCCGGTCAGAATAGAGGGTATGCATTTATCACCTTCTGTGGAAAG 709

Query: 181 GAAGCTGCACAGGAAGCCGTGAAACTGTGTGACAGCTATGAAATTCGCCCTGGTAAACAC 240
 |||
 Sbjct: 710 GAAGCTGCACAGGAAGCCGTGAAACTGTGTGACAGCTATGAAATTCGCCCTGGTAAACAC 769

Query: 241 CTTGGAGTGTGCATTTCTGTGGCAAACAACAGACTTTTTGTTGGATCCATTCCGAAGAAT 300
 |||
 Sbjct: 770 CTTGGAGTGTGCATTTCTGTGGCAAACAACAGACTTTTTGTTGGATCCATTCCGAAGAAT 829

Query: 301 AAGACTAAAGAAAACATTTTGAAGAATTCAGTAAAGTCACAGAGGGTTTGGTGGACGTT 360
 |||
 Sbjct: 830 AAGACTAAAGAAAACATTTTGAAGAATTCAGTAAAGTCACAGAGGGTTTGGTGGACGTT 889

Query: 361 ATTCTCTATCATCAACCCGATGACA 385
 |||
 Sbjct: 890 ATTCTCTATCATCAACCCGATGACA 914

42. Proteína de unión de Fosfatidil Etanolamina (PBP)

SECUENCIA

ACAATGTGATTTTATGGTGTGACTCACCTAGACAACCAAGAGGCTGGCATTGAGGCTA
ACCCCCAACACAGTGCATCTCAGATGCCTCAGTAGGCATCAGTATGTCACCTCTGGTCCCT
TTAAAGAGCAATCCTGGAAGAAGCAGGAGGGAGGTTGGCTTTGCTGTTGTGGGACATGG
CAATCTAGACCGGTAGCAGCGCTCGCTGACAGCTTGGGAGGAAACCTGAGATCTGTGTTT
TCTAAATGATCGTTCTTCATGGGGTAAGAAAAGCTGGTCTGGAGTTGCTGAATGTTGC
ATTAATGTGCTGTTTGTGTTGTTAGTTGAATAAAAATAGAAACCTGAATGAAAAAAAAA
AA

BLAST

```
EM_HUM:HSHRPBP D16111 Human mRNA for human homologue of r... 1709 5.9e-71 1
EM_HUM:HSPEABP X75252 H.sapiens phosphatidylethanolamine ... 1638 9.4e-68 1
EM_PAT:E05647 E05647 cDNA encoding human hippocampal chol... 1613 1.3e-66 1
```

ALINEAMIENTO

>EM_HUM:HSHRPBP D16111 Human mRNA for human homologue of rat
phosphatidylethanolamine binding protein, complete cds.
Length = 1434

Plus Strand HSPs:

Score = 1709 (262.5 bits), Expect = 5.9e-71, P = 5.9e-71
Identities = 345/349 (98%), Positives = 345/349 (98%), Strand = Plus / Plus

```
Query:      1 ACAATGTGATTTTATGGTGTGACTCACCTAGACAACCAAGAGGCTGGCATTGAGGCTA 60
  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||
Sbjct:    1086 ACAATGTGATTTTATGGTGTGACTCACCTAGACAACCAAGAGGCTGGCATTGAGGCTA 1145

Query:      61 ACCCCCAACACAGTGCATCTCAGATGCCTCAGTAGGCATCAGTATGTCACCTCTGGTCCCT 120
  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||
Sbjct:    1146 ACCTCCAACACAGTGCATCTCAGATGCCTCAGTAGGCATCAGTATGTCACCTCTGGTCCCT 1205

Query:     121 TTAAAGAGCAATCCTGGAAGAAGCAGGAGGGAGGTTGGCTTTGCTGTTGTGGGACATGG 180
  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||
Sbjct:    1206 TTAAAGAGCAATCCTGGAAGAAGCAGGAGGGAGGTTGGCTTTGCTGTTGTGGGACATGG 1265

Query:     181 CAATCTAGACCGGTAGCAGCGCTCGCTGACAGCTTGGGAGGAAACCTGAGATCTGTGTTT 240
  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||
Sbjct:    1266 CAATCTAGACCGGCAGCAGCGCTCGCTGACAGCTTGGGAGGAAACCTGAGATCTGTGTTT 1325

Query:     241 TCTAAATGATCGTTCTTCATGGGGTAAGAAAAGCTGGTCTGGAGTTGCTGAATGTTGC 300
  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||
Sbjct:    1326 TTTAAATGATCGTTCTTCATGGGGTAAGAAAAGCTGGTCTGGAGTTGCTGAATGTTGC 1385

Query:     301 ATTAATGTGCTGTTTGTGTTTGTAGTTGAATAAAAATAGAAACCTGAATG 349
  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||
Sbjct:    1386 ATTAATGTGCTGTTTGTGTTTGTAGTTGAATAAAAATAGAAACCTGAATG 1434
```

43. Citocromo C oxidasa II mitocondrial

SECUENCIA

CTCCCGATTGAAGCCCCCATTCGTATAATAATTACATCACAAGACGTCTTGCACTCATG
 AGCTGTCCCCACATTAGGCTTAAAAACAGATGCAATTCCCGACGTCTAAACCAAACCAC
 TTACTGCTACACGACCGGGGTATACTACGGTCAATGCTCTGAAATCTGTGGAGCAA
 CCACAGTTTCATGCCCATCGTCTAGAATTAATFCCCCTAAAAATCTTTGAAATAGGGCC
 CGTATTACCCTATAGCACCCCTCTACCCCTCTAGAGCAAAAAAAAAA

BLAST

EM_OR:MIHSCDK M25171 Human mitochondrion cytochrome oxida...	1386	3.6e-56	1
EM_OR:MI1302737 AF004339 Homo sapiens cytochrome c oxidas...	1386	5.5e-56	1
EM_OR:MTHSCOXII X55654 H.sapiens mitochondrial coxII mRNA...	1386	5.6e-56	1
EM_OR:HSCOXII X15759 H.sapiens mitochondrial mRNA for cyt...	1381	7.8e-56	1

ALINEAMIENTO

>EM_OR:MIHSCDK M25171 Human mitochondrion cytochrome oxidase subunit II (COII),
 Asp-tRNA and Lys-tRNA genes, complete cds.
 Length = 900

Plus Strand HSPs:

Score = 1386 (214.0 bits), Expect = 3.6e-56, P = 3.6e-56
 Identities = 278/279 (99%), Positives = 278/279 (99%), Strand = Plus / Plus

```

Query:      2 CTCCCGATTGAAGCCCCCATTCGTATAATAATTACATCACAAGACGTCTTGCACTCATGA 61
             |||
Sbjct:     550 CTCCCGATTGAAGCCCCCATTCGTATAATAATTACATCACAAGACGTCTTGCACTCATGA 609

Query:      62 GCTGTCCCCACATTAGGCTTAAAAACAGATGCAATTCCCGACGTCTAAACCAAACCCT 121
             |||
Sbjct:     610 GCTGTCCCCACATTAGGCTTAAAAACAGATGCAATTCCCGACGTCTAAACCAAACCCT 669

Query:     122 TTCACTGCTACACGACCGGGGTATACTACGGTCAATGCTCTGAAATCTGTGGAGCAAAC 181
             |||
Sbjct:     670 TTCACCGCTACACGACCGGGGTATACTACGGTCAATGCTCTGAAATCTGTGGAGCAAAC 729

Query:     182 CACAGTTTCATGCCCATCGTCTAGAATTAATFCCCCTAAAAATCTTTGAAATAGGGCCC 241
             |||
Sbjct:     730 CACAGTTTCATGCCCATCGTCTAGAATTAATFCCCCTAAAAATCTTTGAAATAGGGCCC 789

Query:     242 GTATTACCCTATAGCACCCCTCTACCCCTCTAGAGC 280
             |||
Sbjct:     790 GTATTACCCTATAGCACCCCTCTACCCCTCTAGAGC 828
  
```