



UNIVERSIDAD DE CHILE
Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas.

Memoria para optar al título profesional de
Bioquímico

Papel de la proteína QM en las vías de
transducción de señales y la progresión
tumoral inducidas por TGF- β 1 en células
transformadas

Francisco Javier Aulestia Araya

Santiago de Chile 2007

Director de Memoria

Dr. Juan F. Santibáñez

Laboratorio de Biología Celular.
Instituto de Nutrición y Tecnología de los
Alimentos (INTA)
Universidad de Chile

Profesor Patrocinante

Dra. Daniela Seelenfreund

Facultad de Ciencias Químicas y
Farmacéuticas
Departamento de Bioquímica y Biología
Molecular
Universidad de Chile

Financiamiento

Proyecto FONDECYT 1050476

Agradecimientos

Este trabajo no podría haberse realizado sin el apoyo de mucha gente, es por esto que me gustaría agradecer en especial a mi director de Tesis el Dr. Juan Francisco Santibáñez, que me permitió desarrollar este trabajo en la condiciones que lo hice, sin la ayuda y apoyo de él, no hubiese alcanzado las metas propuestas.

A la Doctora Daniela Seelenfreund por su tiempo y dedicación

A Daniel Silva y Matias Gutierrez por las traducciones y la ayuda con el Ingles

Demás esta agradecer también a la gente del Laboratorio de Biología celular del INTA, en especial a Javier Guerrero, Nicolás Tobar y Mónica Cáceres, que me enseñaron a dar los primeros paso en el laboratorio.

A mis amigos de la “U” Monse, Roger, Coty, Ro, Erick, Matias, Daniel, Miguel.

A mis amigos de siempre, “Los clásicos” Coto, Álvaro, Pato, Sapo, Chago, Negro, Guata,

Jorge, Pablo y Panozo por tantos momentos de camaradería y ayuda incondicional

Agradecer también a mi familia que estuvo conmigo durante este largo proceso, quizás en algunos momentos no me comprendían, pero siempre estuvo el cariño

Me gustaría agradecer en forma especial a una persona que ha sido fundamental para alcanzar mis sueños, a mi novia Lorena. Tú siempre me diste una palabra sabia, una ayuda incondicional y amor, las necesite cuando sentía que estaba derrotado o cuando caí muy bajo y por supuesto en cada alegría que disfrute junto a ti.

Dedicado a mi Padre Francisco Aulestia, a mi madre Raquel Araya, mi hermana

Maria Paz Aulestia y mi novia Lorena Alba

“El perdón más difícil es el que se tiene que dar uno mismo”

Abreviaturas

α -Tub: Alfa-tubulina.

DNA: Acido desoxiribonucleico.

RNA_m: ARN mensajero.

c-DNA: DNA complementario.

DEPC: Dietilpirocarbonato.

DOPE: dioleoil-phosphatidil-etanolamina.

E-Cad: Cadherina E.

EDTA: Etilendiamintetraacetato.

EGFR: Receptor del factor de crecimiento epidérmico.

ERK: Quinasa regulada por señales extracelulares.

GAPDH: Gliceraldehido 3 fosfato deshidrogenasa.

JNK: Quinasa N-terminal de c-Jun.

NEM: N-etilmaleimida.

MEC: Matriz extracelular.

MMP9: Metaloproteinasa de matriz 9.

PAI-1: inhibidor de activador del plasminógeno tipo uroquinasa 1.

Pb: Pares de bases.

PBS: Tampón fosfato salino.

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa.

PMSF: Fluoruro de fenil-metil-sulfonilo

RT-PCR: Retrotranscripción y reacción en cadena de la polimerasa.

SARA: Ancla para Smad para la activación por el receptor.

siRNA: RNA pequeño de interferencia.

SDS: Dodecilsulfato de sodio.

TBR: receptor de TGF- β 1.

TEM: Transición epitelio-mesenquimática.

TGF- β 1: Factor de crecimiento transformante beta 1.

uPA: Activador del plasminógeno tipo uroquinasa.

uPAR: Receptor del activador del plasminógeno tipo uroquinasa.

Vim: Vimentina.

VV: Vector vacío.

Índice

Financiamiento.....	i
Agadecimientos.....	ii
Abreviaturas.....	iii
Indice.....	iv-vii
Resumen.....	viii-ix
Summary.....	x-xi

1) Introducción 1-10

- 1.1) Aspectos generales de TGF- β y su relación con el cáncer
- 1.2) Cascadas de transducción de señales activadas por TGF- β , vías Smads. Esquema (i)
- 1.3) Señalización de TGF- β 1 independiente de Smads
- 1.4) Distintos tipos de efectos celulares de TGF- β
- 1.5) Marcadores de TEM y de la progresión tumoral involucrados en la actividad de TGF- β 1
- 1.6) Proteína QM y su relación con el cáncer
- 1.7) Modelo de carcinogénesis química

2) Hipótesis y Objetivos 11

3) Materiales 12-13

3.1) Reactivos químicos, soluciones estándar y anticuerpos 12

- 3.1.1) Anticuerpos primarios
- 3.1.2) Anticuerpos secundarios
- 3.1.3) Reactivos químicos y soluciones
- 3.1.4) Sistemas comerciales y reactivos importantes

3.2) Líneas celulares utilizadas 12

- 3.2.1) Células de ratón
- 3.2.2) Células de humano
- 3.2.3) Células de mono

3.3) Oligo nucleótidos: partidores (primers) para PCR, secuencias de ARN de interferencia(siRNA), reactivos de Transfección y Plasmidios 13

- 3.3.1) Partidores para RT-PCR
- 3.3.2) RNAs de interferencia
- 3.3.3) Reactivos de transfección
- 3.3.4) Plasmidios, vector de expresión y acoplados a genes reporteros de luciferasa

4) Metodología	14-22
4.1) Protocolo extracción de RNA, síntesis de DNA complementario	14-15
4.1.1) Extracción de RNA	
4.1.2) Síntesis de DNA complementario (c-DNA)	
4.1.3) Amplificación de DNA complementario, reacción en cadena de la polimerasa PCR	
4.2) Lisis celular, electroforesis SDS-PAGE y Western Blot.(<i>W.B</i>)	16
4.2.1) Lisis celular y preparación de Extractos proteicos	
4.2.2) Preparación de geles de Acrilamida para electroforesis SDS-PAGE	
4.2.3) Western Blot	
4.3) Preparación de bacterias competentes, transformación y purificación de plasmidios	17
4.3.1) Preparación de <i>E.coli</i> competentes	
4.3.2) Transformación de <i>E.coli</i> competentes	
4.3.3) Purificación de plasmidios	
4.4) Transfeccion de plasmidios de expresión y asociados a genes reporteros, medición de actividad	18
4.4.1) Cultivo de células y transfección de plasmidios	
4.4.2) Preparación liposomas para la transfección, reactivo TjF	
4.4.3) Medición de actividad luciferasa, luminómetro	
4.4.4) Metodología para transfección de RNA de interferencia	22
4.4.5) Cultivo de células y transfección de siRNA	22
4.4.6) Migración celular, ensayo de heridas	22
5) Resultados	25-48
5.1) Estandarización de la reacción de RT- PCR de las secuencias del gen QM de ratón y humano y del gen constitutivo GADPH	23-24
5.1.1) Estandarización del reacción de RT-PCR de los genes QM de ratón y GADPH	
5.1.2) Estandarización del reacción de RT-PCR de los genes QM de Humano y GADPH	

5.2) Expresión del gen QM y de la proteína QM en células transformadas	25-26
5.2.1) Expresión de RNAm y niveles de la proteína QM en distintos tipos celulares del modelo carcinogénico de piel de ratón	
5.2.2) Niveles de expresión del transcrito QM en líneas celulares MCA-3D, PDV, CarC	
5.2.3) Niveles de la proteína QM en líneas celulares MCA-3D, PDV, CarC	
5.2.4) Expresión del mRNA de QM en línea celular PC3	
5.3) Expresión de QM-Flag, uso de vector pCMV5-QM-Flag en células COS-7	28
5.4) Estudio del efecto de QM sobre las vías de TGF- β 1	29-44
5.4.1) Estudio del efecto de QM sobre las vías de TGF- β 1 en COS7	29-30
5.4.1.1) Efecto de la sobre-expresión de QM sobre la vía Smad 2 de TGF- β en COS-7	
5.4.1.2) Efecto de la sobre-expresión de QM sobre la vía Smad 3 de TGF- β en COS-7	
5.4.1.3) Efecto de la sobre-expresión de QM sobre la vía ERK de TGF- β en COS-7	
5.4.2) Cinética de expresión de las proteínas fosfo. Smad2,3 y ERK1,2 en respuesta a TGF- β 1	32
5.4.3) Estudio del efecto de QM sobre la vía de TGF- β en células PC3	33-37
5.4.3.1) Efecto de la sobre-expresión de QM sobre la vía Smad 2 de TGF- β en células PC3	
5.4.3.2) Efecto de la sobre-expresión de QM sobre los niveles de proteína p-Smad2	
5.4.3.3) Efecto de la sobre-expresión de QM sobre la vía Smad3 de TGF- β en células PC3	
5.4.3.4) Efecto de la sobre-expresión de QM sobre los niveles de proteína p-Smad3	
5.4.3.5) Efecto de la sobre-expresión de QM sobre la vía ERK1,2 de TGF- β en células PC3	
5.4.4) Estudio del efecto de QM sobre la vía de TGF- β en células PDV	38-44
5.4.4.1) Efecto de la sobre-expresión de QM sobre la vía Smad2 de TGF- β en células PDV	
5.4.4.2) Efecto de la sobre-expresión y depleción de QM sobre los niveles de proteínas p-Smad2	
5.4.4.3) Efecto de la sobre-expresión de QM sobre la vía Smad3 de TGF- β 1 en células PDV	
5.4.4.4) Efecto de la sobre-expresión y depleción de QM sobre los niveles de proteínas p-Smad3	
5.4.4.5) Efecto de la sobre-expresión de QM sobre la vía ERK1,2 de TGF- β en células PDV	

5.5) Implicancias de la activación de vías de la ruta de TGF- β 1 y su efecto en la actividad tumoral, búsqueda de marcadores tumorales	45-46
5.5.1) Niveles de transcrito u-PA y MMP9, efecto de siRNA /QM	45
5.5.2) Ensayo de migración de células PDV y ensayo de heridas	46
6) Discusión	47-58
6.1) Expresión de QM en células transformadas	
6.2) Regulación de vías de Señalización en células COS-7	
6.3) Regulación de vías de Señalización en células PC3	
6.4) Regulación de vías de Señalización en células PC3	
6.5) Efecto de la proteína QM sobre la malignidad en células PDV	
7) Conclusiones y modelo propuesto, Esquema (ii)	59
8) Referencias	61-65

Indice de esquemas y Figuras

Esquema de Modelo de carcinogénesis química, Figura 1	10
Esquema de procedimiento de transfección celular, Figura 2(A, B y C)	19-21
PCR a distintos ciclos para gen QM y GADPH de raón, Figura 3	23
PCR a distintos ciclos para gen QM y GADPH de humano, Figura 4	24
PCR expresión de QM en células transformadas, Figura 5	25
Western de QM en células transformadas, Figura 6	26
PCR expresión de QM en células PC3, Figura 7	27
Western de QM-Flag en células COS-7, Figura 8	28
Gráfica de la actividad de la vía Smad2 en células COS-7, Figuras 9	30
Gráfica de la actividad de las vías Smad3 y ERK1,2 en células COS-7, Figuras 10	31
Western de ERK1,2, Smad3, Smad2 en en células PDV y PC3, Figura 11	32
Gráfica de la actividad de la vía Smad3 y Western blot para p-Smad2 en células PC3, Figuras 12 y 13	34
Gráfica de la actividad de la vía Smad3 y Western blot para p-Smad3 en células PC3, Figuras 14 y 15	36
Gráfica de la actividad de la vía ERK1,2 en células PC3, Figuras 16	37
Gráfica de la actividad de la vía Smad2 en células PDV, Figuras 17	39
Western blot para p-Smad2 en células PDV, Figuras 18	40
Gráfica de la actividad de la vía Smad3 en células PDV, Figuras 19	42
Western blot para p-Smad3 en células PDV, Figuras 20	43
Gráfica de la actividad de la vía ERK1,2 en células PDV, Figuras 21	44
PCR expresión de QM, u-PA, MMP9 en respuesta a siRNA en células PDV, Figura 22	45
Ensayo de heridas en células PDV, Figura 23	46

TGF- β 1 es uno de los miembros de la superfamilia de TGF- β , capaz de activar vías de señalización dentro de la célula que modulan la expresión de diversos genes. Entre estas vías encontramos a los complejos Smad2, Smad3 y ERK1,2.

La modulación y/o regulación de estas vías activadas por TGF- β 1 es de vital importancia, puesto que se piensa que esta regulación podría servir como blanco farmacológica contra el desarrollo de tumores. En nuestro laboratorio nos hemos enfocado en buscar proteínas o factores capaces de regular la activación de las vías del factor de crecimiento.

Basado en la evidencia de la presencia de la proteína QM en ciertos tipos de tumores y la capacidad de ésta de interactuar con factores transcripcionales, hemos propuesto que QM tiene la capacidad de regular a los factores Smad2, Smad3 y ERK1,2 activados por TGF- β 1.

Nuestros resultados indicaron que QM es capaz de modular las tres vías estudiadas en respuesta a un estímulo con TGF- β 1 en células COS-7, PDV y CarC, sin embargo esta modulación fue diferente en los tres tipos celulares.

Se observó que al sobre-expresar QM en células COS-7 que representan un estadio normal, las vías de Smad2 y ERK1,2 aumentan su actividad. La actividad de la vía Smad3 en células COS-7 se ve potenciada en respuesta a un estímulo con TGF- β 1 en conjunto con la sobre-expresión de QM.

En (el caso de) células humanas PC3 que representan un estado muy tumorigénico se observó que al sobre-expresar QM, la actividad de la vía Smad2 se ve disminuida al comparar el efecto que se observa al estimular con TGF- β 1. Se obtuvo un efecto similar cuando determinamos la trans-activación del sistema Smad2-Gal4 y junto con los resultados obtenidos por western blot notamos una caída en los niveles de proteína fosforilada. Por el contrario, la actividad de la vía Smad3 se ve aumentada cuando estimulamos con TGF- β 1 y sobre-expresamos QM. El efecto sobre la trans-activación del sistema Smad3-Gal4 en conjunto con los niveles de p-Smad3 determinados por western blot muestran un aumento de la fosforilación de la proteína, lo que indicaría la mayor actividad de la vía.

La actividad de la vía ERK1,2 se ve fuertemente estimulada por la presencia de QM. La trans-activación del sistema Elk1-Gal4 sugiere que la presencia de QM colabora con la fosforilación del factor Elk1 lo que indicaría la mayor actividad de la vía ERK1,2.

En (el caso de las) células de ratón PDV, al sobre-expresar QM se observó que aumenta la actividad de las vías Smad2 y Smad3. Además la presencia de QM potenciaría el efecto de TGF- β 1. Al determinar el efecto de QM sobre la trans-activación del sistema Smad2-Gal4 y Smad3-Gal4 esta aumento. Además los resultados obtenidos por western blot para p-Smad2 y pSmad3, muestran un aumento en los niveles de p-Smad2 y p-Smad3 cuando sobre-expresamos QM. El efecto contrario se observó cuando inhibimos la expresión de QM con siRNA. Estos resultados sugieren que QM tendría un efecto sobre la fosforilación de Smad2 y Smad3, lo que explicaría la mayor actividad de estas vías.

Al sobre-expresar QM en células PDV observamos también un gran aumento de la actividad de la vía ERK1,2. La trans-activación del sistema Elk1-Gal4 aumentó al sobre-expresar QM, sugiriendo que QM tendría un efecto sobre la fosforilación de ERK, lo que explica el aumento de la actividad de la vía.

Al suprimir QM en células PDV y analizar el efecto sobre la expresión de u-PA y MMP9, se observó que u-PA decae y también disminuye MMP9, aunque en menor medida. Nuestros datos también indicaron que QM tendría implicancias sobre la migración celular en células PDV.

Los resultados obtenidos en nuestro trabajo permiten concluir que QM activa las vías de señalización de TGF- β 1 involucradas en procesos tumorales, además de alterar la expresión de u-PA y MMP9 y favorecer la migración en células transformadas. En su conjunto, estos datos sugieren que la posibilidad de modular la expresión de QM en células tumorales aparece como una posible herramienta terapéutica para el tratamiento del cáncer en humanos.

Role of QM protein in signal transduction pathways and tumoral progression induced by TGF- β 1 in transformed cells

TGF- β 1 is a member of the TGF- β superfamily of proteins. These proteins are capable of activating signaling pathways in the cell to modulate the expression of different genes. Among the TGF- β 1 pathways we find the following protein complexes: Smad2, Smad3 y ERK1,2.

The modulation and/or regulation of these pathways activated by TGF- β 1 are of vital importance, (given that it is) and we believe that this regulation may serve as a pharmacological target against tumor development. In our lab, we have focused on the search of proteins and/or factors capable of regulating pathways leading to growth factor activation.

Based on evidence showing that the presence of QM protein in certain types of tumors, and its ability to interact with (other) transcriptional factors, we (have) propose that QM modulates the following TGF- β 1 regulated factors: Smad2, Smad3 y ERK1,2.

Our results indicate that QM is able to modulate these three pathways after a TGF- β 1 stimulus in COS-7, PDV y CarC cell lines, yet the regulation pattern varies among cell types.

A normal state was observed in COS-7 cells when QM was over-expressed. Smad2 and ERK1,2 pathways increase their activity under this condition.. The Smad3 pathway activity was clearly enhanced in response to TGF- β 1 stimuli when QM was over-expressed.

In the human cell line PC3 presenting a tumorigenic state, a decreased Smad2 pathway activity was observed following QM over-expression, when compared to TGF- β 1 stimulation. A similar effect was obtained when the trans-activation of the Smad2-Gal4 system was assayed. This latter result, together with our western blots, show a drop in phosphorylated protein levels. On the other hand, the Smad3 pathway activity is induced after a TGF- β 1 stimulus and QM over-expression.

Summary

The effect on the Smad3-Gal4 system transactivation and on the levels of p-Smad3, show an increase in the phosphorylation of this protein, as determined by western blots, thus indicating an increased pathway activity.

ERK1,2 pathway activity is strongly stimulated by QM. The trans-activation of the Elk1-Gal4 system suggests that the presence of QM enhances Elk1 phosphorylation, which would indicate an increased ERK1,2 pathway activity.

When QM was over-expressed in the PDV mice cell line, an increase in the activity of Smad2 and Smad3 pathways was observed. More over, the presence of QM potentiates the effect of TGF- β 1. When we assayed the effect of QM on the trans-activation of the Smad2-Gal4 and Smad3-Gal4 systems, we found an increase of...?. The western blot results for p-Smad2 and pSmad3 also show an increase of levels after QM over-expression. The opposite effect was observed when QM expression was inhibited with siRNA. These results strongly suggest an effect of QM on the phosphorylation of Smad2 and Smad3, which would explain the increased activity of these pathways.

When QM was over-expressed in PDV cells, the ERK1,2 pathway showed an increase of activity. The trans-activation of the Elk1-Gal4 system increased when QM was over-expressed. This suggests an effect of QM on ERK phosphorylation, which would explain the increased activity of this pathway.

When QM was suppressed in PDV cells, a decrease in u-PA and MMP9 was observed even though the latter decreased to a lesser extent. Our data also indicate that QM increases cellular migration in PDV cells.

Our results lead us to conclude that QM activation of TGF- β 1 signaling pathways is involved in tumoral processes, in addition to altering the expression of u-PA and MMP9 and favoring their migration in transformed cells. Taken together, these results suggest that the regulation of QM expression in tumoral cells could be a powerful therapeutic tool for the treatment of cancer in humans.

1) Introducción

1.1) Aspectos generales de TGF- β y su relación con el cáncer.

En los últimos años se han dirigido los esfuerzos en mejoras de diagnóstico y una comprensión más acabada de los distintos tipos de cáncer, que bien se sabe, son una problemática de salud pública mundial.

Ha sido bastante complejo identificar fenotipos o mecanismos moleculares generales que permitan unificar los esfuerzos en el área de la investigación. La tendencia ha sido determinar mecanismos específicos para cada tipo de cáncer. Dentro de las áreas en que se ha indagado se encuentra una citoquina o factor de crecimiento denominado TGF- β (Factor de crecimiento transformante tipo beta). La superfamilia de TGF- β está constituida por una serie de péptidos genéticamente relacionados que actúan como reguladores multifuncionales del crecimiento y la diferenciación celular. Los miembros de esta superfamilia están involucrados en fenómenos tan diversos como la morfogénesis, el desarrollo embrionario, la regulación de la función endocrina, la regulación de la proliferación y la diferenciación celular (1).

Los primeros estudios sobre TGF- β que se realizaron en células epiteliales indicaban un rol dual de esta citoquina: por una parte el factor en etapas tempranas de la tumorigénesis actuaría inhibiendo la proliferación con un concomitante incremento de las células que sufrían apoptosis (2,4). Por otra parte, estudios posteriores indicaron que TGF- β 1 era fundamental para el desarrollo tumoral y favorecía la malignidad celular, por lo cual se ha postulado a este factor de crecimiento como una citoquina dual en la carcinogénesis (2,4).

El interés por entender el mecanismo de acción de TGF- β se relacionó además con otros mecanismos asociados a la tumorigénesis, como es la angiogénesis, inmunodepresión y la transición epitelio-mesenquémica (TEM) (3,5).

Debido a estas razones los esfuerzos se han enfocado a comprender los mecanismos moleculares de la acción de TGF- β 1, su interacción con su receptor, las vías de señalización intracelular involucradas, con el fin de desarrollar nuevas estrategias terapéuticas en el combate contra el cáncer.

1.2) Cascadas de transducción de señales activadas por TGF- β 1, vías Smads.

Como mencionábamos anteriormente, TGF- β es una citoquina polipeptídica asociada a muchas funciones, las cuales podrían tener una estrecha relación con la progresión tumoral (5,6).

En la actualidad se han identificado 3 isoformas de TGF- β en mamíferos (TGF- β 1,2 y 3). TGF- β al completar su síntesis es procesado en el aparato de Golgi, para posteriormente ser secretado al medio extracelular en forma inactiva unido a un segmento denominado LAP (péptido de latencia asociado) que le impide la unión a su receptor (7). TGF- β , una vez secretada, es liberada de su interacción con el segmento LAP por acción de plasmina u otra proteinasa y por tanto queda biodisponible para su unión a su receptor en la superficie celular. (7,9)

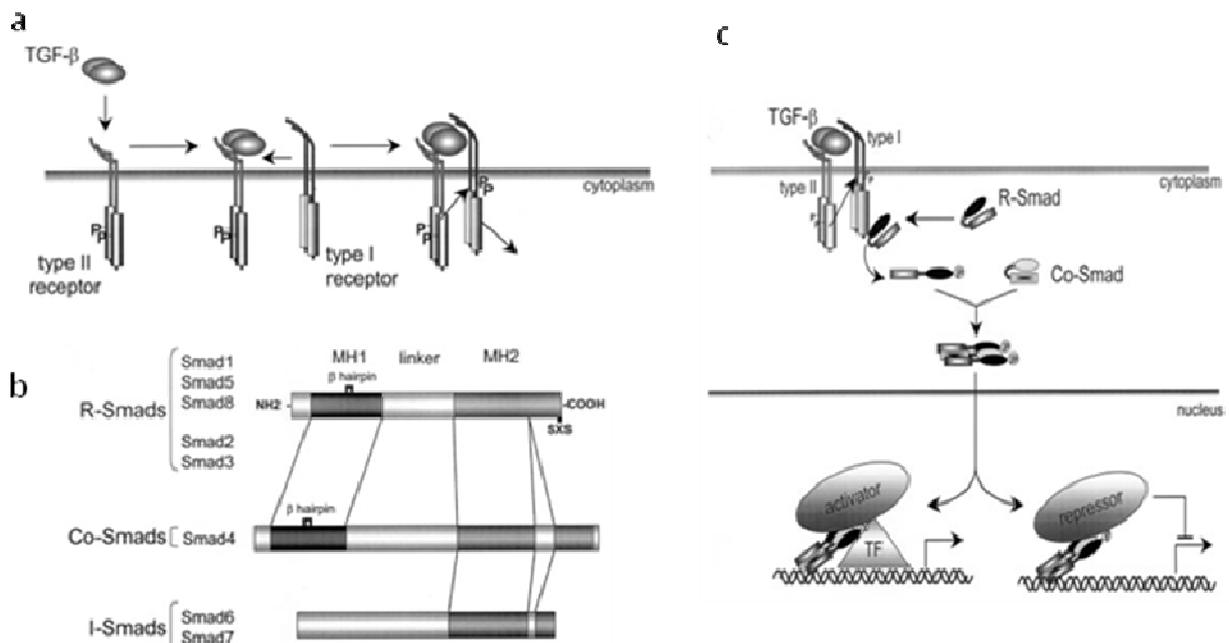
TGF- β 1 es un homodímero y cada dominio de 12 kDa está unido por enlaces bisulfuro. En esta forma activa es capaz de unirse a su receptor, el cual transduce una señal que permite el control de la expresión de genes determinados (7, 9).

El receptor de TGF- β 1 es un tetrámero que se ensambla luego de la interacción con el ligando. TGF- β 1 se une al receptor tipo II, el cual se encarga de reclutar al receptor tipo I (ALK-5) y activarlo por fosforilación en una región denominada GS. El complejo receptor queda conformado por dos receptores tipo I y dos del tipo II y tiene la capacidad de fosforilar y por ende activar las proteínas Smads con acción efectora sobre diversos genes (7.9).

Las proteínas Smads son los efectores de la vía activada por TGF- β 1. Se han identificado nueve tipos de Smads y se han dividido en tres grupos distintos: las R-Smads, Co-Smads e I-Smads. Entre las R-Smads encontramos Smads 2 y 3, las cuales tienen un dominio fosforilable SXS por el receptor tipo I, lo que induce un cambio conformacional que cambia la afinidad por un proteína denominada SARA (que mantiene a las Smad en la membrana) y que permite su liberación y posterior translocación al núcleo (7, 9).

Una vez activos los Smads forman un complejo con Smad4 (Co-Smad), el cual es translocado al núcleo, para luego unirse a los promotores de los genes blanco (7,9).

Dentro del grupo de las I-Smads encontramos a Smad 7 que compete con las R-Smad o simplemente impide su translocación hacia el núcleo por interactuar con una ubiquitina ligasa E3 llamada Smurf, que señala la degradación del receptor de TGF- β 1 vía proteosoma (7,9,10).



Esquema (i): (a) Heterodimerización del receptor de TGF- β luego de la unión al ligando. (b) Dominios específicos de las distintas proteínas Smads. (c) Cascada de señalización activada luego de la unión del ligando al receptor de TGF- β . Fosforilación de R-Smads y unión de R-Smad a Co-Smad para posterior translocación al núcleo. Activación o represión de genes mediante factores Smads (Sylviane Dennier y col 2002).

1.3) Señalización de TGF- β 1 independiente de Smads.

Además de las vías de señalización de Smads, TGF- β 1 es capaz de activar otras vías de señalización que colaboran en los diversos efectos del factor sobre la homeostasis celular. Entre las distintas rutas de transducción que median los efectos de TGF- β 1 encontramos las rutas de ERKs, JNK, p-38, NF κ b y Rho GTPasas (11).

Los mecanismos que dan cuenta de la capacidad de TGF- β 1 de activar estas rutas de transducción no han sido dilucidados, y en la actualidad se realizan esfuerzos por develar este fenómeno. En la literatura, se reporta que la capacidad de TGF- β 1 de activar estas vías podría ser independiente de la activación de la ruta de Smad; de hecho, receptores mutantes de TGF- β 1 incapaces de fosforilar Smad2 y 3 mantienen la capacidad de activar p-38 y JNK (12,13). En este sentido se ha sugerido que TGF- β 1 induce la activación ERK1,2 y p-38 mediante la transactivación de EGFR (14,15,16), lo que en gran medida podría explicar la capacidad de TGF- β 1 de activar vías independientes de Smad. TGF- β 1 es capaz de activar Ras y ERK MAP quinasas en queratinocitos transformados y células epiteliales normales (17), así como JNK (18).

1.4) Distintos tipos de efectos celulares de TGF- β .

Recientemente se ha evidenciado el efecto de TGF- β 1 sobre la proliferación de algunas líneas celulares. Esta citoquina ejercería su efecto en la etapa G1 del ciclo celular, en parte por su efecto sobre la expresión de los Ids (Inhibitors of DNA binding) (19). En este sentido, se ha demostrado que el factor también inhibe el crecimiento de cierto tipo de sarcoma al disminuir los niveles de la ciclina-cdk2 y c-Myc. Este efecto sería el causal de la detención del ciclo celular en la etapa G1 (20).

La respuesta antitumoral mediada por linfocitos T CD4 y CD8 en algunos casos se ve reprimida en el ambiente cercano al tumor. Este efecto se puede explicar por la presencia de citoquinas como TGF- β 1 y IL-10 que frenan la proliferación de linfocitos T e impide la acción inmune sobre el desarrollo tumoral y le confiere un ambiente próspero para su crecimiento a las células transformadas (21).

Las estrategias de escape de las células tumorales a la acción inmunológica es a veces mucho más compleja, debido al repertorio que esta ocupa. Las células tumorales tienen la capacidad de secretar factores solubles HLA-I que impiden el reconocimiento e inducen la apoptosis del linfocito.

Además las células tumorales también disminuyen la expresión de moléculas en su superficie que imposibilita aún más su reconocimiento por parte de linfocitos T (22).

TGF- β 1 es una citoquina que también participa en el proceso apoptótico. Se ha visto en células cancerígenas de mama que el bloqueo de TGF- β 1 inhibe la apoptosis, efecto que sería independiente de las Smads, siendo más bien producido por la vía MAP quinasa ERK y p38 (23). Sin embargo, TGF- β 1 puede ser utilizado como vía de escape de algunos tumores, y es así como a través de TGF- β 1 ciertos tipos de linfomas inducen la muerte por apoptosis de células dendríticas (24).

Otro proceso inducido por TGF- β 1 es la transición epitelio-mesenquimática (TEM). Este proceso se caracteriza por una pérdida de uniones intercelulares y cambios en el citoesqueleto. Las células adquieren una mayor independencia y existe un cambio en la morfología celular de cuboides epiteliales a células mesenquimáticas con una morfología tipo fibroblasto (25,26). Esta transformación de célula epitelial a célula mesenquimática es un proceso fisiológico que permite el desarrollo de algunos órganos y tejidos. También se la ha asociado al desarrollo de diversas patologías (27). Los eventos más relevantes de la TEM maligna se agrupan en las siguientes categorías: (i) Dispersión celular, la cual es la única siempre presente en la TEM, e involucra pérdida de Cadherina-E; (ii) producción de proteinasas que degradan la matriz extracelular; y (ii) reordenamiento del citoesqueleto de actina que permite la motilidad celular, junto con cambios de los filamentos intermedios epiteliales de queratina por los filamentos de vimentina (28,29).

Entre las patologías asociadas a TEM encontramos también el cáncer, pues el cambio de fenotipo pasa de un estado tumoral inicial a uno mucho más maligno. Avances recientes han permitido dilucidar los requerimientos moleculares para la TEM, donde TGF- β 1 juega un papel fundamental en la transición epitelio mesenquimática asociada a la progresión tumoral (25,26).

TGF- β 1 provoca un aumento de la expresión de u-PA, fibronectina como también de Vimentina, mediante la activación de la vía de JNK. También se produce una deslocalización de Cadherina-E, lo cual ayuda a que la célula adquiriera un fenotipo más maligno, facilitando también su capacidad migratoria (30).

Las vías Smad activadas por TGF- β 1 sin duda alguna son importantes en el proceso de TEM. Estas vías presentan una comunicación cruzada con otras vías como la ya mencionada JNK, así como las vías ERK1,2, PI3K y la vía de Wnt. Se ha propuesto que todas ellas actúan en forma coordinada en el proceso de TEM que permitiría a la célula adquirir un fenotipo maligno (31).

1.5) Marcadores de TEM y de la progresión tumoral implicados en la actividad de TGF- β 1

Durante la transición epitelio-mesenquimática las células van adquiriendo propiedades migratorias e invasivas, como cambios en el contacto célula-célula, célula-matriz extracelular y un aumento en la expresión y secreción de proteinasas (28,29).

La habilidad de las células epiteliales de disociarse de su entorno es debido a una ruptura de las uniones intercelulares. En las etapas iniciales de la TEM, las proteínas de los complejos de unión celular, tales como las uniones estrechas, uniones adherentes, desmosomas y uniones tipo "Gap", son remodeladas y desintegradas funcionalmente (27). Entre las principales proteínas de las uniones adherentes se encuentra la Cadherina-E (Cad-E), principalmente dependiente de calcio que media las uniones homotípicas célula-célula. En la TEM esta proteína de unión intercelular es desestabilizada inicialmente, lo que facilita la ruptura de los complejos de adhesión, seguido de una disminución de sus niveles y finalmente una pérdida completa de expresión en etapas tardías de la TEM. La Cad-E ha sido postulada como una proteína supresora de tumores y su expresión es clave para la mantención del fenotipo epitelial (29). De hecho, la inducción de la TEM por TGF- β 1 coincide con una pérdida de expresión de Cad-E.

Entre los posibles mecanismos moleculares implicados se ha descrito la inducción de los factores de transcripción SNAIL y SIP1 por TGF- β 1 como responsables de la pérdida de expresión de Cad-E (32,33). Estos datos indican que la TEM inducida por TGF- β 1 en células transformadas está mediada en parte por la expresión de factores de transcripción represores del gen de Cad-E.

Diversos estudios indican una influencia dramática del ambiente que rodea a los tumores en el comportamiento de las células pre-cancerosas (28). La disociación de las células epiteliales entre sí y de sus sustratos celulares se asocia con importantes remodelaciones de la composición de la MEC.

En general, la remodelación y/o destrucción de la MEC puede ser un evento marcador de los últimos estadios de la tumorigénesis. Cambios en la composición de la MEC y la activación de proteinasas implicadas en la degradación de ésta pueden estar involucradas en un aumento de la proliferación, variación en la morfología celular, adquisición de un fenotipo migratorio y modificaciones a la respuesta a citoquinas (28). La degradación de la MEC es un proceso fundamental para el proceso de invasión tumoral por parte de las células invasoras. De hecho, existe una correlación directa entre la agresividad de las células tumorales y el nivel de producción de proteinasas de MEC. Existen numerosas evidencias experimentales que involucran al activador del plasminógeno tipo uroquinasa u-PA en la malignidad de muchos tipos de tumores (34). El principal sustrato fisiológico de u-PA es el plasminógeno, el zimógeno más abundante en el organismo. Su forma activa plasmina es una serina-proteinasas de amplio espectro involucrada en la degradación de la MEC, en la activación de otras proteinasas, factores de crecimiento y citoquinas (33).

Se ha evidenciado que TGF- β 1 produce un aumento de la expresión y secreción de u-PA en células transformadas, lo que facilita la capacidad migratoria e invasiva por parte de la célula tumoral (35). Además, al inhibir con nucleótidos de antisentido las vías de MAPKs, ERK1/2 y p38, y luego de un estímulo con TGF- β 1, se observa una disminución en la expresión de u-PA. Esto evidencia la participación de estas vías de señalización en el efecto de TGF- β 1 sobre la expresión de esta proteinasas tumoral (36).

Es interesante considerar que u-PA posiblemente tenga un papel importante en la tumorigénesis más allá de su función como proteínasa. De hecho, la unión de u-PA a su receptor gatilla la activación de las rutas de STAT y ERK MAP quinasa, lo que se asocia a un aumento de la migración (37).

Otros marcadores tumorales relacionados con la migración inducida por TGF- β 1 son las metaloproteinasas MMP9 y MMP2, cuya expresión es estimulada por el factor de crecimiento a través de las vías de ERK1,2 y p38 en células epiteliales (38).

1.6) Proteína QM y su relación con el cáncer

Con el fin de encontrar factores que regulen la cascada de señales en la vía de TGF- β 1 en células tumorales, nuestro laboratorio ha determinado que AMPc impide la reorganización del citoesqueleto e inhibe la interrupción de las interacciones célula-célula de E-Cadherina, características propias de las células mesenquimáticas posterior a un estímulo con TGF- β 1, sugiriendo que AMPc tiene un papel regulador de esta vía (39). Este resultado nos ha alentado a estudiar mecanismos propios de la célula tumoral que puedan antagonizar o regular los efectos de TGF- β 1 sobre las células transformadas.

Nuestro interés es encontrar proteínas que tengan alguna función relacionada con las vías de señalización de TGF- β 1, y que puedan modular los efectos de este factor en la carcinogénesis.

En este último aspecto nos ha interesado determinar el posible papel de una proteína denominada QM sobre las vías de señalización de TGF- β 1 en células transformadas.

QM fue identificada originalmente en tumores de Wilms (40). Se ha sugerido que QM es un supresor de tumores debido a que su expresión en clones no tumorigénicos de Wilms es elevada con respecto a los parentales malignos. El gen de QM codifica para la proteína ribosómica RPL10 de la subunidad 60S del ribosoma en el retículo endoplásmico, siendo un factor importante en la unión de esta subunidad con la subunidad menor 40S (42). En la actualidad se ha sugerido múltiples funciones distintas a su papel en los ribosomas (43). QM es capaz de unir c-Jun, e inhibe la actividad transcripcional de AP1 (44).

A su vez, para inhibir la actividad de c-Jun, QM interacciona con preselina-1 (PS1), lo que promueve su translocación nuclear. (45). Se ha propuesto un nuevo papel de QM como posible supresor tumoral, debido a que QM inhibe potentemente la actividad c-Yes, un proto-oncogén de la familia Src (46).

En animales los niveles de expresión de QM son elevados en tejidos en división comparados con tejidos diferenciados, por lo cual se relaciona a QM con la regulación de la proliferación y diferenciación celular (47).

La relación de QM con cáncer se evidenció recientemente, mediante ensayos de inmunohistoquímica que muestran de que en un estado inicial del desarrollo del cáncer prostático QM está disminuida, y a su vez altos niveles de QM pueden facilitar la progresión de tumores o un fenotipo más agresivo (48).

La determinación de la influencia de QM en la vía de señalización de TGF- β 1 en el proceso de trans-diferenciación de células tumorales promete el descubrimiento de mecanismos regulatorios de la progresión tumoral y eventualmente podría ser objeto de interés como blanco terapéutico para inhibir la progresión del cáncer.

1.7) Modelo de carcinogénesis química.

Este modelo consiste en varias líneas celulares aisladas de ratones a los cuales se les administró DMBA (7,12-dimetilbenz[a]antraceno) y dosis semanales de TPA (12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato). La ventaja de este modelo es que corresponde a líneas celulares con distintos grados de malignidad, es decir, desde células tipo epiteliales normales a células fusocelulares muy tumorogénicas (E.1) (49).

En análisis posteriores se determinó que estas células presentan una serie de genes mutados, tales como H-Ras que posee una mutación en el codón 61, haciendo la proteína más activa y oncogénica. Además existen mutaciones en los genes de ciclina D1, p53 y p16. En este modelo se ha determinado una correlación entre el grado de malignidad y el de fosforilación de ERK1,2 (Ras/RAf/MEK/ERK1,2) (49)

En nuestro modelo de estudio, las células del estado intermedio (PDV) pueden aumentar su malignidad por un estímulo de TGF- β 1, efecto que se ha relacionado con el proceso de la transición epitelio mesenquimática, y que ha sido relacionado también con el oncogen H-Ras (50).

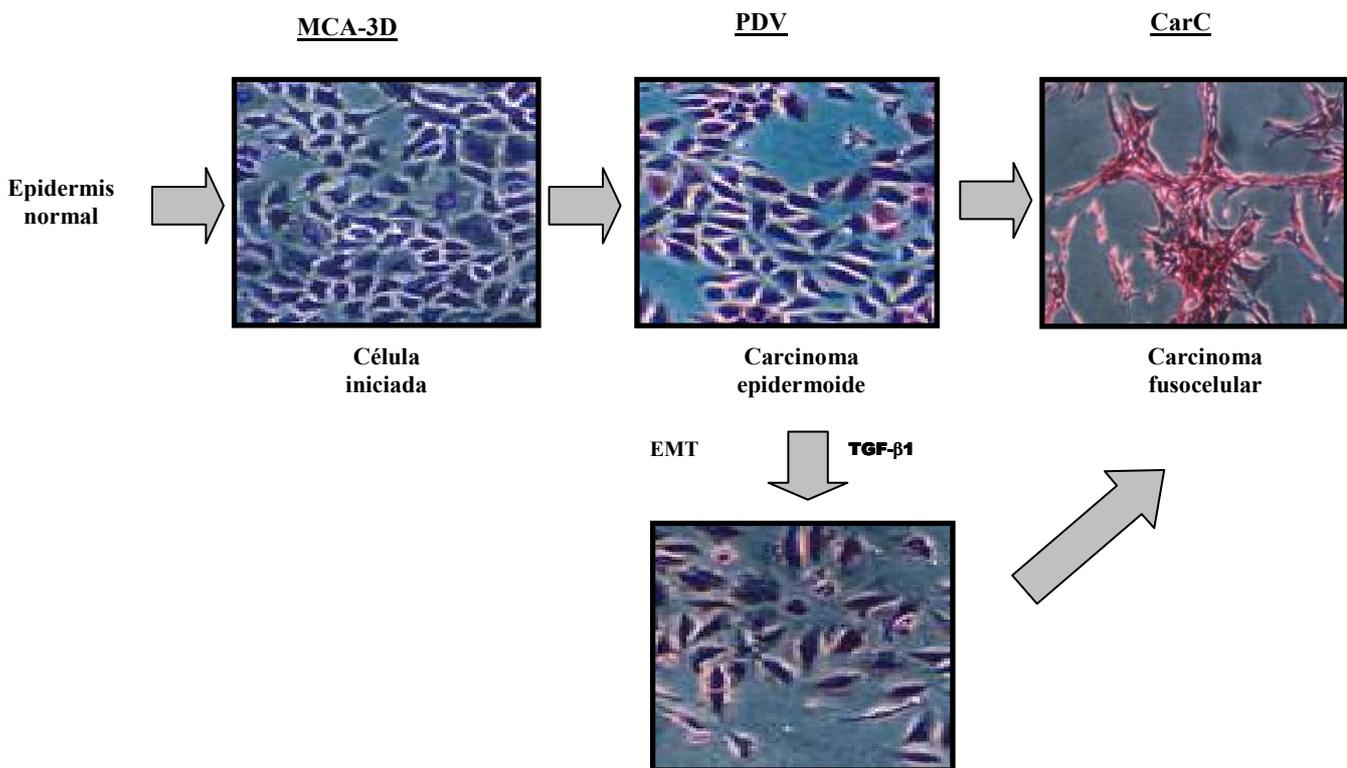


Figura 1: Carcinogénesis química de células de piel de ratón. Se induce la carcinogénesis con los reactivos químico DMBA y TPA sobre las células normales MCA-3D. Las células MCA-3D luego del tratamiento químico pasan a un estado intermedio de malignidad PDV. Posteriormente, en respuesta al estímulo con TGF- β 1 las células pasan aun estado mucho mas agresivo CarC. Este proceso se denomina transición epitelio-mesenquemática (TEM)

2) Hipótesis y Objetivos

En vista de los siguientes antecedentes:

- 1) Presencia de QM en tumores de tipo Wilms
- 2) Presencia de QM en cortes de tejidos de cáncer prostático
- 3) QM regulador transcripcional c-Jun
- 4) QM regulador transcripcional de c-Yes

Hemos planteado la siguiente Hipótesis:

“La proteína QM activa las vías de señalización Smad2, Smad3 y ERK1,2 de TGF- β 1 en células transformadas”.

Para demostrar nuestra hipótesis hemos planteados los siguientes objetivos

Objetivo General: Determinar la participación de la proteína QM en la vía de señalización de TGF- β 1 en células transformadas.

Objetivos específicos:

- 1.- Analizar la expresión de QM en células transformadas.
- 2.- Determinar el efecto de TGF- β 1 sobre la expresión de QM en células transformadas.
- 3.- Estudiar el papel de QM sobre la activación de las vías de señalización Smad2, Smad3 y ERK1,2 en respuesta a TGF- β 1 en células transformadas.
- 4.- Estudiar el efecto de QM en la expresión de los marcadores tumorales u-PA y MMP9 inducidos por TGF- β 1, en células PDV.
- 5.- Determinar la influencia de QM sobre la migración de las células PDV estimuladas por TGF- β 1 en células PDV.

3) Materiales

3.1) Reactivos Químicos, soluciones estándar y anticuerpos.

3.1.1) Anticuerpos primarios:

Anti-QM: N-17 human-mouse (Santa Cruz, SC-799)
Anti-tubulina (Sigma, T5168)
Anti Smad2P (Calbiochem, 566415)
Anti Smad Total (Sigma)
Anti Smad3P (Calbiochem, PK1012)
Anti ERK P (Santa Cruz, sc-23759-R)
Anti-ERk total (Santa Cruz, sc-16981-R)

3.1.2) Anticuerpos secundarios:

Anti-ConejoPO (Rockland, 211-1301)
Anti-RatónPO (Rockland, 210-4301)

3.1.3) Reactivos Químicos:

- Acrilamida (Sigma)
- N bis acrilamida (Sigma)
- Agarosa, (Sigma)
- Azul Bromo fenol (Sigma)
- β -Mercaptoetanol (Merck)
- Bromuro de etidio (Sigma)
- NaCl (Merck)
- ortovanadato de sodio (Sigma)
- SDS (Merck)
- KH_2PO_4 (Merck)
- NaF (Merck)
- CaCl_2 (Sigma)
- Tris (Merck)

3.2) Líneas celulares utilizadas

3.2.1) Células de ratón

PDV, MCA-3D, CarC

3.2.2) Células de humano

PC3

3.2.3) Células de mono

COS-7

- N-Etilmaleimida (NEM), (Sigma)
- Propanol libre de nucleasas (Merck)
- TEMED, (Sigma)
- Tween 20-Metanol (Sigma)
- Isobutanol, (Merck)
- LB (Invitrogen)
- Marcador de peso Molecular (Prestained Protein Ladder Biolabs)
- NaOH, (Merck)
- Glicina (Merck)
- NaH_2PO_4 , (Merck)
- CuSO_4 (Merck)
- folin (Merck)
- caseína (Merck)
- Etanol libre de Nucleasas (Merck)
- EDTA (Sigma)
- PMSF (Sigma)
- DABCO-Mowiol

3.1.4) Sistemas comerciales y

reactivos importantes:

- TGF- β 1 (RD system)
- ThermoScript (Invitrogen)
- Trizol (Invitrogen)
- ECL, (Pierce)
- Sustrato Luciferasa, (Promega)
- Plasminógeno (Sigma)
- Reactivo de lisis para luciferasa (Promega)

3.3) Nucleótidos partidores (primers) para PCR, secuencias de RNA de interferencia(siRNA), reactivos de transfección y plasmidios .

3.3.1) Partidores para RT-PCR

Partidor	Secuencia	Tamaño de amplicon (pb)
QM Ratón	Sentido 5' GAGGTGCTTTCCAGAAATCCATGT 3' Anti sentido 5' AATGACCCTCTGTTTAGCTCCAGA 3'	198
QM Humano	Sentido 5' CCCGGTACCATGGGCCGCCGC 3' Anti sentido 5' GGGGAGGCTTTCCTGAGTGCAGGGC 3'	700
GAPDH Humano y Ratón.	Sentido 5' ACCACAGTCCATGCCATCAC 3' Anti sentido 5' TCCACCACCCTGTGCTGTA 3'	450
u-PA Ratón	Sentido 5' TGCCCAAGGAAATTCTGCCCAAGGAAATCCACGC 3' Anti sentido 5' GCCAATCTGCACATAGCACC 3'	280

3.3.2) RNAs de Interferencia

-siRNA QM (Santa Cruz)

3.3.3) Reactivos de Transfección

-TJF (Liposomas, preparado en laboratorio)

-ESCORT V (SIGMA)

3.3.4) Plasmidios; Vector de expresión y acoplados a genes reporteros de Luciferasa.

-p-CMV5-QM-Flag; p-Fast1; p-ARE; p-CAGAC; p-RF5-Luc; p-CMV5-Lacz
Cedidos por el Dr. Carmelo Bernabeu, CIB, Madrid, España;

-p-SRE cedido por el Dr. A. Corbí, CIB, CSIC, Madrid, España

-p-Gal4-Smad2, p-Gal4-Smad3, pFA-Elk1 fue obtenido de Stratagen, La Jolla, E.E.U.U.

4) Metodología

4.1) Protocolo extracción de RNA y síntesis de DNA complementario.

4.1.1) Extracción de RNA

Las distintas líneas celulares se sembraron en placas de 60 mm a una densidad de 5×10^5 . Al cabo del tratamiento indicado se lavaron 3 veces con PBS y se sometieron a la extracción de mRNA utilizando el reactivo Trizol de acuerdo a las indicaciones del fabricante, las cuales se detallan brevemente a continuación. A cada placa de cultivo se le agregó 1 ml de Trizol, luego de 5 min a temperatura ambiente (TA) se recogió el lisado y se transfirió a un tubo de 1,5 ml. Se adicionó 0,2 ml de cloroformo por ml de Trizol, agitándose suavemente durante 15 seg y se incubó durante 3 min, luego de esto se centrifugaron las mezclas a 10000 rpm (microcentrifuga) por 5 min a TA, lo que permitió separar la mezcla en una fase acuosa que contiene el RNA total (transparente) y una orgánica (roja). La fase acuosa se transfirió a un nuevo tubo y se adicionó 0,5 ml de alcohol isopropílico, se agitó en un vortex por 10 seg y se incubó por 10 min a TA, luego se sometió la mezcla a centrifugación durante 5 min y a 10000 rpm. Se eliminó el sobrenadante y el precipitado se lavó con 1 ml de etanol al 75%. Luego de una nueva centrifugación se retiró el sobrenadante y se dejó secar el precipitado durante 10 min a TA. Finalmente el precipitado se re-disolvió en 25 μ l de agua DEPC y se determinó la concentración RNA en un espectrofotómetro UV a 260 nm.

4.1.2) Síntesis de DNA complementario (c-DNA)

Una vez conocidas la concentración de RNA se procedió a sintetizar los c-DNA utilizando el sistema comercial ThermoScript. Esto se hizo de acuerdo con lo descrito por el fabricante:

Primero se realizó la siguiente mezcla para cada ensayo (A): se tomó 1µL de primer oligoDT, 2µg de mRNA extraído de las células con el tratamiento determinado, 2µL de 10 mM dNTP mix , agregando agua libre de RNAsas hasta completar 12 µL. Luego esta mezcla se incubó 65° C por 5 min, y se enfrió rápidamente en hielo. En paralelo se realizó la siguiente mezcla (B): 4 µL de 5X c-DNA tampón de síntesis, 1µL DTT 0,1 M, 1µL de RNAsaOUT, 1 µL agua DEPC y 1 µL de la enzima ThermoScript por ensayo. Finalmente se mezclaron 8 µL de (B) con (A) y se incubó a 55° C durante 1h. Para detener la reacción se incubó a 85° C durante 5 min.

4.1.3) Amplificación de DNA complementario, reacción en cadena de la polimerasa PCR.

Una vez sintetizado los c-DNAs respectivos, se sometieron a análisis por PCR, para los genes de estudio, utilizando el reactivo Platinum PCR supermix (Invitrogen). La mezcla de reacción para PCR se preparó de la siguiente forma: se depositó 1µL de c-DNA (Aprox. 1,5 µg), 1 µL de partidores (sentido/antisentido y 50 ng/mL de cada uno) más 22,5 µL del reactivo de PCR.

Se utilizó el siguiente programa de PCR estándar:

El programa estándar que se utilizó para el PCR fue:

- 1.- 5 min a 94° C. Desnaturación inicial
- 2.- 45 s. a 94° C. Desnaturación
- 3.- 30 s a 52° C. Apareamiento
- 4.- 1,5 min a 72° C. Extensión
- 5.- 10 min a 72° C Extensión final

Repetiendo 29 veces los pasos 2 hasta el 4.

4.2) Lisis celular, electroforesis SDS-PAGE y Western Blot.

4.2.1) Lisis celular y preparación de extractos proteicos.

Las distintas líneas celulares cultivadas en las condiciones indicadas para cada experimento, fueron incubadas en hielo con el reactivo de lisis (EDTA 1 mM, PMSF 1 mM, NEM 1 mM y SDS 0,5 % en PBS pH 7,4) de tal manera de obtener extractos celulares. En el caso de extracción para la determinación de proteínas fosforiladas, se agregó al reactivo de lisis NaF 5 mM y Ortovanadato de sodio (OVA) 1mM (concentración final). Luego se determinó la concentración de proteínas (57) y finalmente las distintas muestras se almacenaron a -20°C hasta su análisis.

4.2.2) Preparación de geles de poliacrilamida para electroforesis SDS-PAGE

Los distintos lisados celulares se mezclaron con tampón de carga (6X), llevando este a la concentración 1X, y las mezclas de proteínas se sometieron a una separación por electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS (58).

4.2.3) Western Blot

Las distintas muestras separadas como se indicó en el método anterior se electrotransferieron a una membrana de Nitrocelulosa (0,45 μ m de poro) (59). Las membranas se incubaron por 30 min con solución de bloqueo (leche descremada en polvo al 4%, Tween- 20 0,5 %, en TBS), luego se incubaron con los anticuerpos primarios respectivos diluidos 1:1000 en la solución anterior por 1 h a TA con agitación. Al cabo de este tiempo las membranas se lavaron 3 veces durante 5 min con solución de lavado (0,05 % de Tween-20 en TBS). Posteriormente las distintas membranas se incubaron con los anticuerpos secundarios correspondientes acoplados a la enzima peroxidasa de rabanita, diluidos 1:1000 en solución de bloqueo. Se repitió el lavado de las membranas como se indicó anteriormente y se detectaron los complejos antígeno-anticuerpo por quimioluminiscencia utilizando un sistema comercial (Pierce).

4.3) Preparación de bacterias competentes, transformación y purificación de plasmidios

4.3.1) Preparación de *E.coli* competentes.

Se inoculó 10 ul de bacterias *E.coli* en un tubo estéril con 50 ml de medio LB, y se incubo toda la noche a 37°C con agitación (250 rpm).

Posteriormente se inoculó 4 ml del cultivo del cultivo anterior en un matraz de 1 litro estéril con 400 ml de medio LB, se incubo nuevamente toda la noche a 37°C con agitación.

Luego de crecer bacterias se alicuotó el volumen en tubos estériles de 50 ml y se dejaron en hielo durante 5 minutos, al cabo de este tiempo se centrifugó durante 7 minutos a 3000 rpm (microcentrifuga). Se resuspendió cada precipitado de bacterias en CaCl₂ (60 mM) frío y se dejaron en hielo durante 30 minutos, luego se centrifugó por 5 minutos a 3000 rpm, y nuevamente se resuspendió cada precipitado con 2 ml de CaCl₂ frío, se alicuotaron 250 µl en tubos estériles y se congelaron inmediatamente a -80°C hasta su uso.

4.3.2) Transformación de *E.coli* competentes.

Para la transformación se usó el método de estrés térmico. Brevemente, se agregó 10 ng de DNA plasmidial a un tubo con bacterias competentes previamente descongeladas y se mantuvo en hielo durante 10 min. A continuación se sometieron las mezclas de DNA y bacterias 42°C durante 2 min y luego se enfrió rápidamente en hielo. Se agregó a cada tubo 1 ml de LB y se incubó durante 1h a 37°C con agitación. Finalmente se sembraron las bacterias en una placa de LB-Agar con ampicilina (100 µg/ml) y se incubó a 37°C durante 12 a 16 h.

4.3.3) Purificación de plasmidios.

Se procedió a la purificación de plásmidos indicados desde las colonias resistentes a Ampicilina del punto anterior. Para ello se utilizó el sistema comercial PureLink™ HiPure Plasmid FP (INVITROGEN) de acuerdo a las indicaciones del fabricante. Se determinó la concentración de DNA plasmidial en un espectrofómeto UV (longitud de onda 260 nm), y se observó las características electroforética, en geles de agarosa al 1%.

4.4) Transfección de plasmidios de expresión y asociados a genes reporteros, medición de actividad luciferasa.

4.4.1) Cultivo de células y transfección de plasmidios

Se sembraron 4×10^4 células por pozos en placas de 24 pocillos, después de 24 h se lavaron tres veces las células con PBS, y se les agregó 0,3 mL de medio DMEM con 5% SFB. Paralelamente se preparó en un tubo de 1,5 ml una solución compuesta por plásmidos, en la concentración adecuada para los ensayos, y DMEM sin suero, luego a esta mezcla se le agregó protamina (1mg/mL) en la razón 4 μ g: 1 μ g DNA. Se esperó 5 min y se agregó el reactivo de transfección TjF en la razón 5 μ g: 1 μ g DNA, a continuación se incubó la mezcla durante 15 min a temperatura ambiente (ver en esquemas Figura 2). Finalmente se agregó 20 μ L de la mezcla final a cada pozo y se incubó durante 4h a 37°C, esta mezcla de transfección se retiró y se agregó medio de cultivo completo incubando por 24 h adicionales a 37°C. Al cabo de este último período las células se estimularon con TGF- β 1 (5 ng/ μ L) o con el vehículo (HCl 4 mM BSA 4%) por 24h (ver en esquemas E.1 y E.2). Una vez concluido el tiempo de estímulo las células se lavaron con PBS y congelaron a -20°C para la posterior determinación de actividad luciferasa y β -galactosidasa.

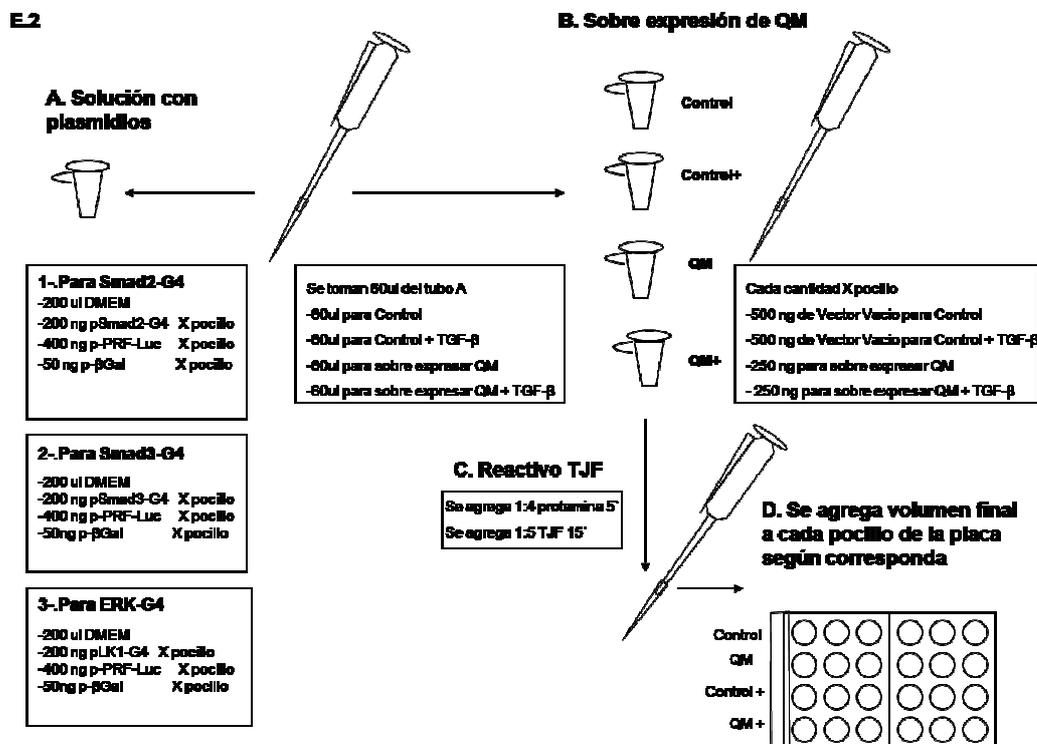
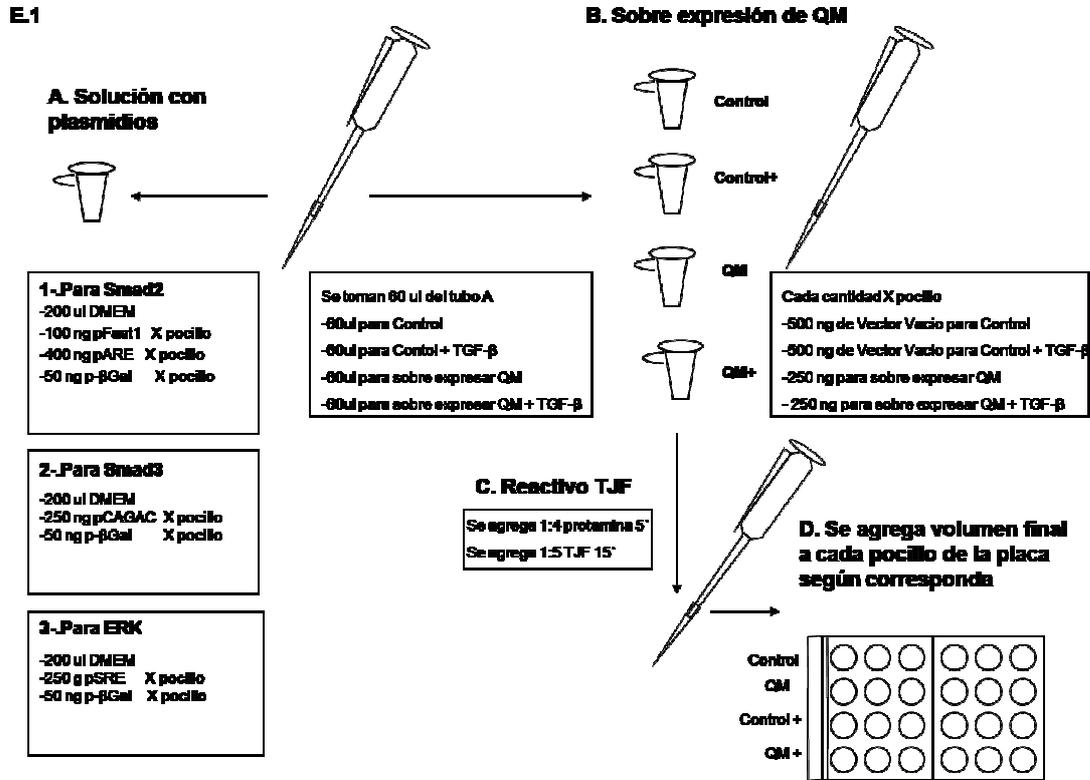
4.4.2) Preparación de liposomas para la transfección celular, reactivo TjF.

En un tubo se mezclaron 10 mg de DC-Colesterol (SIGMA), 10 mg de DOPE (SIGMA) y 1 ml de etanol a 37°C y esta mezcla se filtró en un cono con diámetro de 0,5 μ m. Finalmente se agregaron 50 μ L de la mezcla resultante por cada ml de agua estéril para obtener el reactivo de transfección a una concentración de 1 mg/mL listo para su uso.

4.4.3) Medición de actividad luciferasa mediante luminómetro.

Se agregó 50 μ L de solución de lisis comercial (Promega) por pozo y se incubó durante 5 minutos, luego se determinó la actividad de luciferasa mezclando 5 μ L de lisado más 10 μ L de sustrato Luciferasa (Promega) en un tubo de polipropileno. Se midió la emisión de luz durante 20 segundos en un luminómetro. La normalización de transfección se realizó gracias a otro plasmidio reportero p-CMV5-LacZ (actividad β -galactosidasa).

Figura 2(A) Esquema de procedimiento de transfección celular



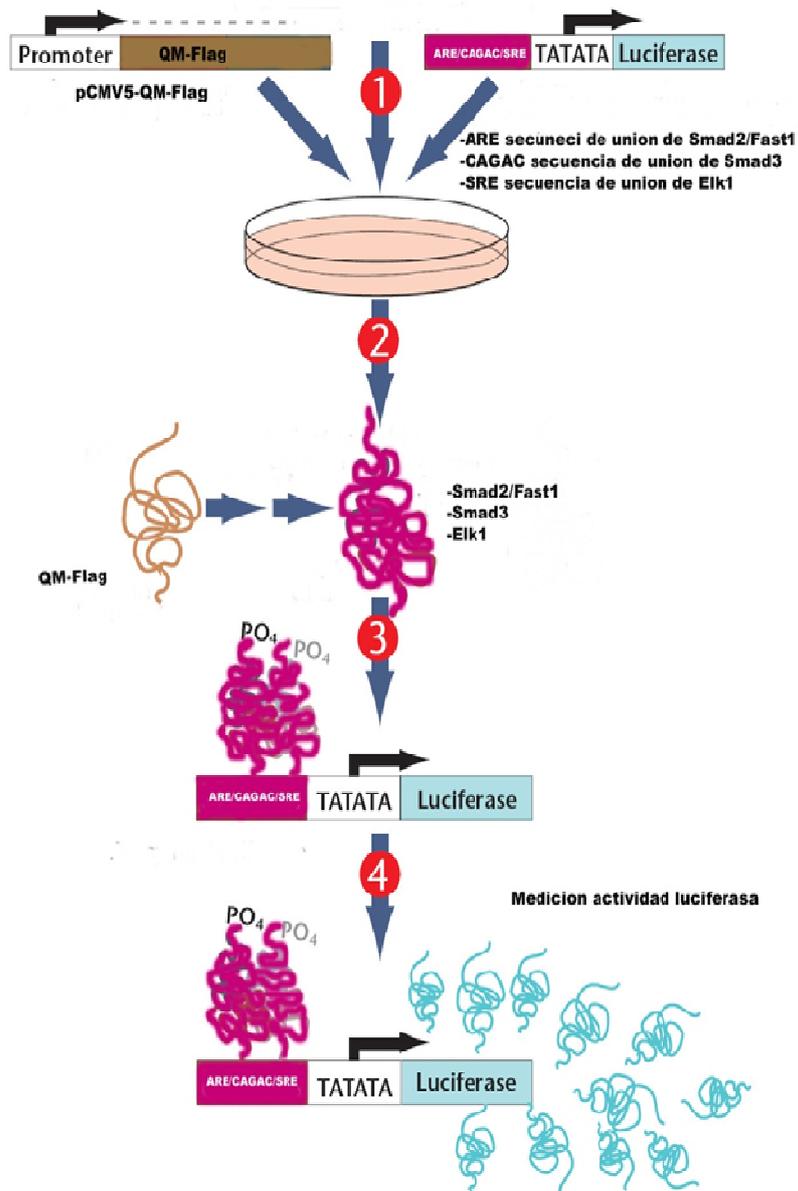


Figura2(B): Funcionamiento de co-transfección de plásmidos reporteros y vector de expresión QM-Flag.

(1) Se co-transfectan en primer lugar los plásmidos de expresión pCMV5-QM-Flag y los plásmidos reporteros con la secuencia específica para cada caso (ARE-Fast1/Smad2, CAGAC-Smad3, SRE-Elk1/ERK). (2) Expresión de la proteína de interés QM-Flag. (3) Si es capaz de modular a los factores Smad2/Fast1, Smad3 o Elk1 estos se unirán a la secuencia consenso específica para cada uno. (4) Se expresa el gen de luciferasa. La capacidad de modular QM a los factores es detectada por la actividad luciferasa.

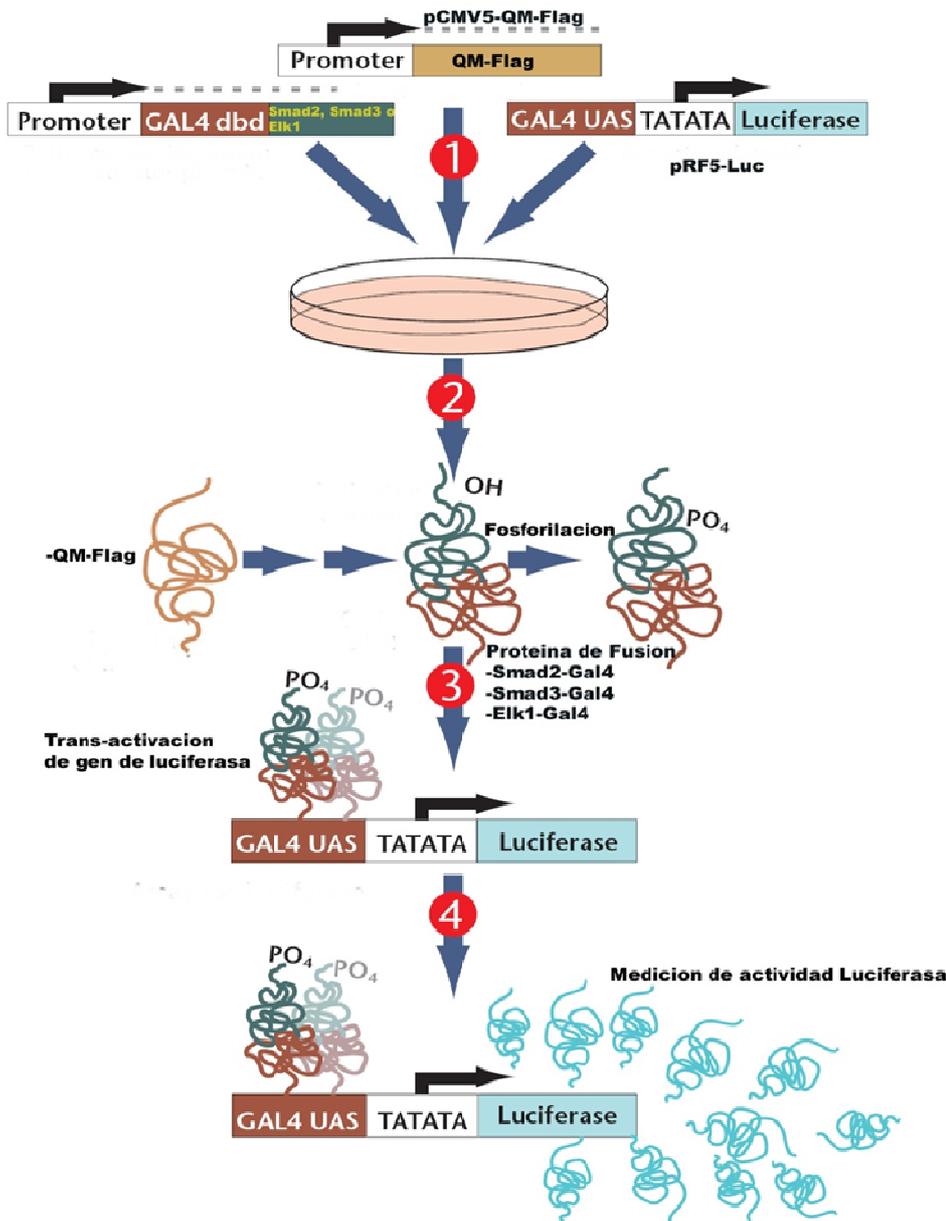


Figura2(C): Funcionamiento de co-transfección de los vectores de expresión QM-Flag, plásmido de proteína de fusión (Smad2-Gal4, Smad3-Gal4, Elk1-Gal4) y plásmido reportero (Luciferasa).

(1) En primer lugar se co-transfectan los plásmidos de expresión pCMV5-QM-Flag, el plásmido reportero con la secuencia específica para unión de Gal4, y el plásmido que contiene a la fusión de los factores de interés (Smad2, Smad3 y Elk1) con el dominio DBD de Gal4. (2) Se expresan la proteína QM-Flag y la proteína de fusión (Smad2-Gal4, Smad3-Gal4 o Elk1-Gal4). (3) Si QM es capaz de modular la fosforilación de la proteína de fusión esta es capaz de unirse a la secuencia de unión de Gal4. (4) Trans-activación del gen de luciferasa. La capacidad de inducir la fosforilación por parte de QM es detectada por la actividad luciferasa.

4.4.4) Metodología para la transfección de RNA de interferencia

4.4.5) Cultivo de células y transfección de siRNA

Se sembraron células PDV o PC3 en placas de 6 pocillos a una densidad de 5×10^6 al segundo día las células fueron transfectadas utilizando el reactivo comercial EscortV (Sigma) de acuerdo a las indicaciones del fabricante:

Se preparó una solución A mezclando de 60 μ L Tampón EscortV más 9 μ L del reactivo Escort V, luego se incubó a temperatura ambiente durante 5 min. Paralelamente se preparó la solución B, la cual consistió en 60 μ L de DMEM más 8 μ L de siRNA QM (4 μ M) o siRNA control en la misma concentración anterior. Luego de esto, la solución A se mezcló con la solución B, y se incubó a temperatura ambiente durante 15 min para finalmente agregar el total del volumen sobre 1 pocillo de la placa. La concentración final de siRNA fue de 80 nM. Se incubó durante 4h a 37°C, y se cambió el medio de transfección por medio fresco, se esperó 48 h y se determinó los niveles de QM por Western blot.

4.4.6) Migración celular, ensayo de heridas.

Para realizar este ensayo se sembraron 10^5 células en placas de 24 pocillos y se dejaron crecer a confluencia. Posteriormente se realizó una herida en el centro del cada pocillo utilizando una punta de pipeta de 200 μ L. Luego las células se lavaron tres veces con PBS, se les agregó medio completo y se estimularon con TGF- β 1 (5 ng/mL) durante 24 h. Después de este tiempo las células se lavaron con PBS y se fijaron con metanol durante 5 min. a TA. Finalmente se tiñeron con cristal violeta 0,01 % para ser fotografiadas utilizando una cámara digital acoplada a un microscopio invertido.

5) Resultados

5.1) Estandarización de la reacción de RT- PCR de las secuencias del gen QM de ratón y humano y del gen constitutivo GADPH.

5.1.1) Estandarización de la reacción de RT-PCR de los genes QM de ratón y GADPH

Con el fin de determinar el numero de ciclos adecuado para cuantificar la expresión de los genes de QM y GADPH es que decidimos realizar el siguiente procedimiento. Luego de sembrar en placas de 100mm en medio con suero F-12 células PDV y llevar a confluencia se extrajo el RNA y se obtuvo el DNA complementario de los RNA mensajeros las cuales se sometieron a análisis por *PCR*, como se describe en *Métodos*.

La Figura 3 muestra la cantidad de ciclos necesarios para una comparación semi cuantitativa óptima de amplificación de transcrito del gen QM y el gen constitutivo GADPH.

Como se puede apreciar en la Figura, ambas amplificaciones son óptimas al cabo de 30 ciclos.

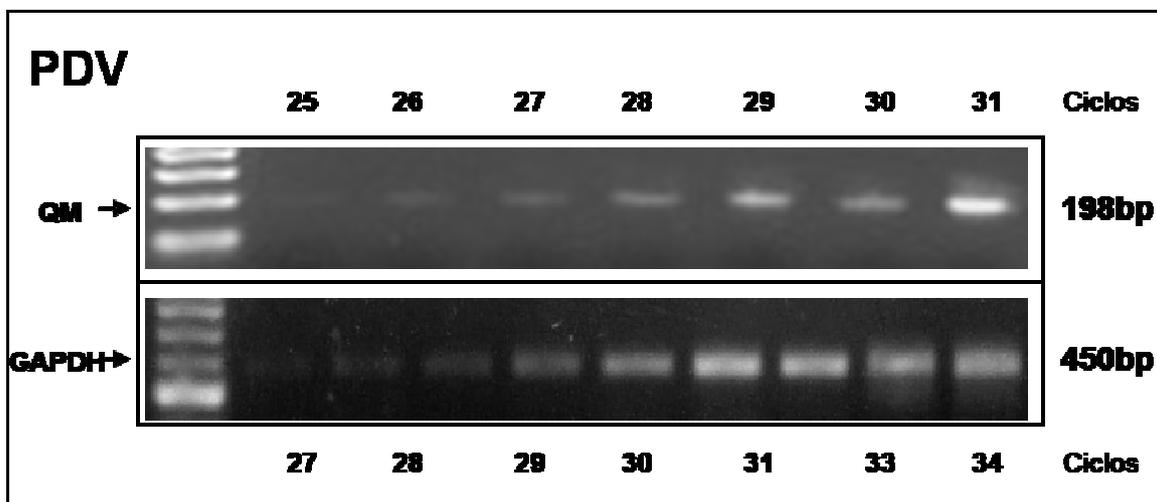


Figura 3: Determinación del N° del numero de ciclos optimo para la amplificación del transcrito de los genes QM ratón (superior) y GAPDH (inferior). RT-PCR. Gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. Se observa que luego de 30 ciclos la señal comienza a alcanzar el nivel de saturación en ambos casos.

5.1.2) Estandarización de la reacción de RT-PCR de los genes QM de humano y GADPH.

En segundo lugar determinamos el número de ciclos adecuados para realizar un análisis semi-cuantitativo de la expresión del gen QM y GADPH en la línea celular humana PC3. Para esto sembramos 10^5 células en placas de 100 mm en medio con suero DMEM se llevó a confluencia, se extrajo el RNA y se hizo un *RT-PCR* como se describe en Métodos.

La Figura 4 muestra también que a 30 ciclos es el número óptimo de ciclos para una comparación semi cuantitativa del transcrito del gen QM humano

El resultado de ambas curvas de ciclos nos permitió tomar la decisión de realizar todas las amplificaciones a 30 ciclos.

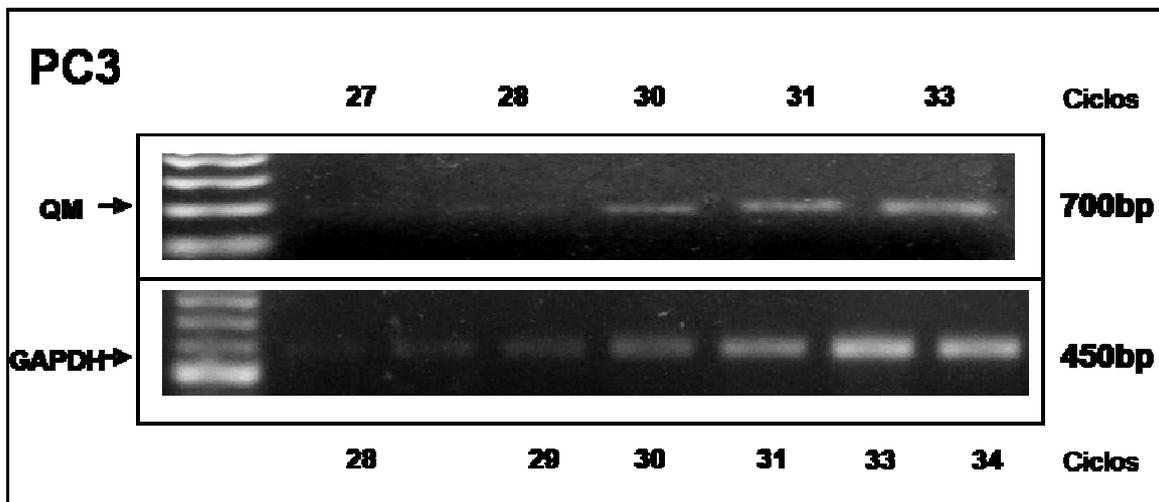


Figura 4: Determinación del N° del número de ciclos óptimo para la amplificación del transcrito de los genes QM humano (superior) y GAPDH (inferior). *RT-PCR*. Gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. Se observa que luego de 30 ciclos la señal comienza a alcanzar el nivel de saturación en ambos casos.

5.2) Expresión del gen QM y de la proteína QM en células transformadas

5.2.1) Expresión de mRNA y niveles de la proteína QM en distintos tipos celulares del modelo carcinogénico de piel de ratón.

Con el fin de determinar si existían diferencias en los niveles de expresión del gen QM sometidas a estímulos con TGF- β 1 en las líneas celulares MCA-3D, PDV y CarC decidimos realizar mediciones semi-cuantitativas para el transcrito mediante *RT-PCR* en las tres líneas celulares.

5.2.2) Expresión del transcrito QM en las líneas celulares MCA-3D, PDV, CarC.

Se sembró en placas de 100 mm cada tipo celular en medio con suero, al segundo día se estimuló con TGF- β 1, se llevó a confluencia para luego extraer el RNA y se medio mediante una reacción *RT-PCR*, como se describe en Métodos.

La Figura 5 se muestra que la expresión del gen QM es similar en las distintas líneas celulares analizadas tanto a nivel basal como luego de un estímulo con TGF- β 1.

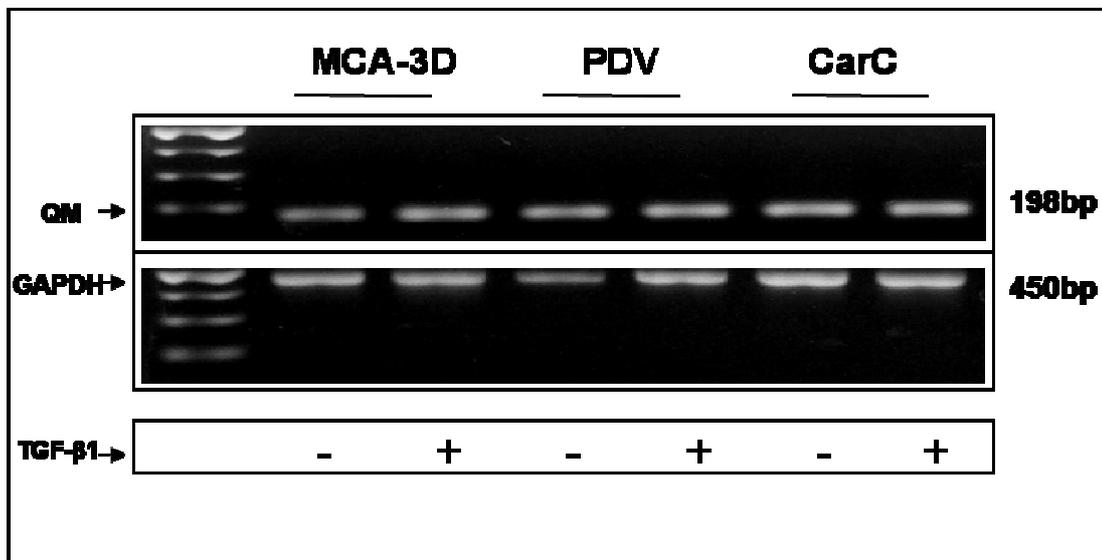


Figura 5: Expresión de QM en líneas celulares del modelo carcinogénico. *RT-PCR* Gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. Se observa que la expresión es similar en las tres líneas celulares MCA-3D (Normal), PDV (malignidad intermedia), CarC (malignidad alta). La expresión no es alterada en respuesta a TGF- β 1.

5.2.3) Niveles de la proteína QM en las líneas celulares MCA-3D, PDV, CarC.

El paso siguiente fue analizar los niveles de proteína QM en los tres tipos celulares (MCA-3D, PDV y CarC) luego de un estímulo con TGF- β 1, para determinar si existen diferencias a su respuesta. Para esto se sembraron células de los tres tipos en placas de 100 mm (200.000 células por placa), al segundo día se estimuló con TGF- β 1 por 30 minutos, según lo descrito en la sección *Metodología* y al cabo del tratamiento se determinaron los niveles de QM mediante *western blot*.

La Figura 6 muestra los niveles de la proteína QM en los distintos tipos celulares estudiados. Se observa que las células PDV presentan un nivel mayor de la proteína en comparación con las células CarC, las que muestran un nivel intermedio de proteína. Las células MCA-3D presentan el nivel más bajo de proteína. A su vez, el tratamiento con TGF- β 1 no produjo un aumento en los niveles de proteína QM en ninguna de las líneas celulares analizadas.

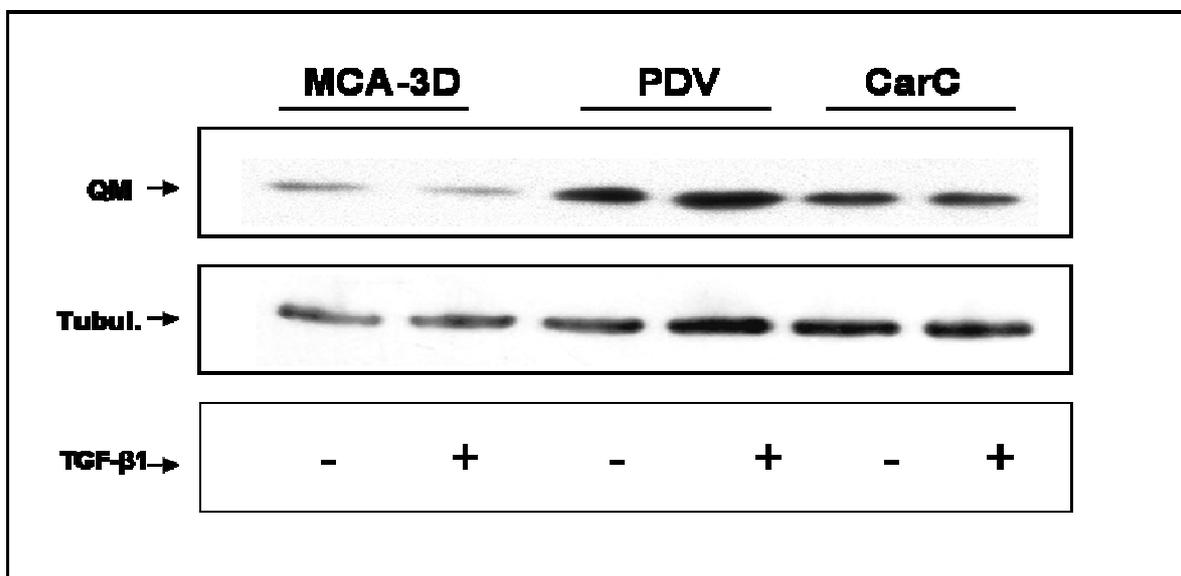


Figura 6: Niveles de proteína QM en líneas celulares del modelo de carcinogénesis química. *Western blot*, revelado con reactivo ECL. Se puede apreciar que los niveles de proteína de las células MCA-3D (normal) son los más bajos comparado con las otras dos líneas celulares. Las células PDV (malignidad intermedia) presentan los niveles más altos de las tres líneas celulares incluso que la línea CarC (malignidad alta). Los niveles de proteína no cambiaron en respuesta a TGF- β 1

5.2.4) Expresión del mRNA de QM en línea celular humana de cáncer prostático PC3.

En este trabajo también realizamos estudios en la línea celular humana PC3. El primer paso fue analizar si QM se expresa en esta línea celular y si esta expresión se altera por la presencia de TGF- β 1. Para esto se procedió en forma similar a lo antes descrito donde se hizo una medición semi-cuantitativa de la expresión del gen QM mediante la técnica de *RT-PCR*.

La Figura 7 muestra que la línea celular de cáncer de próstata humana PC3 expresa el gen de QM. Además podemos notar que el tratamiento con TGF- β 1 no modificó la expresión del gen de QM en esta línea celular, al igual a lo que se observó en las líneas celulares del modelo experimental de carcinogénesis química de piel de ratón.

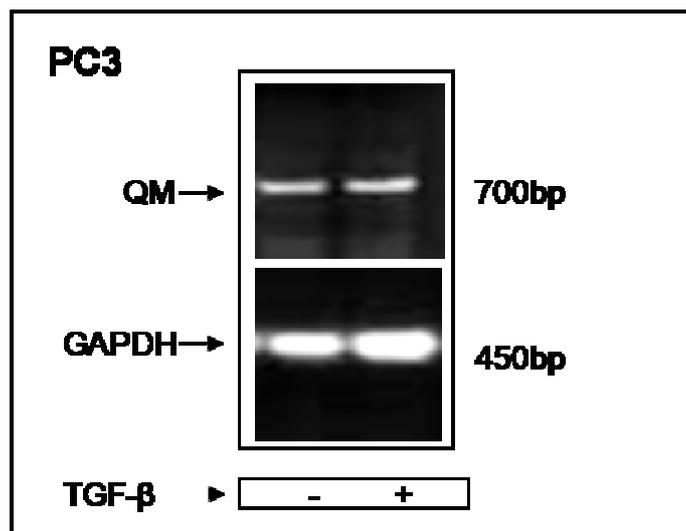


Figura 7: Expresión QM en células de cáncer prostático PC3. *RT-PCR*. Gel de agarosa al 1% tinción con bromuro de etidio. Se observa expresión del gen de QM, la cual no se ve afectada por la presencia de TGF- β 1

5.3) Expresión de QM-Flag, uso de vector pCMV5-QM-Flag en células COS-7.

Dado que parte de nuestros análisis sobre el papel de QM en las rutas de señalización de TGF- β 1 se realizaron por sobre-expresión de QM, nos pareció indicado determinar la expresión ectópica de esta proteína. Para ello utilizamos la línea celular COS-7, la cual es una línea celular transformada que permite obtener un buen nivel de expresión de proteínas. Sométimos un cultivo de células COS-7 a transfección con el plasmidio pCMV5-QM-Flag, y determinamos la expresión de QM mediante *western blot* (*Metodología*) utilizando un anticuerpo que reconoce el epítipo Flag.

Como se observa en la Figura 5, se obtuvo la expresión de una proteína con una separación electroforética correspondiente a una proteína de un peso molecular mayor a 30 kD, lo que concordó con lo esperado, dado que el peso molecular descrito para QM es de 28kD. No se observó la proteína en el carril correspondiente a las células transfectadas con el vector pCMV5 vacío.

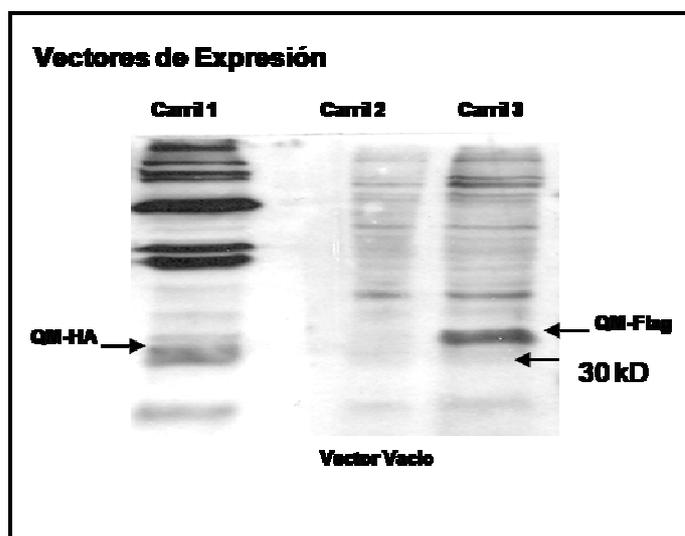


Figura 8: Expresión del vector pCMV5-QM-Flag. *Western blot* revelado con reactivo ECL. Marcador de peso molecular 30 kD. Carril 1 vector que contiene QM-HA (pcDNA-QM-HA). Carril 2 Vector vacío (pCMV5). Carril 3 vector con QM-Flag (pCMV5-QM-Flag) se ve una señal nítida de la proteína.

5.4) Estudio del efecto de QM sobre las vías de TGF- β 1.

De acuerdo a los antecedentes QM es capaz de unirse a ciertos tipos de factores de transcripción. Es por esto que uno de nuestros objetivos principales fue determinar si QM tiene algún papel en las vías de señalización de Smad2, Smad3, y ERK1,2 de TGF- β 1 en distintas líneas celulares.

5.4.1) Estudio del efecto de QM sobre las vía de TGF- β 1 en células COS-7.

5.4.1.1) Efecto de la sobre-expresión de QM sobre la actividad de la vía Smad2 de TGF- β en células COS-7.

Comenzamos nuestro trabajo utilizando la línea celular COS-7. Para determinar la actividad de la vía Smad2 co-transfectamos las células con una forma activa del receptor tipo 1 de TGF- β 1 (ALK5a) y los sistemas reporteros para las distintas rutas de transducción analizadas. Las células COS-7 que hemos utilizado no responden a TGF- β 1, posiblemente porque no expresan un nivel alto de los receptores para el factor o éstos se encuentren mutados, razón por la cual utilizamos como estrategia experimental la co-transfección con ALK5a para estimular las vías de TGF- β 1 en estas células.

Nuestra primera ruta de señalización de TGF- β 1 a analizar fue la de Smad2. La Figura 9 muestra un aumento en la actividad de luciferasa del sistema reportero ARE/Fast1 cuando se co-transfectó con ALK5a. Al sobre-expresar QM se observó un aumento en la actividad basal de este reportero, efecto que no fue estimulado significativamente con la co-transfección con el receptor activo.

La trans-activación de la proteína híbrida Smad2-Gal4 nos permite medir si los niveles de fosforilación de Smad2 se ven afectados por la presencia de la proteína QM ectópica. Se observa en la Figura que QM aumenta la trans-activación de la proteína de fusión Smad2-Gal4. Este efecto es similar al observado en respuesta a TGF- β 1 (ALK5a). Sin embargo, el efecto de QM en conjunto con ALK5a es menor que el de ambos por si solos.

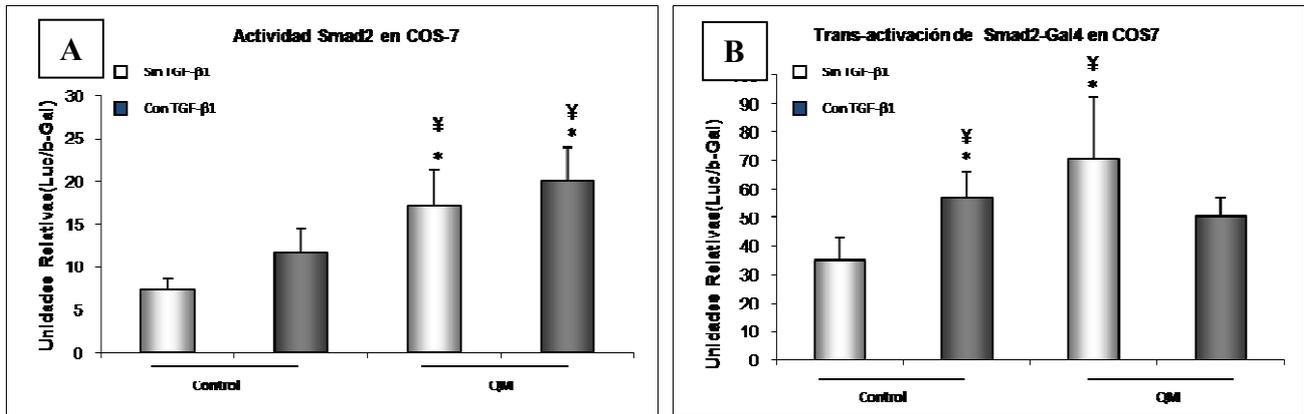


Figura 9: Efecto de sobre-expresión de proteína QM sobre la vía de Smad2 en respuesta a TGF-β1. Cuentas de luz de la actividad luciferasa y β-galactosidasa medida durante 20 segundos en un luminómetro. +/- Desviación estandar. (*) $p \leq 0,05$ (A) Actividad de la vía Smad2 (reportero Fast1/ARE-Luc). Se observa un aumento significativo (*) de la actividad al sobre-expresar QM al comparar con los controles (¥). El estímulo con TGF-β1 al sobre-expresar QM aumenta la actividad (*) de Smad2 en al comparar con los controles. (B) Trans-activación de proteína de fusión Smad2-Gal4. El estímulo con TGF-β1 aumenta la actividad (*) al comparar con la situación control (¥). También se observa un aumento en la actividad (*) al sobre-expresar QM comparado con los controles (¥).

5.4.1.2) Efecto de la sobre-expresión de QM sobre la actividad de la vía Smad3 de TGF-β en células COS-7.

Nuestro siguiente paso fue analizar si la sobre-expresión de QM podría regular la activación de la vía de Smad3 por TGF-β1. Como se muestra en la Figura 10(A). La presencia receptor ALK5a aumenta la actividad de la vía de Smad3 analizada por el reportero CAGAC-Luc comparada con la situación control. A su vez que la sobre-expresión de QM provocó un aumento de la actividad de este reportero en presencia del receptor activado.

5.4.1.3) Efecto de la sobre-expresión de QM sobre la actividad de la vía ERK1,2 de TGF- β en células COS-7.

A continuación nos interesó determinar si expresión ectópica de QM podría modificar la activación de la vía de ERK1,2 por TGF- β 1. Para ello utilizamos como reportero el plasmido SRE-luc que contiene las secuencias de respuesta al factor de transcripción Elk1, el cual está activado por la vía de MAP quinasa. Como se observa en la Figura 10(B) la cotransfección con ALK5a provocó un significativo aumento en la actividad del reportero en comparación con la situación control. Al co-transfectar con QM se observó un fuerte aumento de la actividad del reportero SRE-Luc, la cual no aumenta por la presencia del receptor activado.

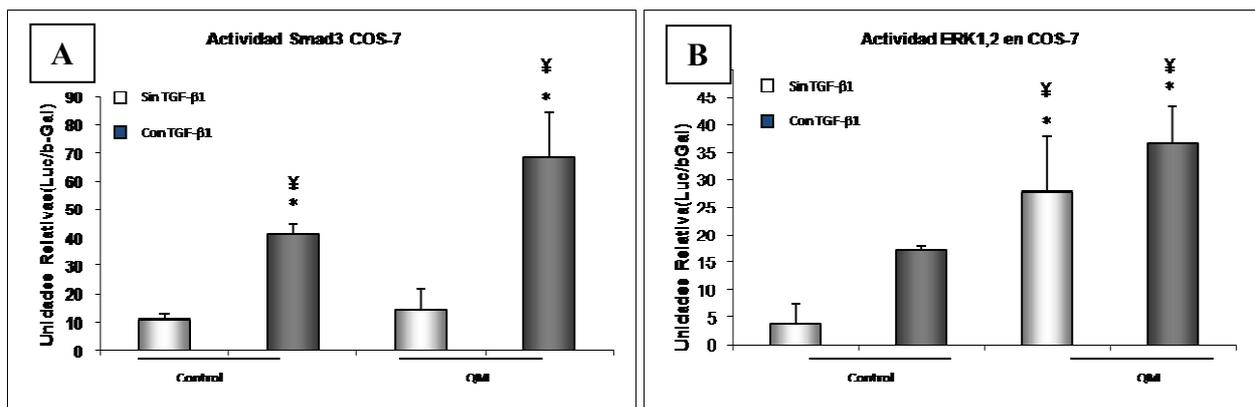


Figura 10: Efecto de sobre-expresión de proteína QM sobre la vía de Smad3 y ERK1,2 en respuesta a TGF- β 1. Cuentas de luz de la actividad luciferasa y β -galactosidasa medida durante 20 segundos en un luminómetro. (A) Actividad de la vía Smad3 (reportero CAGAC-Luc). Se observa un aumento de la actividad en respuesta a TGF- β 1 comparado con el control (¥). El estímulo con TGF- β 1 en presencia de QM aumenta la actividad de Smad2 significativamente (*) cuando se compara con el control con TGF- β 1(¥). (B) Actividad de la vía ERK1,2 (reportero SRE-Luc). Se observa un aumento significativo (*) de la actividad ERK1,2 en presencia de QM. TGF- β 1 y QM aumentan la actividad de la vía al con los controles (¥).

5.4.2) Cinética de la expresión de las proteínas fosforiladas Smad2,3 y ERK1,2 en respuesta a estímulos con TGF- β 1.

La siguiente parte de nuestro trabajo fue determinar el efecto de QM sobre las vías de TGF- β 1 en las líneas celulares de ratón PDV y humana PC3. Ambos tipos celulares responden al tratamiento con el factor dado que poseen receptores para TGF- β 1.

Esto se puede apoyar en el hecho de que tanto en PDV como en PC3 el tratamiento con TGF- β 1 desencadena la fosforilación y por tanto activación de las vías estudiadas, como lo demuestran las Figura 11(A y B).

Nuestros resultados muestran que el tratamiento con el factor de crecimiento provocó un aumento en la fosforilación de ERK1,2 Smad2 y Smad3 en los dos tipos celulares, coincidiendo con un nivel de activación notorio en todos los casos a los 30 min de tratamiento, aunque las cinéticas de activación fueron distintas en PDV comparadas con PC3.

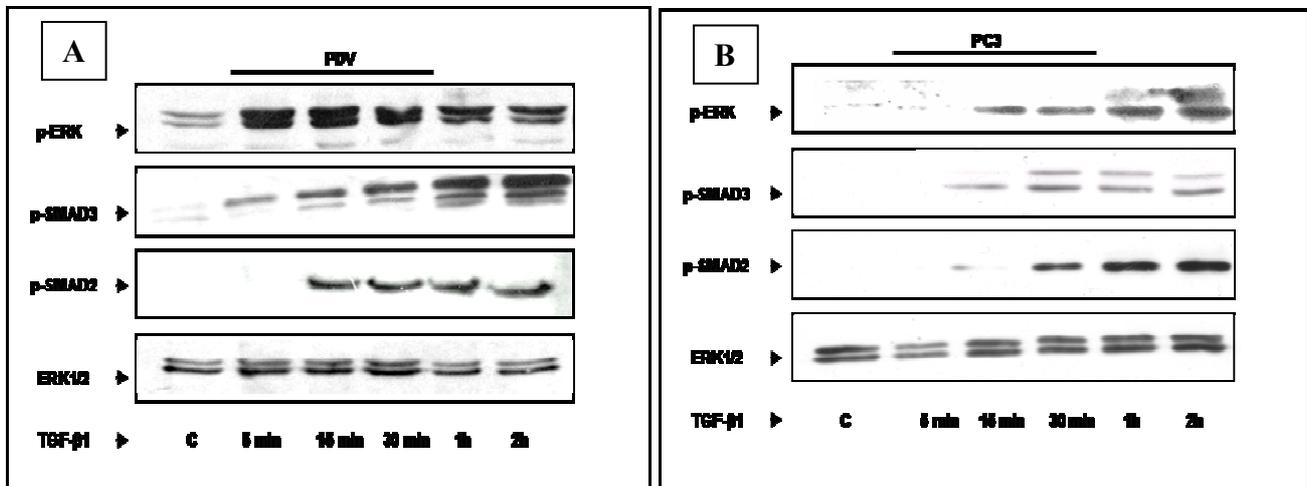


Figura 11: Cinética de expresión de las proteínas Smad2,3 y ERK1,2 activadas en respuesta a TGF- β 1. *Western Blot* revelado con reactivo ECL. (A) Niveles de proteínas fosforiladas Smad2, Smad3 y ERK en células PDV. Se observa que transcurridos 15 minutos están presentes todas las proteínas en respuesta a TGF- β 1. (B) Niveles de proteínas fosforiladas Smad2, Smad3 y ERK en células PC3. Se observa que transcurridos 30 minutos están presentes todas las proteínas en respuesta a TGF- β 1.

5.4.3) Estudio del efecto de la proteína QM sobre la vía de TGF- β en células PC3.

Una vez determinada la capacidad de TGF- β 1 de inducir la activación de las vías de señalización indicadas, nos enfocamos en analizar el papel de QM sobre estas rutas de transducción de señales. Para esto se utilizaron dos estrategias distintas. Con una

i) determinamos la actividad de la vía *in situ* mediante el uso de genes reporteros de luciferasa. ii) Se midieron los niveles de proteínas fosforiladas mediante la técnica de Western Blot.

5.4.3.1) Efecto de la sobre-expresión de QM sobre la actividad de la vía Smad2 de TGF- β en células PC3.

Se determinó si la expresión ectópica de QM alteraría la actividad de Smad2. Para determinar la actividad de este factor transcripcional se utilizó el sistema reportero Fast1/ARE-Luc, y se comparó con los controles luego de un estímulo con TGF- β 1.

Como muestra la Figura 12(A), un estímulo de TGF- β 1 aumenta considerablemente la actividad de la vía Smad2 y su efecto es contrareestado cuando sobre-expresamos la proteína QM. Cuando determinamos el efecto de QM sobre esta vía de señalización utilizando el sistema de trans-activación del híbrido simple para Smad2 (Smad2-Gal4/pRF5-luc), observamos que un estímulo de TGF- β 1 aumenta la trans-activación de este sistema reportero, efecto que fue inhibido por la cotransfección de la proteína QM (Figura 12(B)) en forma similar a lo obtenido con el sistema de genes reporteros Fast1/ARE-Luc.

5.4.3.2) Efecto de la sobre-expresión de QM sobre los niveles de proteína p-Smad2

El siguiente paso fue determinar si el fenómeno observado se relacionaba con los niveles de fosforilación de Smad2 bajo el estímulo de TGF- β 1, observamos mediante el análisis de *western blot* que la sobre-expresión de QM provocó una disminución de los niveles de fosforilación de Smad2 inducidos por el factor de crecimiento, en comparación con la situación control (Figura 13).

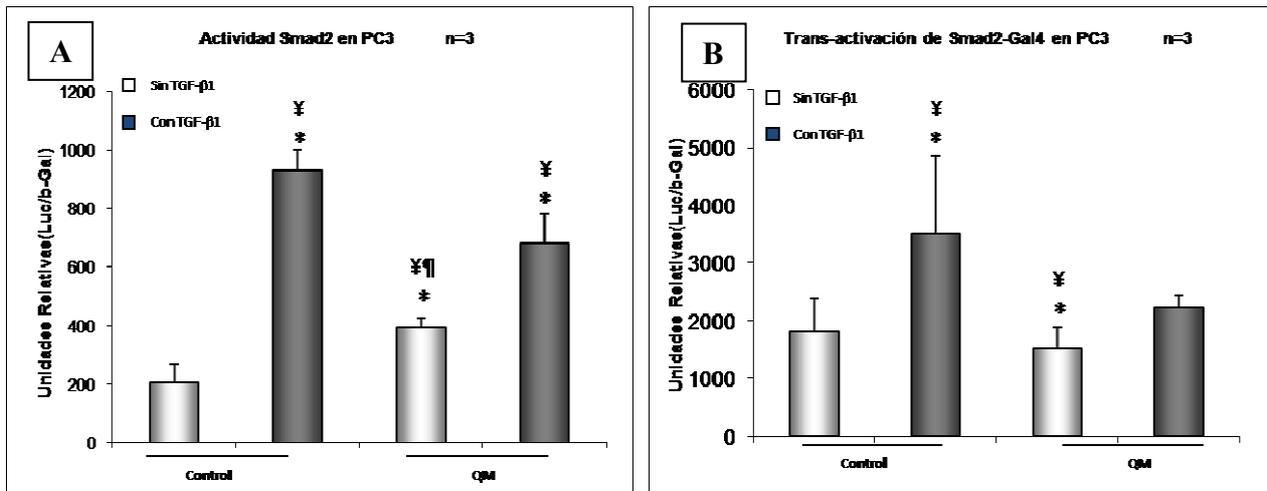


Figura 12: Efecto de sobre-expresión de proteína QM sobre la vía de Smad2 en respuesta a TGF-β1. Cuentas de luz de la actividad luciferasa y β-galactosidasa medida durante 20 segundos en un luminómetro. +/- Desviación estándar. (*) $p \leq 0,05$. (A) Actividad de la vía Smad2 (reportero Fast1/ARE-Luc). Se observa un aumento significativo (*) de la actividad en respuesta a TGF-β1 al comparar con el control (¥). Al sobre-expresar QM la actividad de la vía es significativamente menor al comparar con el control con TGF-β1 (¥). La actividad de la vía es también significativamente menor (*) al comparar con el efecto de QM y TGF-β1 juntos (¶). La actividad de la vía es significativamente menor (*) al comparar el efecto de QM en presencia de TGF-β1 con el control con TGF-β1 (¥). (B) Trans-activación de proteína de fusión Smad2-Gal4. Se observa un aumento significativo (*) de la actividad en respuesta a TGF-β1 al comparar con el control (¥). Al sobre-expresar QM se muestra una actividad significativamente (*) menor en comparación a la actividad que muestra el control con TGF-β1 (¥).

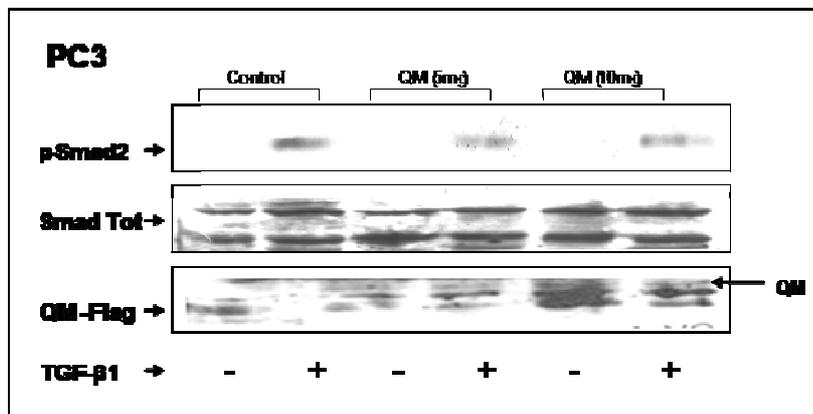


Figura 13: Efecto de la sobre expresión de QM sobre niveles de proteína p-Smad2. Western Blot revelado con reactivo ECL. Pesos Moleculares 58kD p-Smad2, QM-Flag 30 kDa. Se transfectoron dos concentraciones del vector pCMV5-QM-Flag (5mg/ul y 10mg/ul). Se observa en la figura que la proteína p-Smad2 aparece solo en respuesta a TGF-β1. Al sobre-expresar QM disminuyen los niveles de p-Smad2.

5.4.3.3) Efecto de la sobre-expresión de QM sobre la actividad de la vía Smad3 de TGF- β en células PC3.

Nuestro siguiente paso fue analizar si la sobre-expresión de QM podría regular la activación de la vía de Smad3 por TGF- β 1. Para esto se realizó, un experimento similar al anterior donde se utilizaron dos estrategias experimentales distintas. Con una determinamos la actividad de la vía por medio de genes reporteros de luciferasa (CAGAC-Luc) y el sistema de mono-híbrido para Smad3 (Smad3-Gal4/pRF5-luc), con la segunda estrategia, , determinamos los niveles de fosforilación de Smad3 mediante *western blot*.

Según muestra la Figura 14(A), la vía Smad3 se activa con un estímulo de TGF- β 1. La sobre-expresión de la proteína QM provocó un aumento de la actividad de la vía estimulada por el factor en relación a la situación control.

La Figura 14(B) muestra el efecto que tiene QM sobre la trans-activación de Smad3-Gal4, aumentando considerablemente su actividad en presencia de TGF- β 1, lo cual coincide con los resultados de actividad de Smad3.

5.4.3.4) Efecto de la sobre-expresión de QM sobre los niveles de proteína p-Smad3

Posteriormente decidimos determinar si la sobre-expresión de QM modulaba el estímulo de TGF- β 1 sobre la fosforilación de Smad3. Como se observa en la Figura 15 la sobre-expresión de QM provocó un aumento en el grado de fosforilación de Smad3 estimulado por TGF- β 1.

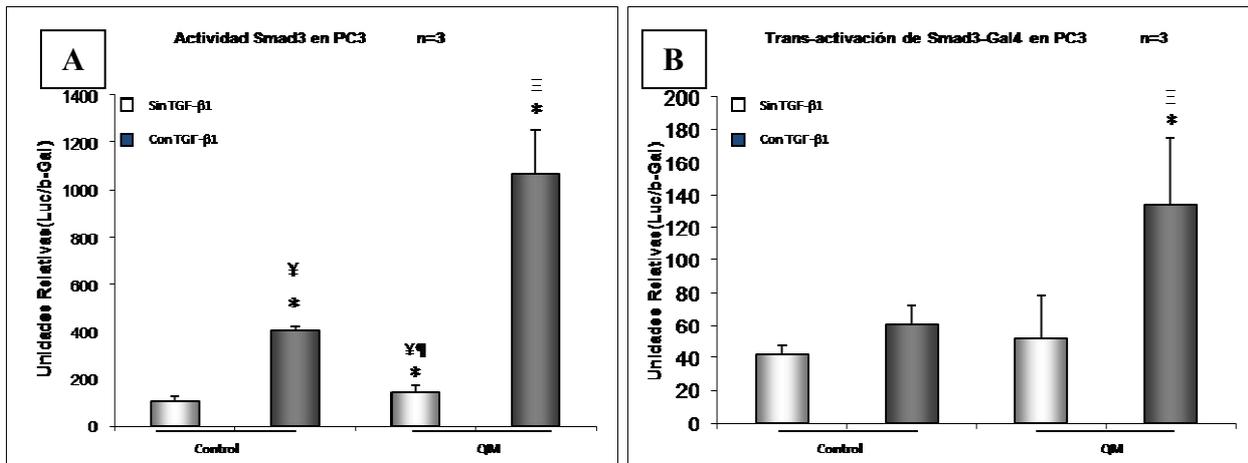


Figura 14: Efecto de sobre-expresión de proteína QM sobre la vía de Smad3 en respuesta a TGF-β1. Cuentas de luz de la actividad luciferasa y β-galactosidasa medida durante 20 segundos en un luminómetro. +/- Desviación estándar. (*) $p \leq 0,05$. (A) Actividad de la vía Smad3 (reportero CAGAC-Luc). Se observa un aumento significativo (*) de la actividad en respuesta a TGF-β1 en comparación al control (¥). Al sobre-expresar QM la actividad de la vía disminuye (*) al comparar con el control con TGF-β1 (¥). La actividad de la vía también es significativamente menor (*) al comparar con el efecto de QM y TGF-β1 en conjunto (¶). El efecto de QM y TGF-β1 en conjunto es significativamente mayor (*) al comparar con los controles y con el efecto de QM por si solo (Ξ). (B) Trans-activación de proteína de fusión Smad3-Gal4. Se observa un aumento significativo (*) de la actividad en respuesta a TGF-β1 y al sobre-expresar QM cuando se compara con los controles y con el efecto de QM por si solo.

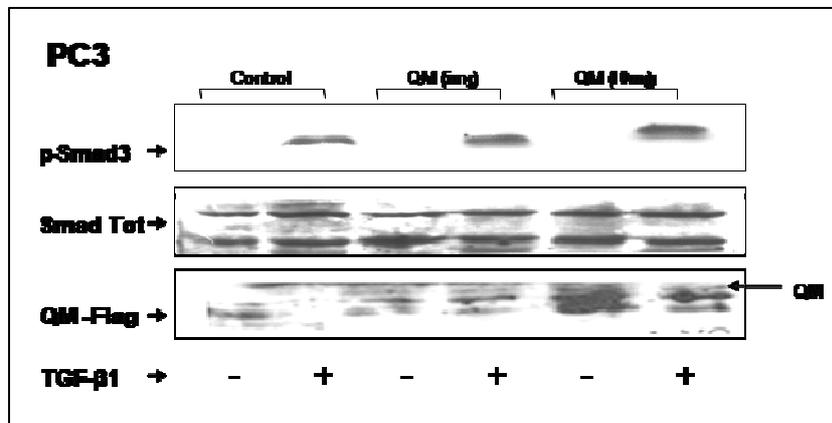


Figura 15: Efecto de la sobre expresión de QM sobre niveles de proteína p-Smad3. Western Blot revelado con reactivo ECL. Pesos Moleculares 58kD p-Smad3, QM-Flag 30 kDa. Se transfectaron dos concentraciones del vector pCMV5-QM-Flag (5mg/ul y 10mg/ul). Se observa en la figura que la proteína p-Smad3 aparece solo en respuesta a TGF-β1. Se observa un aumento de p-Smad3 al sobre-expresar QM.

5.4.3.5) Efecto de la sobre-expresión de QM sobre la actividad de la vía ERK1,2 de TGF- β en células tumorales PC3.

Para finalizar el estudio en la línea celular PC3 se decidió medir la actividad de la vía de señalización ERK1,2 y evidenciar el efecto que tiene la expresión ectópica de la proteína QM en conjunto con un estímulo de TGF- β 1. En este caso sólo se determinó la actividad *in situ* de la vía ERK mediante genes reporteros.

La actividad de la vía ERK1,2 en la línea celular PC3 se determinó utilizando el reportero SRE-Luc, y el sistema de híbrido simple Elk1-Gal4/pRF5-luc. Como se muestra en la Figura 16(A), la expresión de QM estimuló fuertemente la actividad de la vía de ERK1,2 determinada por el reportero SRE-luc en ausencia de estímulo con TGF- β 1, y el tratamiento con el factor no modificó este nivel de activación de la vía de señalización.

De igual forma a lo observado en el experimento anterior, la sobre-expresión de QM provocó un aumento de la activación Elk-1 en forma independiente de TGF- β 1 exógeno, y la presencia del factor no cambió significativamente este aumento. (Figura 16(B)).

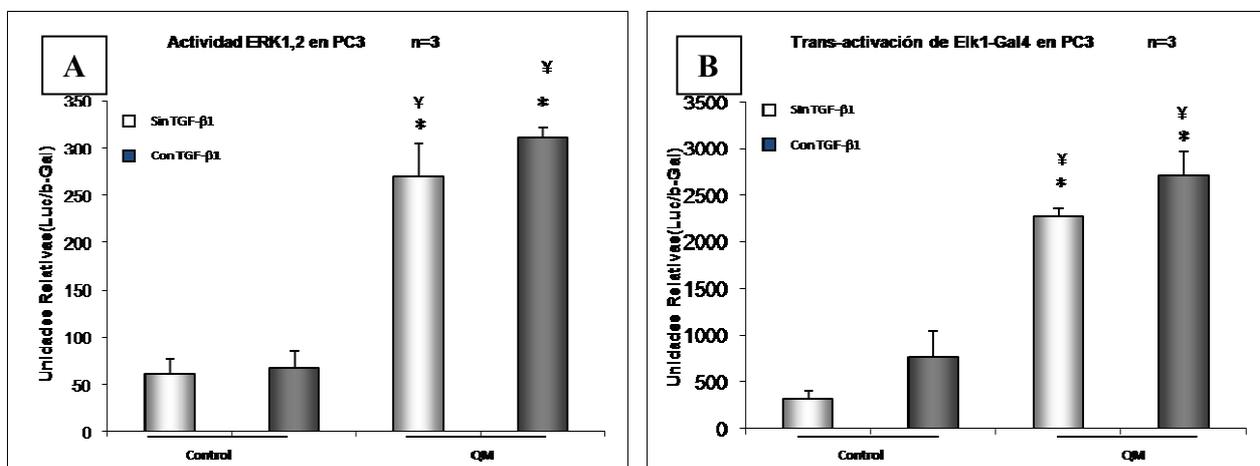


Figura 16: Efecto de sobre-expresión de proteína QM sobre la vía de ERK1,2 en respuesta a TGF- β 1. Cuentas de luz de la actividad luciferasa y β -galactosidasa medida durante 20 segundos en un luminómetro. \pm Desviación estándar. (*) $p \leq 0.05$. (A) Actividad de la vía ERK1,2 (reportero SRE-Luc). Se observa un aumento significativo (*) de la actividad al sobre-expresar QM en comparación a los controles (\neq). El efecto de TGF- β 1 en conjunto con QM es significativamente (*) mayor que los controles (\neq) (B) Trans-activación de proteína de fusión Elk1-Gal4. Se observa un aumento significativo (*) de la actividad al sobre-expresar QM en comparación a los controles (\neq). El efecto de TGF- β 1 en conjunto con QM es significativamente (*) mayor que los controles (\neq).

5.4.4) Estudio del efecto de la proteína QM sobre la vía de TGF- β en células PDV.

Como el objetivo central de este trabajo fue verificar la influencia de QM sobre las vías de señalización de TGF- β 1. Como modelo principal se utilizó una línea celular PDV de ratón capaz de sufrir TEM en respuesta a TGF- β 1. Para determinar la actividad de estas vías *in situ* se procedió de la misma manera que anteriormente, usando plasmidios que contienen genes reporteros. Se midieron los niveles de las proteínas Smad 2,3 luego de sobre-expresar y depletar QM y luego determinar si existía una relación con los resultados registrados por genes reporteros para la actividad de estas vías.

5.4.4.1) Efecto de la sobre-expresión de QM sobre la actividad de la vía Smad2 de TGF- β en células PDV.

Para la línea celular PDV determinamos la actividad de Smad2 mediante los plasmidios Fast1/ARE-Luc. La sobre-expresión de la proteína QM se realizó con un vector de expresión pcMV5-QM-Flag para luego estimular con TGF- β 1 recombinante y así comparar los distintos tratamientos.

Como muestra la Figura 17(A) la actividad de la vía evidenciada por el sistema Fast1/ARE-Luc aumenta con un estímulo de TGF- β 1, al sobre-expresar QM el aumento de la actividad de esta vía es significativamente mayor que con TGF- β 1 por sí solo, inclusive el efecto observado es aún mayor cuando se vuelve a estimular con TGF- β 1 en presencia de QM.

Para determinar los niveles de fosforilación o de trans-activación del factor Smad2, usamos el sistema de trans-activación Smad2-Gal4/pRF5-Luc, obteniendo un aumento de la trans-activación o fosforilación estimulados con TGF- β 1, este es un efecto similar al registrado con el sistema de genes reporteros Fast1/ARE-Luc, como muestra la Figura 17(B). Sin embargo, la sobre-expresión de la proteína QM por sí sola no determina un aumento significativo de la actividad del sistema comparada con la situación control.

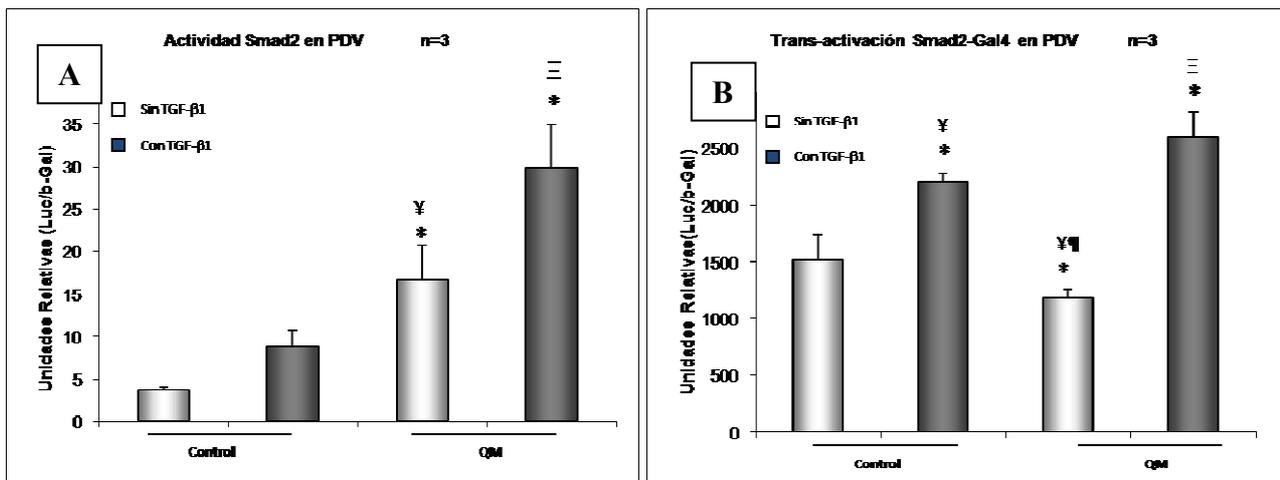


Figura 17: Efecto de sobre-expresión de proteína QM sobre la vía de Smad2 en respuesta a TGF-β1. Cuentas de luz de la actividad luciferasa y β-galactosidasa medida durante 20 segundos en un luminómetro. +/- Desviación estándar (A) Actividad de la vía Smad2 (reportero Fast1/ARE-Luc). Se observa un aumento significativo (*) de la actividad al sobre-expresar QM al comparar con los controles (¥). El estímulo con TGF-β1 al sobre-expresar QM aumenta la actividad (*) de Smad2 al comparar con los controles y con el efecto de QM por si solo (Ξ) (B) Trans-activación de proteína de fusión Smad2-Gal4. El estímulo con TGF-β1 aumenta la actividad (*) al comparar con la situación control (¥). También se observa una disminución en la actividad (*) al sobre-expresar QM comparado con los controles y con el efecto de QM y TGF-β1 en conjunto (¶). El efecto de QM y TGF-β1 en conjunto es significativamente (*) mayor que los controles y que QM por si solo (Ξ).

5.4.4.2) Efecto de la sobre-expresión y depleción de proteína QM sobre los niveles de proteínas Smad2.

Como parte de la estrategia de este estudio también determinamos los niveles de p-Smad2 mediante *Western Blot*. Para este efecto utilizamos dos estrategias donde se sobre-expreso la proteína QM con el vector p-CMV5-QM-Flag y además se suprimió la expresión de QM con siRNA. Ambas estrategias se ensayaron también en presencia de TGF- β 1. Como muestra la Figura 18(A), en presencia de la proteína QM los niveles de p-Smad2 aumentan. Además se observa una dependencia de la concentración de QM.

Por el contrario, como muestra la Figura 18(B), al suprimir la proteína con QM con siRNA no se observa una disminución clara de los niveles de p-Smad2.

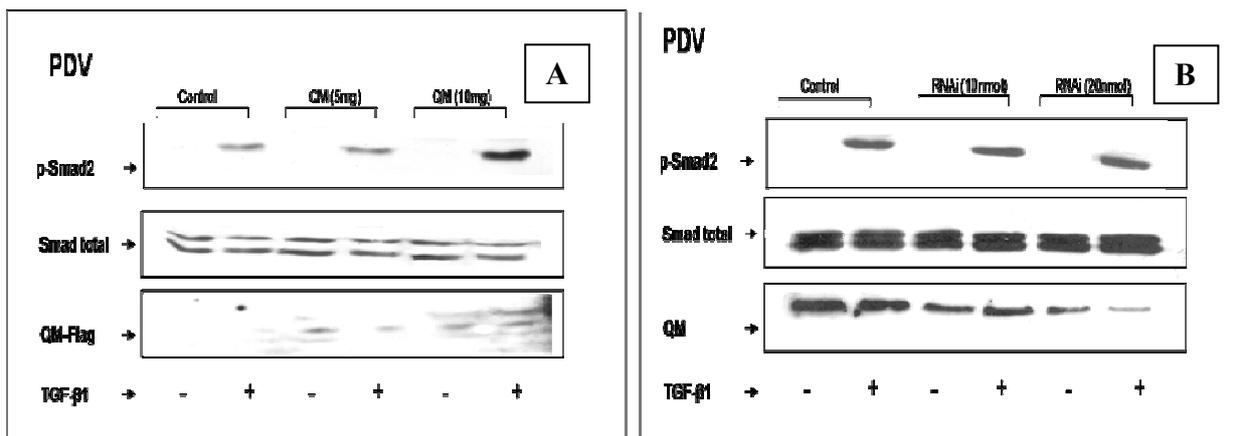


Figura 18: Efecto de la sobre expresión y depleción de la proteína QM sobre los niveles de p-Smad2 en respuesta a TGF- β 1. *Western blot* revelado con reactivo ECL. Pesos moleculares: p-Smad2 58 kD, QM-Flag 30 kD, QM 28 kD. Se transfectaron dos cantidades distintas del vector pCMV5-QM-Flag (5 mg y 10 mg). En el caso de siRNA también se transfectaron dos cantidades (10 nmol y 20 nmol). (A) Se observa en la figura que la proteína p-Smad3 aparece solo en respuesta a TGF- β 1. La sobre expresión de QM aumenta los niveles de p-Smad2. (B) Al inhibir la expresión de QM, los niveles de p-Smad2 no disminuyen.

5.4.4.3) Efecto de la sobre-expresión de QM sobre la actividad de la vía Smad3 de TGF- β en células PDV.

Nuestro estudio continuó con la determinación de la expresión ectópica de QM en células PDV y la posible modulación de la vía de señalización Smad3. Para determinar la actividad de estas vías *in situ* se procedió de la misma manera que anteriormente, usando plasmidios asociados a genes reporteros. Se midieron también los niveles de la proteína p-Smad3 luego de sobre-expresar y suprimir QM, tanto en presencia o ausencia de estímulo con TGF- β 1.

Para analizar la actividad de Smad3 co-transfectamos el plasmidio reportero de CAGAC-Luc, también sobre-expresamos la proteína QM con el vector pCMV5-QM-Flag. En este caso también se sometieron las células a un estímulo con TGF- β 1 recombinante. Según muestra la Figura 19(A), la actividad de la vía Smad3 aumenta con un estímulo de TGF- β 1 y es aún mayor cuando sobre-expresamos la proteína QM en conjunto con el factor TGF- β 1. QM por sí solo no muestra mayor influencia sobre esta vía.

Para determinar los niveles de fosforilación o trans-activación del factor Smad3, se usó el sistema Smad3-Gal4/Prf5-Luc. Como muestra la Figura 19(B) de manera similar a lo registrado con el sistema de reporteros CAGAC-Luc que detecta un aumento de la actividad de Smad3, se obtuvo en este caso que TGF- β 1 aumenta la fosforilación de la proteína de fusión Smad3-Gal4 o su capacidad de trans-activar al plasmidio Prf5-Luc, cuando sobre-expresamos QM en presencia del factor. El aumento de esta actividad es significativamente mayor, que con un estímulo de TGF- β 1 por sí solo.

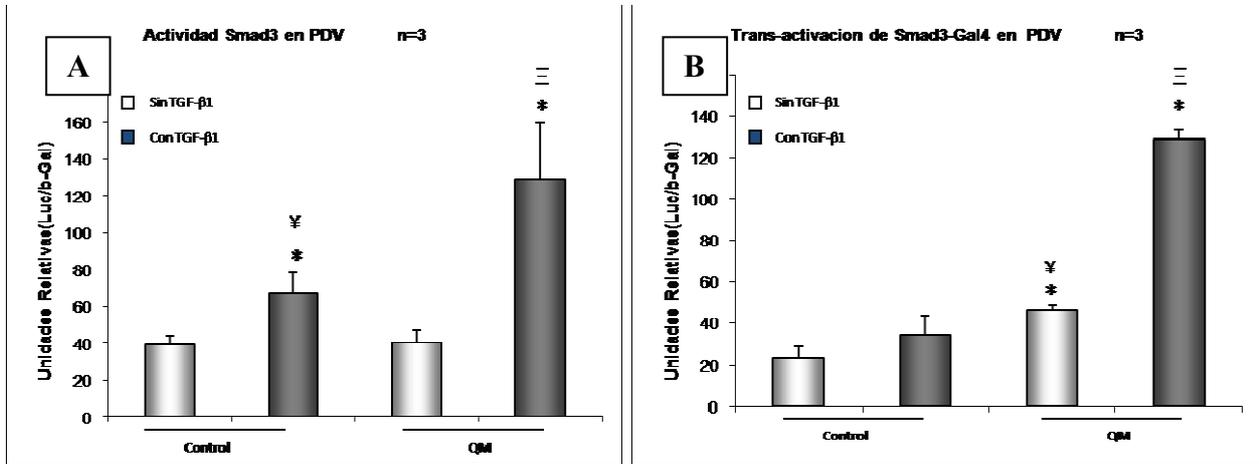


Figura 19: Efecto de sobre expresión de proteína QM sobre la vía de Smad3 en respuesta a TGF-β1. Cuentas de luz de la actividad luciferasa y β-galactosidasa medida durante 20 segundos en un luminómetro. +/- Desviación estándar. (*) $p \leq 0,05$ (A) Actividad de la vía Smad3 (reportero CAGAC-Luc). Se observa un aumento significativo (*) de la actividad en respuesta a TGF-β1 comparada con la situación control (¥). El efecto de QM y TGF-β1 en conjunto es significativamente mayor (*) que los controles y que QM por si solo (Ξ). (B) Trans-activación de proteína de fusión Smad3-Gal4. Se observa un aumento significativo (*) de la actividad al sobre expresar QM al compara con los controles (¥). El efecto de QM y TGF-β1 en conjunto es significativamente mayor (*) que los controles y de QM por si solo (Ξ).

5.4.4.4) Efecto de la sobre-expresión y depleción de la proteína QM sobre los niveles de proteína p-Smad3.

Continuamos nuestro estudio sobre la vía de Smad3 en células PDV. Para este efecto procedimos a determinar el efecto de la expresión ectópica de QM y la supresión de esta sobre los niveles de p-Smad3 condicionados al estímulo con TGF- β 1.

La Figura 20(A) muestra el efecto de la sobre-expresión la proteína QM. Se observa un aumento sustancial en los niveles de p-Smad3 y que además está en relación directa con la concentración de QM.

En la Figura 20(B) vemos el efecto de la depleción de la proteína QM con siRNA sobre la vía Smad3 en células PDV. Se ve una concordancia lógica con los resultados mostrados anteriormente, puesto que al suprimir a la proteína QM notamos una baja en los niveles de p-Smad3.

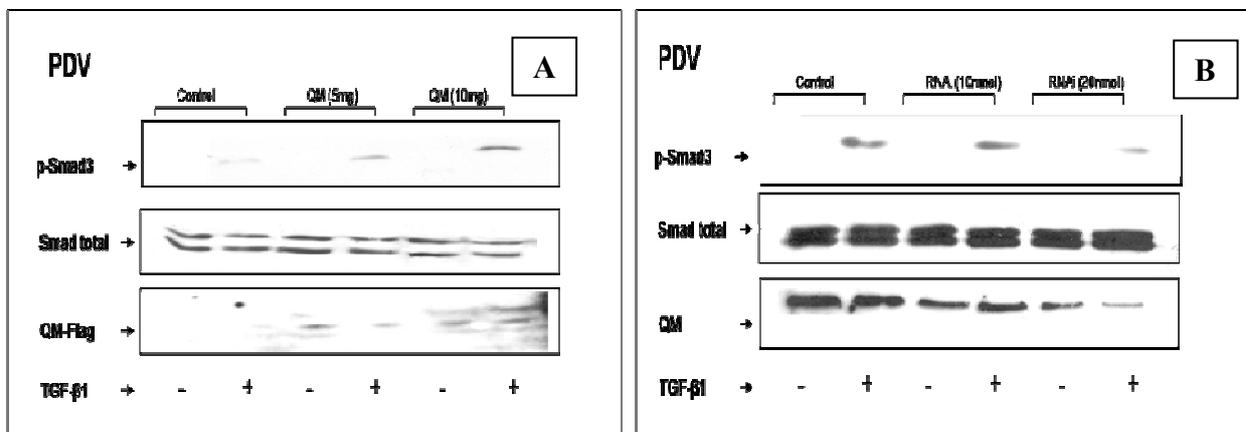


Figura 20: Efecto de la sobre- expresión y depleción de la proteína QM sobre los niveles de p-Smad3 en respuesta a TGF- β 1. Western blot revelado con reactivo ECL. Pesos moleculares: p-Smad3 58 kD, QM-Flag 30 kD, QM 28 kD. Se transfectaron dos cantidades distintas del vector pCMV5-QM-Flag (5 mg y 10 mg). En el caso de siRNA también se transfectaron dos cantidades (10 nmol y 20 nmol). (A) Se observa en la figura que la proteína p-Smad3 aparece solo en respuesta a TGF- β 1. La sobre-expresión de QM aumenta los niveles de p-Smad3. (B) Al inhibir la expresión de QM, los niveles de p-Smad3 disminuyen.

5.4.4.5) Efecto de la sobre-expresión de QM sobre la actividad de la vía ERK1,2 de TGF- β en células PDV.

Finalmente para nuestro estudio en células PDV se decidió medir la actividad de la vía de señalización ERK1,2 y evidenciar el efecto que tiene la expresión ectópica de la proteína QM en conjunto con un estímulo de TGF- β 1. En este caso sólo se determinó la actividad *in situ* de la vía ERK mediante genes reporteros.

La actividad de la vía ERK1,2 en la línea celular PDV se determinó utilizando el reportero SRE-Luc, y el sistema de híbrido simple Elk1-Gal4/pRF5-luc. Como se muestra en la Figura 21(A), la expresión de QM estimuló fuertemente la actividad de la vía de ERK1,2 determinada por el reportero SRE-Luc en conjunto con TGF- β 1, y el tratamiento con QM solo no modificó este nivel de activación de la vía de señalización.

Sin embargo, se observó que la sobre-expresión de QM provocó un aumento de la trans activación de Elk-1-Gal4 en forma independiente de TGF- β 1 exógeno, y la presencia del factor no cambió significativamente este aumento (Figura 21(B)).

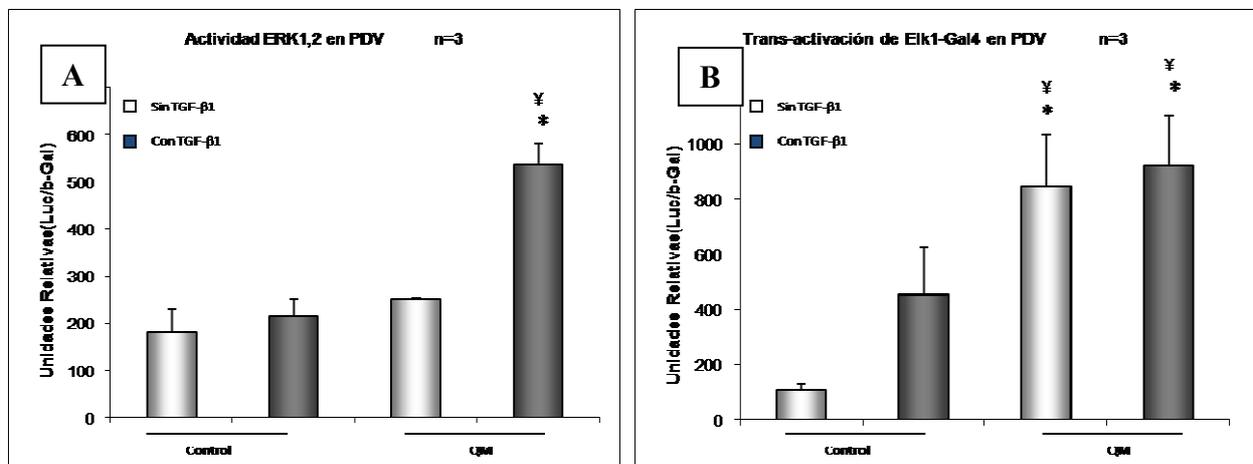


Figura 21: Efecto de sobre-expresión de proteína QM sobre la vía de ERK1,2 en respuesta a TGF- β 1. Cuentas de luz de la actividad luciferasa y β -galactosidasa medida durante 20 segundos en un luminómetro. +/- Desviación estándar. (*) $p \leq 0.05$. (A) Actividad de la vía ERK1,2 (reportero SRE-Luc). El efecto de TGF- β 1 en conjunto con QM es significativamente (*) mayor que los controles (¥) (B) Trans-activación de proteína de fusión Elk1-Gal4. Se observa un aumento significativo (*) de la actividad al sobre expresar QM en comparación a los controles (¥). El efecto de TGF- β 1 en conjunto con QM es significativamente (*) mayor que los controles (¥).

5.5) Implicancias de la activación de vías de la ruta de TGF- β y su efecto en la actividad tumoral, búsqueda de marcadores tumorales.

Con el fin de determinar la influencia de QM sobre la pogrésión tumoral, estudiamos el efecto que tenia la inhibición de la expresión de QM sobre dos maracadores tumorales u-PA y MMP9 dos proteasas implicadas en el proceso migratorio. Para estos experimentos se sembraron células de la línea celular PDV, al siguiente día se procedió a la transfección con siRNA de QM a dos concentraciones: 10 nmol ó 20 nmol. Posteriormente luego de 24-72 horas se estimuló con TGF- β 1 y se incubó un día adicional para luego analizar la expresión de u-PA y MMP9 mediante *RT-PCR*.

5.5.1) Niveles de transcrito u-PA y MMP9, efecto de siRNA para QM

En la Figura 22 se ve el efecto que tiene la supresión del transcrito QM por siRNA de sobre marcadores tumorales involucrados en las vías de TGF- β 1 Smad2,3 y ERK1,2. Junto con la caída en la expresión de transcrito de QM se ve un baja en la expresión de u-PA, no así de MMP9.

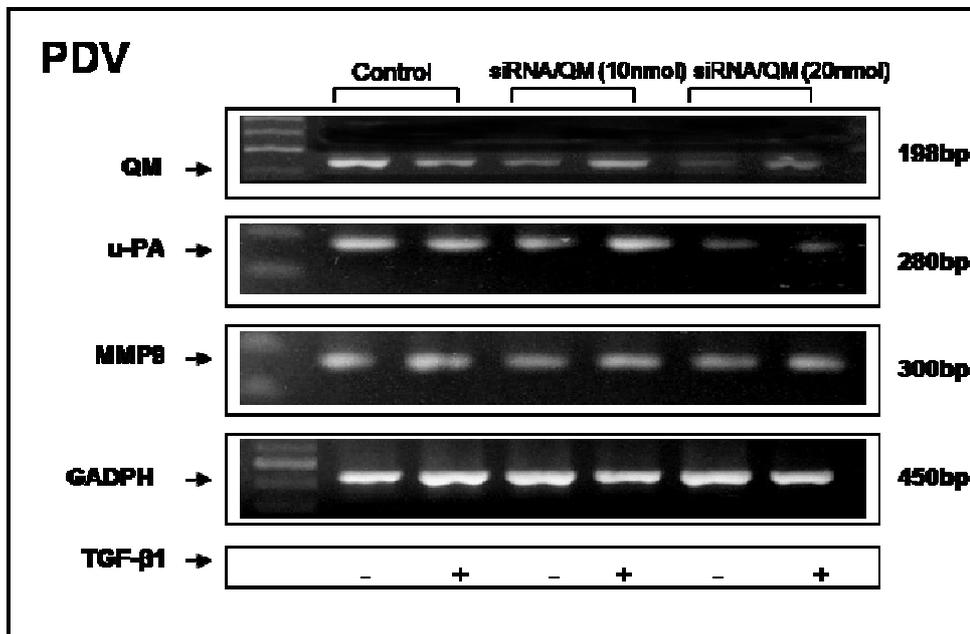


Figura 22: Efecto de la inhibición de la expresión de QM sobre la expresión de los genes de u-PA y MMP-9. RT-PCR Gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. Para inhibir la expresión de QM se transfectaron dos concentraciones de siRNA (10nMol y 20nMol). Se observa que la expresión de QM es inhibida completamente a las dos concentraciones utilizadas. Al inhibir la expresión de QM vemos que disminuye la expresión de u-PA. El efecto sobre MMP9 mucho menor que el de u-PA

5.5.2) Efecto de QM sobre la migración de células PDV, ensayo de heridas.

Una vez determinado el efecto de QM sobre los marcadores tumorales, y dado que ellos se encuentran relacionados en parte con la migración de las células tumorales, no enfocamos en determinar el posible papel de nuestra proteína sobre la capacidad de las células PDV de migrar en un ensayo de herida.

La Figura 23 muestra el efecto que tiene la sobre-expresión y la supresión de QM sobre la capacidad migratoria de nuestras células en estudio. Se observa que la expresión ectópica que QM potencia la migración de estas células en forma basal y potencia el efecto de TGF- β 1. Al estar ausente o en bajo nivel de expresión, estas células migraron en menor magnitud con o sin estímulo del factor de crecimiento.

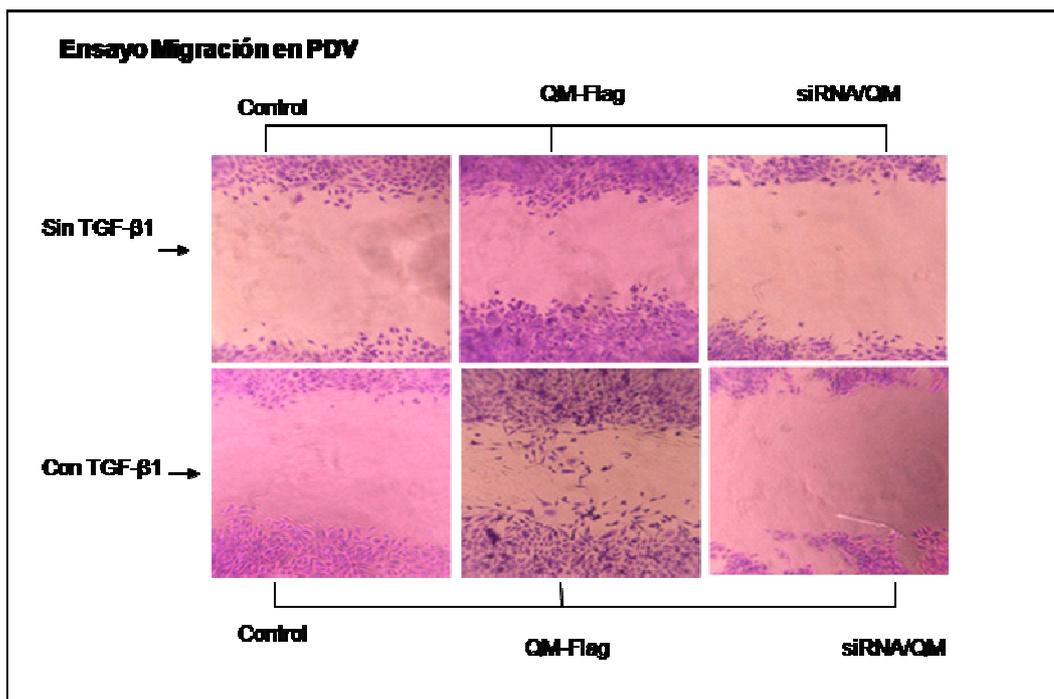


Figura 23: Efecto de la sobre-expresión de QM e inhibición de la expresión de QM sobre la migración de células PDV. Cultivo de células PDV 100% confluencia. Posterior a confluencia se realiza una herida sobre el cultivo. Las células luego de la herida se someten a tratamientos con el vector de expresión pCMV5-QM-Flag (5 y 10 mg/ul) y con siRNA (10nMol y 20nMol/ul). Las células posterior a tratamientos se tiñen con cristal violeta 5%. Se observa (células en el centro de la herida) que la migración de las células se ve potenciada por la presencia de QM en respuesta aun estímulo con TGF- β 1. Las células pierden la capacidad de migrar (células solo en los extremos) cuando inhibimos la expresión de QM.

6) Discusión

El factor de crecimiento transformante beta1 (TGF- β 1) ha mostrado tener un importante papel en el desarrollo del cáncer, el cual puede actuar como un represor en estadios tempranos de este proceso y en estadios avanzados de la tumorigénesis es capaz de promover la tumorigénesis (4). Para realizar sus funciones celulares el TGF- β 1 es capaz de desencadenar distintas rutas de señalización intracelular, las cuales darían cuenta de los efectos de este sobre el proceso tumorigénico (9). En este aspecto, la posibilidad de entender y manejar las vías de señalización de este factor de crecimiento en células tumorales, podría aportar sin duda a la generación de nuevas terapias en el tratamiento del cáncer.

En el presente trabajo hemos tenido como objetivo principal determinar si la proteína QM participa en la regulación y/o modulación de las vías de señalización de TGF- β 1, con la proyección de que esta proteína pueda ser un blanco molecular para regular las rutas de transducción del factor de crecimiento en células tumorales.

6.1) Expresión de QM en células transformadas

Nuestro primer paso fue analizar los niveles de expresión de QM en distintas líneas celulares, las cuales *in vitro* representan distintos estados tumorales del modelo de la carcinogénesis de piel de ratón, así como también la determinar la expresión de esta proteína en la línea celular PC-3, representativa de cáncer humano de próstata. Nuestros datos indican que la expresión de QM en las líneas tumorogénicas PDV y CarC fue mayor que en las células MCA-3D, línea celular representativas de un estadio normal no tumoral en nuestro modelo de carcinogénesis (49). En las tres líneas analizadas el tratamiento con TGF- β 1 no afectó el nivel de expresión de QM.

Un hecho importante observado fue que la línea celular PDV mostró el mayor nivel de expresión de QM. Esta línea celular posee un grado intermedio de tumorigenicidad en comparación con las células CarC, a su vez que PDV sufre el proceso de transición epitelio-mesenquimática (TEM) adquiriendo propiedades de una célula tumoral con mayor grado de malignidad (35). Los niveles aumentados de QM podrían facilitar la progresión tumoral de esta línea celular hacia fenotipos más agresivos. Este aspecto estaría en concordancia con el estudio donde se determinó la distribución de QM en cortes de tejido de cáncer de próstata, observando un mayor grado de expresión de esta proteína confinada a focos de invasión perineural en tumores con grado 4-5 de Gleason, y que podría estar relacionada a la progresión de las células tumorales. (48). Estos aspectos, junto a que QM se ha relacionado con la regulación de vías de señalización implicadas en la tumorigénesis (44,45,46), nos llevó a la hipótesis de que esta proteína QM participa en la regulación de vías de señalización de TGF- β 1 en células transformadas.

Al analizar la expresión de QM en la línea celular humana de cáncer prostático PC3, observamos la presencia del transcrito correspondiente, aunque no comparamos el nivel de expresión con otras líneas celulares de cáncer de próstata. Por su parte, el tratamiento con el factor TGF- β 1 no modificó la expresión del mRNA de QM. Nosotros en particular estábamos interesados en conocer si las células PC3 expresan esta proteína, en parte porque en la literatura no existe información de la expresión de QM en líneas celulares de próstata. Sólo recientemente se ha descrito la expresión de ésta en cortes de tumores prostáticos (48), y porque determinar su expresión nos ayudaría a desarrollar las siguientes estrategias experimentales para el desarrollo de esta tesis con respecto a esta células.

En la línea celular PDV, objeto central de esta tesis, encontramos una expresión basal del transcrito de QM. Para ello se utilizó la técnica de RT-PCR y se determinó el número de ciclos necesario para una banda en la cual se detectan diferencias en respuesta a un estímulo de TGF- β 1. Se determinó que 30 ciclos era el número óptimo para estos análisis semi-cuantitativos.

Este mismo procedimiento se repitió con la línea celular PC3 de cáncer de próstata humana de características muy malignas. Se encontró también una expresión basal del transcrito de QM y se estableció que 30 ciclos era adecuado para los posteriores análisis semi cuantitativos de expresión frente a estímulos con TGF- β 1.

A continuación, estudiamos si QM participa en la regulación de las vías de señalización de TGF- β 1. Para ello desarrollamos nuestro estudio en tres líneas celulares; COS-7 provenientes de epitelio de riñón de mono y que tiene la particularidad de expresar en altos niveles proteínas producto de transfección; PC-3 por ser representantes de cáncer humano, y la línea PDV en la cual el tratamiento con TGF- β 1 induce un aumento de la malignidad celular (35). A su vez nos enfocamos en el análisis de tres vía de señalización de TGF- β 1 que de alguna manera están involucradas en el proceso tumorigénico inducido por TGF- β 1 como son Smad3, Smad2 y ERK1,2 (7, 9, 11, 23, 30).

6.2) Regulación de vías de señalización en células COS-7

Nuestro primer paso fue determinar el efecto de QM sobre las vías descritas de TGF- β 1 en la línea celular COS-7. Para ello realizamos experimentos de co-transfección con una forma activa del receptor tipo 1 para TGF- β 1 (ALK-5a) y con plasmidios reporteros para censar la actividad de la tres rutas de señalización a analizar.

Para registrar la actividad de Smad2 se utilizaron dos plasmidios Fast1 y pARE-luc. Dado que Smad2 no se une directamente al DNA y sino unido a un co-activador, que en nuestro sistema reportero es Fast1 (51). Este factor sí tiene la capacidad de unirse al DNA cuando Smad2 está activo. Tal como era de esperar, en la situación control (en ausencia de expresión de QM exógeno) la presencia de ALK5a produjo un aumento de la vía de Smad2, determinada como actividad de luciferasa. Cuando se sobre-expresó QM observamos un aumento de actividad de esta vía en ausencia del receptor activado, y que no fue modificada por co-transfección con ALK5a. Este resultado indicó que QM podría tener un rol en la regulación de esta vía.

Una posibilidad para que pueda ocurrir el aumento de la vía de Smad2 por QM en ausencia de estímulo, podría ocurrir debido a algún grado de interacción entre ambas proteínas o porque activa algún complejo intermediario entre ambas, y que por tanto pueda mantener en un estado activo esta vía. Para poner a prueba esta posibilidad, utilizamos el sistema de híbrido simple Gal-4 para Smad2. Para ello contamos con un plasmidio que expresa una proteína híbrida constituida por el dominio de transactivación a Smad2 y el dominio de unión al DNA de Gal-4 (52). Cuando Smad2 es activado por fosforilación (transactivación) esta proteína híbrida se une al plásmido reportero (pRF5-luc) aumentando la expresión de luciferasa, lo que a su vez nos permite determinar la actividad activadora o represora de proteínas que puedan interactuar directa o indirectamente con Smad2.

Los resultados obtenidos nos mostraron que tal como se observó anteriormente la coexpresión de QM con este sistema reportero aumentó la actividad de la vía de Smad2 en forma independiente de ALK5a. Estos datos son consistentes con lo propuesto, y nos podrían indicar una posible interacción entre QM y Smad2. Tampoco podemos descartar la posibilidad de que QM pueda estabilizar la proteína y aumentar su vida media, y que esto se vea reflejado en una mayor actividad basal de Smad2. También podría ocurrir la activación de un complejo que permita su estabilización, existen evidencias en este sentido de que una protección de que la proteína Smad2 frente a la degradación se relaciona con un aumento en la actividad basal de esta vía de señalización (53).

A continuación determinamos el efecto de QM sobre la vía Smad3. Para esto realizamos experimentos de co-transfección de ALK5a y el plasmidio reportero CAGAC-Luc, donde el factor Smad3 es capaz de unirse a la secuencia CAGAC e inducir la expresión de luciferasa (54).

En este caso observamos que la presencia de ALK5a aumenta la actividad de la vía Smad3 y que QM por sí solo no induce un aumento en la actividad de Smad3 al compararlo con la situación control. Sin embargo, al sobre-expresar QM en conjunto con ALK5a la actividad de Smad3 aumenta considerablemente. Esta evidencia nos permite especular que QM también tendría la capacidad de potenciar la actividad de esta vía. Una forma de explicar este fenómeno podría ser que QM establezca la interacción entre Smad3 y la zona de unión al DNA y por tanto potencie la activación del reportero. Tampoco podemos descartar la posibilidad de que QM esté aumentando la vida media de Smad3, o favoreciendo su fosforilación por los receptores de TGF- β 1.

También en células Cos-7 quisimos determinar si QM tendría la capacidad de modular la vía ERK1,2 activada por el receptor de TGF- β 1. En este caso co-transfectamos ALK5a y el plasmidio reportero SRE-Luc, el cual contiene una secuencia de unión específica para el factor de transcripción Elk1, que a su vez es activado por MAP quinasas. (55)

La actividad de la vía de ERK aumentó por el estímulo de ALK5a. Por otra parte, cuando sobreexpresamos QM, la actividad de la vía ERK1,2 aumentó fuertemente en ausencia de ALK5a. Esta observación quizás pueda deberse a la posibilidad de que QM mantenga activa alguna de las quinasas que actúan en esta vía. Incluso QM podría actuar directamente sobre el factor Elk1, posiblemente porque QM podría inhibir alguna(s) de la fosfatasa (s) encargada (s) de silenciar la vía de transducción de señales en cuestión, lo que por tanto se podría reflejar en una mayor actividad basal de la vía en forma independiente de TGF- β 1.

6.3) Regulación de vías de señalización en células PC3

Entre los objetivos de este trabajo estaba también determinar si QM participa en la modulación ó regulación de las vías de señalización de TGF- β 1 en un modelo celular humano. Para este fin utilizamos la línea celular de cáncer de próstata PC3, apoyados en la evidencia de que la expresión de QM aumenta en cortes de tejidos de tumores de alta agresividad. (48)

Como primer paso estudiamos el efecto de la expresión ectópica de QM sobre la vía Smad2. Para aquello co-transfectamos el vector de expresión pCMV5-QM-Flag en conjunto con el sistema de reporteros Fast1/pARE-luc. Para el estímulo, se utilizó la proteína recombinante TGF- β 1, observándose un aumento en la actividad de la vía Smad2 cuando estimulamos con TGF- β 1. Ahora, cuando sobre-expesamos QM, la actividad de esta vía de señalización en ausencia del factor no se modifica, en cambio al estimular con TGF- β 1 observamos que QM inhibe la activación de la vía de Smad2. Estos resultados nos sugirieron que QM podría estar actuando como regulador negativo de la actividad de Smad2 luego de un estímulo con TGF- β 1. La manera en que QM regula la actividad de Smad2 podría ser atribuida a la unión directa a Smad2 o bien a que se active a algún complejo que impida que el receptor activado fosforile a este factor transcripcional.

Para apoyar esta idea, se procedió a determinar los niveles de fosforilación de Smad2 mediante el sistema Smad2-Gal4, obteniéndose una disminución de la transactivación de este factor lo que podría indicar un menor grado de fosforilación del complejo Smad2 cuando estimulamos con TGF- β 1 en presencia de QM. Esta inhibición por QM de la vía Smad2 estimulada por TGF- β 1 se podría atribuir también a la posibilidad que QM pueda interferir en la unión a DNA de los complejos que contienen Smad2. Estos datos se vieron refrendados cuando analizamos los niveles de fosforilación de Smad2 en respuesta a un estímulo de TGF- β 1 y con sobreexpresión de QM. Como muestra la Figura 12 los niveles de proteína p-Smad2 presentaron una disminución en presencia de QM, concordando con nuestros resultados anteriores. Esto apoyaría aún más nuestra hipótesis de que quizás QM tendría la capacidad, de forma directa o indirecta, de inhibir la fosforilación de Smad2 en respuesta a TGF- β 1, reduciendo así la actividad de esta vía en las células transformadas PC-3.

Cuando estudiamos el efecto de QM sobre la vía de señalización Smad3 en células de cáncer de próstata, observamos un aumento de la actividad de esta vía cuando estimulamos con TGF- β 1. Sin embargo cuando sobre-expesamos QM y estimulamos con TGF- β 1 se obtuvo un importante incremento de la actividad de la vía Smad3. Esta observación podría atribuirse a que QM facilitaría la fosforilación de Smad3 o también que podría estar actuando como un co-activador transcripcional favoreciendo la unión de Smad3 a sus secuencias de unión al DNA. Esta hipótesis coincide con los resultados obtenidos al medir la trans activación del sistema híbrido simple de Smad3 (Smad3-Gal4/Prf5-Luc), donde se observa que la presencia de QM bajo un estímulo de TGF- β 1 provoca un aumento de la actividad del reportero, debido a un mayor grado de fosforilación de la proteína híbrida Smad3-Gal4. Tampoco es posible descartar de que QM esté fortaleciendo la unión de Smad3-Gal4 a Prf5-Luc y esto provoque una mayor actividad de la vía de transducción estudiada.

Para apoyar nuestra idea determinamos los niveles de fosforilación de Smad3 por western blot. En este caso observamos, un discreto aumento de los niveles de fosforilación de Smad3 al estimular con TGF- β 1 bajo sobre-expresión de QM. Estos resultados confirmarían nuestra especulación de que QM directamente o quizás mediante otro complejo proteico potencie la capacidad de TGF- β 1 de inducir la fosforilación y por lo tanto la actividad de la vía de Smad3.

En nuestro estudio en células PC3, también determinamos el efecto de QM sobre la vía ERK1,2. Para medir la actividad de esta vía de señalización utilizamos el plasmidio reportero SRE-Luc en conjunto con el vector de expresión para QM. En este caso obtuvimos un considerable aumento de la actividad de la vía ERK cuando sobre-expesamos la proteína QM en ausencia de estímulo con TGF- β 1.

Esta observación quizás se pueda deber a que QM estaría activando la vía ERK, manteniendo los niveles de fosforilación altos de estas quinasas la cual determinaría su mayor actividad. Para apoyar nuestra idea determinamos la fosforilación de ERK con el sistema de trans-activación (Elk1-Gal4/Prf5-Luc). En este caso observamos una concordancia con los resultados de actividad de ERK1,2 descritos anteriormente, lo que indicaría un aumento en la fosforilación de la proteína de fusión Elk1-Gal4.

6.4) Regulación de las vías de señalización en células PDV.

Uno de nuestros objetivos principales en este trabajo fue determinar si la proteína QM tenía la capacidad de modular o regular la vía de señalización de TGF- β 1 en células PDV, las cuales pertenecen al modelo de carcinogénesis química de ratón. Este modelo consiste en tres líneas celulares (MCA-3D, PDV, Carc) de queratinocitos transformado, donde cada línea representa un estadio del tumor. Nuestros experimentos fueron realizados principalmente en la línea PDV que representa un estadio intermedio de la progresión tumoral. Estas células tienen la capacidad de sufrir una transición epitelio-mesenquimática, proceso característico de un fenotipo más agresivo en respuesta a TGF- β 1 (33). La capacidad de modular la vía de TGF- β 1 en esta línea celular, podría tener efectos sobre la progresión tumoral y/o en procesos fisiológicos como la TEM.

Nuestro primer paso fue determinar el efecto de QM sobre la vía de Smad2. Para ello se co-transfectó el sistema Fast1/ARE-Luc en conjunto con el vector de expresión para QM. Se observó un aumento en la actividad la vía Smad2 cuando estimulamos con TGF- β 1. Al sobre-expresar la proteína QM, la actividad de la vía se vio aumentada en comparación a la situación control y significativamente superior cuando sobre-expresamos QM en conjunto con un estímulo de TGF- β 1, lo que nos permite deducir que QM tiene la capacidad de modular esta vía aumentando la actividad de Smad2.

Al analizar los resultados de la trans-activación del sistema Smad2-Gal4, se observó que QM en presencia de TGF- β 1 expresa una mayor actividad. Esto sugiere que QM actuaría como un potenciador de la vía Smad2 de TGF- β 1, posiblemente actuando sobre la fosforilación o estabilizando la unión de los complejos con el factor de transcripción a sus secuencias de interacción en los promotores de los genes blanco regulados por esta vía de señalización intracelular.

Para definir el posible mecanismo de potenciación de QM sobre la vía Smad2 se procedió a medir los niveles de proteína p-Smad2 en respuesta a TGF- β 1. En este experimento se realizaron dos estrategias, una por sobreexpresión de QM y la otra utilizando siRNA contra esta proteína. Se observó que los niveles de fosforilación de Smad2 inducidos por TGF- β 1 aumentaron cuando sobre-expresamos QM en comparación con la situación control. Este efecto fue inverso cuando suprimimos QM con siRNA, resultado que está relacionado con lo obtenido en nuestro experimento de co-transfección de QM. Esto apoyaría la tesis que QM potencia la vía de Smad2 manteniendo altos niveles de fosforilación. El mecanismo para mantener los niveles de fosforilación se pueden explicar según lo especulado anteriormente, donde proponíamos que QM actuaría directamente o indirectamente sobre Smad2 favoreciendo la fosforilación y así aumentando su actividad frente a un estímulo de TGF- β 1.

El segundo paso fue determinar el efecto de QM sobre la vía Smad3, en este caso co-transfectamos el plasmidio CAGAC-Luc en conjunto con el vector de expresión para QM. Se observó que TGF- β 1 activa esta vía de señalización y que QM por sí solo no tiene un efecto significativo sobre la actividad de Smad3, sin embargo al sobre-expresar QM y estimular con TGF- β 1 vemos que la actividad de la vía se potencia significativamente. Al analizar los resultados de la trans-activación del sistema (Smad3-Gal4/Prf5-Luc) vemos una concordancia con los resultados anteriores. Esta evidencia nos permite deducir que QM en este caso también actúa como potenciador de la vía Smad3.

Para definir el posible mecanismo de potenciación de QM sobre la vía Smad3 se procedió a medir los niveles de proteína p-Smad3. En este caso se diseñaron dos estrategias donde sobre-expresamos QM e inhibimos la expresión con siRNA.

Se vio que al sobre-expresar QM los niveles de proteína fosforilada aumentan en forma dosis dependiente y por el contrario al inhibir QM con siRNA los niveles de Smad3 disminuyen también de manera dosis dependiente. Esta evidencia apoya la tesis de que QM actúa como un modulador de la fosforilación de Smad3.

Finalmente medimos la capacidad de QM de modular o regular la vía ERK, en este caso co-transfectamos el plasmidio reportero SRE-Luc en conjunto con el vector de expresión para QM. QM provoca un gran aumento de la actividad de ERK que solapa en gran medida el efecto de TGF- β 1 sobre la actividad de ERK, sin embargo, no cabe duda de que TGF- β 1 estimula la actividad de ERK. También observamos que al sobre-expresar QM y estimular con TGF- β 1 la actividad de la vía no aumenta significativamente al comparar el efecto de QM solo. Esto sugeriría que QM estaría potenciando esta vía de forma independiente a un estímulo con TGF- β 1. Quizás en este caso QM se esté uniendo directamente sobre el reportero SRE-Luc y no esté delatando la actividad de ERK o quizás QM esté actuando a nivel de MAP quinasas independiente del estímulo con el factor. Al analizar el efecto de QM sobre la trans-activación del sistema (Smad3-Gal4/Prf-Luc) vemos un efecto similar, donde QM potencia significativamente la actividad. Esto explicaría que quizás QM aumente la fosforilación de ERK o asista a la unión del factor con el DNA.

Para confirmar esta hipótesis sería necesario realizar experimentos de *western blot* en la que se puedan detectar los niveles de proteína fosforilada, aunque los datos (no mostrados) no nos permitieron obtener una conclusión respecto a este punto.

En este trabajo se demuestra entonces que QM es capaz de modular de forma distinta las vías de TGF- β 1 en las tres líneas celulares COS-7, PC3 y PDV. El mecanismo de acción es un poco confuso aún, pero existe la tendencia a pensar a QM actuaría como modulador de la fosforilación de estos factores transcripcionales, sin descartar otros mecanismos posibles.

6.5) Efecto de la proteína QM sobre la malignidad en células PDV

Como objetivo final de este trabajo establecimos la relación entre la presencia de QM y un aumento en la malignidad de las células PDV y en relación con la modulación de las vías de TGF- β 1 y la progresión tumoral. Para este objetivo determinamos el cambio de expresión de dos marcadores tumorigénicos, u-PA y MMP9.

En los experimentos realizados usamos la estrategia de inhibir la proteína QM con siRNA y luego medir la expresión de las proteinasas mediante RT-PCR, con y sin estímulo con TGF- β 1. Se observó que al suprimir la proteína QM los niveles de transcrito de u-PA disminuyen fuertemente, efecto que fue menos drástico al determinar la expresión de mRNA de MMP-9. Este efecto sobre u-PA podría atribuirse a que al suprimir la proteína QM, la vía ERK se ve inhibida, y esta vía es necesaria para la expresión de u-PA estimulada por TGF- β 1 en células PDV (36). Es lógico pensar además que por el contrario, al aumentar los niveles de QM, la actividad de la vía de ERK1,2 también aumenta, lo que podría reflejarse en una mayor expresión de u-PA. Si es así, el aumento de esta proteinasa ayudaría a degradar la matriz extracelular por parte de la célula tumoral, favoreciendo la migración, lo que se podría reflejar en la posibilidad de colonizar otros tejidos aumentando así la agresividad de los tumores.

Para corroborar esta idea realizamos un experimento de migración, en condiciones de sobre-expresión e inhibición de los niveles de QM. Para ello, utilizamos cultivos de PDV en confluencia a los cuales se les realizó una herida, para luego estimular con TGF- β 1. Este ensayo nos muestra la capacidad de las células en estudio de cerrar esta herida y por tanto migrar en el cultivo, y nos permite comparar la capacidad migratoria de las células frente a distintos estímulos. Finalmente se observó que al sobre-expresar QM las células migraron en mayor cuantía en respuesta a TGF- β 1 que en la situación control. Se obtuvo un efecto contrario al depletar la proteína con siRNA, dado que las células se mostraron inhibidas a la migración en respuesta al factor de crecimiento. Este resultado se puede relacionar con los efectos de QM sobre la vía de ERK1,2 y de la expresión de u-PA.

Esta vía de señalización ha sido relacionada con la migración celular, no sólo en PDV, sino también en otros tipos celulares tanto normales como transformados (36). Por otra parte uPA a través de la unión su receptor de superficie celular actúa como un potente activador de la migración, lo que a su vez puede ser por la capacidad de esta proteínasa de activar la vía de ERK1,2 en las células blanco (35,55).

Los resultados obtenidos en nuestro trabajo nos permiten concluir que QM tiene la capacidad de modular la activación de las vías de señalización de TGF- β 1 involucradas en procesos tumorales. En el caso de células COS-7, QM actúa potenciando la vías de Smad2, Smad3 y ERK1,2. En células humanas PC3 QM es capaz de potenciar las vías de Smad3 y ERK1,2, no así en el caso de Smad2, donde QM juega un papel de regulador de esta vía. Finalmente en las células PDV del modelo carcinogénico, QM es un potente activador de las tres vías Smad2, Smad3 y ERK.

Nuestros resultados sugieren que QM actuaría sobre la fosforilación de estos complejos, aunque desconocemos los mecanismos por los cuales QM podría ejercer este efecto. Nos aventuramos en postular que QM podría estar interaccionando con fosfatasa que controlan estas vías o quizás interaccionando con su receptor encargado de la fosforilación de los complejos luego del estímulo con TGF- β 1

QM además es capaz de disminuir la expresión de u-PA y posiblemente de MMP9, que tendrían influencia en la progresión tumoral y favorecer la migración en células transformadas.

En su conjunto, estos datos nos indican que la posibilidad de inhibir la expresión de QM en células tumorales aparecería como una posible herramienta terapéutica para el tratamiento del cáncer en humanos.

G) Conclusiones

1- El gen QM se expresa en las líneas celulares MCA-3D, PDV y CarC. de ratón del modelo de carcinogénesis química

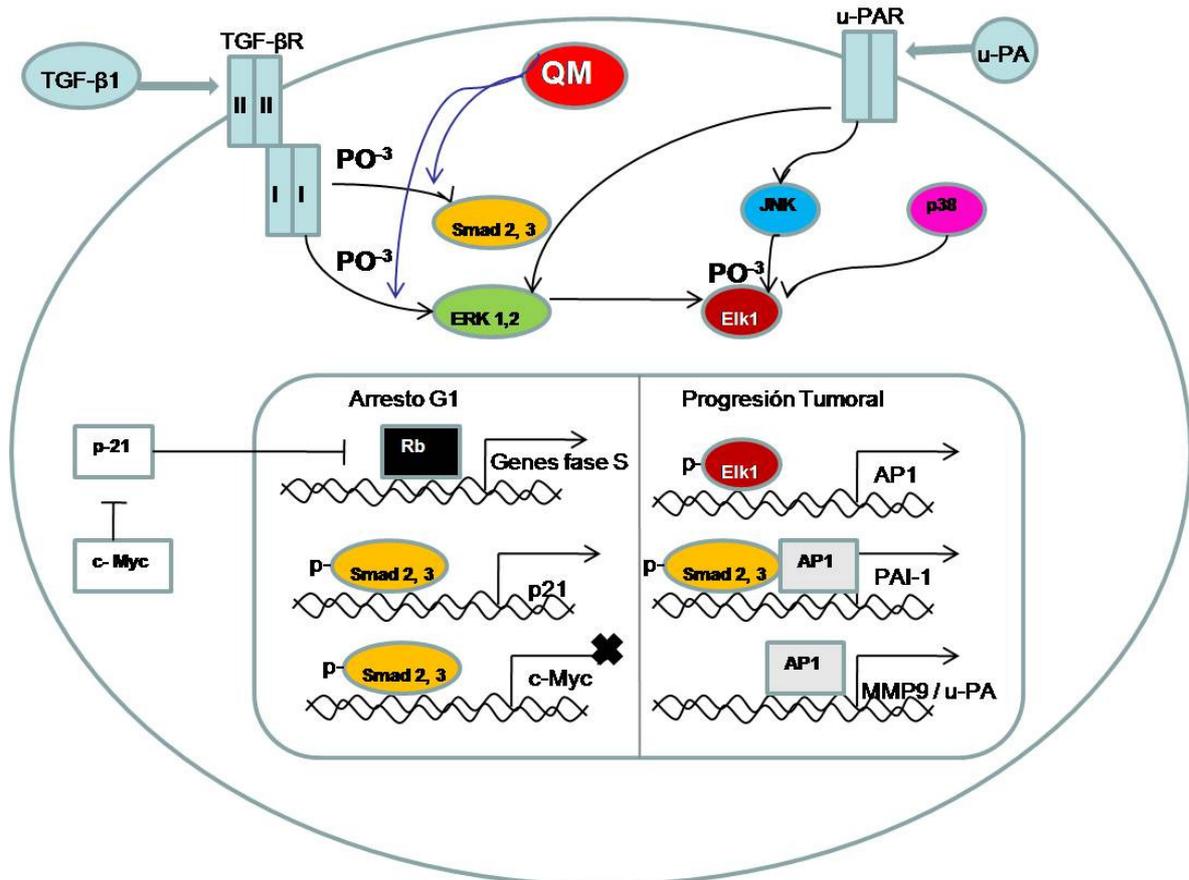
QM también se expresó en células humanas de cáncer prostático PC3. En ningún caso la expresión se vio afectada por la presencia de TGF- β 1. Sin embargo, la expresión de QM es mayor en células PDV y CarC que en células MCA-3D

2- TGF- β 1 no altera los niveles de la proteína QM en células del modelo de carcinogénesis química, donde MCA-3D presenta los niveles más bajos y las células PDV los niveles más altos de QM. Esta evidencia sugiere que QM sería necesario para el paso de un estado menos maligno (células PDV) a un estado más agresivo (células CarC).

3- Al sobre-expresar QM, éste aumenta la actividad de las vías de señalización Smad2, Smad3 y ERK1,2 activadas en respuesta a TGF- β 1 en células PDV. Una mayor actividad de estas vías explicaría el paso de un fenotipo menos maligno a uno de mayor agresividad. La mayor actividad de Smad2, Smad3 y ERK1,2 inducida por QM se debería a un aumento de la fosforilación de los factores Smad2, Smad3 y ERK1,2 o a un aumento en su vida media.

4- Al inhibir la expresión de QM con siRNA en células PDV se alteró la expresión de dos proteinasas u-PA y en menor medida MMP9. Ambas proteinasas estarían involucradas en procesos de migración celular, razón por la cual son consideradas marcadores tumorales. Al inhibir la expresión de QM se afectaría la activación de las vías Smad2, Smad3 y ERK, factores involucrados en la expresión de u-PA y MMP9.

5-. Al inhibir la expresión de QM con siRNA en células PDV se afecta la migración de las células PDV en respuesta a TGF-β1. Por el contrario, al sobre-exresar QM las células migran mucho más que en respuesta a un estímulo con TGF-β1. Esto se correlaciona con el patrón de expresión de proteinasas u-PA y MMP9 en respuesta a QM.



Esquema (ii): Modelo propuesto. Efecto de QM sobre las vías Smad2, Smad3 y ERK1,2. QM aumenta la actividad de las tres vías en células PDV. La mayor actividad de Smad2, Smad3 y ERK1,2 provoca dos efectos. (1)Arresto en G1 por la inducción de la expresión de p21 e inhibición de c-Myc. (2) Progresión tumoral por la inducción de los genes AP-1, PAI-1, u-PA y MMP9 involucrados en la degradación de la MEC.

8) Referencias

- 1-. **Ten Dijke P, Hill CS. 2004.** New insights into TGF-beta-Smad signalling. Trends Biochem Sci. 29:265-73.
- 2-. **Rotello RJ, Lieberman RC, Purchio AF, Gerschenson LE. 1991.** Coordinated regulation of apoptosis and cell proliferation by transforming growth factor beta 1 in cultured uterine epithelial cells. Proc Natl Acad Sci.USA. 88:3412-5.
- 3-. **Krieg P, Schnapke R, Furstenberger G, Vogt I, Marks F. 1991.** TGF-beta 1 and skin carcinogenesis: antiproliferative effect *in vitro* and TGF-beta 1 RNAm expression during epidermal hyperproliferation and multistage tumorigenesis. Mol Carcinog. 4:129-37.
- 4-. **Roberts AB, Wakefield LM. 2003.** The two faces of transforming growth factor beta in carcinogenesis. Proc Natl Acad Sci U S A. 100:8430-5.
- 5-. **Oft M, Heider KH, Beug H. 1998.** TGFbeta signaling is necessary for carcinoma cell invasiveness and metastasis. Curr Biol. 8:1243-52.
- 6-. **Elliott RL, Blobe GC. 2005.** Role of transforming growth factor Beta in human cancer. J Clin Oncol. 23:2078-93.
- 7-. **Feng XH, Derynck R. 2005.** Specificity and versatility in tgf-beta signaling through Smads. Annu Rev Cell Dev Biol. 21:659-93.
- 8-. **Rifkin DB, Mazziere R, Munger JS, Noguera I, Sung. 1999.** Proteolytic control of growth factor availability. J. APMIS. 107:80-5.
- 9-. **Massague J. 2000.** How cells read TGF-beta signals. Nat Rev Mol Cell Biol. 1:169-78.
- 10-. **Wicks SJ, Grocott T, Haros K, Maillard M, ten Dijke P, Chantry A. 2006.** Reversible ubiquitination regulates the Smad/TGF-beta signalling pathway. Biochem Soc Trans. 34:761-3.
- 11-. **Derynck R, Zhang YE. 2003.** Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling. Nature. 425:577-84.
- 12-. **Yu J, Bian D, Mahanivong C, Cheng RK, Zhou W, Huang S. 2004.** p38 Mitogen-activated protein kinase regulation of endothelial cell migration depends on urokinase plasminogen activator expression. J Biol Chem. 279:50446-54

- 13-. **Itoh S, Thorikay M, Kowanetz M, Moustakas A, Itoh F, Heldin CH, Ten Dijke P. 2003.** Elucidation of Smad requirement in transforming growth factor-beta type I receptor-induced responses. *J Biol Chem.* 278:3751-61.
- 14-. **Guerrero J, Santibañez JF, González A, Martínez. 2004.** EGF receptor transactivation by urokinase receptor stimulus through a mechanism involving Src and matrix metalloproteinases. *J. Exp Cell Res.* 292:201-8.
- 15-. **Iglesias M, Frontelo P, Gamallo C, Quintanilla M. 2000.** Blockade of Smad4 in transformed keratinocytes containing a Ras oncogene leads to hyperactivation of the Ras-dependent Erk signalling pathway associated with progression to undifferentiated carcinomas. *Oncogene* 19:4134-45.
- 16-. **Yue J, Mulder KM. 2001.** Transforming growth factor-beta signal transduction in epithelial cells. *Pharmacol Ther.* 91:1-34.
- 17-. **Yue J, Sun B, Liu G, Mulder KM. 2004.** Requirement of TGF-beta receptor-dependent activation of c-Jun N-terminal kinases (JNKs)/stress-activated protein kinases (Sapks) for TGF-beta up-regulation of the urokinase-type plasminogen activator receptor. *J Cell Physiol.* 199:284-92.
- 18-. **Santibañez JF. 2006.** JNK mediates TGF-beta1-induced epithelial mesenchymal transdifferentiation of mouse transformed keratinocytes. *FEBS Lett.* 580:5385-91.
- 19-. **Damdinsuren B, Nagano H, Kondo M, Natsag J, Hanada H, Nakamura M, Wada H, Kato H, Marubashi S, Miyamoto A, Takeda Y, Umeshita K, Dono K, Monden M. 2006.** TGF-beta1-induced cell growth arrest and partial differentiation is related to the suppression of Id1 in human hepatoma cells. *Oncol Rep.* 15:401-8.
- 20-. **Ye L, Zhang HY, Wang H, Yang GH, Bu H, Zhang L, Wang SL. 2005.** Effects of transforming growth factor beta 1 on the growth of rhabdomyosarcoma cell line RD. *Chin Med J (Engl).* 118:678-86.
- 21-. **Koehler H, Kofler D, Hombach A, Abken H. 2007.** CD28 costimulation overcomes transforming growth factor-beta-mediated repression of proliferation of redirected human CD4+ and CD8+ T cells in an antitumor cell attack. *Cancer Res.* 67:2265-73.
- 22-. **Poggi A, Zocchi MR. 2006.** Mechanisms of tumor escape: role of tumor microenvironment in inducing apoptosis of cytolytic effector cells. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz).* 54:323-33.
- 23-. **Lei X, Yang J, Nichols RW, Sun LZ. 2007.** Abrogation of TGFbeta signaling induces apoptosis through the modulation of MAP kinase pathways in breast cancer cells. *Exp Cell Res.* 313:1687-95.

- 24-. **Ito M, Minamiya Y, Kawai H, Saito S, Saito H, Nakagawa T, Imai K, Hirokawa M, Ogawa J. 2006.** Tumor-derived TGFbeta-1 induces dendritic cell apoptosis in the sentinel lymph node. *J Immunol.* 176:5637-43.
- 25-. **Lee JM, Dedhar S, Kalluri R, Thompson EW. 2006.** The epithelial-mesenchymal transition: new insights in signaling, development, and disease. *J Cell Biol.* 172:973-81.
- 26-. **Nawshad A, Lagamba D, Polad A, Hay ED. 2005.** Transforming growth factor-beta signaling during epithelial-mesenchymal transformation: implications for embryogenesis and tumor metastasis. *Cells Tissues Organs.* 179:11-23.
- 27-. **Gotzmann J, Mikula M, Eger A, Schulte-Hermann R, Foisner R, Beug H, Mikulits W. 2004.** Molecular aspects of epithelial cell plasticity: implications for local tumor invasion and metastasis. *Mutat Res.* 566:9-20
- 28 -. **Liotta LA, Kohn E. 2004.** Anoikis: cancer and the homeless cell. *Nature* 430:973-4.
- 29-. **Thiery JP. 2003.** Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Curr Opin Cell Biol.* 15:740-6.
- 30-. **Santibanez JF. 2006.** JNK mediates TGF-beta1-induced epithelial mesenchymal transdifferentiation of mouse transformed keratinocytes. *FEBS Lett.* 580:5385-91.
- 31-. **Huber MA, Kraut N, Beug H. 2005.** Molecular requirements for epithelial-mesenchymal transition during tumor progression. *Curr Opin Cell Biol.* 17:548-58.
- 32-. **Comijn J, Berx G, Vermassen P, Verschuere K, van Grunsven L, Bruyneel E, Mareel M, Huylebroeck D, van Roy F. 2001.** The two-handed E box binding zinc finger protein SIP1 downregulates E-cadherin and induces invasion. *Mol Cell* 7:1267-78.
- 33-. **Peinado H, Quintanilla M, Cano A. 2003.** Transforming growth factor beta-1 induces snail transcription factor in epithelial cell lines: mechanisms for epithelial mesenchymal transitions. *J Biol Chem.* 278:21113-23.
- 34-. **Andreasen PA, Kjoller L, Christensen L, Duffy MJ. 1997.** The urokinase-type plasminogen activator system in cancer metastasis. *Int J Cancer.* 72:1-22.
- 35-. **Santibanez JF, Frontelo P, Iglesias M, Martinez J, Quintanilla M. 1999.** Urokinase expression and binding activity associated with the transforming growth factor beta1-induced migratory and invasive phenotype of mouse epidermal keratinocytes. *J Cell Biochem.* 74:61-73.

- 36-. **Santibanez JF, Iglesias M, Frontelo P, Martinez J, Quintanilla M. 2000.** Involvement of the Ras/MAPK signaling pathway in the modulation of urokinase production and cellular invasiveness by transforming growth factor-beta(1) in transformed keratinocytes, *Biochem Biophys Res Commun.* 273:521-7.
- 37-. **Duffy MJ. 2007.** The urokinase plasminogen activator system: role in malignancy. *Eur J Intern Med.* 18:175-184.
- 38-. **Kim ES, Kim MS, Moon A. 2004.** TGF-beta-induced upregulation of MMP-2 and MMP-9 depends on p38 MAPK, but not ERK signaling in MCF10A human breast epithelial cells. *Int J Oncol.* 25:1375-82.
- 39-. **Santibanez JF, Olivares D, Guerrero J, Martinez J. 2003.** Cyclic AMP inhibits TGFbeta1-induced cell-scattering and invasiveness in murine-transformed keratinocytes. *Int J Cancer.* 107:715-20.
- 40-. **Dowdy SF, Lai KM, Weissman BE, Matsui Y, Hogan BL, Stanbridge EJ. 1991.** The isolation and characterization of a novel cDNA demonstrating an altered RNAm level in nontumorigenic Wilms' microcell hybrid cells. *Nucleic Acids Res.* 19:5763-9.
- 41-. **Nguyen YH, Mills AA, Stanbridge EJ. 1998.** Assembly of the QM protein onto the 60S ribosomal subunit occurs in the cytoplasm. *J Cell Biochem.* 68:281-5.
- 43-. **Chiocchetti A, Zhou J, Zhu H, Karl T, Haubenreisser O, Rinnerthaler M, Heeren G, Oender K, Bauer J, Hintner H, Breitenbach M, Breitenbach-Koller L. 2007.** Ribosomal proteins Rpl10 and Rps6 are potent regulators of yeast replicative life span. *Exp Gerontol.* 42:275-86.
- 44-. **Monteclaro FS, Vogt PK. 1993.** A Jun-binding protein related to a putative tumor suppressor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 90:6726-30.
- 45-. **Imafuku I, Masaki T, Waragai M, Takeuchi S, Kawabata M, Hirai S, Ohno S, Nee LE, Lippa CF, Kanazawa I, Imagawa M, Okazawa H. 1999.** Presenilin 1 suppresses the function of c-Jun homodimers via interaction with QM/Jif-1. *J Cell Biol.* 147:121-34.
- 46-. **Oh HS, Kwon H, Sun SK, Yang CH. 2002.** QM, a putative tumor suppressor, regulates proto-oncogene c-yes. *J Biol Chem.* 277:36489-98.
- 47-. **Green H, Canfield AE, Hillarby MC, Grant ME, Boot-Handford RP, Freemont AJ, Wallis GA. 2000.** The ribosomal protein QM is expressed differentially during vertebrate endochondral bone development. *J Bone Miner Res.* 15:1066-75.

- 48-. **Altinok G, Powell IJ, Che M, Hormont K, Sarkar FH, Sakr WA, Grignon D, Liao DJ. 2006.** Reduction of QM protein expression correlates with tumor grade in prostatic adenocarcinoma., *Prostate Cancer Prostatic Dis.* 9:77-82.
- 49-. **Zoumpourlis V, Solakidi S, Papathoma A, Papaevangeliou D. 2003.** Alterations in signal transduction pathways implicated in tumour progression during multistage mouse skin carcinogenesis.*Carcinogenesis* 24:1159-65.
- 50-. **Bowden GT, Schneider B, Domann R, Kulesz-Martin M. 1994.** Oncogene activation and tumor suppressor gene inactivation during multistage mouse skin carcinogenesis. *Cancer Res.* 54:1882-5
- 51-. **Labbe E, Silvestri C, Hoodless PA, Wrana JL, Attisano L. 1998.** Smad2 and Smad3 positively and negatively regulate TGF beta-dependent transcription through the forkhead DNA-binding protein FAST2.*Mol Cell.* 2:109-20.
- 52-. **Feng XH, Zhang Y, Wu RY, Derynck R. 1998.** The tumor suppressor Smad4/DPC4 and transcriptional adaptor CBP/p300 are coactivators for smad3 in TGF-beta-induced transcriptional activation. *Genes Dev.* 12:2153-63.
- 53-. **Santibanez JF, Letamendia A, Perez-Barriocanal F, Silvestri C, Saura M, Vary CP, Lopez-Novoa JM, Attisano L, Bernabeu C. 2007.** Endoglin increases eNOS expression by modulating Smad2 protein levels and Smad2-dependent TGF-beta signaling. *J Cell Physiol.* 210:456-68.
- 54-. **Chen SJ, Yuan W, Lo S, Trojanowska M, Varga J. 2000.** Interaction of smad3 with a proximal smad-binding element of the human alpha2(I) procollagen gene promoter required for transcriptional activation by TGF-beta. *J Cell Physiol.*183:381-92.
- 55-. **Yang SH, Sharrocks AD. 2006.** Convergence of the SUMO and MAPK pathways on the ETS-domain transcription factor Elk-1. *Biochem Soc Symp.* 1:121-9.
- 56-. **Guerrero J, Santibanez JF, Gonzalez A, Martinez J. 2004.** EGF receptor transactivation by urokinase receptor stimulus through a mechanism involving Src and matrix metalloproteinases. *Exp Cell Res.* 292:201-8.
- 57-. **Lowry O, Rosebrough N, Farr A, Randall J. 1951.** Protein measurement with the Folin's phenol reagent. *J. Biol. Chem.*193:265-275.
- 58-.**Laemmli. 1970.** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4" *Nature.* 227: 680-685
- 59-.**Towbin H, Satehelin T, Gordon J. 1979.** Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and applications. *Proc Natl Acad Sci.* 76:4350-4.