

Universidad de Chile
Facultad de Medicina
Escuela de Postgrado

Caveolina-1 inhibe la proliferación y promueve la muerte celular mediante la regulación negativa de la ciclooxigenasa-2 y survivina

Autor:

Diego Alejandro Rodriguez Gonzalez

Tesis para optar al grado de doctor en Ciencias Biomédicas

Directores de Tesis: Prof. Dr. Andrew Quest

Santiago-Chile

2009

Texto completo en: www.cybertesis.uchile.cl/tesis/uchile/2009/me-rodriguez_d/pdfAmont/me-rodriguez_d.pdf

Prof. Dra. Lisette Leyton

RESUMEN . .	4
Disponible a texto completo . .	7

RESUMEN

El cáncer es una de las mayores causas de muerte a nivel mundial. Múltiples cambios a nivel molecular se han asociado con la génesis de esta enfermedad, los cuales se ubican dentro de dos categorías, estas alteraciones atribuidas a oncogenes (ganancia de función) o a supresores de tumores (pérdida de función). Un ejemplo de gen supresor de tumores es el gen de *caveolina-1*, ya que su expresión es eliminada en muchos tipos de células de cáncer y su re-expresión, dependiendo del contexto y tipo celular, inhibe las características asociadas con el fenotipo transformado. Caveolina-1 es una proteína integral de membrana de 21-24 kDa y constituye el principal componente proteico de las caveolas o “pequeñas cuevas” que son invaginaciones vesiculares de la membrana plasmática de 50-100 nm de tamaño. Caveolina-1 pertenece a una familia de proteínas que comprende tres isoformas diferentes (caveolina-1, 2 y 3). La caveolina-1 y 2 son usualmente co-expresadas en diferentes tejidos y células, mientras que la expresión de caveolina-3 se limita principalmente a células musculares.

En diferentes tipos de cáncer, genes cuya transcripción es normalmente inducible, frecuentemente se vuelve constitutiva, como es el caso de la enzima ciclooxigenasa-2(COX-2), que cataliza la síntesis de prostaglandinas (PGs) a partir del ácido araquidónico (AA). Particularmente, en cáncer de colon, PGE₂, aumenta la actividad transcripcional de β -catenina que en asociación con los factores de transcripción Tcf/Lef (Tcf, T cell factor; Lef, Lymphoid enhancer factor) promueven la expresión de genes tales como: *ciclina D1* y *survivina*. Survivina, es un miembro de la familia de proteínas inhibidoras de la apoptosis (IAPs) y está normalmente ausente en los tejidos diferenciados adultos, pero se sobreexpresa en células cancerosas y su expresión correlaciona bien con una tasa proliferativa aumentada y el mal pronóstico para los pacientes.

Se ha descrito previamente que caveolina-1 co-localiza en la membrana plasmática con E-cadherina y β -catenina, dado que co-inmunoprecipita con estas proteínas. Adicionalmente, la expresión de caveolina-1 reprime la actividad transcripcional dependiente de β -catenina-Tcf/Lef, inducida por la proteína secretada Wnt o por la sobreexpresión de β -catenina. En concordancia con estas observaciones, nuestro laboratorio demostró que la sobreexpresión de caveolina-1 en células HEK293T, ZR75, DLD-1 y HT29(ATCC), reprime la expresión de survivina, por un mecanismo transcripcional que involucra la vía de β -catenina-Tcf/Lef, disminuye la proliferación y promueve la muerte celular. Además, dicha inhibición requiere de la presencia de E-cadherina, dado que células de origen metastático HT29(US), que carecen de E-cadherina no responden a dicha regulación, pero lo hacen al re-expresar esta proteína.

Alternativamente, demostramos previamente que caveolina-1 regula blancos río abajo por un mecanismo de regulación post-transcripcional mediado por la degradación proteasomal, como es el caso de la isoforma sintasa inducible del óxido nítrico (iNOs).

El trabajo descrito aquí se focalizó en la identificación de mecanismos por el cual caveolina-1 regula la actividad/expresión de COX-2, también estudiamos como alteraciones en la expresión de COX-2 se relaciona con posibles cambios en la expresión de survivina y la proliferación celular. En estos estudios se analizaron tres líneas celulares de cáncer de colon [DLD-1; HT29(ATCC) y HT29(US)] y una línea celular de cáncer mamario (ZR-75)

que expresan establemente caveolina-1 (inducción por IPTG). También se usó células de origen embrionario (HEK293T) transfectadas de manera transitoria con caveolina-1. Los resultados indicaron que la presencia de caveolina-1 disminuye los niveles de mRNA y proteicos de COX-2 así como también, la liberación de PGE2. Células HT29(US) que sobreexpresan caveolina-1 no revelaron cambios en los niveles de mRNA de COX-2, pero si se restablece este tipo de regulación cuando se co-expresó E-cadherina junto con caveolina-1. También, en células HEK293T, DLD-1 y ZR75 la presencia de caveolina-1 disminuyó la actividad transcripcional β -catenina-Tcf/Lef, así como la actividad reportera específica de COX-2. La inhibición observada por la presencia de caveolina-1 fue revertida en células incubadas con los inhibidores de la quinasa GSK-3 β . Estos resultados indican que caveolina-1 inhibe la expresión de COX-2 por un mecanismo de regulación transcripcional, similar al que fue previamente descrito para survivina.

Adicionalmente, investigamos si la expresión ectópica de COX-2 o la adición de

PGE2 al cultivo celular, aumenta la expresión de survivina y si dicho efecto es suficiente para sobrellevar la inhibición de survivina por caveolina-1. Resultados obtenidos por análisis de RT-PCR, Western blot y ensayos de reporteros, revelaron que la sobreexpresión de COX-2 aumenta la expresión de survivina, activa la vía de β -catenina-Tcf/Lef y específicamente aumenta la actividad reportera de plasmidios que contienen elementos de respuesta de la región promotora de COX-2 y survivina. Estos eventos fueron acompañados por una mayor liberación de PGE2. Adicionalmente, PGE2 incrementó los niveles de mRNA y proteicos de survivina y COX-2, así como la actividad de vectores reporteros previamente mencionados, indicando que COX-2 promovería su propia expresión por un mecanismo de retroalimentación positivo.

Estos experimentos revelaron también que la adición de PGE2 previene la inhibición de la expresión de survivina y la proliferación debido a la presencia de caveolina-1, así como en presencia del inhibidor específico de COX-2. Además, la inhibición de COX-2 disminuyó los niveles de PGE2, la actividad transcripcional de β -catenina-Tcf/Lef, los niveles proteicos de survivina y la proliferación celular. En células de cáncer de colon, la inhibición de COX-1 reflejó un efecto similar pero menos pronunciado. Como fue observado en células HEK293T, transfecciones transitorias adicionales de COX-2 en células DLD-1 que expresan o no caveolina-1, sobrellevó los efectos inhibitorios observados por la presencia de caveolina-1, incluyendo la reducción de la expresión de survivina, reducida actividad reportera de β -catenina-Tcf/Lef y del reportero que contiene el promotor de survivina, así como también redujo la producción de PGE2 y la proliferación celular. Además, la presencia de PGE2, en células HT29(ATCC) que expresan caveolina-1, aumenta los niveles nucleares de β -catenina, disminuye la co-localización y la co-inmunoprecipitación de β -catenina con caveolina-1. En conjunto, estos resultados sugieren que el tratamiento con PGE2 previene la formación eficiente del complejo caveolina-1/ β -catenina/E-cadherina en la membrana plasmática y por ende permite la translocación nuclear de β -catenina. Finalmente, mediante espectrometría de masas (MALDI-TOF), se comparó proteínas que componen los complejos multiproteicos asociados a caveolina-1 en células HT29(ATCC) y HT29(US) que expresan o no caveolina-1. Los resultados revelaron diferencias sustanciales en la composición de los complejos, algunas de las cuales fueron proteínas involucradas en la degradación proteasomal. En concordancia, se observó que la presencia de caveolina-1 disminuyó sustancialmente la vida media de survivina, sugiriéndose que ocurre a través de un mecanismo post-transcripcional mediado por la degradación vía proteasomal. Interesantemente, dicho efecto fue independiente de la presencia de E-cadherina.

En resumen, este trabajo demuestra que caveolina-1 inhibe la expresión de COX-2 de una manera similar a lo descrito para ciclina D1 y survivina. Además, se identificó un mecanismo de retroalimentación positivo entre COX-2/PGE2 y la expresión de survivina. Este estudio también muestra cómo caveolina-1 o COX-2, inhiben o activan la transcripción dependiente de β -catenina-Tcf/Lef. Por un lado, PGE2 un producto derivado de la actividad enzimática de COX-2 se une a receptores EP2 incrementando la actividad transcripcional de β -catenina-Tcf/Lef, promoviendo la expresión de genes proliferativos como *cox-2* y *survivina*. Por otra parte, caveolina-1 secuestra β -catenina a la membrana plasmática en un complejo multiproteico con E-cadherina, inhibiendo la transcripción de survivina y COX-2 la cual es dependiente de β -catenina-Tcf/Lef. Además, según la evidencia presentada se predice que la producción de PGE2 por alguna célula vecina reducirá la capacidad de caveolina-1 para inhibir la transcripción dependiente de β -catenina-Tcf/Lef y, por ende, su función como supresor de tumores en la misma célula o en células vecinas. Por el contrario, incrementos en la expresión de caveolina-1 podrían modular características de células por la reducción en la producción de PGE2 sugiriendo que alteraciones en la expresión de caveolina-1 en células epiteliales y del estroma podrían ser importantes en el desarrollo tumoral.

Finalmente, este estudio sugiere que caveolina-1 de manera simultánea promueve la degradación de survivina por un mecanismo de regulación post-transcripcional. Por lo tanto, el impacto de caveolina-1 sobre survivina ocurre a diferentes niveles al parecer por mecanismos interconectados. Dada la importancia atribuida a la expresión de survivina en células de cáncer, estas observaciones representan un avance sustancial en el entendimiento de la función de caveolina-1 como supresora de tumores.

Disponible a texto completo

Texto completo en: www.cybertesis.uchile.cl/tesis/uchile/2009/me-rodriguez_d/pdfAmont/me-rodriguez_d.pdf