

CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS DEL
INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

**PARTICIPACIÓN DEL MARCADOR DE ENDOTELIO
TUMORAL 5 (TEM5/GPR124) EN LA RESPUESTA
ANGIOGÉNICA POR FACTORES SECRETADOS POR
CÉLULAS TUMORALES**

TESIS QUE PRESENTA
Q.F.B. MAGDA NOHEMÍ HERNÁNDEZ VÁSQUEZ

PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRA EN CIENCIAS EN LA
ESPECIALIDAD DE FARMACOLOGÍA

DIRECTOR
Dr. JOSÉ VÁZQUEZ PRADO

Ciudad de México, D.F.

Diciembre del 2012

AGRADECIMIENTOS

“ Hijo, dedícate a la instrucción desde tu juventud, y hasta tu vejez, encontrarás sabiduría. Trabájala así como hacen el labrador y el sembrador y espera pacientemente sus buenos frutos; te cansarás un poco al trabajarla, pero pronto comerás sus frutos”.

Sirácida 6:18

Primero y antes que nada, le agradezco a Dios por guiarme con sabiduría en cada paso que doy, por llenarme de fortaleza en todo momento, por permitirme adquirir experiencias y conocimientos, que resultaron en aprendizajes y por brindarme una vida que atesoro.

Le doy gracias a mis padres Benny y Nohemí por darme siempre su apoyo incondicional, por los valores que me han inculcado, y por haberme dado la oportunidad de tener una excelente educación ¡Los amo!

A mis hermanos Rubén y Karyme por ser parte importante de mi vida, y por disfrutar de su compañía, promoviendo la unión familiar y por llenarme de alegría con sus logros ¡Por todo esto, gracias!

A toda mi familia y amigos, aunque en algunos casos, la distancia nos separa, sepan que siempre estuvieron conmigo y les agradezco su apoyo moral y emocional recibido en todo momento.

Quiero agradecer a mis compañeros y amigos de laboratorio sus apoyos y solidaridad, por transmitirme sus experiencias científicas y hacer del laboratorio un ambiente ameno.

Gracias José por haberme dado la oportunidad de desarrollar el proyecto de maestría bajo tu dirección, que para mí fue todo un honor. Por brindarme todas las herramientas necesarias que enriquecieron mi formación profesional.

A los Dres. Guadalupe Reyes Cruz y María del Carmen García G. les expreso mi agradecimiento por la asesoría y observaciones aportadas durante este proyecto de tesis. En especial a la Dra. Lupita, por permitirme realizar el trabajo de tesis en su laboratorio y por la confianza depositada.

ÍNDICE

INDICE	1
RESUMEN	6
GLOSARIO	8
ÍNDICE DE FIGURAS	11
1. INTRODUCCIÓN	13
1.1 ANGIOGÉNESIS TUMORAL.....	13
1.2 MARCADORES DE ENDOTELIO TUMORAL.....	16
1.2.1 MARCADOR DE ENDOTELIO TUMORAL 5 (TEM5/GPR124).....	18
1.3. RECEPTORES ACOPLADOS A PROTEÍNAS G (GPCRs).....	21
1.4 LAS GTPasas DE LA FAMILIA DE Rho.....	22
JUSTIFICACIÓN	26
HIPÓTESIS	27
OBJETIVOS	27
OBJETIVO GENERAL.....	27
OBJETIVOS PARTICULARES.....	27
2. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	28
2.1 EFECTO EN LA EXPRESION DE TEM5 ENDÓGENO EN CÉLULAS HMEC Y HUVEC ESTIMULADAS CON VEGF	29
2.1.1 AMPLIFICACIÓN DE TEM5.....	29
2.2.1 ELECTROFORESIS EN GELES DE AGAROSA.....	30
2.2 CLONACIÓN DE shRNA_TEM5_262 Y shRNA_TEM5_3895	31
2.2.1. AMPLIFICACIÓN DE LOS shRNA_TEM5_262 Y shRNA_TEM5_3895	31
2.2.2 ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA.....	33
2.2.3. PURIFICACIÓN DE LOS FRAGMENTOS AMPLIFICADOS.....	34
2.2.4. DIGESTIÓN DE LOS shRNA_TEM5 Y EL VECTOR pEN_EmirC3 CON ENZIMAS DE RESTRICCIÓN.....	35
2.2.5 PURIFICACIÓN DE LOS FRAGMENTOS DIGERIDOS.....	36

2.2.6 LIGACIÓN.....	37
2.2.7. TRANSFORMACIÓN DE BACTERIAS DH5α.....	38
2.2.8. MINIPREP DE ADN.....	40
2.2.9 MEDICIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE ADN.....	41
2.2.10 DIGESTIÓN DE LA LIGACIÓN.....	42
2.3. EFECTO DE pEN_EmirC3_shRNA_TEM5_262 Y pEN_EmirC3_shRNA _TEM5_3895 SOBRE TEM5.....	42
2.3.1. MANTENIMIENTO DEL CULTIVO CELULAR.....	43
2.3.2. TRANSFECCIÓN CELULAR. TRANSFECCIÓN DE CÉLULAS HEK 293T CON LAS CONSTRUCCIONES 3XFlag-TEM5-GFP pEN_EmirC3_shRNA_TEM5_262 Y pEN_EmirC3_shRNA_TEM5_3895 POR EL MÉTODO DE POLYFECT.....	43
2.3.3. LISADO CELULAR.....	44
2.3.4. CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNA.....	45
2.3.5. WESTERN BLOT.....	47
2.3.6. REVELADO.....	47
2.4 RECOMBINACIÓN DE shRNA_TEM5_262_pEN_EmirC3/ shRNA_TEM5 _3895_pEN_EmirC3 y pDSL_hpIP/pDSL_hpIG.....	48
2.5. EFECTO DE LA SOBREEXPRESIÓN DEL RECEPTOR TEM5.....	49
2.5.1. MANTENIMIENTO DEL CULTIVO CELULAR.....	50
2.5.2. TRANSFECCIÓN CELULAR. TRANSFECCIÓN DE CÉLULAS HEK 293 CON LAS CONSTRUCCIONES 3XFlag-TEM5 Y 3XFlag-TEM5-GFP POR EL MÉTODO DE POLYFECT.....	50
2.5.3. AYUNO CELULAR.....	51
2.5.4. LISIS CELULAR.....	51
2.5.5. WESTERN BLOT.....	52
2.5.6. REVELADO.....	54
2.6. EFECTO DEL MEDIO CONDICIONADO DE LAS CÉLULAS HT-29 (Línea celular de cáncer colorrectal humano) EN LA VÍA DE TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES DEL RECEPTOR TEM5.....	55

2.6.1. MANTENIMIENTO DEL CULTIVO CELULAR.....	55
2.6.2. TRANSFECCIÓN CELULAR. TRANSFECCIÓN DE CÉLULAS HEK 293 CON LAS CONSTRUCCIONES 3XFlag-TEM5 Y 3XFlag-TEM5-GFP POR EL MÉTODO DE POLYFECT.....	56
2.6.3. AYUNO CELULAR.....	57
2.6.4. LISIS CELULAR.....	58
2.6.5. WESTERN BLOT.....	58
2.6.6. REVELADO.....	61
2.7. ACTIVACIÓN DE LA GTPasa Rac PROMOVIDA POR EL MEDIO CONDICIONADO DE LAS CÉLULAS HT-29.....	61
2.7.1. MANTENIMIENTO DEL CULTIVO CELULAR.....	62
2.7.2. TRANSFECCIÓN CELULAR. TRANSFECCIÓN DE CÉLULAS HEK 293 CON LAS CONSTRUCCIONES 3XFlag-TEM5 y pCEFL POR EL MÉTODO DE POLYFECT.....	62
2.7.3. AYUNO CELULAR.....	63
2.7.4. LISIS CELULAR.....	64
2.7.5. WESTERN BLOT.....	67
2.8. DINÁMICA DEL RECEPTOR TEM5 EN RESPUESTA AL MEDIO CONDICIONADO DE LAS CÉLULAS HT-29.....	68
2.8.1. MANTENIMIENTO DEL CULTIVO CELULAR.....	68
2.8.2. TRANSFECCIÓN CELULAR. TRANSFECCIÓN DE CÉLULAS HeLa CON LAS CONSTRUCCIONES 3XFlag-TEM5-GFP Y pCEFL-EGFP POR EL MÉTODO DE POLYFECT	69
2.8.3. AYUNO CELULAR.....	70
2.8.4. ESTIMULACIÓN DE LAS CÉLULAS HeLa CON EL MEDIO CONDICIONADO DE LAS CÉLULAS HT-29.....	71
2.9. EFECTO FUNCIONAL DE TEM5 EN LA MIGRACIÓN CELULAR PROMOVIDA POR EL MEDIO CONDICIONADO DE LAS CÉLULAS HT- 29.....	72
2.9.1. MANTENIMIENTO DEL CULTIVO CELULAR.....	72

2.9.2. TRANSFECCIÓN CELULAR. TRANSFECCIÓN DE CÉLULAS HeLa CON LAS CONSTRUCCIONES 3XFlag-TEM5-GFP Y pCEFL-EGFP POR EL MÉTODO DE POLYFECT.....	73
2.9.3. AYUNO CELULAR.....	74
2.9.4. ESTIMULACIÓN DE LAS CÉLULAS HeLa CON EL MEDIO CONDICIONADO DE LAS CÉLULAS HT-29.....	74
2.9.5 CIERRE DE HERIDA.....	75
2.10 EFECTO FUNCIONAL DE TEM5 EN LA ANGIOGÉNESIS <i>IN VITRO</i> EN MATRIGEL.....	76
2.10.1 MANTENIMIENTO DEL CULTIVO CELULAR.....	76
2.10.2 TRANSFECCIÓN EN CÉLULAS PAE CON LAS CONSTRUCCIONES 3XFlag-TEM5-GFP Y pCEFL-EGFP POR EL MÉTODO DE LIPOFECTAMINA LTX-PLUS.....	76
2.10.3 Ensayo de angiogénesis <i>in vitro</i>	78
RESULTADOS.....	80
EFECTO DEL FACTOR DE CRECIMIENTO DE ENDOTELIO VASCULAR (VEGF) SOBRE LA EXPRESIÓN DEL ARN MENSAJERO DE TEM5 EN CÉLULAS ENDOTELIALES.....	80
CONSTRUCCIÓN DE LOS pEN_EmirC3_shRNA_TEM5.....	81
CONSTRUCCIÓN DE pDSL_hpIP/IG_shRNA_TEM5_3895.....	84
EFECTO DE LA SOBREEXPRESIÓN DE TEM5/GPR124 EN LA TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES.....	85
EFECTO DEL MEDIO CONDICIONADO DE LAS CÉLULAS HT-29 SOBRE TEM5/GPR124 EN LA TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES.....	87
EFECTO DE LOS MEDIOS CONDICIONADOS DE LAS CÉLULAS HT-29 SOBRE LA ACTIVACIÓN DE LA GTPasa Rac.....	89
RELOCALIZACIÓN DEL RECEPTOR TEM5 EN RESPUESTA AL MEDIO CONDICIONADO DE LAS CÉLULAS HT-29.....	90
EFECTO DE TEM5 EN LA MIGRACIÓN CELULAR EN RESPUESTA AL MEDIO CONDICIONADO DE LAS CÉLULAS HT-29.....	93

EFFECTO DE TEM5 EN LA ANGIOGÉNESIS <i>IN VITRO</i>	95
DISCUSIÓN	98
CONCLUSIONES	106
PERSPECTIVAS	108
REFERENCIAS	110

RESUMEN

El cáncer es un proceso patológico donde las células proliferan de manera descontrolada y lleva a la formación de nuevos vasos sanguíneos, angiogénesis tumoral. Las células cancerosas deben, mediante la formación de nuevos vasos sanguíneos, ser provistas de oxígeno y nutrientes necesarios para proliferar en un ambiente inicialmente hipóxico. En este contexto la identificación de proteínas expresadas diferencialmente en tejido patológico resulta una herramienta interesante para iniciar la caracterización de blancos terapéuticos potenciales para inhibir el desarrollo del cáncer o metástasis. Recientemente, GPR124, también conocido como TEM5, fue identificado como un marcador de endotelio tumoral sobreexpresado en células endoteliales de cáncer colorrectal humano. La expresión de TEM5 es esencial durante el desarrollo de los vasos sanguíneos cerebrales en la etapa embrionaria. Consideramos que TEM5, un receptor huérfano perteneciente a la clase B de los receptores acoplados a proteínas G (GPCRs), podría inducir cascadas de señalización relacionadas al remodelaje del citoesqueleto y migración celular por sobreexpresión o medio condicionado de las células HT-29 (línea celular de cáncer colorrectal). Además por antecedentes del laboratorio sabemos que la sobreexpresión de TEM5 conduce a un aumento de la actividad de la GTPasa Rac, sugiriendo que en su transducción de señales involucra a GTPasas de la familia de Rho, cinasas y a la vía de PI3K/Akt/mTOR, importantes para el movimiento celular.

En este trabajo encontramos que la sobreexpresión del receptor TEM5 llevó a la activación de la cinasa Akt, determinada por su fosforilación en la serina 473, y no así de las cinasas ERK, GSK3 β ni S6K. Sin embargo, el receptor TEM5 atenuó significativamente, a tiempos largos, la fosforilación de la cinasa ERK ocurrida en respuesta a medio condicionado de células HT-29. Además, los medios condicionados de las células HT-29 en células

transfectadas con TEM5 favorecieron la activación de la GTPasa Rac a tiempos cortos, sugiriendo que TEM5 tiene un papel importante en el movimiento celular polarizado.

Aunado a lo anterior, el receptor TEM5 se relocalizó hacia las proyecciones celulares (en el frente de la célula en movimiento) en respuesta a medio condicionado de células HT-29 y promovió la migración celular en cierre de herida. TEM5 participó de manera crucial en la angiogénesis, ya que por su sobreexpresión promovió la formación de cordones a las 2 horas, mientras que en la condición control no sucedió si no hasta las 3.5h, además con menos formación de estas estructuras capilares. TEM5 respondió a los medios condicionados de las células HT-29 en los diversos experimentos, sugiriendo que reconoce un posible ligando.

Los resultados obtenidos en este trabajo nos permitieron evidenciar la participación de TEM5 en cascadas de transducción de señales relacionados con funciones celulares como la migración celular y la angiogénesis.

GLOSARIO

Angiogénesis: Proceso fisiológico que consiste en la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de los ya existentes. Este evento se presenta en el desarrollo embrionario, la regeneración de tejidos y también en procesos patológicos como el cáncer, en cuyo caso se denomina angiogénesis tumoral.

Akt/PKB: Es una proteína cinasa de serina/treonina que juegan un papel importante en múltiples procesos como la proliferación celular, migración celular, supervivencia, entre otros.

Cdc42: GTPasa de bajo peso molecular que pertenece a la familia de Rho. Esta GTPasa regula la formación de filopodios, promoviendo cambios dinámicos en la morfología celular que pueden contribuir a eventos de migración. Además, puede conducir a una progresión del ciclo celular.

CXCR: Receptores acoplados a proteínas G que responden a la familia CXC de quimiocinas.

EGFP: Proteína verde fluorescente. Siglas en inglés, Enhanced Green Fluorescent Protein.

ERK/MAPK: Proteína cinasa de serina/treonina activada por mitógenos.

GEF: Factor intercambiador de nucleótidos de guanina.

GPCR: Receptores de 7 hélices transmembranales acoplados a proteínas G. Estos receptores reconocen moléculas extracelulares y activan vías de transducción de señales que, dependiendo del tipo celular, dan lugar a una gran variedad de respuestas celulares.

GSK3 β : cinasa glucógeno sintetasa 3 importante para el crecimiento celular y el desarrollo del organismo.

GTPasa: Guanosina trifosfatasa. Son enzimas de tipo hidrolasa que poseen una región conservada denominada dominio G, en ella, pueden incorporar a una molécula guanosina trifosfato (GTP), misma que, eventualmente es hidrolizada. La GTPasa que tiene GTP unido a ella está activa e inactiva cuando está unida al GDP.

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa (Polymerase Chain Reaction) es una técnica para amplificar secuencias de ADN.

P-REX: Factor intercambiador de nucleótidos de guanina con especificidad para la GTPasa Rac.

Proteínas G: Término usado para referirse a las proteínas G heterotriméricas que son reguladas por la unión de nucleótidos de guanina. Las proteínas G se conforma en cuatro familias. La familia Gs activa la adenilato ciclasa, la cual eleva los niveles de AMPc, mientras que la familia Gi inhibe la actividad de adenilato ciclada y disminuye los niveles de AMPc. La familia Gq activa la cinasa PKC a través de la liberación de calcio y la producción de diacilglicerol. Finalmente, la familia G_{12/13} lleva a la activación de la GTPasa Rho.

Rac: GTPasa de bajo peso molecular de la familia de Rho que induce la polimerización de actina, participando en la formación de lamelipodios en el frente de la célula en movimiento.

Rho: GTPasa de bajo peso molecular de la familia de Rho que da lugar a la formación de fibras de estrés en la parte trasera de la célula en movimiento.

S6K: Cinasa que regula la actividad de los factores iniciadores de la síntesis de proteínas.

TEM: Marcador de Endotelio Tumoral (Tumour Endothelial Marker). Nombre otorgado a un grupo de genes diferencialmente expresado en células endoteliales de cáncer colorrectal humano y de función desconocida.

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLA

- Figura 1.** Tipos de formación de vasos sanguíneos en tejido normal y en tumores.
- Figura 2.** Estructuras hipotéticas de TEM1, TEM5, TEM7 y TEM8.
- Figura 3.** Dominios estructurales del receptor TEM5.
- Figura 4.** TEM5/GPR124 en células endoteliales es responsable de la formación de capilares en el sistema nervioso central (SNC).
- Figura 5.** Localización espacial de las GTPasas de la familia de Rho en la reorganización del citoesqueleto de actina.
- Figura 6.** Estrategia experimental para determinar el papel del marcador de endotelio tumoral 5 (TEM5/GPR124) en respuesta al medio condicionado de las células HT-29.
- Figura 7.** Esquema general de la obtención de los pEN_EmirC3_shRNA_TEM5
- Figura 8.** Expresión constitutiva del ARNm de TEM5 en células HMEC y HUVEC, respectivamente.
- Figura 9.** Construcción del pEN_EmiRc3_shRNA de TEM5.
- Figura 10.** Efecto del pEN_EmiRc3_shRNA_TEM5 sobre la expresión del receptor 3XFlag-TEM5-GFP en células HEK 293T.
- Figura 11.** Construcción del pDSL_hpIP_shRNA_TEM5_3895 y del pDSL_hpIG_shRNA_TEM5_3895
- Figura 12.** Efecto de la sobreexpresión del receptor TEM5 sobre la fosforilación de la cinasa AKT en serina 473 en células HEK 293.
- Figura 13.** Efecto inducido por sobrenadantes de las células HT-29 sobre vías de señalización dependientes de la activación de TEM5 en células HEK 293.
- Figura 14.** Efecto de los sobrenadantes HT-29 sobre ERK, AKT, GSK3 β y S6K en células HEK 293 que expresan TEM5.

- Figura 15.** El receptor TEM5, transfectado en células HEK293, activa a la GTPasa Rac en respuesta a la incubación con medios condicionados de células HT-29.
- Figura 16.** TEM5 se relocaliza en las proyecciones celulares en respuesta a los medios condicionados de las células HT-29.
- Figura 17.** Relocalización del receptor TEM5 en las proyecciones nacientes de la célula en respuesta al medio condicionado de las células HT-29.
- Figura 18.** Las células que expresan a TEM5 estimuladas con los medios condicionados de células HT-29 promueven rápidamente la migración celular.
- Figura 19.** Fenotipo de una célula PAE transfectada con el receptor TEM5 fusionado a la proteína verde fluorescente.
- Figura 20.** Efecto de TEM5 en la angiogénesis *in vitro*.
- Figura 21.** Modelo propuesto de la señalización de TEM5 debida a su sobreexpresión y como respuesta al medio condicionado de las células de cáncer de colon.
- Tabla 1.** Análisis de expresión de mTEMs en tumores murinos, B16 melanoma de ratón o HCT116 carcinoma del colon humano implantaos en los ratones y usados para ensayos de hibridación *in situ*

1. INTRODUCCIÓN

1.1 ANGIOGÉNESIS TUMORAL

El cáncer resulta de una proliferación descontrolada de células anormales, con capacidad de invasión y metástasis a tejidos sanos. Estas células envían constantemente señales extracelulares, que estimulan el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos con proyección hacia el tumor para obtener los nutrientes y el oxígeno necesarios que les permita proliferar. A este proceso se le denomina angiogénesis tumoral (Figura 1). Algunos estudios sugieren que el tumor, para crecer, emplea mecanismos relacionados con la respuesta al ambiente hipóxico, como el factor inducible por hipoxia 1 (HIF-1 α) (1), promoviendo la expresión de factores angiogénicos, como el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) (1), así como la respuesta de las células endoteliales del entorno (2).

Las células endoteliales forman los capilares de los vasos sanguíneos y, debido a su ubicación accesible a la circulación, pueden responder a señales angiogénicas extracelulares, las cuales inducen el desplazamiento polarizado (3). Existen receptores localizados en la membrana celular que reconocen dichas señales extracelulares (4). Algunos de estos receptores tienen propiedades angiogénicas al transferir la información al interior de la célula, mediante transducción de señales, promoviendo la activación e interacción de elementos moleculares requeridos para llevar a eventos de angiogénesis y migración celular, un ejemplo es el receptor para esfingosina 1-fosfato S1PR (5). En términos generales, se considera que la angiogénesis tumoral es imprescindible para el desarrollo del tumor.

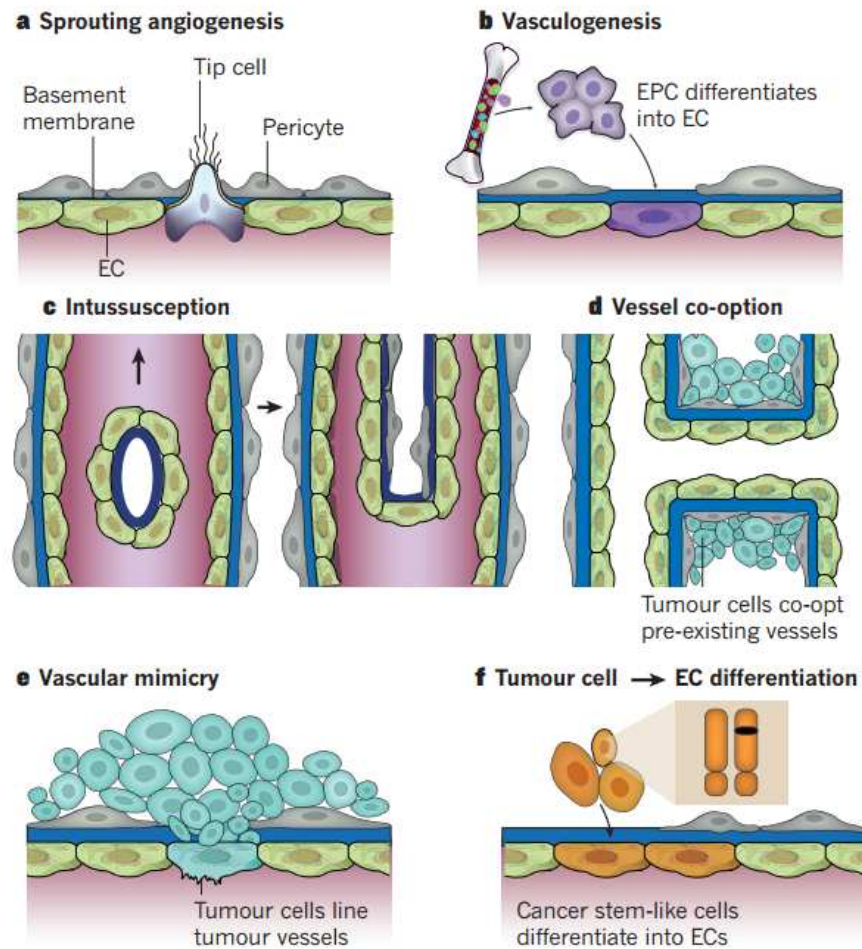


Figura 1. Tipos de formación de vasos sanguíneos en tejido normal y en tumores. **a-c**, La formación de vasos puede ocurrir por brotación en la angiogénesis (a), así como por reclutamiento de las células endoteliales progenitoras (EPCs) derivadas de la médula ósea o de la misma pared vascular residente, que se diferencian en células endoteliales (ECs) (b), o bien, por el proceso de división de los vasos conocido como intususcepción (c). **d-f**, Las células tumorales pueden co-optar en vasos preexistentes (d), o las células altamente malignas semejantes a células endoteliales, pueden incorporarse a los vasos formando vasos tumorales (e) o células endoteliales, con anomalías en sus cromosomas (f). Los tumores pueden usar los 6 modelos de formación de vasos sanguíneos en favor de mantener su supervivencia, proliferación, migración y metástasis en respuesta a factores angiogénicos. Tomado de (6).

La terapia anti-angiogénica fue originalmente desarrollada para privar de nutrientes al tumor primario y disminuir la aparición de tumores en otros

órganos diferentes al sitio donde se inició, metástasis, por bloqueo del reclutamiento de los vasos sanguíneos. El fármaco bevacizumab (Avastin®), un anticuerpo monoclonal humanizado para el VEGF, ha demostrado su eficacia en el tratamiento de cáncer de colon, cáncer de mama y cáncer de pulmón. La administración del fármaco bevacizumab durante 1 año, acompañada con 6 meses de quimioterapia reduce la recurrencia tumoral durante el periodo de tratamiento. Sin embargo, la interrupción del tratamiento con bevacizumab incrementa la tasa de recurrencia, así como la abruta evolución del tumor hacia un fenotipo más agresivo. Esto sugiere que dicho fármaco tiene un efecto citostático sobre las células tumorales o bien, favorece el desarrollo de micro-metástasis (7) .

Aún falta un gran camino por recorrer para contar con terapias antiangiogénicas efectivas para el tratamiento de distintos tipos de cánceres, ya que las que ahora existen sólo son útiles en casos limitados y pueden tener importantes efectos adversos. Los fármacos combinados, tal es el caso de bevacizumab y cetuximab (Erbix®), un anticuerpo monoclonal contra el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), no tienen actividad anti-tumoral significativa (8). Los inhibidores de la cinasa del VEGFR, tales como el cediranib, vandetanib, sorafenib, entre otros, tienen selectividad relativa y han mostrado poco efecto en la supervivencia de los pacientes, por lo que han sido descartados en ensayos de fases I, II y III. La hipertensión es uno de los efectos adversos en los pacientes que reciben terapia con fármacos anti-VEGF. No obstante, el mecanismo no está del todo descrito, una teoría es que la inhibición del VEGF reduce la síntesis de óxido nítrico, aumentando la presión sanguínea como consecuencia de la vasoconstricción (9).

Por lo anterior, la angiogénesis tumoral es considerada blanco de estrategias antineoplásicas, por lo que es importante conocer las bases moleculares de los procesos celulares implicados en la formación de nuevos

vasos sanguíneos, tales como los eventos de transducción de señales angiogénicas que provocan ajustes en la forma de la célula para dar lugar a un capilar, así como los eventos de migración celular ligados a este proceso (5).

1.2 MARCADORES DE ENDOTELIO TUMORAL

Con la idea de establecer nuevos blancos terapéuticos, una estrategia para identificar proteínas con propiedades angiogénicas se ha basado en analizar la expresión de genes en endotelio tumoral y compararla con la expresión de genes identificados en endotelio normal. Al respecto, se han descrito genes que sólo se expresan en la angiogénesis tumoral. Tal es el caso de los marcadores de endotelio tumoral (Tumor Endothelial Markers, TEMs)(Figura 2). Los TEMs (TEM1, TEM5, TEM7, TEM8) se encuentran sobreexpresados en células endoteliales de cáncer colorrectal como se muestra en la tabla 1 (10) .

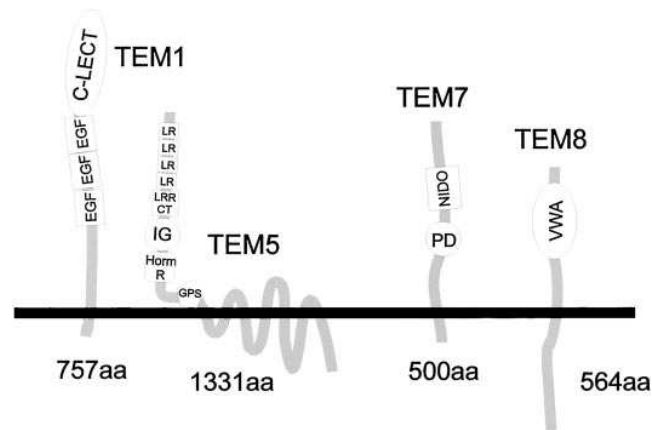


Figura 2. Estructuras hipotéticas de TEM1, TEM5, TEM7 y TEM8. Los dominios C-LECT son dominios parecidos a C-Lectina; EGF, dominio parecido al factor de crecimiento epidermal; NIDO, dominio parecido a nidógeno; PD, dominio parecido a plexina; VA, dominio de von Willerbrand A (9). Los dominios de TEM5 son descritos en la siguiente sección.

Los TEMs fueron identificados mediante la técnica de SAGE (Serial Analysis of Gene Expression, Análisis Serial de Expresión Genética). El TEM1

conocido como endosialina o CD248, glicoproteína transmembranal 1, se encuentra altamente expresado en la vasculatura del hígado como en el cerebro, fue identificado con un anticuerpo contra fibroblastos fetales humanos (11,12). Por otra parte, TEM1 podría regular la proliferación de pericitos a través del receptor β para el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR β) como mecanismo de regulación de la formación de vasos(13).

El TEM7 también es una proteína transmembranal con un extenso dominio extracelular y un dominio citoplasmático corto. Adicionalmente, el TEM7 tiene 4 isoformas generadas por procesamiento alternativo de su ARN. La isoforma TEM7m, unida a la membrana, contiene el péptido señal y el dominio transmembranal, TEM7-s1 y TEM7-s2 son dos formas secretadas de esta proteína, tienen el dominio de péptido señal pero carecen del dominio transmembranal, además existe una forma intracelular, TEM7i(14). Las formas solubles y de membrana de TEM7 contribuyen considerablemente a la proliferación y supervivencia de los osteoblastos, favoreciendo metástasis del sarcoma osteogénico y la pobre supervivencia en los pacientes con esta enfermedad (15).

El TEM8 es una proteína de membrana tipo 1. El dominio vWF A de TEM8 (dominio I, en las integrinas) es muy similar a la integrina α D, el cual interacciona con moléculas de adhesión celular vía su dominio I durante el tráfico de leucocitos (16,17). Los ratones knockout de TEM8 son viables, alcanzan la etapa adulta y no presentan alteraciones en la angiogénesis. Los ratones knockout de TEM8 muestran exceso de componentes de matriz extracelular (ECM) como colágeno tipo I y IV, no así de laminina o fibrinógeno en tejido como ovarios, útero, piel. El TEM8 promueve el crecimiento de los melanocitos en ratones (línea celular B16) en comparación con los ratones knockout de TEM8 en la misma línea celular (18). En particular, nos enfocaremos al estudio de uno de los TEMs, conocido como TEM5/GPR124.

Hibridación <i>in situ</i> de tejidos de ratón adulto														
Nombre	% Iden ^a	Tejidos normales											Tumores	
		Ad	Br	H	I	Ki-C/M	Li	Lg	M	P	Sp	St	B16	HCT
mTEM1	77	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+++	+++
mTEM5	87	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+++ ^c	+++
mTEM7	81	-	+++ ^d	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
mTEM7R	91	-	+ ^e	+	+	-	+	+++	+++	+	+	-	ND ^f	+++
mTEM8	96	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+++ ^c	+++
VEGFR	N/A	+++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++

^a Porcentaje de identidad de aminoácidos homólogos de TEMs humanos.

^b -, No detección de tinción en células endoteliales; +, tinción positiva débil en células endoteliales; ++, tinción positiva moderada en células endoteliales; +++, tinción positiva fuerte en células endoteliales. Ad, glándula adrenal; B, cerebro; H, corazón; I, intestino; Ki-C/M, riñón corteza/médula; Li, hígado; Lg, pulmón; M, músculo esquelético; P, páncreas; Sp, bazo; St, estómago; HCT, HCT116 tumor xenógrafo de colon humano; B16, B16 melanoma de ratón.

Tabla 1. Análisis de expresión de mTEMs en tumores murinos, B16 melanoma de ratón o HCT116 carcinoma colon humano implantados en ratones y usados para ensayos de hibridación *in situ* (10).

1.2.1 MARCADOR DE ENDOTELIO TUMORAL 5 (TEM5/GPR124)

El TEM5/GPR124 es una proteína de siete segmentos transmembranales cuya homología con otros receptores sugiere que se trata de un receptor acoplado a proteínas G (GPCR) perteneciente a la familia II (parecido al receptor GPCR para la secretina) (10), del cual se desconoce su ligando (19). El receptor TEM5/GPR124 está formado por 1338 aminoácidos y contiene varios dominios en la región N-terminal, ilustrados en la figura 3. Puesto que se desconoce su ligando, es poco lo que se sabe de sus mecanismos de transducción de señales. Incluso se desconoce a qué proteína G está acoplado. Estudios previos de nuestro laboratorio, basados en la clonación del cDNA que codifica para TEM5/GPR124 seguida de su

sobreexpresión en células modelo, demostraron que este receptor puede llevar a la activación de la GTPasa Rac y de la cinasa AKT, mediante mecanismos de señalización intracelular aun desconocidos. Es de interés para nosotros caracterizar la vía de señalización de TEM5/GPR124 y su importancia en la respuesta angiogénica inducida por factores secretados por células tumorales.

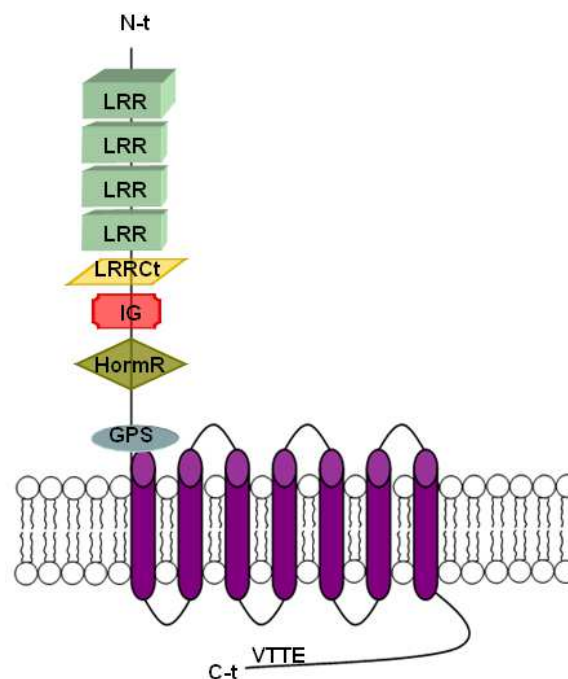


Figura 3. Dominios estructurales del receptor TEM5. El receptor TEM5/GPR124 contiene los siguientes dominios: cuatro repeticiones de LRRs (repeticiones ricas en leucinas) potencialmente involucradas en interacciones con otras proteínas, un LRR de tipo C-terminal, un dominio tipo inmunoglobulina (HormR) conservado en los receptores para hormonas como calcitonina, corticotropina, secretina, entre otras, y un sitio de proteólisis GPCR (GPS); en el C-terminal contiene un motivo (VTTE) para unión a dominios PDZ (20).

TEM5/GPR124 es un regulador importante del desarrollo de la neurovasculatura ya que es requerido para la invasión y migración de los vasos sanguíneos en el neuroepitelio, así como para el establecimiento de las propiedades de la barrera hematoencefálica. En efecto, la expresión de

TEM5/GPR124 es esencial en las primeras etapas para consolidar la barrera hematoencefálica. De tal manera que los ratones knockout de TEM5/GPR124 mueren durante el desarrollo debido al escaso crecimiento de la vasculatura cerebral que lleva a la formación de estructuras vasculares glomeruloides y a hemorragias intracraneales, como se ilustra en la figura 4 (18). En tanto que la posible función de TEM5/GPR124 favoreciendo procesos de angiogénesis patológica incierta.

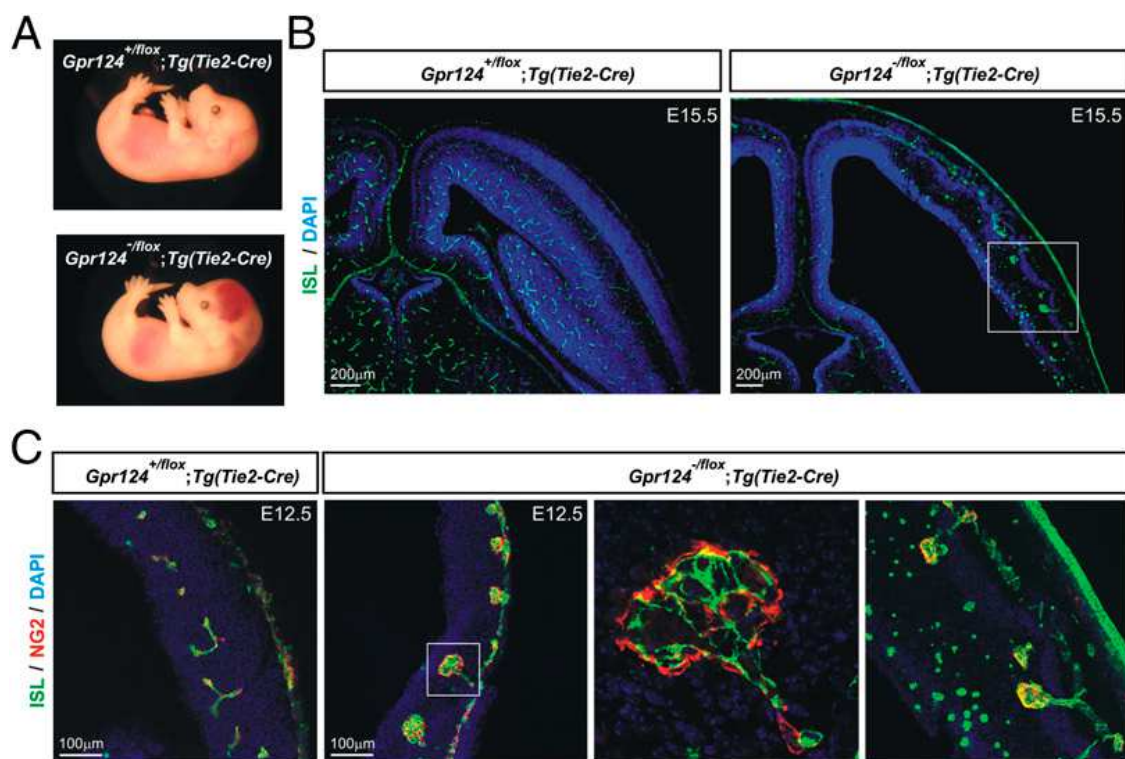


Figura 4. TEM5/GPR124 en células endoteliales es responsable de la formación de capilares en el sistema nervioso central (SNC). (A) Los ratones con TEM5/GPR124^{-flox} muestran hemorragia macroscópica en el cerebro del embrión (15.5 día). Sin embargo, los ratones con TEM5/GPR124^{+flox}; Tg (Tie2-Cre) no muestran dicha aberración. (B) En etapa embrionaria de 15.5 días, la región del pálido del cerebro de ratones con TEM5/GPR124^{-flox} muestra un adelgazamiento notable. (C) La carencia de TEM5 durante el desarrollo embrionario conduce a la formación de estructuras glomeruloides positivas a isolectina-B4 (ISL), marcador de endotelio, y NG2, marcador de pericitos, en la región ventricular en la etapa embrionaria de 12.5 días (18).

El hallazgo de TEM5/GPR124 en células endoteliales de tumores sugiere su participación en la angiogénesis tumoral en respuesta a señales extracelulares. Además, su ubicación estratégica en el lumen de las células endoteliales favorece que haya interacción con factores angiogénicos que provienen del tumor (20). Por lo que es relevante la caracterización de sus mecanismos de transducción de señales y su función.

1.3. RECEPTORES ACOPLADOS A PROTEÍNAS G (GPCRs)

Receptores acoplados a proteínas G, tales como el receptor CXCR4, promueven la formación de nuevos vasos sanguíneos en tumores en respuesta a factores que se liberan del medio hipóxico. El receptor CXCR4 responde a la quimiocina SDF-1, considerada como un factor proangiogénico, que activa vías de señalización especializadas en migración celular y angiogénesis. El bloqueo de la señalización del receptor CXCR4 inhibe la progresión del tumor y la metástasis (21). El CXCR4 induce migración celular y angiogénesis *in vitro* a través del reclutamiento de P-Rex1, un GEF para la GTPasa Rac, en células endoteliales de microvasculatura humana (HMEC) dependiente de estímulo (SDF-1)(22).

Asociado a este proceso de migración celular mediado por GPCRs, el receptor para esfingosina 1 fosfato (S1P₁R) regula este evento celular mediante interacciones con los dominios PDZ de P-Rex1, en células PAE (células endoteliales de aorta de porcino), promoviendo migración dependiente de estímulo con S1P (1nM) (23). Por lo tanto, determinar las proteínas específicas que se activan para permitir el desplazamiento direccionado de las células es motivo de estudio.

La migración celular quimiotáctica, controlada por las acciones de receptores de membrana que se activan en respuesta a factores quimiotácticos, conduce a cascadas de transducción que promueven la polimerización de actina y por consiguiente el desplazamiento de la célula. En células endoteliales microvasculares de cerebro humano (HBMEC), mediante estudios *in vitro*, se identificó la distribución de TEM5/GPR124 cercana a la región de formación de filopodios causados por la reorganización del citoesqueleto de actina, favoreciendo la migración celular (18).

La quimiotaxis requiere que los receptores para factores angiogénicos generen una cascada de señalización que lleve a la activación de las GTPasas responsables del movimiento celular (11). En particular, la cascada de señalización del complejo mTOR/P-Rex1 lleva a la activación de la GTPasa Rac en respuesta a la activación de GPCRs, como aparentemente ocurre con el receptor para esfingosina 1- fosfato, involucrado en la migración y sobrevivencia de células (23).

1.4 LAS GTPasas DE LA FAMILIA DE Rho

Las GTPasas que pertenecen a la familia de Rho (Rac, Cdc42 y RhoA), conocidas como *switches* moleculares, son proteínas que promueven cambios en el citoesqueleto, por ejemplo la formación de lamelipodios, filopodios y fibras de estrés, fungiendo así como componentes esenciales de la maquinaria molecular involucrada en el movimiento polarizado (24). Una vez que se activan localmente a GTPasas como Rac y Cdc42 en la parte delantera de la célula en movimiento; mientras que la GTPasa RhoA se localiza en la parte posterior de la célula permitiendo su contracción, la célula puede desplazarse hacia el estímulo quimioatrayente. Las GTPasas tienen un mecanismo de regulación que les permite encender y apagar la transducción

de señales. Las GTPasas están activas cuando tienen unido guanosina trifosfato, GTP. Para ello, participan factores intercambiadores de nucleótidos de guanina (RhoGEFs) que favorecen el intercambio de GDP por GTP, como el GEF P-Rex1 para la GTPasa Rac, como se ilustra en la figura 5. Por otro lado, hay proteínas llamadas GAPs, promotoras de la actividad de GTPasa, que inactivan a las GTPasas al promover que éstas hidrolicen al GTP y proteínas que inhiben la disociación de nucleótidos de guanina (GDIs) (24).

Otro sistema de regulación de estas GTPasas es a través del sistema de degradación por proteosoma. Por ejemplo, HACE1, una ligasa de ubiquitina E3, cataliza la poliubiquitinación de Rac1 en la lisina 147 en respuesta al estímulo del factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), llevando a Rac1 a degradación vía proteosoma y restringiendo el movimiento celular en las células embrionarias de fibroblasto de ratón (MEFs). Sin embargo, las células MEFs con HACE1 nulo migran más rápido que las células MEFs con HACE1 de tipo silvestre sin estímulo de HGF (25).

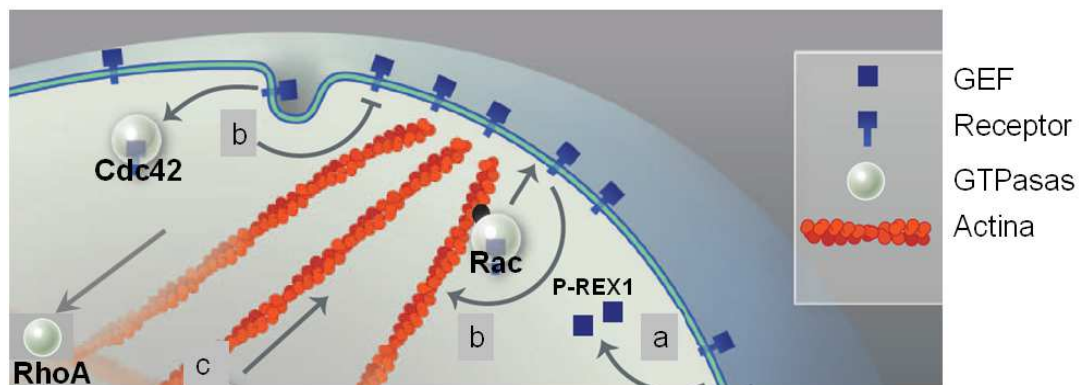


Figura 5. Localización espacial de las GTPasas de la familia de Rho en la reorganización del citoesqueleto de actina. En respuesta a un estímulo, las GTPasas de la familia de Rho se reubican en el plano de la membrana plasmática. Sin embargo hay localizaciones específicas para ellas. (a) En primera instancia P-REX1, GEF para la GTPasa Rac1, se recluta al frente de la célula por reconocimiento de la formación de PIP₃ producido como consecuencia de la activación de receptores de membrana, a través de su dominio PH, por tanto favorece el estado activo de Rac1 en la membrana y la polimerización de actina, formando lamelipodios (b) y reclutando el complejo ARP2/3 (c). También se puede activar la GTPasa Cdc42 al polo

delantero de la célula, favoreciendo la formación de estructuras de filopodios. Sin embargo, en la parte posterior de la célula se encuentra la GTPasa RhoA, formando fibras de estrés y produciendo contracción de la misma a fin de contribuir al desplazamiento de la célula en respuesta a un gradiente de concentración.

Por otro lado, la sobreexpresión de TEM5/GPR124 conduce a la activación de la GTPasa Rac y de la cinasa AKT, efecto que resulta dependiente del grado de sobreexpresión de este receptor en las células HEK293T (26). En este proyecto, estamos investigando los mecanismos por los cuales el receptor TEM5/GPR124 lleva a la activación de la GTPasa Rac y los efectos en células endoteliales que resultan de la expresión diferencial de TEM5/GPR124. En este sentido, la vía de señalización mTOR/P-Rex1 podría llevar a la migración celular por activación de la GTPasa Rac, a través de la interacción de los dos dominios DEP de P-REX1 con el complejo mTORC2. Tal como hemos demostrado que ocurre cuando mTOR es activado en respuesta a Leucina; en tal situación, demostramos que P-REX1 lleva a la activación de Rac y migración celular en respuesta a Leucina vía la activación de un complejo de mTOR insensible a rapamicina (mTORC2) (27).

En este trabajo investigamos la posibilidad de que elementos expresados por células tumorales activen la vía de señalización mTOR/P-Rex1 como parte de la cascada de transducción del receptor TEM5/GPR124, así como su relevancia en la activación de la GTPasa Rac, la reorganización del citoesqueleto de actina y la migración de células endoteliales.

El receptor TEM5/GPR124 cuenta en su extremo carboxilo terminal con una secuencia corta (ETTV) responsable de la interacción de este receptor con los dominios PDZ presentes en una proteína determinante de la polaridad en células de *Drosophila* conocida como disco-grande (28). Estos antecedentes sugieren la posibilidad de que TEM5/GPR124 pudiera establecer interacciones directas con proteínas promotoras de la activación de GTPasas

de la familia de Rho, siendo particularmente de interés para este proyecto la posibilidad de que TEM5/GPR124 se asocie a los dominios PDZ del GEF P-Rex1. Por otro lado, la capacidad de TEM5/GPR124 para promover la fosforilación en Ser473 de la cinasa AKT sugiere la participación del complejo mTORC2 en la cascada de transducción de señales generada por TEM5/GPR124, ya que se ha considerado que mTORC2 es responsable de la fosforilación de AKT en la posición de serina 473 (29).

En concreto, la expresión de TEM5/GPR124 en eventos de angiogénesis tumoral, así como su localización en la membrana plasmática y sus características estructurales que aluden a su capacidad para activar vías de transducción de señales dependientes de proteínas G heterotriméricas y de interacciones establecidas con su región carboxilo terminal, sugieren que este receptor podría reconocer factores angiogénicos y generar cascadas de transducción de señales implicadas en eventos celulares, como migración y angiogénesis.

JUSTIFICACIÓN

La caracterización de proteínas expresadas diferencialmente en el endotelio vascular tumoral es de gran relevancia para enfrentar terapéuticamente el desarrollo de procesos patológicos como el cáncer. La premisa es que estas proteínas, pertenecientes al endotelio, pueden participar de manera diferencial en eventos de proliferación descontrolada, migración y metástasis. En este contexto, elucidar la participación de una proteína expresada diferencialmente en un tejido específico podría conducir a la identificación de un blanco terapéutico. En el caso que tal proteína se ubique en la membrana plasmática, el acceso terapéutico a ella, a través de la circulación sanguínea promete un mejor efecto para revertir el papel del endotelio tumoral como favorecedor del desarrollo del tumor o bien la migración de las células cancerosas.

Es por ello que el receptor TEM5/GPR124, originalmente descrito como un gen expresado diferencialmente en células endoteliales de cáncer colorrectal, podría considerarse como un blanco terapéutico antiangiogénico contra el cáncer. Considerando que entre las sustancias secretadas al microambiente del tumor colorrectal podría estar presente el ligando endógeno del receptor TEM5/GPR124, es posible que el medio condicionado de una línea tumoral de cáncer colorrectal (HT-29) pudiera servir para activar al receptor TEM5/GPR124 con el fin de estudiar su cascada de señalización. En este sentido, evaluar la participación de TEM5/GPR124 en el proceso de angiogénesis, y su señalización en respuesta al medio condicionado del cáncer colorrectal sería de gran relevancia tanto a nivel molecular como en el área clínica.

HIPÓTESIS

En respuesta a factores secretados por células tumorales, el marcador de endotelio tumoral 5 (TEM5/GPR124) activa cascadas de transducción de señales promotoras de la reorganización del citoesqueleto de actina en eventos celulares como migración y angiogénesis dependientes de la activación de la GTPasa Rac.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Determinar el papel del marcador de endotelio tumoral 5 (TEM5/GPR124) en la respuesta al medio condicionado de las células de cáncer colorrectal (línea tumoral HT-29).

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Determinar el papel de TEM5/GPR124, en las vías de transducción de señales que promueven la activación de las GTPasas de la Familia de Rho en células endoteliales estimuladas con factores secretados por células tumorales.
2. Investigar el papel de TEM5/GPR124 en la dinámica del citoesqueleto de actina en respuesta al medio condicionado de las células HT-29.
3. Elucidar la participación de TEM5/GPR124 en la angiogénesis *in vitro* promovida por el medio condicionado de las células HT-29.

2. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

El esquema de la figura 6 representa la estrategia experimental seguida para elucidar la transducción de señales del receptor TEM5/GPR124, así como su papel en eventos celulares como la migración celular (cierre de herida) y la angiogénesis *in vitro*, en respuesta al medio condicionado de células de cáncer colorrectal (línea celular HT-29).

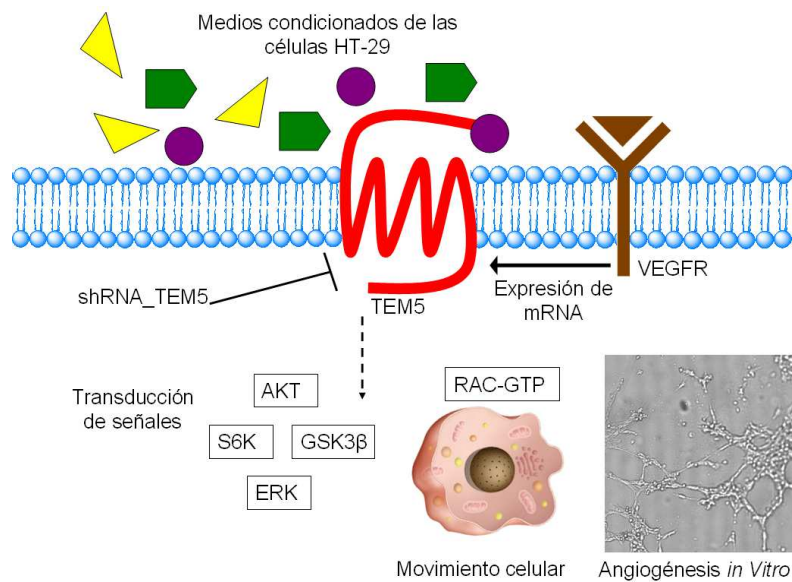


Figura 6. Estrategia experimental para determinar el papel del marcador de endotelio tumoral 5 (TEM5/GPR124) en respuesta al medio condicionado de las células HT-29. Como control se utilizan células sin expresión de TEM5/GPR124 estimuladas con el medio condicionado de las células HT-29. Para determinar el papel de TEM5/GPR124 en las vías de transducción de señales que promueven la activación de las GTPasas de la familia de Rho se sobreexpresa el receptor TEM5 para la técnica de pulldown y, también para probar el efecto del shRNA contra TEM5. Para investigar la dinámica de TEM5/GPR124 en respuesta a este medio condicionado se emplea la microscopía de fluorescencia. Finalmente se hacen ensayos de migración celular (cierre de herida) en células transfectadas con TEM5 así como angiogénesis *in vitro* promovida por los medios condicionados de las células HT-29.

2.1 EFECTO EN LA EXPRESION DE TEM5 ENDÓGENO EN CÉLULAS HMEC Y HUVEC ESTIMULADAS CON VEGF

El factor de crecimiento de endotelio vascular (VEGF) es una proteína que favorece principalmente dos procesos fisiológicos, la vasculogénesis y la angiogénesis. Sin embargo, el VEGF está sobreexpresado en procesos patológicos como el cáncer, y como consecuencia de ello exacerba la sobrevivencia de las células endoteliales así como la migración de estas células hacia la masa tumoral. En este contexto, VEGF pudiera regular la expresión de TEM5, sobreexpresado en células endoteliales de cáncer colorrectal, en células endoteliales.

Para comprobar el efecto de VEGF sobre TEM5 endógeno en células endoteliales (HMEC/HUVEC), se extrae el RNA (mRNA) de las células endoteliales control y estimuladas 1, 3 y 12 horas con VEGF (100 ng/ml) y se convierten a cDNA, con ayuda de la enzima transcriptasa reversa. Posteriormente se amplifica TEM5 endógeno para visualizar su expresión en gel de agarosa al 1%. El procedimiento se describe a continuación.

2.1.1 AMPLIFICACIÓN DE TEM5

Componentes	
H ₂ O	8.25 µl
Mix Red	12.5 µl
Primer 5´	1.0 µl
Primer 3´	1.0 µl
Dimetil sulfóxido (DMSO)	1.25 µl
cDNA	1.0 µl

Una vez preparada la solución en los tubos eppendorf perfectamente identificados, se prende el termociclador GeneAmp PCR System 9000, éste

permite calentar y enfriar los tubos de reacción para controlar la temperatura adecuada, y se escogen cuatro programas enlazados del software. Primeramente, se programa el No. 5, el cual tiene una temperatura de 94° C por 5 min. Después se añade el programa No. 118, el cual contiene tres temperaturas de 94° C por 30 s., 61° C por 30 s. y 72° C por 1 min. Posteriormente se agrega el programa No. 6 que contiene una temperatura de 72° C por 10 min. y en seguida se adiciona el programa No. 4 que conserva los tubos de reacción añadidos en el termociclador a 4° C. Finalmente, en el termociclador se coloca la cantidad de volumen final (25 µl) y el No. de ciclos (35) de la reacción.

2.2.1 ELECTROFORESIS EN GELES DE AGAROSA

La amplificación de TEM5 se detecta mediante electroforesis. Por tanto, se requiere determinar el tamaño y la concentración del gel de agarosa.

1. La dureza del gel es de 1% de agarosa en Buffer TAE 1X (40mM Tris, 20mM Acetato y 2Mm EDTA).
2. Pesar la cantidad de agarosa requerida para la electroforesis y disolver en el Buffer TAE 1X con ayuda del microondas (evitar que hierva, sólo unos segundos).
3. Dejar que la solución se enfríe (hasta que deje de eliminar vapor) para agregar el bromuro de etidio (2 µl por cada 50 µl de solución de agarosa). Posteriormente se vacía en el molde y se deja solidificar con el peine correspondiente.
4. Una vez montada la cámara de electroforesis y solidificado el gel retirar el peine con cuidado y agregar el buffer TAE 1X, que cubra los pozos.
5. Colocar las muestras en los pozos respectivos (8-10 µl), evitando perforar el fondo del pozo con la punta de la pipeta. Combinar la

6. cantidad de muestra con el buffer de carga Clear Band de MTR Scientific (una parte de buffer 6X por 5 de muestra).
7. Agregar el marcador de número de pares de bases (de Invitrogen) en el primer pozo (3 µl).
8. Colocar la tapa de la cámara de electroforesis. Checar que el cable de la parte superior (donde están los pozos) sea de color rojo y el otro extremo negro. Correr el gel a 70 mA constantes por 20 min.
9. Detener la corriente generada de la fuente de poder y observar el gel en el transiluminador y tomar foto del fragmento en un peso aproximado de 200 pares de bases.

2.2 CLONACIÓN DE shRNA_TEM5_262 Y shRNA_TEM5_3895

A continuación se detalla la metodología para la obtención de los dos shRNAs para TEM5 ilustrada en la figura 7.

2..2.1. AMPLIFICACIÓN DE LOS shRNA_TEM5_262 Y shRNA_TEM5_3895

En este paso los shRNA de TEM5 se amplificarán con la finalidad de obtener más fragmento de ADN de los mismos para introducirlos en vectores, como plásmidos.

Primer 1

5'-AGAAGGTGGAGATCGTGGTG

3'-GGCACTGAGGTGAAGGGATA

Primer 2

5'-AGCCATGACCTCTGCTGTCT

3'-TCCCTCCAGCGATCAAATAG

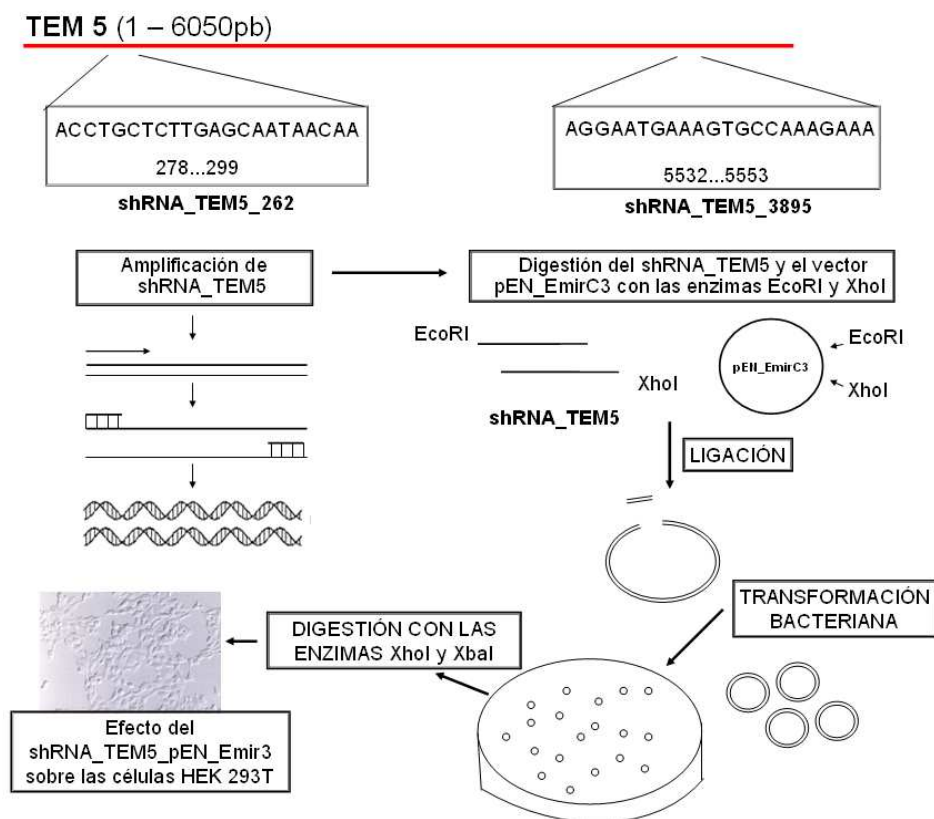


Figura 7. Esquema general de la obtención de los pEN_EmirC3_shRNA_TEM5.
Agregar en el siguiente orden:

1) H ₂ O	37 µl
2) dNTPs	1.0 µl
3) Betaína	2.5 µl
4) Primer 5´XhoI	0.5 µl
5) Primer 3´EcoRI	0.5 µl
6) Templado	
(shRNA_TEM5_262 ó shRNA_TEM5_3895)	0.5 µl
7) DMSO	2.5 µl
8) Buffer de la enzima	
Expand High Fidelity	5.0 µl
9) Enzima High Fidelity	<u>0.5 µl</u>
Volumen total	50.0 µl

Una vez preparada la solución en los tubos eppendorf perfectamente identificados, se prende el termociclador GeneAmp PCR System 9000. Este aparato permite calentar y enfriar los tubos de reacción para controlar la temperatura adecuada, y se escogen cuatro programas enlazados del software. Primeramente, se programa el No. 5, el cual tiene una temperatura de 94° C por 30 s. Después se añade el programa No. 140, el cual contiene tres temperaturas de 94° C por 30 s., 54° C por 30 s. y 72° C por 1 min. Posteriormente se agrega el programa No. 139 que contiene una temperatura de 72° C por 10 min. y en seguida se adiciona el programa No. 4 que conserva los tubos de reacción añadidos en el termociclador a 4° C. Finalmente, en el termociclador se coloca la cantidad de volumen final (50 µl) y el No. de ciclos (30) de la reacción.

2.2.2. ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA

La amplificación de los fragmentos de shRNA_TEM5_262 y shRNA_TEM5_3895 se detectan mediante electroforesis. Por tanto, se requiere determinar el tamaño y la concentración del gel de agarosa.

1. La dureza del gel es de 2% de agarosa en Buffer TAE 1X (40mM Tris, 20Mm Acetato y 2Mm EDTA).
2. Pesar la cantidad de agarosa requerida para la electroforesis y disolver en el Buffer TAE 1X con ayuda del microondas (evitar que hierva, sólo unos segundos).
3. Dejar que la solución se enfríe (hasta que deje de eliminar vapor) para agregar el bromuro de etidio (2 µl por cada 50 µl de solución de agarosa). Posteriormente se vacía en el molde y se deja solidificar con el peine correspondiente.
4. Una vez montada la cámara de electroforesis y solidificado el gel retirar el peine con cuidado y agregar el buffer TAE 1X, que cubra los pozos.

5. Colocar las muestras en los pozos respectivos (8-10 μ l), evitando perforar el fondo del pozo con la punta de la pipeta. Combinar la cantidad de muestra con el buffer de carga Clear Band de MTR Scientific (una parte de buffer 6X por 5 de muestra).
6. Agregar el marcador de número de pares de bases (de Invitrogen) en el primer pozo (3 μ l).
7. Colocar la tapa de la cámara de electroforesis. Checar que el cable de la parte superior (donde están los pozos) sea de color rojo y el otro extremo negro. Correr el gel a 70 mA constantes por 20 min.
8. Detener la corriente generada de la fuente de poder y observar el gel en el transiluminador y tomar foto del fragmento en un peso aproximado de 200 pares de bases.

2.2.3. PURIFICACIÓN DE LOS FRAGMENTOS AMPLIFICADOS

La purificación de la amplificación de los fragmentos se obtiene mediante el kit QIAquick PCR Purification Kit Protocols QIAQUICK® Spin HandBook con numero de catálogo 28104, el cual extrae el ADN del gel de agarosa y purifica el ADN de tamaños comprendidos entre 100pb y 10Kb.

1. Cortar la banda del fragmento de ADN de interés en el gel, previamente identificado en el transiluminador. Se utiliza guantes y una navaja sólo utilizada para cortar geles con bromuro de etidio. Una vez cortado el fragmento de gel se procede a colocar en un tubo de polipropileno previamente pesado.
2. Pesar la cantidad de gel recolectado.
3. El gel obtenido es procesado de acuerdo al kit de QIAquick anteriormente mencionado.

4. Primeramente el gel de agarosa se disuelve con 5 volúmenes del Buffer PBI por cada volumen de gel. El buffer PBI permanece de color amarillo y el gel se disuelve en menos de 10min. a 50° C.
5. Para obtener el ADN, colocar la muestra a la columna en tubo de 2ml y centrifugar a 13 000 rpm por 30-60 s.
6. Descartar el sobrenadante y colocar la columna de vuelta al mismo tubo.
7. Para lavar, agregar 0.75ml de Buffer PE a la columna QIAquick con la muestra y centrifugar a 13 000 rpm por 30-60 s.
8. Descartar el sobrenadante y colocar la columna de vuelta al mismo tubo y centrifugar la columna a 13 000 rpm por 1min.
9. Colocar la columna QIAquick con la muestra en un tubo de 1.5ml.
10. Para fluir el ADN, se agrega 40µl de H₂O grado biología molecular en el centro de la columna, dejar que la columna se humedezca por 2min. y centrifugar a 13 000 rpm por 1 min.
11. Para verificar la purificación, correr un gel diagnóstico al 2% de agarosa con bromuro de etidio y agregando 8-10 µl de muestra.

2.2.4. DIGESTIÓN DE LOS shRNA_TEM5 Y EL VECTOR pEN_EmirC3 CON ENZIMAS DE RESTRICCIÓN

El proceso de digestión con enzimas de restricción permite cortar el ADN en regiones específicas, liberando el fragmento de ADN que contiene el shRNA de TEM5, lo cual facilitará la ligación con el vector (pEN_EmirC3).

1. Seleccionar las enzimas de restricción a usar (EcoRI y XhoI).
2. Determinar el buffer de digestión que se utilizará en la reacción, ambas enzimas deben coincidir con el empleo del mismo buffer.
3. Para la digestión el volumen final es de 20µl y homogenizar.
4. Dejar la digestión en la incubadora por 37° C por 12h.

Componente de la digestión	DNA: shRNA_TEM5_262/ shRNA_TEM5_3895/pEN_EmirC3
Buffer H 10x	2 μ l
H ₂ O	1 μ l
DNA	16 μ l
EcoRI	0.5 μ l
XhoI	0.5 μ l
Volumen total	20.0 μ l

Los fragmentos de shRNA_TEM5_262, shRNA_TEM5_3895 y pEN_EmirC3 digeridos se identifican mediante electroforesis por gel al 2% de agarosa, anteriormente descrito en el procedimiento de electroforesis.

2.2.5 PURIFICACIÓN DE LOS FRAGMENTOS DIGERIDOS

La purificación del fragmento digerido con las enzimas EcoRI y XhoI se realiza mediante QIAquick Gel Extraction Kit Protocol QIAQUICK® Spin Handbook con número de catálogo 28104. Este protocolo es diseñado para la extracción de ADN de 70pb a 10kb.

1. Cortar la banda del fragmento de ADN de interés en el gel, previamente identificado en el transiluminador. Se utiliza guantes y una navaja sólo utilizada para cortar el gel con bromuro de etidio. Una vez cortado el fragmento de gel se procede a colocar en un tubo de polipropileno previamente pesado.
2. Pesar la cantidad de gel recolectado.
3. Agregar 3 volúmenes de Buffer QG (color amarillo) por cada volumen de gel.

4. Incubar la muestra con dicho Buffer a 50° C por 10 min. Para ayudar a disolver el gel, agitar en el vórtex cada 2min. durante la incubación.
5. Agregar al gel disuelto un volumen de isopropanol a la muestra y mezclar.
6. Colocar la columna QIAquick en un tubo de 2ml.
7. Colocar la muestra a la columna QIAquick y centrifugar por 1 min.
8. Descartar el sobrenadante y colocar la columna QIAquick (donde está el DNA retenido) de nuevo en el tubo.
9. Para lavar el ADN, agregar 0.75ml de Buffer PE a la columna QIAquick y centrifugar 1 min.
10. Descartar el sobrenadante y centrifugar la columna QIAquick por un 1 min. a 13 000 rpm.
11. Pasar la columna QIAquick a un tubo 1.5ml.
12. Eluir el ADN en 25 µl de H₂O grado biología molecular y centrifugar a 13 000 rpm por 1 min.

Los fragmentos de shRNA_TEM5_262, shRNA_TEM5_3895 y pEN_EmirC3 digeridos y purificados se identifican mediante electroforesis por gel al 2% de agarosa con 5 µl de muestra de ADN, anteriormente descrito el procedimiento de electroforesis. El vector pEN_EmirC3 se identifica en un peso aproximado de 4Kb.

2.2.6 LIGACIÓN

Los fragmentos de shRNA_TEM5_262 y shRNA_TEM5_3895 después de cortarse con las enzimas de restricción EcoRI y XhoI pueden unirse a otro fragmento, en este caso con un vector que contiene extremos complementarios mediante la enzima ADN ligasa (T4 de Roche).

La proporción del fragmento (inserto) que se introduce en el vector correspondiente es mayor, aproximadamente 20:1. Esto depende de la observación de la concentración de ADN en la purificación de la digestión.

2. La reacción de ligación se prepara en frío y se emplean tubos de polipropileno para PCR, puesto que los tubos se colocan en un termociclador.

Componentes de la ligación	shRNA_TEM5_3895	shRNA_TEM5_262
H ₂ O (μl)	7.0	9.5
Vector pEN_EmirC3 (μl)	0.5	0.5
Inserto (μl)	10.0	7.5
Buffer para ADN ligasa (μl)	2.0	2.0
Enzima Ligasa (μl)	0.5	0.5
Volumen total (μl)	20	20

3. Una vez preparada la reacción, se prende el termociclador GeneAmp PCR System 9000 y se escoge el programa 1, donde la temperatura se mantiene a 16° C por 12h.

2.2.7. TRANSFORMACIÓN DE BACTERIAS DH5α

El resultado de la ligación se introduce en bacterias altamente competentes con la finalidad de producir mayor cantidad de ADN y evaluar la inserción de los shRNA de TEM5 en el vector pEN_EmirC3. Las bacterias de *E. coli* DH5α (preparadas en el laboratorio por el método del cloruro de rubidio) tienen una concentración de 10⁹ ufc/μg (unidades formadoras de colonia por μg).

1. Descongelar las bacterias altamente competentes en hielo por 10 min almacenadas a -198°C .
2. En un tubo de polipropileno, identificado para cada ligación, se agrega 50 μl de bacterias altamente competentes recién descongeladas.
3. Agregar 5 μl de la solución de la ligación al tubo con bacterias (50 μl) e incubar en hielo por un periodo de 20 a 30 min.
4. Realizar un choque térmico de 1min. a 42°C .
5. Inmediatamente terminado el tiempo del choque térmico incubar los tubos durante 10 min. en hielo.
6. Agregar a los tubos 300 μl de medio S.O.C. (medio LB + glucosa).
7. Incubar los tubos en agitación constante (180-200 rpm) durante 1 hora a 37°C .
8. Centrifugar los tubos a 6 000 rpm por 1min. para concentrar las bacterias.
9. Desechar el sobrenadante y resuspender las bacterias en 50 μl de medio super broth (LB), el cual es un medio altamente enriquecido para el cultivo de bacterias, con el antibiótico correspondiente.
10. Colocar los 50 μl de la mezcla de bacterias con el medio sobre la superficie del agar. Previamente se colocan perlas estériles, las cuales ayudarán a la distribución de la solución sobre la placa de agar.
11. Colocar las cajas con agar en una incubadora a 37°C por 12 horas. Transcurrido ese tiempo, se observarán colonias de bacterias en el agar.
12. Picar una colonia de bacterias con un asa bacteriológica estéril y transportarla a un tubo con medio super broth (LB) con el antibiótico correspondiente y en la concentración adecuada y agitar vigorosamente.
13. Incubar los tubos a 37°C por 12 horas en agitación constante (180-200 rpm).

2.2.8. MINIPREP DE ADN

La técnica miniprep permite extraer el ADN de naturaleza plasmídica de un cultivo bacteriano. El rendimiento de ADN en plásmido es de 20-30 µg con alta pureza. Para el desarrollo de esta técnica se utiliza el kit QIAGEN QIAprep spin Miniprep (SIGMA, catálogo No. PLN350-1KT). Los pasos de esta técnica se describen a continuación.

1. Los tubos con las bacterias en medio super broth (para ligación) se centrifugan durante 5 min. a 2 500 rpm para concentrar las bacterias.
2. Retirar el sobrenadante de los tubos y resuspender el concentrado de bacterias con 200 µl del Buffer P1 (50Mm Tris-HCl, 10 Mm EDTA, 100µg/ml RNasas, que contiene RNAasa A y pH 8.0), el cual contiene RNasa A que debe estar a 4° C.
3. Una vez resuspendida la mezcla se coloca en un tubo de 2ml, donde se le agrega 200 µl del Buffer P2 (200Mm NaOH, 1% SDS), el cual es el Buffer de lisis y se invierte el tubo suavemente 4-6 veces (no utilizar el vortex) y se incuba a temperatura ambiente por no más de 5 min.
4. Para neutralizar la acción del Buffer de lisis, se agrega 350 µl de Buffer P3 (3.0 M Acetato de potasio, pH 5.5) y se mezcla suavemente invirtiendo el tubo 4-6 veces.
5. Centrifugar el tubo 10 min. a 13 000 rpm. en una microcentrífuga. Durante este periodo se preparan las columnas; una para cada colonia tratada con 500 µl de Buffer para columna.
6. El sobrenadante resultante de la centrifugación se vierte en la columna y se centrifuga por 1 min. a 13 000 rpm. El filtrado se elimina.
7. El ADN retenido en la columna se lava con 750 µl de Buffer QC (1.0M NaCl; 50 mM MOPS, pH 7.0; 15% isopropanol) y se centrifuga por 1 min. a 13 000 rpm. El filtrado se elimina.
8. Para secar bien la columna se centrifuga por 1 min. a 13 000 rpm.

9. Colocar la columna a un tubo eppendorf y agregar a la columna 40 μ l de H₂O estéril y dejar reposar 3 min.
10. Centrifugar la columna por 1 min. a 13 000 rpm.

2.2.9 MEDICIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE ADN

Determinar la concentración de ADN para experimentos posteriores será de utilidad. La concentración de ADN se determina midiendo la absorción de luz ultravioleta (280 nm) en un espectrofotómetro Beckman.

11. Encender el espectrofotómetro y posteriormente prender la lámpara de luz ultravioleta 15 min. antes de empezar a leer las concentraciones.
12. Realizar la dilución de ADN que se medirá (1:50) por lo tanto, se agrega 2 μ l de la muestra de ADN y 98 μ l de H₂O.
13. En el software del espectrofotómetro se selecciona la opción de DNA oligoquant: en Assay Type se elige ds (Tipo de ensayo, double strand), en Devices se elige single (Dispositivo único) y en la columna de factor de dilución se establece 50.
14. Lavar la celda, donde se leerá la concentración de ADN, varias veces con 100 μ l de H₂O grado biología molecular. Posteriormente se lee el blanco, colocando 100 μ l de H₂O grado biología molecular y en el software se escoge Blank (ubicado en la parte inferior del menú).
15. Retirar el agua de la celda y se coloca la muestra que se desea leer. Para ello, se selecciona la opción Read Sample (los datos aparecen en la pantalla). Se retira la muestra leída y se coloca la próxima muestra.
16. Una vez terminada la lectura de las muestras, se lava la celda con H₂O grado biología molecular.
17. Al terminar las mediciones, asegurarse de apagar el espectrofotómetro.

2.2.10 DIGESTIÓN DE LA LIGACIÓN

En este paso se obtendrán los fragmentos de ADN que corresponden al shRNA_TEM5_262 y shRNA_TEM5_3895 liberados del vector pEN_EmirC3 con el fin de corroborar que el shRNA de TEM5 fue exitosamente insertado en este vector. Para ello, se procede a la digestión del producto de la ligación con las enzimas XhoI y XbaI por 12h a 37° C.

Componente de la digestión	DNA: pEN_EmirC3_shRNA_TEM5_262 / pEN_EmirC3_shRNA_TEM5_3895
Buffer H 10x	1.6 µl
DNA	11-15 µl
EcoRI	0.5 µl
XhoI	0.5 µl
Volumen total	13.5-17 µl

Posteriormente se realiza electroforesis de las muestras (13.5 - 17 µl) en gel de agarosa al 2%, como se describió anteriormente.

2.3. EFECTO DE pEN_EmirC3_shRNA_TEM5_262 Y pEN_EmirC3_shRNA_TEM5_3895 SOBRE TEM5

El efecto de pEN_EmirC3_shRNA_TEM5_262 y pEN_EmirC3_shRNA_TEM5_3895 sobre el receptor TEM5 se determina transfecando las construcciones del receptor TEM5 (3XFlag-TEM5 y 3XFlag-TEM5-GFP) y los respectivos shRNAs de TEM5 en la línea celular HEK 293T (Human Embryonic Kidney, de riñón de embrión humano).

2.3.1. MANTENIMIENTO DEL CULTIVO CELULAR

Las células se cultivan en cajas petri de 100 mm de diámetro con medio DMEM (Sigma, No. de catálogo D-7777) con 10% de SFB (suero fetal bovino) en una atmosfera de 5% de CO₂ a 37° C.

PROCEDIMIENTO.

1. Retirar el medio DMEM de las células HEK 293T.
2. Lavar las células HEK 293T con PBS 1X (Buffer salino de fosfatos).
3. Agregar 1ml de tripsina-EDTA 1X (SIGMA, 0.5g de tripsina y 0.2g de EDTA en 100ml)
4. Dejar actuar la tripsina 3 min. en la incubadora a 37° C. Golpear un poco la caja que contiene tripsina para facilitar el despegado de células.
5. Neutralizar la acción de la tripsina, agregando 9 ml de medio DMEM con 10% SFB a las células tripsinizadas.
6. Resuspender varias veces para separar los agregados celulares y realizar una dilución 1/5 para las cajas que se van a transfectar, esto es 1 ml de la suspensión celular más 4 ml de medio DMEM por cada caja de 60 cm de diámetro, previamente tratada con Poly-D-Lisina (SIGMA, No. de catálogo P-4408) por 10 min. El stock se mantiene resemebrando las células con una dilución 1/10, 2 veces por semana.

2.3.2. TRANSFECCIÓN CELULAR. TRANSFECCIÓN DE CÉLULAS HEK 293T CON LAS CONSTRUCCIONES 3XFlag-TEM5-GFP pEN_EmirC3_shRNA_TEM5_262 Y pEN_EmirC3_shRNA_TEM5_3895 POR EL MÉTODO DE POLYFECT

Preparar Polyfect (QIAGEN, No. de catálogo 301107) en un tubo de polipropileno dependiendo del número de cajas. El procedimiento se describe a continuación.

1. Marcar y colocar los tubos eppendorf en una gradilla. Agregar 150 μ l de medio DMEM sin suero por caja más 15 μ l de Polyfect a los tubos correspondientes.
2. Transferir esa mezcla a los tubos con el ADN (1.25 μ g del shRNA_TEM5_262_pEN_EmirC3/ shRNA_TEM5_3895_pEN_EmirC3 y 0.7 μ g de 3XFlag-TEM5-GFP), agitar e incubar 10 min.
3. Preparar las células. Lavar con PBS 1X, agregar 3ml de medio DMEM con SFB al 10%.
4. Después de los 10 min. añadir 1ml de DMEM con SFB al 10% a cada tubo. Mezclar y agregar la mezcla a las cajas petri de 60 mm de diámetro.
5. Incubar en una atmósfera de 5% de CO₂ a 37° C. Procesar 3 días después de la transfección.

2.3.3. LISADO CELULAR

1. Lavar las células con 2 ml de PBS 1X.
2. Colocar las cajas sobre hielo.
3. Agregar 300 μ l de buffer de lisis Tritón 1X sin EDTA que contiene 50 mM de Tris-HCl, pH 7.5; 0.15M de NaCl, 1% Tritón X100 e inhibidores de proteasas (aprotinina 0.1 μ g/ml; leupeptina 0.1 μ g/ml; fenil-metil-sulfonil-fluoruro 100 μ g/ml). Los inhibidores se agregan antes de usar el buffer de lisis. Preparar sobre hielo.
4. Dejar reposar 10 min.
5. Centrifugar a 4° C durante 10 min. a 13 000 rpm.
6. Recuperar el sobrenadante en tubos nuevos (trabajar sobre hielo).

2.3.4. CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNA

Este paso nos ayuda a equiparar concentraciones de proteína entre los lisados obtenidos, de tal manera que nos permite comparar adecuadamente el efecto del shRNA TEM5. Para ello, se prepara una alícuota del sobrenadante resultante de la centrifugación de cada condición para conocer su concentración en lector de ELISA. A continuación se describe el procedimiento.

1. Preparar en tubos eppendorf de 600 μ l:

mg/ml	BSA (2 mg/ml)	Buffer de lisis (Tritón 1X)
0.0	0 μ l	100 μ l
0.1	5 μ l	95 μ l
0.2	10 μ l	90 μ l
0.4	20 μ l	80 μ l
0.8	40 μ l	60 μ l
1.6	80 μ l	20 μ l
2.0	100 μ l	0 μ l

2. Poner 5 μ l de las muestras y las diluciones en cada pozo, por triplicado.
3. Adicionar a cada pozo 25 μ l del reactivo A (A= 2 ml del reactivo A + 40 μ l del reactivo S).
4. Adicionar a cada pozo 200 μ l del reactivo B.
5. Incubar 15 min. y leer a 690 nm en el lector de ELISA.

- Reactivo A, solución de tartrato de cobre alcalino, Bio-Rad No. de catálogo 500-0113.

- Reactivo B, reactivo de Folin, Bio-Rad No. de catálogo 500-0114.
- Reactivo S, solución surfactante, Bio-Rad No. de catálogo 500-0115.
- BSA, albumina de suero bovino (Fracción V), MP Biomedicals No. de catálogo 160069.

Una vez obtenida la concentración de proteína de cada condición, se procede a realizar los cálculos en Excel para que la concentración final de proteína en cada condición sea de 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Ajustar el volumen de muestra así como el volumen de Buffer de lisis y el Buffer de muestra es constante (50 μl).

Debido a que el receptor TEM5 pesa aproximadamente 185 KDa se prepara un gel en poliacrilamida al 6%, que facilita el movimiento de dicha proteína a través de la red de poliacrilamida. Sin embargo, para la proteína AKT (60 KDa) se utiliza un gel al 10% de poliacrilamida. Preparar el gel en poliacrilamida de acuerdo a la sección 3 del manual de laboratorio de referencia.

1. Hervir las muestras 5 min. y centrifugar 5min a 13 000 rpm (temperatura ambiente).
2. Colocar 25 μl de lisado total en el gel de poliacrilamida. Electroforesis a 40 mA aproximadamente 2.5h
3. Transferir en Immobilon P Millipore (previamente tratado con metanol por 5 min. y posteriormente lavado con agua y Buffer de transferencia) durante 2:30 horas a 320 mA.

2.3.5. WESTERN BLOT

1. Lavar la membrana con agua desionizada.
2. Agregar TBS-Tween 0.05% a la membrana y mantener en agitación durante 5 min.

3. Bloquear con leche libre de grasa (Nestle® Svelty) al 5% en TBS-Tween 0.05%.
4. Mantener en agitación constante (40 rpm) 1 hora a temperatura ambiente.
5. Lavar 3 veces con TBS-Tween 0.05% y dejar en agitación durante 5 min cada lavado.
6. Agregar anticuerpo primario contra la proteína verde fluorescente (GFP (B-2), Santa Cruz Biotechnology Inc. con No. de catálogo sc-9996) para detectar al receptor TEM5 y anticuerpo primario contra la cinasa Akt, (Sigma) ambos diluïdos 1:10 000 en TBS-Tween 0.05% y mantenerlo en agitación constante durante 12h a 4° C.
7. Recuperar los anticuerpos primarios y lavar la membrana 3 veces con TBS-Tween 0.05% durante 5 min. cada lavado.
8. Agregar anticuerpo secundario anti-ratón (KPL, No. de catálogo 074-1802) diluïdo 1:10 000 para GFP y 1:5 000 para Akt en leche libre de grasa al 5% en TBS-Tween 0.05%.
9. Incubar 1 hora en agitación a temperatura ambiente.
10. Lavar 3 veces con TBS-Tween 0.05% y en cada lavado agitar 5 min.
11. Dejar en TBS 1X las membranas hasta su uso.

2.3.6. REVELADO

1. Agregar sustrato luminol y solución peroxidada, Immobilon™ Western Milipore con No. de catálogo WBKLS05000 diluïdo 1:1 (vol/vol) a la membrana e incubar 1 min.
2. Secar la membrana y colocar en un cassette para autorradiografía. Asegurar que no queden burbujas en la membrana.
3. Exponer con placas para Rayos-X (Agfa-Gevaert) 30s y 1 min. En caso requerido dejar menor o mayor tiempo de exposición.
4. Revelar.

2.4 RECOMBINACIÓN DE pEN_EmirC3_shRNA_TEM5_262 / pEN_EmirC3_hRNA_TEM5_3895 y pDSL_hpIP/pDSL_hpIG

Este proceso es un intercambio de secuencias de ADN de dos orígenes diferentes, en el caso de pEN_EmirC3_shRNA_TEM5_262 / pEN_EmirC3_shRNA_TEM5_3895 son los vectores donadores de las secuencias de los shRNA de TEM5 y pDSL_hpIP y pDSL_hpIG, los cuales son los vectores aceptores de dichas secuencias de ADN. Estos vectores aceptores pueden ser visualizados con la proteína verde fluorescente (pDSL_hpIG) o seleccionado con puromicina (pDSL_hpIP). El procedimiento se describe a continuación.

1. La reacción se realiza en un volumen de 5 μ l con las siguientes condiciones de reacción.

Componentes de la recombinación	pDSL_hpIG	pDSL_hpIP
Buffer de elución Tris 10 mM	5 μ l	5 μ l
Vector destino (pEN_EmirC3_shRNA_TEM5_262 / pEN_EmirC3_shRNA_TEM5_3895)	1 μ l	1.5 μ l
Vector de entrada (pDSL_hpIP/pDSL_hpIG)	1 μ l	1 μ l
Enzima clonasa LRII	0.5 μ l	0.5 μ l
H ₂ O	2.5 μ l	2.0 μ l

2. Incubar a 22° C por 12h en el termociclador Beckman.
3. Transformar 2 μ l de la reacción en 50 μ l de bacterias DH5 α . Procesar como la técnica de ligación, anteriormente descrita.

Para verificar que la recombinación fue efectiva, el producto de la reacción se digiere con la enzima BamHI y debe liberar un fragmento de 796 pb. El vector pDSL_hpIP/pDSL_hpIG tiene tres sitios de corte para la enzima BamHI, el cual un sitio se anula por la inserción del fragmento que corresponde al shRNA de TEM5.

La digestión con la enzima BamHI se realiza a 37° C por 3 horas con las siguientes condiciones.

Componentes de la digestión	Cantidades (µl)
Buffer B	1.5 µl
Enzima BamHI	0.5 µl
pDSL_hpIP_shRNA_TEM5_262/ pDSL_hpIP_shRNA_TEM5_3895	1.2- 2.5 µl

Posteriormente, hacer el gel de agarosa al 1% y el fragmento liberado de 796 pb es detectado por electroforesis, técnica descrita anteriormente.

2.5. EFECTO DE LA SOBREEXPRESIÓN DEL RECEPTOR TEM5

Una de las estrategias experimentales para evaluar las vías de señalización activadas por la presencia del receptor TEM5 es transfectar las construcciones del receptor, 3XFlag-TEM5 y 3XFlag-TEM5-GFP, esperando que ambas construcciones tengan un patrón de modulación similar. Para ello, el receptor TEM5 es transfectado por el método de Polyfect en concentraciones crecientes (0.1 µg - 2 µg) y complementado con vector vacío (pCEFL) en las células HEK 293.

2.5.1. MANTENIMIENTO DEL CULTIVO CELULAR

Las células HEK 293 se cultivan en cajas petri de 100 mm de diámetro con medio DMEM (Sigma, No. de catálogo D-7777) con 10% de SFB (suero fetal bovino) en una atmosfera de 5% de CO₂ a 37° C.

PROCEDIMIENTO

1. Retirar el medio DMEM de las células HEK 293.
2. Lavar las células HEK 293 con PBS 1X (Buffer salino de fosfatos).
3. Agregar 1ml de tripsina-EDTA 1X (SIGMA, 0.5g de tripsina y 0.2g de EDTA en 100ml)
4. Dejar actuar la tripsina 3 min. en la incubadora a 37° C. Golpear un poco la caja que contiene tripsina para facilitar el despegado de células.
5. Neutralizar la acción de la tripsina, agregando 9 ml de medio DMEM con 10% SFB a las células tripsinizadas.
6. Resuspender varias veces para separar los agregados celulares y realizar una dilución 1/5 para las cajas que se van a transfectar, esto es 1 ml de la suspensión celular más 4 ml de medio DMEM por cada caja de 60 cm de diámetro, previamente tratada con Poly-D-Lisina (SIGMA, No. de catálogo P-4408) por 10 min. El stock se mantiene resemebrando las células con una dilución 1/10, 2 veces por semana.

2.5.2. TRANSFECCIÓN CELULAR. TRANSFECCIÓN DE CÉLULAS HEK 293 CON LAS CONSTRUCCIONES 3XFlag-TEM5 Y 3XFlag-TEM5-GFP POR EL MÉTODO DE POLYFECT

Preparar Polyfect (QIAGEN, No. de catálogo 301107) en un tubo de polipropileno dependiendo del número de cajas a transfectar. El procedimiento es descrito a continuación.

1. Marcar y colocar los tubos eppendorf en una gradilla. Agregar 150 μ l de medio DMEM sin suero por caja más 15 μ l de Polyfect a los tubos correspondientes.
2. Transferir esa mezcla a los tubos correspondientes con el ADN 3XFlag-TEM5/3XFlag-TEM5-GFP (concentraciones crecientes en μ g 0.1, 0.5, 1, 1.5, 2.0), CXCR4 (0.25 μ g) y pCEFL (2.0 μ g) agitar e incubar 10 min.
3. Preparar las células. Lavar con PBS 1X, agregar 3ml de medio DMEM con SFB al 10%.
4. Después de los 10 min. añadir 1ml de DMEM con SFB al 10% a cada tubo y mezclar. Incorporar la mezcla a las células contenidas en los pozos de cada caja.
5. Incubar en una atmósfera de 5% de CO₂ a 37° C. Procesar 2 días después de la transfección.

2.5.3. AYUNO CELULAR

En este método las células son privadas de suero fetal bovino, reduciendo su actividad basal. El uso del suero fetal bovino interfiere con los resultados por lo tanto, afecta las conclusiones del experimento. El ayuno es de 12 horas antes de la lisis celular.

1. Lavar las células con PBS 1X. Tener cuidado de no despegar las células.
2. Agregar 1.5 ml de medio DMEM sin suero.
3. Mantener la incubación a 37° C en una atmósfera de 5% de CO₂.

2.5.4. LISIS CELULAR

1. Lavar las células con 2 ml de PBS 1X.
2. Colocar las cajas sobre hielo.

3. Agregar 250 μ l de buffer de lisis Tritón 1X sin EDTA que contiene 50 mM de Tris-HCl, pH 7.5; 0.15M de NaCl, 1% Tritón X100 e inhibidores de proteasas (aprotinina 0.1 μ g/ml; leupeptina 0.1 μ g/ml; fenil-metil-sulfonil-fluoruro 100 μ g/ml) así como los inhibidores de fosfatasas (β -Glicerolfosfato 100 μ g/ml; Ortovanadato de sodio 0.1 μ g/ml; Fluoruro de sodio 0.1 μ g/ml). Los inhibidores se agregan antes de usar el buffer de lisis. Preparar sobre hielo.
4. Dejar reposar 10 min.
5. Centrifugar a 4° C durante 10 min. a 13 000 rpm.
6. Recuperar el sobrenadante en tubos nuevos (trabajar sobre hielo).
7. Agregar a las muestras la tercera parte de buffer de muestra (Laemmli con β -MeOH) 1X.
8. Hervir 5 min. y centrifugar 5 min. a 13 000 rpm. Guardar los tubos a -20° C hasta su uso.

2.5.5. WESTERN BLOT

La preparación de gel en poliacrilamida al 6% facilita el movimiento del receptor TEM5 (185 KDa) a través de la red de acrilamida. Sin embargo, para las proteínas Akt (60 KDa) ERK (42 y 44 KDa), GSK3 β (46 KDa), S6K (70 KDa) se utiliza un gel al 10% de poliacrilamida. Preparar el gel de poliacrilamida de acuerdo a la sección 3 del manual de laboratorio de referencia.

1. Hervir las muestras 5 min. y centrifugar 5min a 13 000 rpm (temperatura ambiente).
2. Colocar 20 μ l (1 μ g = 1 μ l) de lisado total en el gel de poliacrilamida. Electroforesis a 40 mA.

3. Transferir en Immobilon P Millipore (previamente tratado con metanol por 5 min. y posteriormente lavado con agua y Buffer de transferencia) durante 2:30 horas a 320 mA.
4. Lavar la membrana con agua desionizada.
5. Agregar TBS-Tween 0.05% a la membrana y mantener en agitación durante 5 min.
6. Bloquear con leche libre de grasa (Nestle® Svelty) al 5% en TBS-Tween 0.05%.
7. Mantener en agitación constante (40 rpm) 1 hora a temperatura ambiente.
8. Lavar 3 veces con TBS-Tween 0.05% y dejar en agitación durante 5 min cada lavado.
9. Agregar anticuerpo primario contra la proteína verde fluorescente (GFP (B-2) monoclonal, Santa Cruz Biotechnology Inc. con No. de catálogo sc-9996) y Flag (anti-Flag® M2 monoclonal, SIGMA con No. de catálogo F 3165) para detectar al receptor TEM5 y anticuerpos primarios contra las proteínas Akt, (anti-AKT1 monoclonal SIGMA con No. de catálogo P 2482), pAkt (pAkt (S473)-R, Santa Cruz Biotechnology Inc. con No. de catálogo sc-7985-R), ERK p44/42 (ERK 2 (C-14) policlonal, Santa Cruz Biotechnology Inc. con No. de catálogo sc-154), pERK (pERK p44/42 (Thr202 y Tyr204) policlonal, Cell Signaling con No. de catálogo 9101), GSK3 β (GSK3 β (27C10) monoclonal, Cell Signaling con No. de catálogo 9315), pGSK3 β (pGSK3 β (Ser9) policlonal, Cell Signaling con No. de catálogo 9336) pS6K (pS6K policlonal, Cell Signaling con No. de catálogo 9202), ppS6K (ppS6K (Thr389) policlonal, Cell Signaling con No. de catálogo 9205), diluidos en TBS-Tween 0.05% (excepto el anticuerpo Flag, el cual es diluido en BSA al 5% en TBS-Tween 0.05%) y en agitación constante durante 12h a 4° C.
10. Recuperar los anticuerpos primarios y lavar la membrana 3 veces con TBS-Tween 0.05% durante 5 min. cada lavado.

11. Agregar anticuerpos secundario anti-ratón (KPL, No. de catálogo 074-1802) y anti- conejo (KPL) diluidos en leche libre de grasa al 5% en TBS-Tween 0.05%.

	Dilución de Ac. Primario	Dilución de Ac. Secundario
GFP	1: 10 000	1: 10 000
Flag	1: 10 000	1: 10 000
Akt	1: 15 000	1: 10 000
pAkt S473	1: 5 000	1: 5 000
ERK	1: 15 000	1: 10 000
pERK	1: 5 000	1: 5 000
GSK3 β	1: 10 000	1: 10 000
pGSK3 β	1: 5 000	1: 5 000
pS6K	1: 5 000	1: 5 000
ppS6K	1: 10 000	1: 10 000

12. Incubar 1 hora en agitación a temperatura ambiente.
 13. Lavar 3 veces con TBS-Tween 0.05% y en cada lavado agitar 5 min.
 14. Dejar en TBS 1X las membranas hasta su uso.

2.5.6. REVELADO

1. Agregar sustrato luminol y solución peroxidada, ImmobilonTM Western Milipore con No. de catálogo WBKLS05000 diluído 1:1 (vol/vol) a la membrana e incubar 1 min.
2. Secar la membrana y colocar en un cassette para autorradiografía. Asegurar que no queden burbujas en la membrana.
3. Exponer con placas para Rayos-X (Agfa-Gevaert) 30s y 1 min. En caso requerido dejar menor o mayor tiempo de exposición.
4. Revelar.

2.6. EFECTO DEL MEDIO CONDICIONADO DE LAS CÉLULAS HT-29 (Línea celular de cáncer colorrectal humano) EN LA VÍA DE TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES DEL RECEPTOR TEM5

Una de las estrategias para evaluar la activación de TEM5 es el uso del medio condicionado de las células HT-29. La presencia exacerbada de TEM5 en los capilares sanguíneos de cáncer colorrectal sugiere el reconocimiento de una señal proveniente de estas células cancerosas. Las proteínas de interés son cuantificadas (píxeles) con ayuda del programa Image J y con los datos obtenidos se desarrolla un análisis estadístico en el programa GraphPad Prism 4.

2.6.1. MANTENIMIENTO DEL CULTIVO CELULAR

Las células HEK 293 se cultivan en cajas petri de 100 mm de diámetro con medio DMEM (Sigma, No. de catálogo D-7777) y medio McCoy 5a (Sigma, No. de catálogo M4892) para la línea celular HT-29 con 10% de SFB (suero fetal bovino) en una atmosfera de 5% de CO₂ a 37° C.

PROCEDIMIENTO.

1. Retirar el medio DMEM de las células HEK 293.
2. Lavar las células HEK 293 con PBS 1X (Buffer salino de fosfatos).
3. Agregar 1ml de tripsina-EDTA 1X (SIGMA, 0.5g de tripsina y 0.2g de EDTA en 100ml)
4. Dejar actuar la tripsina 3 min. en la incubadora a 37° C. Golpear un poco la caja que contiene tripsina para facilitar el despegado de células.
5. Neutralizar la acción de la tripsina, agregando 9 ml de medio DMEM con 10% SFB a las células tripsinizadas.
6. Resuspender varias veces para separar los agregados celulares y realizar una dilución 1/5 para las cajas que se van a transfectar, esto es

2 ml de la suspensión celular más 8 ml de medio DMEM por cada caja de 100 cm de diámetro, previamente tratada con Poly-D-Lisina (SIGMA, No. de catálogo P-4408) por 10 min. El stock se mantiene resemebrando las células con una dilución 1/10, 2 veces por semana.

2.6.2. TRANSFECCIÓN CELULAR. TRANSFECCIÓN DE CÉLULAS HEK 293 CON LAS CONSTRUCCIONES 3XFlag-TEM5 Y 3XFlag-TEM5-GFP POR EL MÉTODO DE POLYFECT

Preparar Polyfect (QIAGEN, No. de catálogo 301107) en un tubo de polipropileno dependiendo del número de cajas a transfectar. El procedimiento se describe a continuación.

1. Marcar y colocar los tubos eppendorf en una gradilla. Agregar 300 μ l de medio DMEM sin suero por caja p100, adicionar 25 μ l de Polyfect a los tubos correspondientes.
2. Transferir esa mezcla a los tubos con el ADN (0.6 μ g) 3XFlag-TEM5/3XFlag-TEM5-GFP/pCEFL/CXCR4 (0.25 μ g), agitar e incubar 10 min.
3. Preparar las células. Lavar con PBS 1X, agregar 7ml de medio DMEM con SFB al 10%.
4. Después de los 10 min. añadir 1ml de DMEM con SFB al 10% a cada tubo. Mezclar y agregar la mezcla a las cajas petri de 100 mm de diámetro.
5. Incubar en una atmósfera de 5% de CO₂ a 37° C. Procesar 2 días después de la transfección.

2.6.3. AYUNO CELULAR

En este método las células son privadas de suero fetal bovino, reduciendo su actividad basal. El uso del suero fetal bovino interfiere con los resultados por lo tanto, afecta las conclusiones del experimento. El ayuno es de 12 horas antes de la lisis celular para las células HEK 293 y 24 horas antes de recolectar el medio condicionado de las células HT-29.

1. Lavar las células con PBS 1X. Tener cuidado de no despegar las células.
2. Agregar 5 ml de medio DMEM sin suero para las células HEK 293 y 10 ml de medio McCoy 5a sin suero para las células HT-29.
3. Mantener la incubación a 37° C en una atmósfera de 5% de CO₂.

- Estimulación de las células HEK 293 con el medio condicionado de las células HT-29

1. Recolectar el sobrenadante de las células HT-29 ayunadas por 24 horas en un tubo falcon de 50 ml.
2. Centrifugar 5min. a 2 500 rpm. Con la finalidad de concentrar las células que se desprendieron en el momento de la recolección.
3. Colocar 1 ml del medio condicionado de las células HT-29 en cada pozo correspondiente a los tiempos de estimulación (1, 5, 15, 30 y 60 min.) en las diferentes condiciones. Adicionar 10ng/μl de SDF-1 (Factor 1 derivado de estroma) para activar al receptor quimiotáctico CXCR4 en los mismos tiempos descritos anteriormente.
4. Una vez terminados los tiempos de estimulación se procede a lisar las células HEK 293.

2.6.4. LISIS CELULAR

1. Lavar las células con 2 ml de PBS 1X.
2. Colocar las cajas sobre hielo.
3. Agregar 200 μ l de buffer de lisis Tritón 1X sin EDTA que contiene 50 mM de Tris-HCl, pH 7.5; 0.15M de NaCl, 1% Tritón X100 e inhibidores de proteasas (aprotinina 0.1 μ g/ml; leupeptina 0.1 μ g/ml; fenil-metil-sulfonil-fluoruro 100 μ g/ml) así como los inhibidores de fosfatasas (β -Glicerolfosfato 100 μ g/ml; Ortovanadato de sodio 0.1 μ g/ml; Fluoruro de sodio 0.1 μ g/ml). Los inhibidores se agregan antes de usar el buffer de lisis. Preparar sobre hielo.
4. Dejar reposar 10 min.
5. Centrifugar a 4° C durante 10 min. a 13 000 rpm.
6. Recuperar el sobrenadante en tubos nuevos (trabajar sobre hielo).
7. Agregar a las muestras la tercera parte de buffer de muestra (Laemmli con β -MeOH) 1X.
8. Hervir 5 min. y posteriormente centrifugar 5 min. a 13 000 rpm. No hervir si se desea detectar al receptor TEM5. Guardar los tubos a -20° C hasta su uso.

2.6.5. WESTERN BLOT

La preparación de gel en poliacrilamida al 6% facilita el movimiento del receptor TEM5 (185 KDa) a través de la red de acrilamida. Sin embargo, para las proteínas Akt (60 KDa) ERK (42 y 44 KDa), GSK3 β (46 KDa), S6K (70 KDa) y sus respectivas fosforilaciones se utiliza un gel al 10% de poliacrilamida. Preparar el gel de poliacrilamida de acuerdo a la sección 3 del manual de laboratorio de referencia.

1. Hervir las muestras 5 min. y centrifugar 5min a 13 000 rpm (temperatura ambiente).
2. Colocar 20 μ l (1 μ g = 1 μ l) de lisado total en el gel de poliacrilamida. Electroforesis a 40 mA.
3. Transferir en Immobilon P Millipore (previamente tratado con metanol por 5 min. y posteriormente lavado con agua y Buffer de transferencia) durante 2:30 horas a 320 mA.
4. Lavar la membrana con agua desionizada.
5. Agregar TBS-Tween 0.05% a la membrana y mantener en agitación durante 5 min.
6. Bloquear con leche libre de grasa (Nestle® Svelty) al 5% en TBS-Tween 0.05%.
7. Mantener en agitación constante (40 rpm) 1 hora a temperatura ambiente.
8. Lavar 3 veces con TBS-Tween 0.05% y dejar en agitación durante 5 min cada lavado.
9. Agregar anticuerpo primario contra la proteína verde fluorescente (GFP (B-2) monoclonal, Santa Cruz Biotechnology Inc. con No. de catálogo sc-9996) y Flag (anti-Flag® M2 monoclonal, SIGMA con No. de catálogo F 3165) para detectar al receptor TEM5 y anticuerpos primarios contra las proteínas Akt, (anti-AKT1 monoclonal SIGMA con No. de catálogo P 2482), pAkt (pAkt (S473)-R, Santa Cruz Biotechnology Inc. con No. de catálogo sc-7985-R), ERK p44/42 (ERK 2 (C-14) policlonal, Santa Cruz Biotechnology Inc. con No. de catálogo sc-154), pERK (pERK p44/42 (Thr202 y Tyr204) policlonal, Cell Signaling con No. de catálogo 9101), GSK3 β (GSK3 β (27C10) monoclonal, Cell Signaling con No. de catálogo 9315), pGSK3 β (pGSK3 β (Ser9) policlonal, Cell Signaling con No. de catálogo 9336) pS6K (pS6K policlonal, Cell Signaling con No. de catálogo 9202), ppS6K (ppS6K (Thr389) policlonal, Cell Signaling con No. de catálogo 9205), diluidos en TBS-Tween 0.05% (excepto el

anticuerpo contra Flag, el cual es diluido en BSA al 5% en TBS-Tween 0.05%) y en agitación constante durante 12h a 4° C.

10. Recuperar los anticuerpos primarios y lavar la membrana 3 veces con TBS-Tween 0.05% durante 5 min. cada lavado.
11. Agregar anticuerpos secundario anti-ratón (KPL, No. de catálogo 074-1802) y anti- conejo (KPL) diluidos en leche libre de grasa al 5% en TBS-Tween 0.05%.

	Dilución de Ac. Primario	Dilución de Ac. Secundario
GFP	1: 10 000	1: 10 000
Flag	1: 20 000	1: 20 000
Akt	1: 20 000	1: 10 000
pAkt S473	1: 5 000	1: 5 000
ERK	1: 50 000	1: 50 000
pERK	1: 5 000	1: 5 000
GSK3 β	1: 10 000	1: 10 000
pGSK3 β	1: 5 000	1: 5 000
pS6K	1: 5 000	1: 5 000
ppS6K	1: 20 000	1: 20 000

12. Incubar 1 hora en agitación a temperatura ambiente.
13. Lavar 3 veces con TBS-Tween 0.05% y en cada lavado agitar 5 min.
14. Dejar en TBS 1X las membranas hasta su uso.

2.6.6. REVELADO

1. Agregar sustrato luminol y solución peroxidada, Immobilon™ Western Milipore con No. de catálogo WBKLS05000 diluído 1:1 (vol/vol) a la membrana e incubar 1 min.
2. Secar la membrana y colocar en un cassette para autorradiografía. Asegurar que no queden burbujas en la membrana.
3. Exponer con placas para Rayos-X (Agfa-Gevaert) 30s y 1 min. En caso requerido dejar menor o mayor tiempo de exposición.
4. Revelar.

2.7. ACTIVACIÓN DE LA GTPasa Rac PROMOVIDA POR EL MEDIO CONDICIONADO DE LAS CÉLULAS HT-29

Para comprobar que, el receptor TEM5 regula la actividad de la GTPasa Rac en respuesta al medio condicionado de las células HT-29 se realiza un ensayo "Pull Down" para la detección de Rac activado (Rac-GTP) en células HEK 293.

2.7.1. MANTENIMIENTO DEL CULTIVO CELULAR

Las células HEK 293 se cultivan en cajas petri de 100 mm de diámetro con medio DMEM (Sigma, No. de catálogo D-7777) y medio McCoy 5a (Sigma, No. de catálogo M4892) para la línea celular HT-29 con 10% de SFB (suero fetal bovino) en una atmosfera de 5% de CO₂ a 37° C.

PROCEDIMIENTO.

1. Retirar el medio DMEM de las células HEK 293.
2. Lavar las células HEK 293 con PBS 1X (Buffer salino de fosfatos).

3. Agregar 1ml de tripsina-EDTA 1X (SIGMA, 0.5g de tripsina y 0.2g de EDTA en 100ml)
4. Dejar actuar la tripsina 3 min. en la incubadora a 37° C. Golpear un poco la caja que contiene tripsina para facilitar el despegado de células.
5. Neutralizar la acción de la tripsina, agregando 9 ml de medio DMEM con 10% SFB a las células tripsinizadas.
6. Resuspender varias veces para separar los agregados celulares y realizar una dilución 1/5 para las cajas que se van a transfectar, esto es 2 ml de la suspensión celular más 8 ml de medio DMEM por cada caja de 100 cm de diámetro, previamente tratada con Poly-D-Lisina (SIGMA, No. de catálogo P-4408) por 10 min. El stock se mantiene resemebrando las células con una dilución 1/10, 2 veces por semana.

2.7.2. TRANSFECCIÓN CELULAR. TRANSFECCIÓN DE CÉLULAS HEK 293 CON LAS CONSTRUCCIONES 3XFlag-TEM5 y pCEFL POR EL MÉTODO DE POLYFECT

Preparar Polyfect (QIAGEN, No. de catálogo 301107) en un tubo de polipropileno dependiendo del número de cajas a transfectar. El procedimiento se describe a continuación.

1. Marcar y colocar los tubos eppendorf en una gradilla. Agregar 300 µl de medio DMEM sin suero por caja p100, adicionar 25 µl de Polyfect a los tubos correspondientes.
2. Transferir esa mezcla a los tubos con el ADN (0.6 µg) 3XFlag-TEM5/3XFlag-TEM5-GFP/pCEFL, agitar e incubar 10 min.
3. Preparar las células. Lavar con PBS 1X, agregar 7ml de medio DMEM con SFB al 10%.

4. Después de los 10 min. añadir 1ml de DMEM con SFB al 10% a cada tubo. Mezclar y agregar la mezcla a las cajas petri de 100 mm de diámetro.
5. Incubar en una atmósfera de 5% de CO₂ a 37° C. Procesar 2 días después de la transfección.

2.7.3. AYUNO CELULAR

En este método las células son privadas de suero fetal bovino, reduciendo su actividad basal. El uso del suero fetal bovino interfiere con los resultados por lo tanto, afecta las conclusiones del experimento. El ayuno es de 12 horas antes de la lisis celular para las células HEK 293 y 24 horas antes de recolectar el medio condicionado de las células HT-29.

1. Lavar las células con PBS 1X. Tener cuidado de no despegar las células.
2. Agregar 5 ml de medio DMEM sin suero para las células HEK 293 y 10 ml de medio McCoy 5a sin suero para las células HT-29.
3. Mantener la incubación a 37° C en una atmósfera de 5% de CO₂.

- Estimulación de las células HEK 293 con el medio condicionado de las células HT-29

1. Recolectar el sobrenadante de las células HT-29 ayunadas por 24 horas en un tubo falcon de 50 ml.
2. Centrifugar 5min. a 2 500 rpm. Con la finalidad de concentrar las células que se desprendieron en el momento de la recolección.
3. Colocar 1 ml del medio condicionado de las células HT-29 en cada pozo correspondiente a los tiempos de estimulación (1, 5, 15, 30 y

- 60 min.) en las diferentes condiciones. Adicionar 10ng/μl de SDF-1 (Factor 1 derivado de estroma) para activar al receptor quimiotáctico CXCR4 en los mismos tiempos descritos anteriormente.
- Una vez terminados los tiempos de estimulación se procede a lisar las células HEK 293.

2.7.4. LISIS CELULAR

Preparación del Buffer de lisis.

- Tris 50mM pH 7.5
- NaCl 0.15M (el sodio total es 150mM)
- EDTA 5mM
- Tritón X-100 1%
- MgCl₂ 10mM
- Inhibidores de proteasas y fosfatasa (aprotinina, leupeptina, PMSF, β-Glicerolfosfato, NaF y Ortovanadato)

Preparación de 500 ml de solución stock de buffer de lisis sin inhibidores

- 25 ml de Tris-HCl 1M
- 5 ml de EDTA 0.5M
- 30 ml de NaCl 2.5M
- 5 ml de Triton-X100
- Aforar a 500 ml con agua Mili Q
- Agitar en la parrilla de agitación magnética. Guardar a 4°C.

Preparación de 50 ml de buffer de lisis con inhibidores

- 50 ml de la solución stock.
- 50 μ l aprotinina (de un stock que contiene 10mg/ml en PBS 1X, almacenado a -20°C)
- 50 μ l leupeptina (de un stock que contiene 10mg/ml en agua, almacenado a -20°C)
- 500 μ l de PMSF (de un stock 0.1M preparado con etanol, almacenado a temperatura ambiente)
- 500 μ l de Beta-glicerolfosfato (de un stock 1M, almacenado a -20°C)
- 50 μ l de NaF (de un stock 1M, almacenado a -20°C)
- 50 μ l de Ortovanadato (de un stock 1M, almacenado a -20°C)
- 250 μ l de MgCl_2 2M
- Mantener el buffer en hielo.

- Ensayo Pull Down para la activación de Rac

1. Preparar una charola con hielo suficiente para el número de cajas a lisar.
2. Marcar tres series de tubos eppendorff y mantenerlos en hielo, p ej 1R, 1LT, 1 \downarrow , para referirse a los tubos en que se recupera el lisado, en que se separa un poco de lisado total después de centrifugar y en el que se incuba el lisado con las perlas, respectivamente. No hervir los tubos con los que se identificará el receptor TEM5. Los tubos correspondientes a 1 \downarrow deben contener 50 μ l de la suspensión de perlas GST-PAKN para cajas p100. No olvidar resuspender muy bien las perlas antes de tomar los 50 μ l mencionados, cortar la punta que se va a usar.
3. Poner a enfriar la centrifuga a 4°C .

4. Una vez terminado el tiempo del estímulo, se colocan las cajas en hielo. Retirar el medio de cada una de las cajas. A partir de este punto es importante que todo se mantenga frío.
5. Lavar rápidamente cada una de las cajas con 2 a 4 ml de PBS 1X frío.
6. Inclinar la caja sobre el hielo y retirar el PBS con la pipeta pasteur conectada al vacío. Adicionar 1 ml de Buffer de lisis con inhibidores. Asegurarse que cubra toda la superficie de la caja e incubar en el mismo hielo durante 5 minutos. Transcurrido ese tiempo se raspan las cajas para transferir los lisados a tubos eppendorf según se indica a continuación.
7. Inmediatamente después rasparlas con un gendarme, concentrando el lisado en una de las orillas. Resuspender con la micropipeta de 1 ml, arriba y abajo 10 veces, y transferir a la primera serie de tubos eppendorff (marcados para recuperar el lisado). Trabajar en hielo.
8. Centrifugar a 13,000-14,000 rpm durante 5min a 4°C.
9. Adicionar 75 µl del sobrenadante en tubos eppendorf (para lisados totales).
10. Adicionar el sobrenadante restante a los tubos eppendorff con esferas GST-PAK-N e incubar en hielo durante 45 minutos. Los tubos deben estar horizontales y dentro del hielo. Incubar en agitación.
11. Mientras tanto, poner a hervir agua y bajar la intensidad a 4-5, adicionar 25 µl de buffer de muestra 4X a los tubos que contienen 75 µl de lisado total, y hervir durante 5 min. Las muestras una vez que son hervidas pueden mantenerse a temperatura ambiente siempre y cuando ese mismo día se planee correr el gel, si no, guardarlas a -20°C, en tal caso hervirlas nuevamente cuando se vaya a correr el gel.
12. Concluido el tiempo de incubación de las muestras con las esferas (paso 10) centrifugar a 5,000 rpm durante 2 minutos a 4°C.
13. Retirar el sobrenadante con cuidado con una punta de micropipeta colocada en una Pasteur y en un sistema de vacío. Lavar la pastilla 3

14. veces con 1 ml de buffer de lisis con inhibidores. Utilizar el vortex brevemente para un lavado eficiente.
15. Retirar el sobrenadante y adicionar 35 μ l de buffer de muestra de Laemmli 1X. con β -mercaptoetanol.
16. Poner a hervir las muestras en agua a ebullición durante 5 minutos.
17. Centrifugar a 13 000 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente.

2.7.5. WESTERN BLOT

1. Correr geles SDS-PAGE al 12 % a 30 mA. Transferir a Immobilon durante 2.5 h a 320 mA.
2. Bloquear con leche libre de grasa al 5% en TBS-T 0.05% durante 1h a temperatura ambiente en el agitador a una velocidad de 40 rpm.
3. Realizar una serie de lavados con agua bidestilada hasta que ya no se observe restos de leche.
4. Realizar un lavado con TBS-T 0.05% durante 5 minutos a temperatura ambiente.
5. Adicionar el anticuerpo anti-Rac (anti Rac monoclonal, BD Biosciences con No. R56220-150) a una dilución 1:5 000 en TBS-T 0.05% e incubar 12h a 4 °C a una velocidad de 30 rpm. Asegurarse que el anticuerpo cubra completamente la membrana. Transcurrido este tiempo recuperar el anticuerpo y guardarlo a -20°C.
6. Realizar un lavado rápido seguido de cuatro lavados de 5 minutos cada uno con TBS-T 0.05%. Debe usarse suficiente TBS-T para que la membrana flote libremente durante la agitación. Asegurarse que la agitación sea vigorosa.
7. Adicionar el anticuerpo secundario 1:10 000 en leche al 5% en TBS-T 0.05% (Anti-ratón) durante 1 hora. Ajustar el agitador de sube y baja a 30 rpm.

8. Realizar un lavado rápido seguido de cuatro lavados de 5 minutos cada uno con TBS-T 0.05%. Debe usarse suficiente TBS-T para que la membrana flote libremente durante la agitación. Asegurarse que la agitación sea vigorosa.
9. Realizar un último lavado de 5 minutos a temperatura ambiente con TBS 1X
10. Revelar el WB con el sustrato quimioluminiscente Millipore a una dilución 1/1. Si se puede, colocar la membrana en una esquina del cassette y exponer 10 seg, 30 seg, 1 min y 5 min en la misma placa.

2.8. DINÁMICA DEL RECEPTOR TEM5 EN RESPUESTA AL MEDIO CONDICIONADO DE LAS CÉLULAS HT-29

De acuerdo a la hipótesis planteada, si el receptor TEM5 es activado en respuesta al medio condicionado de las células HT-29 cambiaría su localización en la membrana plasmática. Por lo tanto, la construcción del receptor TEM5 fusionado con la proteína fluorescente permite monitorizar el desplazamiento del receptor TEM5 en la membrana debida al medio condicionado de las células HT-29. Las construcciones con la proteína verde fluorescente (pCEFL-EGFP) y Red-Caax, la caja Caax tiene una cisteína (C) que es prenalizada a la membrana, a es cualquier aminoácido alifático y la identidad de X determina que enzima actúa sobre la proteína (farnesiltransferasa o geranilgeraniltransferasa), para marcar la membrana sirven como controles en dicho experimento.

2.8.1. MANTENIMIENTO DEL CULTIVO CELULAR

Las células HeLa se cultivan en cajas petri de 100 mm de diámetro con medio DMEM (Sigma, No. de catálogo D-7777) y medio McCoy 5a (Sigma, No.

de catálogo M4892) para la línea celular HT-29 con 10% de SFB (suero fetal bovino) en una atmosfera de 5% de CO₂ a 37° C.

PROCEDIMIENTO.

1. Retirar el medio DMEM de las células HeLa.
2. Lavar las células HeLa con PBS 1X (Buffer salino de fosfatos).
3. Agregar 1ml de tripsina-EDTA 1X (SIGMA, 0.5g de tripsina y 0.2g de EDTA en 100ml)
4. Dejar actuar la tripsina 3 min. en la incubadora a 37° C. Golpear un poco la caja que contiene tripsina para facilitar el despegado de células.
5. Neutralizar la acción de la tripsina, agregando 9 ml de medio DMEM con 10% SFB a las células con tripsina.
6. Resuspender varias veces para separar los agregados celulares y realizar una dilución 1/5 para las cajas que se van a transfectar, esto es 2 ml de la suspensión celular más 8 ml de medio DMEM por cada caja de 100 cm de diámetro, previamente tratada con Poly-D-Lisina (SIGMA, No. de catálogo P-4408) por 10 min. El stock se mantiene resemebrando las células con una dilución 1/10, 2 veces por semana.

2.8.2. TRANSFECCIÓN CELULAR. TRANSFECCIÓN DE CÉLULAS HeLa CON LAS CONSTRUCCIONES 3XFlag-TEM5-GFP Y pCEFL-EGFP POR EL MÉTODO DE POLYFECT

Preparar Polyfect (QIAGEN, No. de catálogo 301107) en un tubo de polipropileno dependiendo del número de cajas a transfectar. El procedimiento se describe a continuación.

1. Marcar y colocar los tubos eppendorf en una gradilla. Agregar 300 μ l de medio DMEM sin suero por caja p100, adicionar 25 μ l de Polyfect a los tubos correspondientes.
2. Transferir esa mezcla a los tubos con el ADN correspondiente y agitar e incubar 10 min.

Tubo 1. 3XFlag-TEM5-GFP (1.5 μ g).

Tubo 2. pCEFL-EGFP (1.5 μ g).

Tubo 3. 3XFlag-TEM5-GFP (1.5 μ g) + Red-Caax (0.25 μ g).

3. Preparar las células. Lavar con PBS 1X, agregar 7ml de medio DMEM con SFB al 10%.
4. Después de los 10 min. añadir 1ml de DMEM con SFB al 10% a cada tubo. Mezclar y agregar la mezcla a las cajas petri de 100 mm de diámetro.
5. Incubar en una atmósfera de 5% de CO₂ a 37° C. Procesar 2 días después de la transfección.
6. Al siguiente día, dividir las células transfectadas (150 μ l a cada caja proveniente de una dilución 1:10) a cajas de fondo de vidrio previamente tratadas con gelatina (Gelatina de piel de bovino tipo B, SIGMA con No. de catálogo G9391-1006) al 0.02% incubada a 37° C por 30 min.

2.8.3. AYUNO CELULAR

En este método las células son privadas de suero fetal bovino, reduciendo su actividad basal. El ayuno es de 12 horas antes del monitoreo para las células HeLa y 24 horas antes de recolectar el medio condicionado de las células HT-29.

1. Lavar las células con PBS 1X. Tener cuidado de no despegar las células.
2. Agregar 5 ml de medio DMEM sin suero para las células HeLa y 10 ml de medio McCoy 5a sin suero para las células HT-29.
3. Mantener la incubación a 37° C en una atmósfera de 5% de CO₂.

2.8.4. ESTIMULACIÓN DE LAS CÉLULAS HeLa CON EL MEDIO CONDICIONADO DE LAS CÉLULAS HT-29

1. Recolectar el sobrenadante de las células HT-29 ayunadas por 24 horas en un tubo falcon de 50 ml.
2. Centrifugar 5min. a 2 500 rpm. Con la finalidad de concentrar las células que se desprendieron en el momento de la recolección.
3. Colocar 1 ml del medio condicionado de las células HT-29 en cada condición.
4. Monitoreo del receptor TEM5 por 4 horas.

El receptor TEM5 es monitorizado en el microscopio invertido Nikon ECLIPSE Ti-E capturado con la cámara NIKON DIGITAL SIGHT DS-Qi1MC en el programa NIS-Elements v3.1 por 4 horas en intervalos de 5min en filtros para verdes (488nm), rojos (543nm) y campo claro con objetivo de 60X. Las células se mantienen dentro de una cámara con atmósfera de 5% de CO₂ a 37° C.

2.9. EFECTO FUNCIONAL DE TEM5 EN LA MIGRACIÓN CELULAR PROMOVIDA POR EL MEDIO CONDICIONADO DE LAS CÉLULAS HT-29

2.9.1. MANTENIMIENTO DEL CULTIVO CELULAR

Las células HeLa se cultivan en cajas petri de 100 mm de diámetro con medio DMEM (Sigma, No. de catálogo D-7777) y medio McCoy 5a (Sigma, No. de catálogo M4892) para la línea celular HT-29 con 10% de SFB (suero fetal bovino) en una atmosfera de 5% de CO₂ a 37° C.

PROCEDIMIENTO.

1. Retirar el medio DMEM de las células HeLa.
2. Lavar las células HeLa con PBS 1X (Buffer salino de fosfatos).
3. Agregar 1ml de tripsina-EDTA 1X (SIGMA, 0.5g de tripsina y 0.2g de EDTA en 100ml).
4. Dejar actuar la tripsina 3 min. en la incubadora a 37° C. Golpear un poco la caja que contiene tripsina para facilitar el despegado de células.
5. Neutralizar la acción de la tripsina, agregando 9 ml de medio DMEM con 10% SFB a las células tripsinizadas.
6. Resuspender varias veces para separar los agregados celulares y realizar una dilución 1/5 para las cajas que se van a transfectar, esto es 2 ml de la suspensión celular más 8 ml de medio DMEM por cada caja de 100 cm de diámetro, previamente tratada con Poly-D-Lisina (SIGMA, No. de catálogo P-4408) por 10 min. El stock se mantiene resemebrando las células con una dilución 1/10, 2 veces por semana.

2.9.2. TRANSFECCIÓN CELULAR. TRANSFECCIÓN DE CÉLULAS HeLa CON LAS CONSTRUCCIONES 3XFlag-TEM5-GFP Y pCEFL-EGFP POR EL MÉTODO DE POLYFECT

Preparar Polyfect (QIAGEN, No. de catálogo 301107) en un tubo de polipropileno dependiendo del número de cajas a transfectar. El procedimiento se describe a continuación.

1. Marcar y colocar los tubos eppendorf en una gradilla. Agregar 150 μ l de medio DMEM sin suero por caja p60, adicionar 15 μ l de Polyfect a los tubos correspondientes.
2. Transferir esa mezcla a los tubos con el ADN correspondiente y agitar e incubar 10 min.

Tubo 1. 3XFlag-TEM5-GFP (1 μ g).

Tubo 2. pCEFL-EGFP (1 μ g).

3. Preparar las células. Lavar con PBS 1X, agregar 3 ml de medio DMEM con SFB al 10%.
4. Después de los 10 min. añadir 1ml de DMEM con SFB al 10% a cada tubo. Mezclar y agregar la mezcla a las cajas petri de 100 mm de diámetro.
5. Incubar en una atmósfera de 5% de CO₂ a 37° C. Procesar 2 días después de la transfección.
6. Al día siguiente, dividir células (300 μ l en cada caja proveniente de una dilución 1:10) en cajas p35 con gelatina al 0.02% previamente incubadas a 37° C por 30 min.

2.9.3. AYUNO CELULAR

En este método las células son privadas de suero fetal bovino, reduciendo su actividad basal. El ayuno es de 12 horas antes del monitoreo para las células HeLa y 24 horas antes de recolectar el medio condicionado de las células HT-29.

1. Lavar las células con PBS 1X. Tener cuidado de no despegar las células.
2. Agregar 5 ml de medio DMEM sin suero para las células HeLa y 10 ml de medio McCoy 5a sin suero para las células HT-29.
3. Mantener la incubación a 37° C en una atmósfera de 5% de CO₂.

2.9.4. ESTIMULACIÓN DE LAS CÉLULAS HELA CON EL MEDIO CONDICIONADO DE LAS CÉLULAS HT-29

1. Recolectar el sobrenadante de las células HT-29 ayunadas por 24 horas en un tubo falcon de 50 ml.
2. Centrifugar 5min. a 2 500 rpm. Con la finalidad de concentrar las células que se desprendieron en el momento de la recolección.
3. Colocar 1 ml del medio condicionado de las células HT-29 en cada condición. Agregar 1ml de medio DMEM con SFB al 10% a la condición control positivo.

2.9.5 CIERRE DE HERIDA

1. Incubar las células con Mitomicina C a una concentración final de $12\mu\text{M}$ a 37°C dos horas antes de terminar el ayuno (el stock está a 2mM por lo tanto son $9\mu\text{l}$ de Mitomicina C en 1.5ml de medio sin suero y sin antibiótico)
2. Limpiar un portaobjetos con etanol al 70%, el cual nos servirá de guía para realizar la herida a la monocapa de células.
3. Retirar la Mitomicina C de las cajas y lavar 2 veces con 1.5ml de PBS 1X. Antes de retirar el segundo lavado se procede hacer la herida con la punta de una micropipeta de $10\mu\text{l}$. La herida debe hacerse en un solo movimiento, rápido y decisivo de arriba hacia abajo.
4. Una vez hecha la herida se retira el PBS 1X y se lava nuevamente para retirar cualquier residuo celular.
5. Se procede a estimular las células con las condiciones correspondientes.
6. Tomar varias fotografías durante el experimento cierre de herida a diferentes tiempos (el cierre completo dura entre 24 y 36h). Monitorizar las condiciones basales, así como 12h post-estimulación, 24h post-estimulación y 36h post-estimulación.
7. El receptor TEM5 es monitorizado en el microscopio invertido Nikon ECLIPSE Ti-E capturado con la cámara NIKON DIGITAL SIGHT DS-Qi1MC en el programa NIS-Elements v3.1 en filtros para verdes (488nm) y campo claro con objetivo de 10X.

2.10 EFECTO FUNCIONAL DE TEM5 EN LA ANGIOGÉNESIS *IN VITRO* EN MATRIGEL

Para evaluar la participación de TEM5 en la formación de estructuras capilares que conforman los vasos sanguíneos se emplea la técnica de angiogénesis *in Vitro* en matrigel. El matrigel contiene 60% de laminina, 30% de colágeno IV, 8% de entactina que proveen lo necesario para la formación estructural de las redes capilares, entre otros factores de crecimiento. El procedimiento se describe a continuación.

2.10.1 MANTENIMIENTO DEL CULTIVO CELULAR

Las células PAE se cultivan en cajas petri de 100 mm de diámetro con medio DMEM (Sigma, No. de catálogo D-7777) y medio McCoy 5a (Sigma, No. de catálogo M4892) para la línea celular HT-29 con 10% de SFB (suero fetal bovino) en una atmosfera de 5% de CO₂ a 37° C.

2.10.2 TRANSFECCIÓN EN CÉLULAS PAE CON LAS CONSTRUCCIONES 3XFlag-TEM5-GFP Y pCEFL-EGFP POR EL MÉTODO DE LIPOFECTAMINA LTX-PLUS

Las células deben dividirse un día antes de la transfección en cajas/placas pretratadas con Poly-D-Lysine durante 10 min. y lavadas con PBS 1X (una o dos veces). Transfectar al 60% de confluencia de las células.

Preparar PLUS en un tubo de propileno para una caja a transfectar.

1. Agregar 1µg de DNA 3XFlag-TEM5-GFP/pCEFL-EGFP al tubo respectivamente.
2. Posteriormente se coloca 750 µl de DMEM sin suero por caja p 100.

3. Se adiciona 10 μ l del reactivo PLUS por caja.
4. Agitar e incubar 15 min.

NOTA: Agregar el PLUS sobre el medio DMEM sin suero y no al revés. Además, si hay algún ADN común para todas las cajas se hace un homogeniza para evitar variaciones de transfección del DNA y se realiza una relación de las cantidades anteriormente descritas dependiendo de la cantidad de cajas a transfectar.

5. Una vez pasado los 15 min de incubación se agrega 12 μ l del reactivo Lipofectamina-LTX (QIAGEN, con No. 15338-100) al tubo de propileno que contiene la mezcla (DNA + DMEM sin suero + PLUS)
6. Agitar la mezcla (DNA + DMEM sin suero + PLUS + Lipofectamina-LTX) e incubar 30 min a temperatura ambiente.

NOTA: Durante la incubación de 30 min. se lava las cajas a transfectar con PBS 1X una vez y se les agrega 9.5ml de medio DMEM con suero y antibiótico.

7. Se agrega la mezcla pasado los 30 min, de incubación a cada caja a transfectar.

A) Preparación del matrigel y ayuno de las células endoteliales

1. Una noche antes de realizar el experimento, colocar una alícuota de matrigel (BD Biosciences cat. 354230) durante toda la noche a 4°C para una mejor manipulación del matrigel.
2. Ayunar las células endoteliales con 5 ml de medio DMEM sin suplementos de cajas p100 durante toda la noche a 37°C.

- Lavar las células con PBS 1X.
- Agregar 5 ml de medio DMEM sin suero para las células PAE y 10 ml de medio McCoy 5a sin suero para las células HT-29.
- Mantener la incubación a 37° C en una atmósfera de 5% de CO₂.

2.10.3 Ensayo de angiogénesis *in Vitro*

1. Realizar una dilución del matrigel a una concentración de 4.5 mg/ml con medio frío para células endoteliales sin suero y sin antibióticos. El stock está a 7.5 mg/ml. Es importante trabajar todo en hielo y en la campana.
2. Lavar los pozos de la placa de 96 pozos (Costar cat. 9102) con PBS 1X frío antes de colocar el matrigel.
3. Colocar 30-40 µl de matrigel a cada pozo evitando la formación de burbujas.
4. Colocar la placa a 37 °C por 40 a 60 minutos.

- Conteo celular

1. Lavar las células con 2-3 ml de PBS 1X estéril.
2. Adicionar 1 ml de tripsina e incubar la caja a 37 °C por 5-8 minutos
3. Neutralizar la tripsina con 4 ml de medio completo y homogenizar completamente.
4. Colocar la suspensión de células en un tubo Falcon de 15 ml estéril y centrifugar a 1,000 rpm durante 3-4 minutos.
5. Retirar el medio completo y resuspender las células en medio de ayuno sin suero y sin antibióticos.
6. Preparar una suspensión de células a 400, 000 cel/ml. Cuantificar las células con la ayuda de un hemocitómetro.

7. A cada pozo adicionar 25 μ l de la suspensión de células (10,000 céls/pozo) y 25 μ l del estímulo (VEGF) al doble de la concentración requerida para que al volumen final (de 50 μ l) quede a la concentración exacta requerida.

NOTA: La estimulación de las células PAE con el medio condicionado de las células HT-29

- Recolectar el sobrenadante de las células HT-29 ayunadas por 24 horas en un tubo falcon de 50 ml.
- Centrifugar 5min. a 2 500 rpm. Con la finalidad de concentrar las células que se desprendieron en el momento de la recolección.
- Colocar 25 μ l del medio condicionado de las células HT-29 en cada condición.

8. Incubar la placa durante 9 horas, tomando fotografías a diferentes tiempos y en diferentes campos para monitorear la formación de estructuras tipo capilar para PAE. Para las células PAE monitorear el basal y a partir de las 2h.

RESULTADOS

EFFECTO DEL FACTOR DE CRECIMIENTO DE ENDOTELIO VASCULAR (VEGF) SOBRE LA EXPRESIÓN DEL ARN MENSAJERO DE TEM5 EN CÉLULAS ENDOTELIALES

Se evaluó el efecto del factor de crecimiento de endotelio vascular (VEGF) sobre la expresión de TEM5. La expresión del ARNm de TEM5 no se observó alterada con el tratamiento de VEGF (100ng) en las células endoteliales de microvasculatura humana (HMEC) ni en las células endoteliales de cordón umbilical humana (HUVEC) como se muestra en la figura 8. La expresión del ARNm de TEM5 se encontró de manera constitutiva en las células HMEC y HUVEC y en el tumor completo humano, donde se encuentran las células endoteliales del mismo, y ésta no es modificada por la estimulación con VEGF por 12 horas. Sin embargo, se observó la expresión de TEM5 tenue, casi nula, en las células aisladas de tumor humano (cáncer de mama). La expresión de TEM5 corresponde a la banda ubicada entre un peso arriba de 100 pb y menor de 300 pb, dependiendo de los primers utilizados.

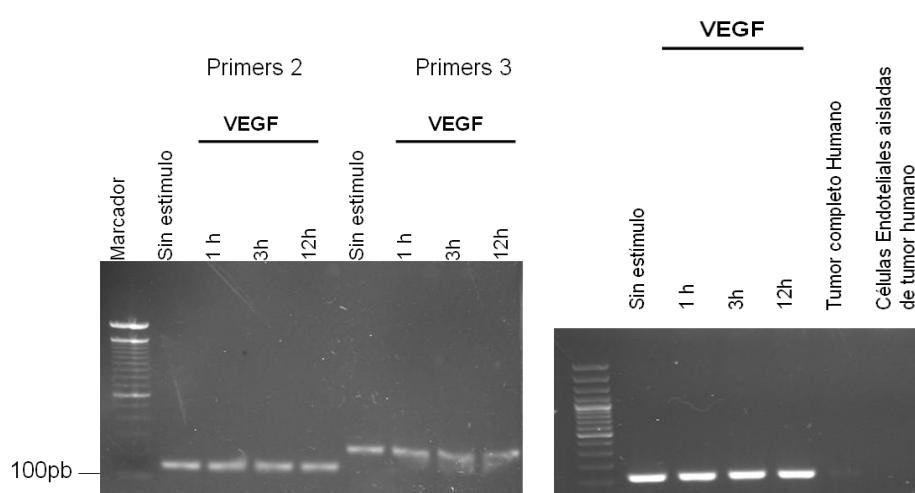


Figura 8. Expresión constitutiva del ARNm de TEM5 en células HMEC y HUVEC, respectivamente.

CONSTRUCCIÓN DE LOS pEN_EmirC3_shRNA_TEM5

Con el fin de inhibir la expresión del receptor TEM5 generamos dos shRNA de TEM5 con secuencias distintas en el vector pEN_EmirC3 (pEN_EmirC3_shRNA_TEM5_262 y pEN_EmirC3_shRNA_TEM5_3895). La obtención de dos construcciones independientes tuvo el fin de asegurar que los efectos observados no resultasen que se estuviera inhibiendo fuera del blanco. En la figura 9 se muestra la digestión de las construcciones correspondientes para verificar la inserción del fragmento de ADN correspondiente en el plásmido pEN_EmirC3. Se obtuvieron los shRNA de TEM5, pEN_EmirC3_shRNA_TEM5_262 como pEN_EmirC3_shRNA_TEM5_3895, ambas construcciones fueron identificadas en un peso entre 200pb y 300pb mediante la digestión con las enzimas XhoI y XbaI.

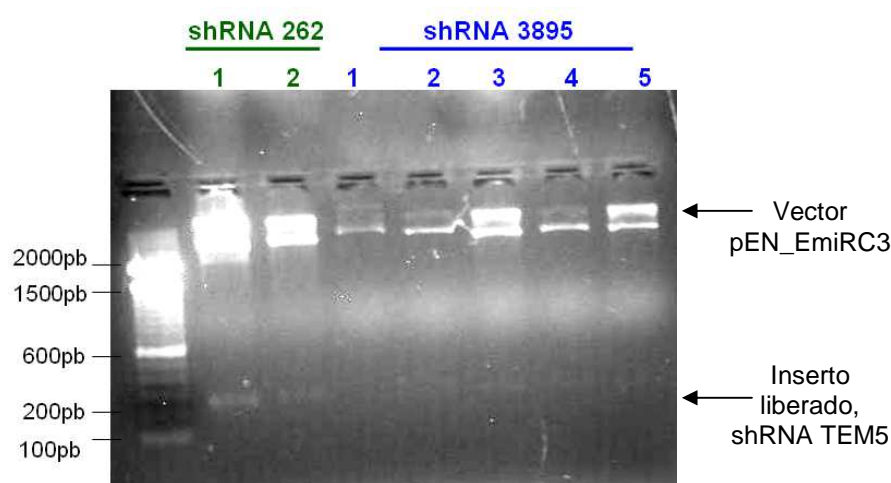


Figura 9. Construcción del pEN_EmirC3_shRNA de TEM5. Contamos con dos shRNAs de TEM5 (262 y 3895) que actúan en dos sitios diferentes de TEM5. Se identificaron dos clones del pEN_EmirC3_shRNA_TEM5_262 y cinco clones del pEN_EmirC3_shRNA_TEM5_3895 mediante la digestión con las enzimas XhoI y XbaI, las cuales promovieron la liberación del fragmento de shRNA de TEM5 en un peso de aproximadamente 200pb.

Posteriormente, estas construcciones se transfectaron en células de mamífero para evaluar su efectividad sobre el receptor TEM5. Ambas construcciones fueron efectivas para inhibir la expresión de TEM5 (3XFlag-TEM5-GFP) transfectado en células HEK 293T (línea celular de riñón embrionario humano), figura 10.

La clona 2 del pEN_EmirC3_shRNA_TEM5_262 y la clona 5 del pEN_EmirC3_shRNA_TEM5_3895 fueron las más efectivas para inhibir la expresión del receptor TEM5 transfectado en células HEK293T. Las fluorescencias mostraron que estas clonas de ambas construcciones fueron efectivas al disminuir la expresión de TEM5 (intensidad de fluorescencia baja) en comparación con el control positivo, es decir, solamente con la construcción 3XFlag-TEM5-GFP transfectada.

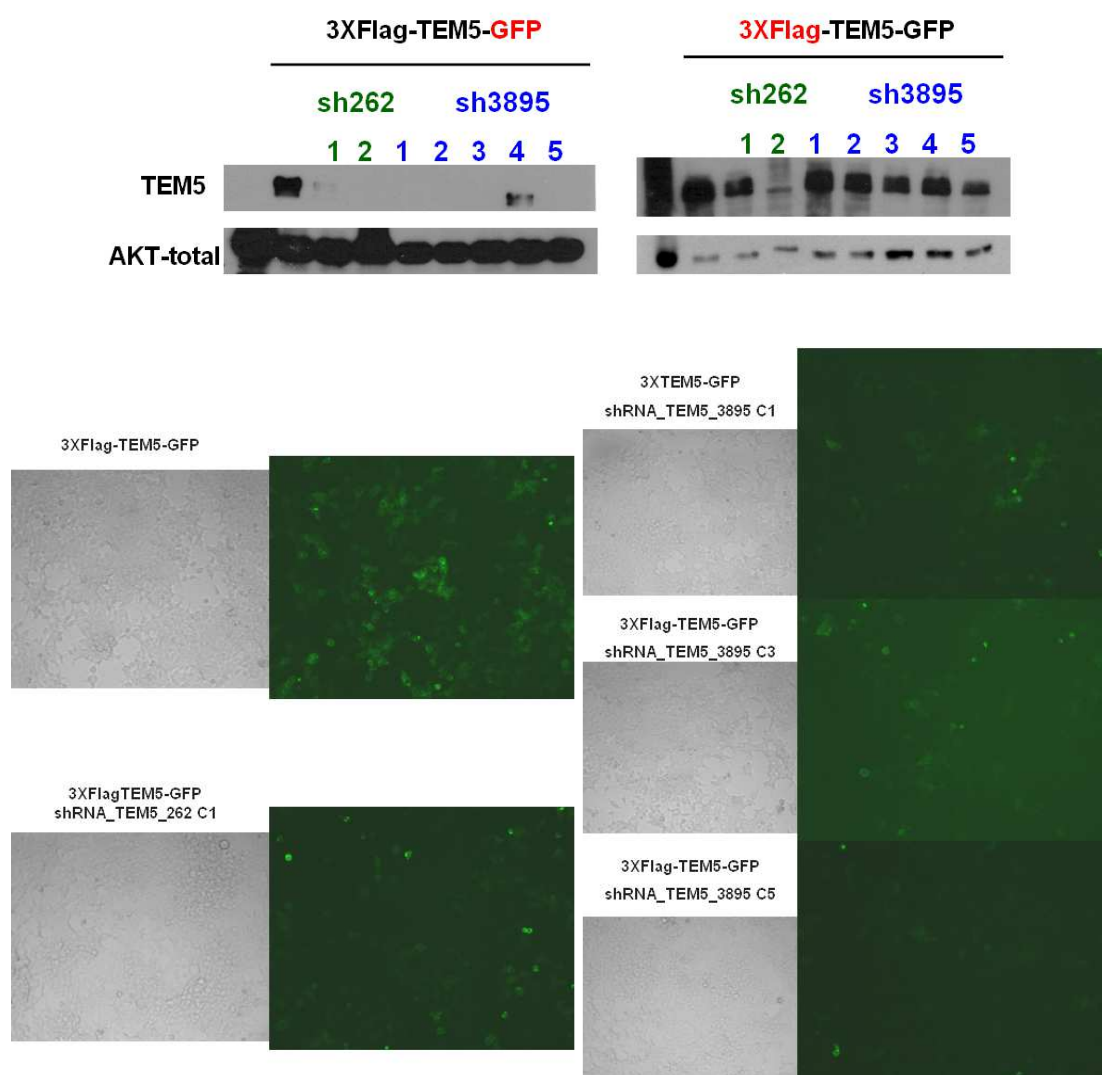


Figura 10. Efecto del pEN_EmiRc3_shRNA_TEM5 sobre la expresión del receptor 3XFlag-TEM5-GFP en células HEK 293T. Para evaluar el efecto de las construcciones con el shRNA de TEM5 sobre la expresión del receptor TEM5, se transfectaron tanto el receptor 3XFlag_TEM5_GFP como las clonas de pEN_EmiRc3_shRNA_TEM5_262 y pEN_EmiRc3_shRNA_TEM5_3895 en las células HEK293T. Las clonas que abaten la expresión del receptor TEM5, son la clona 2 del pEN_EmiRc3_shRNA_TEM5_262 y la clona 5 del pEN_EmiRc3_shRNA_TEM5_3895. Posteriormente con la técnica de microscopía de fluorescencia se observó menos grado de fluorescencia del receptor TEM5, el cual está marcado con la proteína verde fluorescente (GFP), en las células HEK293T transfectadas con el shRNA TEM5.

CONSTRUCCIÓN DE pDSL_hpIP/IG_shRNA_TEM5_3895

Una vez evaluado el efecto del pEN_EmiRc3_shRNA_TEM5 sobre la expresión del receptor TEM5 decidimos subclonar tal shRNA a otros vectores que ofrecen ventajas tales como la posibilidad de seleccionar a las células transfectadas (pDSL_hpIP) o bien, identificarlas al microscopio de fluorescencia (pDSL_hpIG). El plásmido pDSL_hpIP permite que las células transfectadas sean seleccionadas con el fármaco Puromicina, en tanto que el plásmido pDSL_hpIG codifica, junto con el shRNA, a la proteína verde fluorescente (GFP). Con la finalidad de saber si el shRNA de TEM5 quedó insertado en estos vectores se digirió con la enzima BamHI y se liberó un fragmento de aproximadamente 789 pb, indicando que el shRNA de TEM5 se insertó en el plásmido correctamente, figura 11.

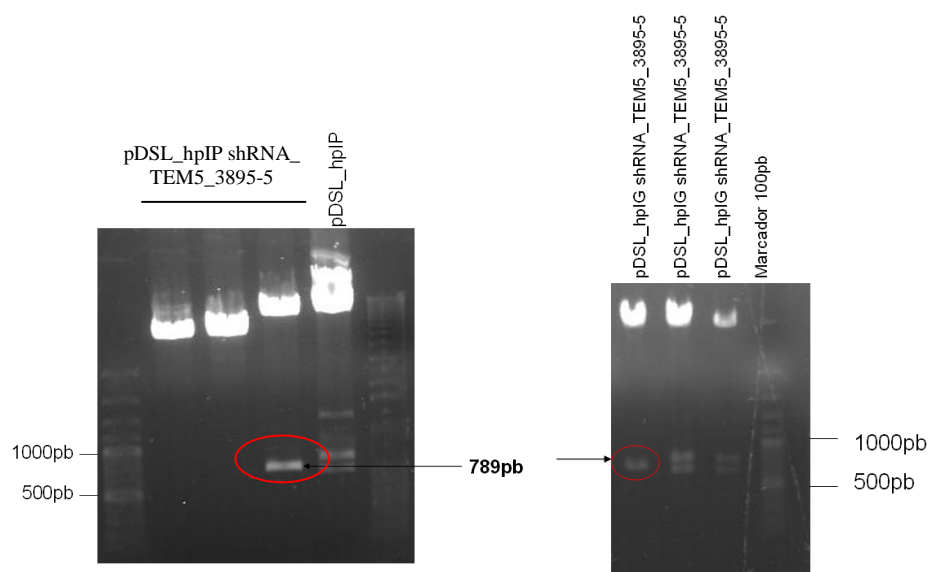


Figura 11. Construcción del pDSL_hpIP_shRNA_TEM5_3895 y del pDSL_hpIG_shRNA_TEM5_3895. Mediante la digestión con la enzima BamHI se comprobó la construcción de un pDSL_hpIP_shRNA_TEM5_3895 y un pDSL_hpIG_shRNA_TEM5_3895 por la liberación de un fragmento de aproximadamente 789pb.

EFEECTO DE LA SOBREEXPRESIÓN DE TEM5/GPR124 EN LA TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES

Por otra parte se investigó los eventos regulados por la sobreexpresión de TEM5 en células HEK293. Para ello transfectamos las dos construcciones del receptor TEM5, una con el epítotope 3XFlag y la otra con dos epítotope 3XFlag y GFP, a concentraciones crecientes (10ng, 50ng, 100ng, 500ng, 1000ng, 1500ng, 2000ng) como se observa en el primer panel de la figura 12.

La repercusión que tuvo esta sobreexpresión es reflejada en la fosforilación incrementada en la cinasa AKT en serina 473 a bajas concentración del receptor TEM5 transfectado como muestra en la figura 12. Sin embargo, no se observó fosforilación de la cinasa ERK, sólo en presencia de 3XFlag-TEM5 a una concentración de 2.0µg. Así mismo, no hay activación de las cinasas GSK3β y S6K por la sobreexpresión de TEM5. Adicionalmente, ambas construcciones de TEM5 tienen un patrón de activación de AKT S473 similar y ninguna de éstas activa las demás cinasas evaluadas.

Las condiciones testigo fueron utilizadas para determinar que el experimento es válido. El CXCR4, un GPCR del cual se conoce su cascada de señalización, fue estimulado con su respectivo ligando, el SDF-1, por 5 min., llevando a la activación de la cinasa Akt determinada por su fosforilación en la serina 473 y fosforilación de la cinasa ERK. Otro control positivo adicional es el suero bovino fetal al 10% para activar vías generales, las cuáles involucran la fosforilación de la cinasa Akt en la S473, ERK, S6K y GSK3β como se muestra en el panel de la derecha de la figura 12. La condición basal indica la actividad de la proteína evaluada sin estímulo y de esta manera se puede evaluar el efecto del receptor TEM5.

Además, contamos con un control negativo interno que es el vector vacío pCEFL, a una concentración de 2.0µg, para indicar que el proceso de la transfección no afecta las vías de señalización a estudiar.

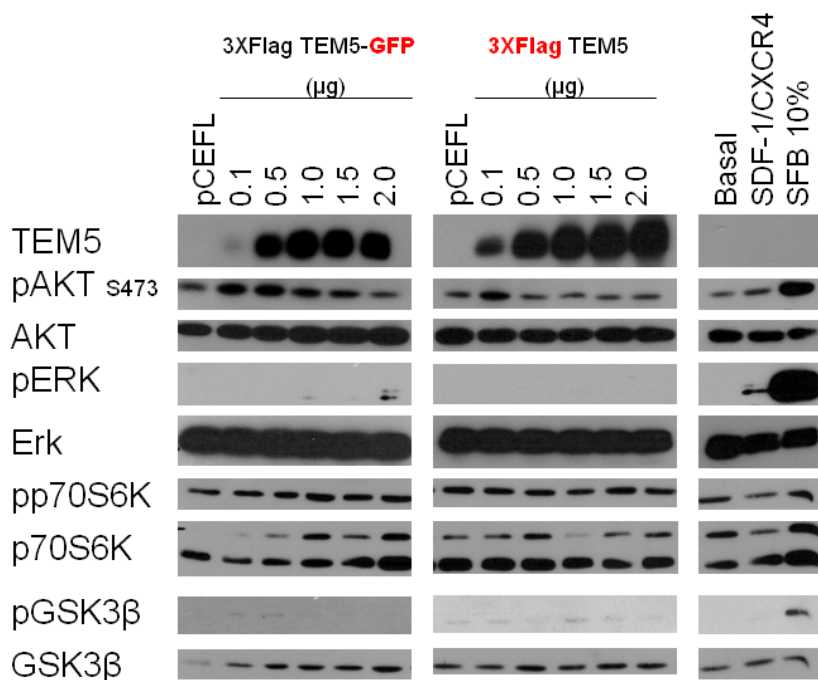


Figura 12. Efecto de la sobreexpresión del receptor TEM5 sobre la fosforilación de la cinasa AKT en serina 473 en células HEK 293. Se observó una fosforilación marcada en la cinasa AKT en serina 473 a partir de concentraciones bajas del receptor transfectado.

**EFFECTO DEL MEDIO CONDICIONADO DE LAS CÉLULAS HT-29
SOBRE TEM5/GPR124 EN LA TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES**

Debido a que el receptor TEM5 se encontró sobreexpresado en las células endoteliales en cáncer colorrectal (HT-29) evaluamos si el medio condicionado obtenido de estas células era capaz de activar a células HEK293 transfectadas con el receptor TEM5, ya que consideramos la posibilidad de que en estos medios condicionados estuviera presente un posible ligando del receptor TEM5.

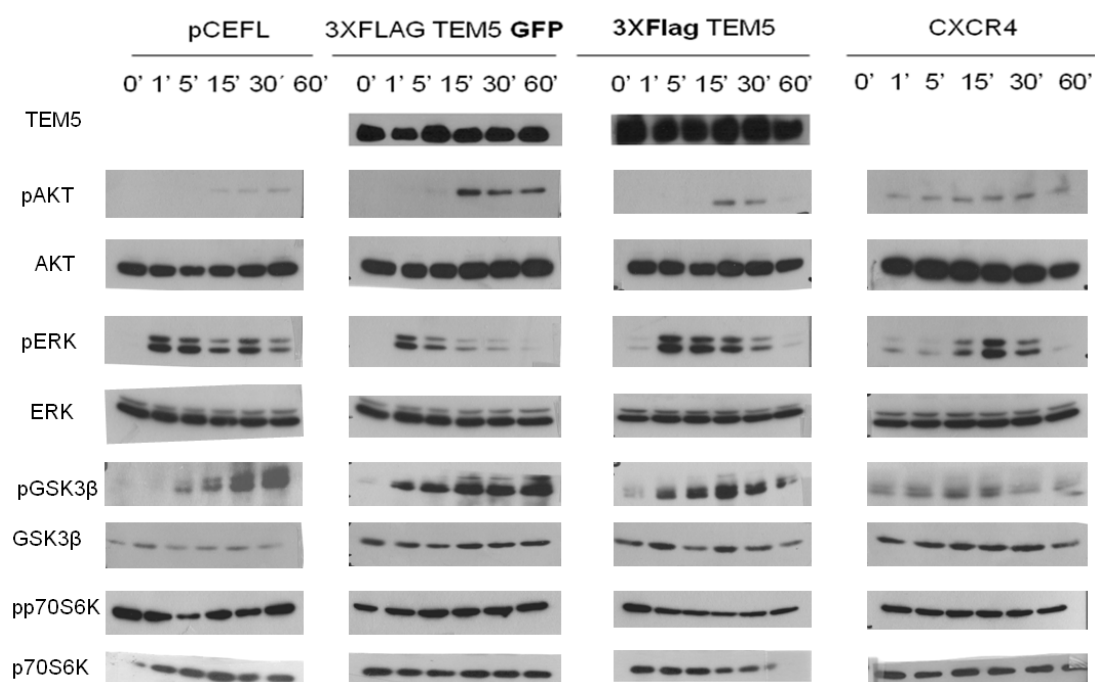


Figura 13. Efecto de medios condicionados de células HT-29 sobre vías de señalización activadas en células HEK293 transfectadas con el receptor TEM5. Se observó claramente la fosforilación de GSK3β a tiempos cortos, así como la atenuación de la fosforilación de la cinasa ERK a tiempos largos en células transfectadas con TEM5.

Los medios condicionados de las células HT-29 promovieron la fosforilación rápida de la cinasa ERK en células HEK 293 control como se muestra en la figura 13. Sin embargo, en los casos en que las células expresaban TEM5 la fosforilación de ERK decayó más rápidamente.

Además, TEM5 aumenta la fosforilación de las cinasas GSK3 β y AKT S473 a tiempos cortos en comparación con la condición control, que las activa a tiempos largos, y produce una significativa caída brusca en la fosforilación de ambas proteínas después de la hora de estimulación, en el caso de la construcción 3XFlag-TEM5, ilustrada en la figura 14. Sin embargo, no hubo modificación de la actividad de la cinasa S6K en ninguna condición, figura 14.

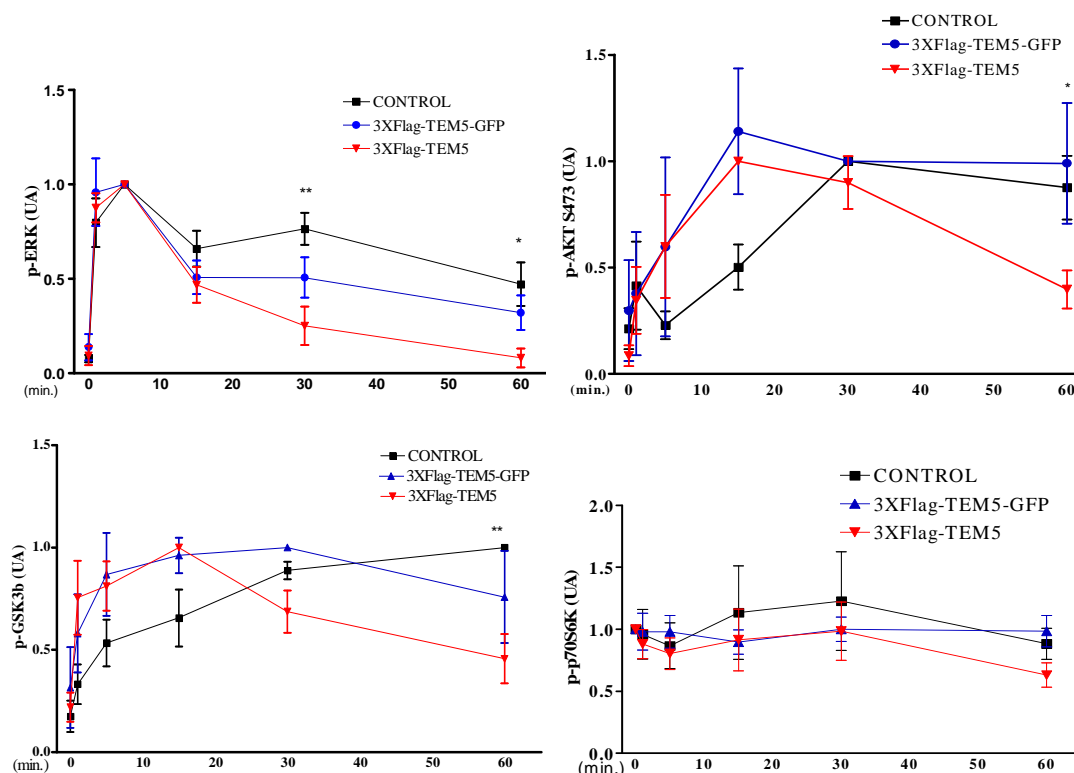


Figura 14. Efecto de medios condicionados de células HT-29 sobre la fosforilación de las cinasas ERK, AKT, GSK3 β y S6K en células HEK 293 que expresan TEM5. Las células HEK 293 fueron transfectadas con 3XFlag-TEM5 y 3XFlag-TEM5-GFP o bien, el plásmido pCEFL como control. Posteriormente, éstas fueron estimuladas 48h postransfección con

medios condicionados de las células HT-29, cultivadas en ausencia de suero durante 24h. El medio condicionado de las células HT-29 promovió la fosforilación duradera de ERK en células control pero no en aquellas que expresaban al receptor TEM5. En cuyo caso, la fosforilación de la cinasa ERK a tiempos de 30 y 60 min. fue menor en comparación con el control que mantuvo elevada la fosforilación de ERK a estos tiempos. Las cinasas GSK3 β y AKT tienden a aumentar la fosforilación a tiempos cortos y hay una caída de la fosforilación de ambas proteínas después de la hora de estimulación. Sin embargo, no hubo modificación de la actividad de la cinasa S6K en ninguna condición. Los resultados representan los valores medios \pm el error estándar de seis experimentos determinados por el análisis de western-blot. Las diferencias fueron significativas de acuerdo a la prueba de Tukey y Bonferroni. *** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$.

EFFECTO DE LOS MEDIOS CONDICIONADOS DE LAS CÉLULAS HT-29 SOBRE LA ACTIVACIÓN DE LA GTPasa Rac EN CÉLULAS TRANSFECTADAS CON EL RECEPTOR TEM5

Datos previos en el laboratorio indicaron que la sobreexpresión de TEM5 lleva a la activación la GTPasa Rac, sugiriendo que TEM5 podría modular la migración celular. Con esa premisa, se evaluó si la activación de Rac es mediada por TEM5 en respuesta al medio condicionado de células HT-29. Aunque los datos obtenidos indicaron una activación de dicha GTPasa en células transfectadas con TEM5 a partir del minuto de estimulación, también se encontró Rac-GTP en la condición control. Tres experimentos independientes mostraron que, la activación de Rac aumentó al minuto 15 en células transfectadas con TEM5 en comparación de la condición control, como se ilustra en la figura 15. El control positivo utilizado fue el factor de crecimiento de hepatocitos.

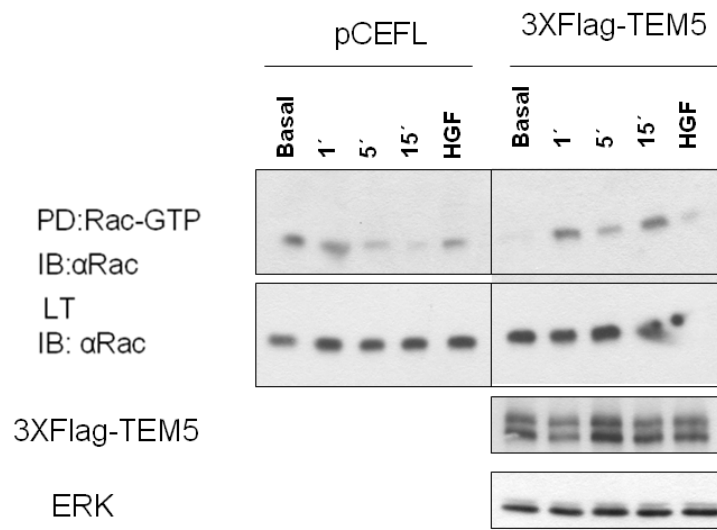


Figura 15. El receptor TEM5, transfectado en células HEK293, activa a la GTPasa Rac en respuesta a la incubación con medios condicionados de células HT-29.

RELOCALIZACIÓN DEL RECEPTOR TEM5 EN RESPUESTA AL MEDIO CONDICIONADO DE LAS CÉLULAS HT-29

El monitoreo de TEM5 fusionado a la proteína verde fluorescente (GFP) nos permitió evaluar los cambios de localización de dicho receptor en células HeLa estimuladas con los sobrenadantes de las células HT-29.

Se empleó una construcción Red-CAAX para marcar la membrana. El motivo Red-Caax sufre una prenilación en la cisteína lo que hace anclarla a la membrana por las enzimas farnesiltransferasa o geranylgeranyltransferasa. Por lo tanto, la construcción Red-Caax delimita la membrana en rojo y podemos monitorizar la localización del receptor TEM5 con la proteína verde fluorescente. La colocalización de estas proteínas da como resultado un color amarillo-anaranjado.

En respuesta al medio condicionado de las células HT-29, el receptor TEM5 se relocalizó hacia las proyecciones celulares como se ilustra en la figura 16. Sin embargo, el receptor TEM5 en condiciones de ayuno no fue capaz de relocalizarse hacia las proyecciones celulares ni los contactos celulares.

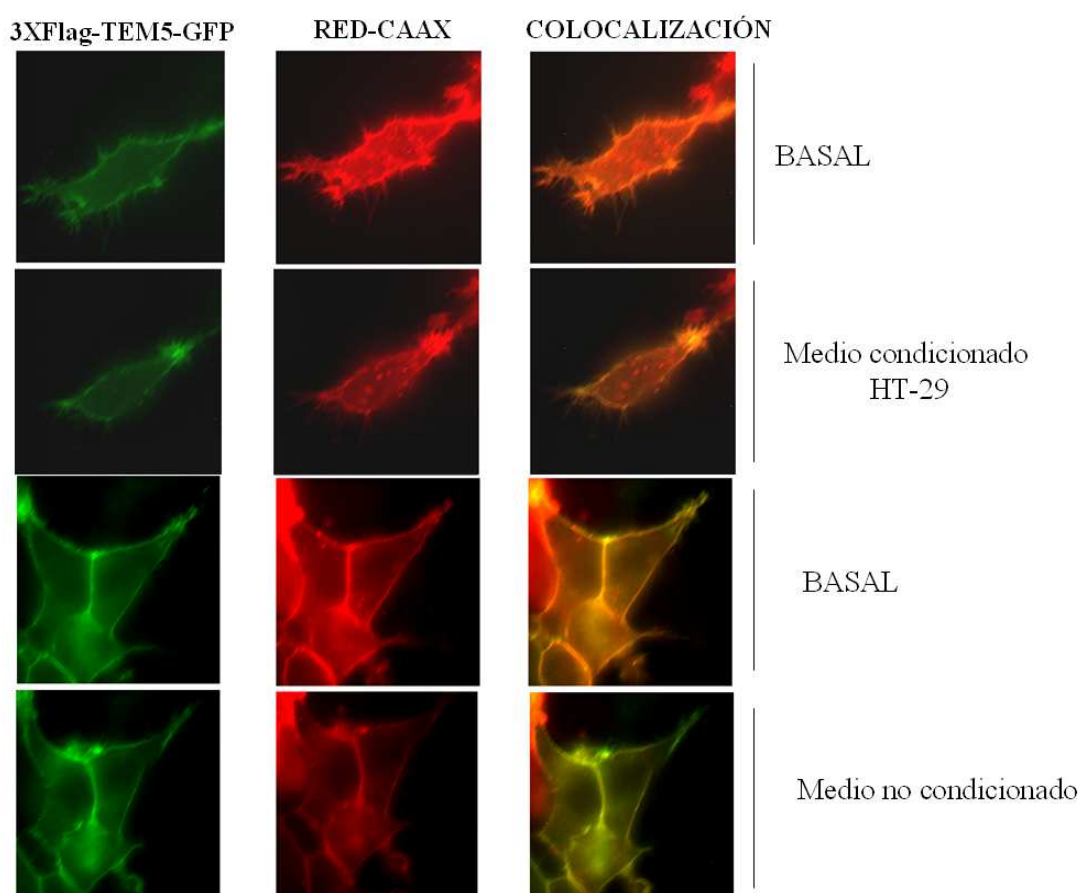


Figura 16. TEM5 se relocaliza en las proyecciones celulares en respuesta a los medios condicionados de las células HT-29. Las células HeLa fueron transfectadas con los plásmidos 3XFlag-TEM5-GFP y Red-CAAX y estimuladas con los sobrenadantes de las células HT-29 durante 4h. En el monitoreo del receptor TEM5 con la proteína verde fluorescente y la membrana marcada con Red-CAAX se pudo observar que dicho receptor se encuentra exclusivamente en la membrana plasmática. Sin embargo, en tres experimentos independientes se observó que TEM5 estimulado con los sobrenadantes HT-29, TEM5 cambia su localización de la periferia en la membrana plasmática hacia el frente de avance de la célula, como se muestra en las fotografías de la segunda fila al minuto 30.

Además, para determinar mejor la localización del receptor en respuesta al medio condicionado de las células HT-29 se monitorizó al receptor TEM5 en células aisladas. Los datos obtenidos confirmaron que el receptor TEM5 se relocaliza en las proyecciones celulares, como se observa en la figura 17. Adicionalmente, hubo colocalización del receptor TEM5 en membrana, marcada en rojo con el motivo Caax, indicando que TEM5 está en el frente de las proyecciones nacientes debido al medio condicionado de las células HT-29, a partir del minuto de estimulación y, que esta observación se mantiene después de las 3 horas de estimulación con el medio condicionado de las células HT-29.

Por otra parte, las células transfectadas con TEM5 cambiaron su morfología para migrar al estimular con dicho medio condicionado en comparación de las células control.

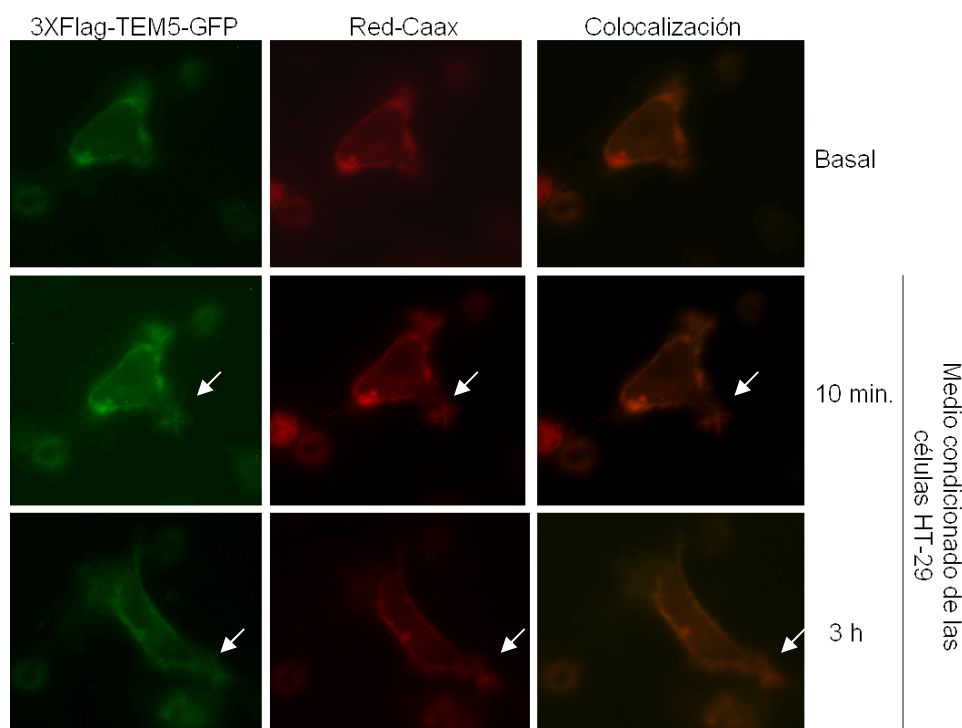
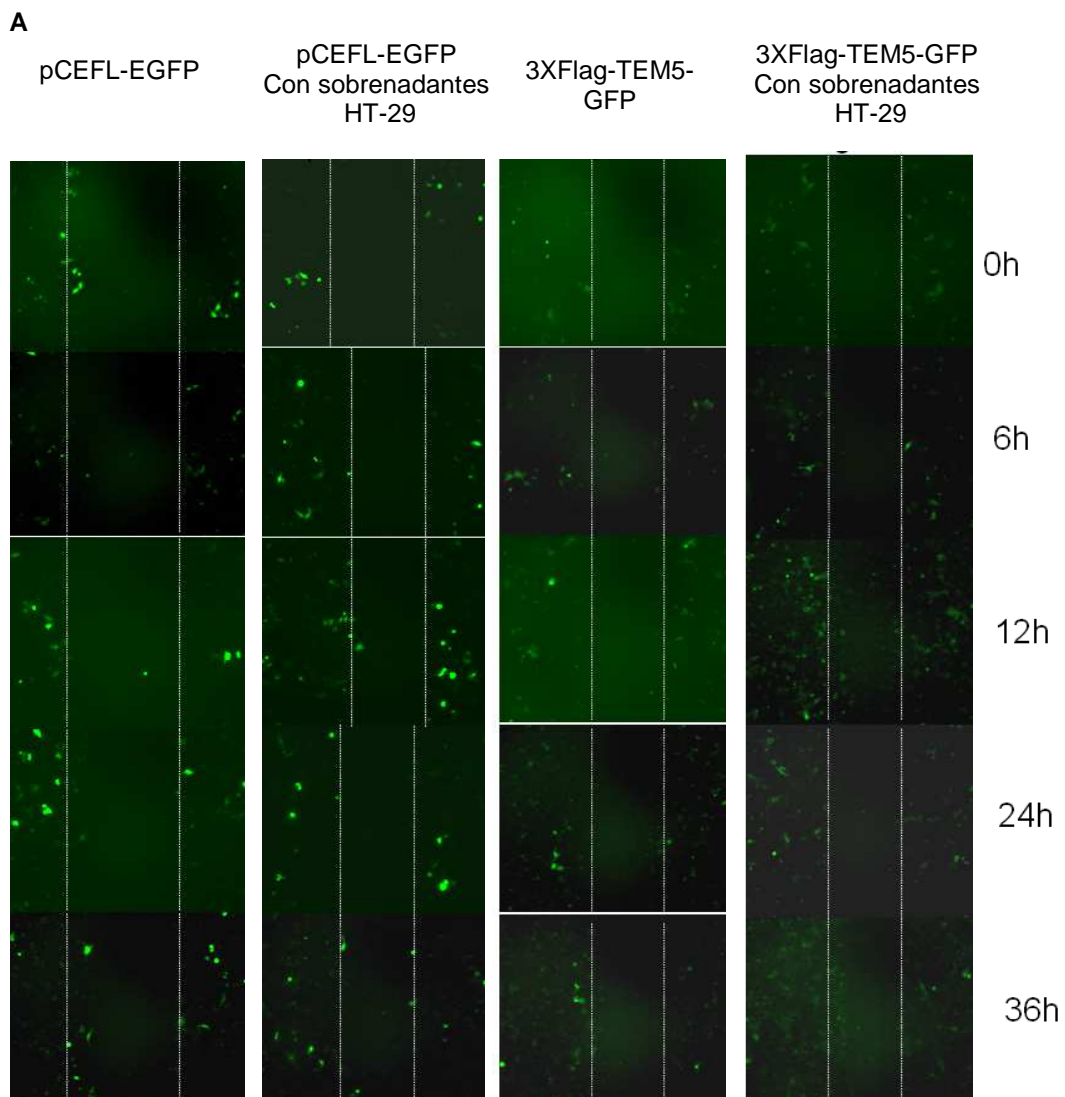


Figura 17. Relocalización del receptor TEM5 en las proyecciones nacientes de la célula en respuesta al medio condicionado de las células HT-29.

EFEECTO DE TEM5 EN LA MIGRACIÓN CELULAR EN RESPUESTA AL MEDIO CONDICIONADO DE LAS CÉLULAS HT-29

Para evaluar la participación de TEM5 en el proceso de migración celular realizamos experimentos de cierre de herida por 36h en células HeLa transfectadas con TEM5 fusionado a la proteína verde fluorescente. Los datos obtenidos sugieren que TEM5 podría estar involucrado en promover la migración celular en respuesta a los sobrenadantes, lo cual resulta evidente a partir de las 12h, figura 18.



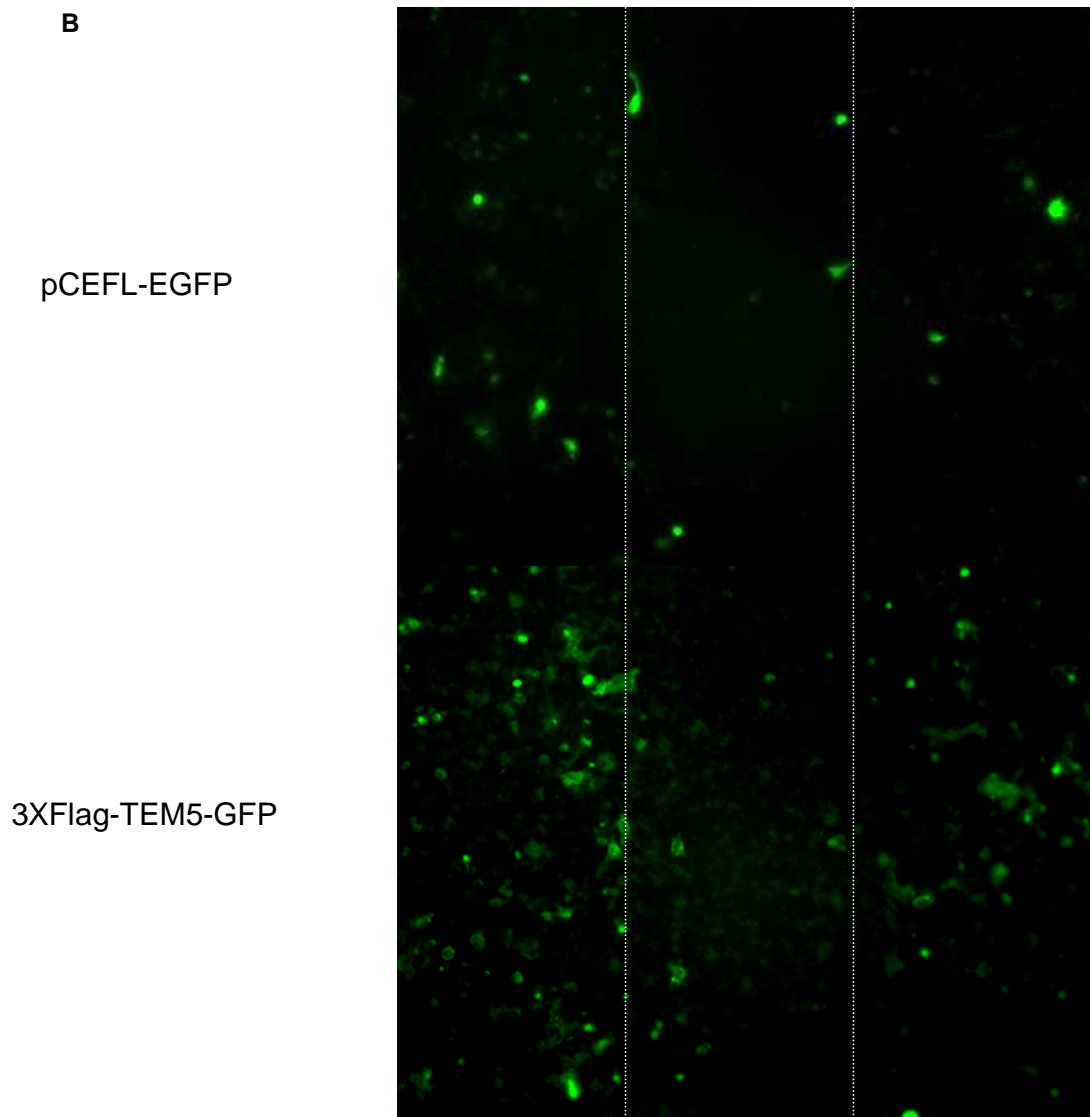


Figura 18. Las células que expresan a TEM5 estimuladas con los medios condicionados de células HT-29 promueven rápidamente la migración celular. (A) Las células HeLa se transfectaron con los plásmidos pCEFL-EGFP como control y 3XFlag-TEM5-GFP. En el experimento de cierre de herida se evaluó la participación del receptor en la migración celular. Datos preliminares sugieren que la presencia de TEM5 podría promover la migración en respuesta a los sobrenadantes HT-29 a partir de las 12h. (B) Ampliación de las fotografías del tiempo 36 horas, donde se estimularon a las células con el medio condicionado de las células HT-29.

EFFECTO DE TEM5 EN LA ANGIOGÉNESIS *IN VITRO*

Los resultados anteriormente descritos, sugieren que el receptor TEM5 desempeña un papel importante como promotor de la motilidad celular. Además, el hecho de que dicho receptor se detectó sobreexpresado en células endoteliales en cáncer colorrectal, sugiere un potencial angiogénicos resultante de las acciones de TEM5, por lo que nos pareció interesante evaluar su participación en la formación de capilares en matrigel.

El fenotipo observado en las células transfectadas con el receptor TEM5 muestra la formación de estructuras extensas tipo filopodios a lo largo y ancho de la célula comparadas con las células control. En estas estructuras formadas se encuentra preferencialmente localizado el receptor TEM5, marcado con la proteína verde fluorescente, figura 19.

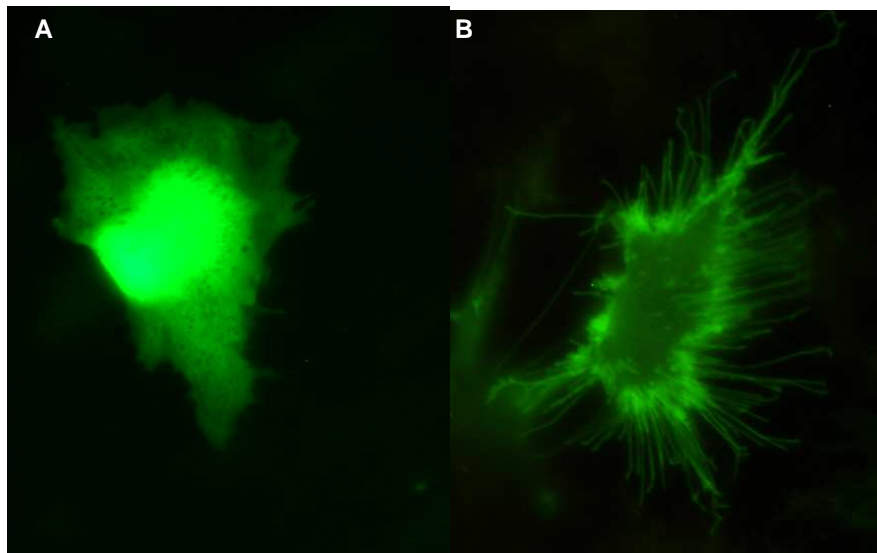


Figura 19. Fenotipo de una célula PAE transfectada con el receptor TEM5 fusionado a la proteína verde fluorescente. (A) La proteína verde fluorescente, transfectada como control muestra una distribución homogénea en la célula endotelial de aorta de porcino (PAE), mientras que la localización del receptor TEM5 se encuentra en el membrana plasmática, de manera particular en las extensiones celulares tipo filopodios (B).

El ensayo de angiogénesis *in vitro* aportó resultados interesantes con respecto a la función celular de TEM5 en células endoteliales.

Las células PAE transfectadas con el receptor TEM5 mostraron mayor formación de cordones (3700 μm) en condiciones basales en comparación con el control (vector vacío, pCEFL-EGFP con 2000 μm) a partir de las 2 horas. No obstante, TEM5 no fue capaz de favorecer la formación de cordones (1900 μm) de las células endoteliales en respuesta al medio condicionado de las células HT-29 en comparación de las células control (2800 μm). Si bien, los medios condicionados de dichas células favorecieron la formación de capilares en la condición control.

Adicionalmente, el factor de crecimiento de endotelio vascular (VEGF; 10ng/ml) se empleó como control positivo para favorecer la formación de redes capilares. Sin embargo, la formación de cordones (2300 μm) en células PAE fue menor en las células estimuladas con VEGF que en aquellas donde se sobreexpresó el receptor TEM5.

Un hallazgo sorprendente fue la disminución de formación de cordones, por TEM5 estimulado, muy por debajo de la condición donde TEM5 fue sobreexpresado en condiciones de ayuno. Estos datos sugieren que TEM5 tiene una función relevante en el proceso de angiogénesis *in vitro* ya que por un lado, su sobreexpresión favoreció la angiogénesis y cuando éste fue estimulado con el medio condicionado de las células HT-29 inhibió esa formación de cordones.

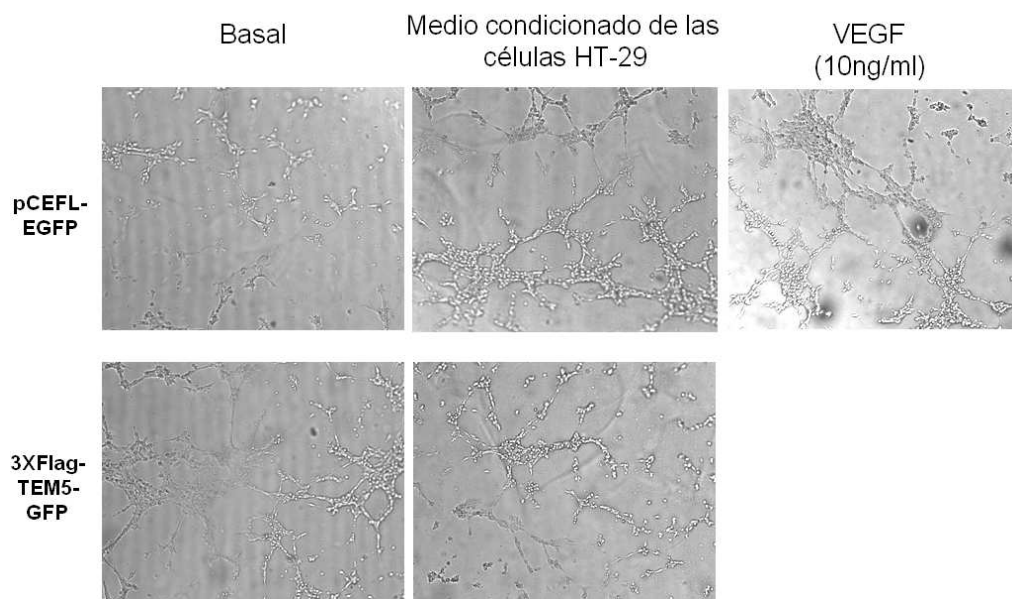


Figura 20. Efecto de TEM5 en la angiogénesis *in vitro*. La sobreexpresión de TEM5 favorece la formación de redes capilares a las dos horas. Sin embargo, su estimulación con los medios condicionados de las células HT-29 atenúa la formación de dichas estructuras. Los medios condicionados activaron vías de señalización que llevaron a la formación de cordones. Así mismo, la estimulación con VEGF fomentó la formación de cordones.

DISCUSIÓN

En este trabajo caracterizamos la transducción de señales de células transfectadas con el receptor TEM5 (conocido como marcador de endotelio tumoral 5) estimuladas con medios condicionados de células de cáncer de colon, línea celular HT-29. Además, investigamos la dinámica celular de este receptor, así como su papel como promotor de la migración celular y de la formación de cordones endoteliales *in vitro*. Por otra parte, considerando los antecedentes que demostraron la sobreexpresión de TEM5 en cáncer de colon, investigamos si el VEGF, uno de los principales factores angiogénicos, promueve su expresión. Por último, generamos herramientas de shRNA que nos permitieron inhibir la expresión de TEM5.

El VEGF está involucrado en la promoción de angiogénesis y de manera principal en la formación de microvasculatura del tumor. Además, el VEGF puede promover la actividad de otros receptores como es el caso de los receptores de glutamato tipo NMDA, los cuales son bien conocidos por sus roles en la sinaptogénesis y plasticidad neuronal, a través de la cinasa Src (6). Sin embargo, el VEGF no alteró la expresión del ARN mensajero de TEM5 en células endoteliales HUVEC ni HMEC.

Un dato sorprendente es que el ARNm de TEM5 se encontró expresado de manera constitutiva en las células HUVEC así como en las HMEC, ya que los antecedentes indicaban que este receptor sólo se sobreexpresaba en condiciones de cáncer. Así pues, la aparente contradicción da lugar a pensar que las células HMEC y HUVEC semejan en cultivo la actividad intrínseca de células endoteliales tumorales, lo cual es consistente con lo ya reportado en células endoteliales tumorales pero no así para las células endoteliales de cordón umbilical humano (10).

Por otro lado, las construcciones de los shRNA de TEM5 fueron probadas en células de mamífero, resultando excelentes shRNAs para disminuir la expresión del receptor TEM5 transfectado. Consideramos que los shRNAs de TEM5 más efectivos fueron shRNA_TEM5_262_2 y shRNA_TEM5_3895_5, ya que mostraron una mejor disminución de la proteína TEM5 en comparación de las otras clonas obtenidas. Estas diferencias del efecto entre las clonas podrían deberse a los efectos específicos de secuencia (particularmente la disponibilidad de la secuencia complementaria en el ARN de TEM5, considerando las posibles estructuras secundarias que ésta adquiera debidas a interacciones intramoleculares).

La fluorescencia de TEM5, fusionado a EGFP, sirvió como parámetro para evidenciar la eficiencia de los shRNAs transfectados, esta técnica fue complementaria a la técnica Western Blot para determinar el efecto de los mismos sobre TEM5. El Western Blot con anticuerpo anti-Flag proporcionó una detección más sensible para la identificación del receptor TEM5 (3XFlag-TEM5-GFP, con tres "banderas" Flag) que el anticuerpo anti-GFP. Como se mencionó anteriormente, la generación de líneas celulares estables con shRNA de TEM5 refiere a tener dicho shRNA en el 100% de la población para posteriores experimentales. Se obtuvo el shRNA_TEM5_3895_5 en ambos vectores (pDSL_hpIP/IG). Las propiedades de estos vectores como ser seleccionados con puromicina y por otro lado, monitorizarlos por mediante la proteína verde fluorescente, ofrecen grandes ventajas en comparación con el vector anterior, pEN_EmirC3. De acuerdo a ambas estrategias experimentales, los shRNAs disminuyeron de forma importante la expresión de TEM5 y serán usados en estudios futuros para caracterizar su efecto sobre la expresión del receptor expresado endógenamente, así como actividades funcionales ligadas a la expresión de éste.

Con respecto al efecto de la sobreexpresión del receptor TEM5 sobre vías de transducción de señal, como la cinasa Akt, se observó un incremento en la fosforilación de la cinasa Akt (serina 473) a concentraciones bajas de transfección del receptor TEM5 (100ng), aunque a concentraciones altas de transfección del receptor provocó una disminución la actividad de la cinasa Akt. Lo anterior sugiere que hay una regulación fina de la activación de dicha cinasa por parte del receptor TEM5.

Las células cancerosas liberan factores pro-angiogénicos como citocinas, el factor de crecimiento de endotelio vascular factor (VEGF) así como el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), el activador de crecimiento de hepatocitos, factor de crecimiento transformante β entre otros que en conjunto tienen un efecto regulador de la actividad de las mismas células tumorales y aquellas de su entorno, controlando procesos celulares como migración, angiogénesis tal es el caso para las células cancerosas del páncreas(30).

El medio condicionado de las células HT-29 utilizado en este trabajo aparentemente cuenta con un contenido rico en factores pro-angiogénicos. En este contexto, dicho medio condicionado usado como estímulo puede activar a diferentes receptores como receptores con actividad intrínseca de cinasas (TRK) y GPCRs. Dado que la activación de diversos receptores en respuesta al medio condicionado de las células HT-29 condujo a una amplia señalización incrementando la actividad de la cinasa ERK.

Una de las vías alteradas en cáncer es la ruta de las cinasas MAP que comprende la activación de Ras-Raf-Mek-ERK 1/2 en respuesta al estímulo extracelular, llevando acabo eventos celulares importantes como proliferación, crecimiento, entre otras (31). Interesantemente, la activación de ERK se afectó por la presencia de TEM5 en células estimuladas con el medio

condicionado, indicando que TEM5 reprime la fosforilación de la cinasa. La expresión de TEM5 interfirió significativamente con la temporalidad en la actividad de cinasa de ERK, particularmente a tiempos de media hora y una hora. Lo que sugiere la intervención de una proteína fosfatasa activada en la cascada de TEM5, que interferiría en el mantenimiento de las cascadas de transducción de señales activadas por otros receptores sensibles a los medios condicionados de las células cancerosas. PTEN, por ejemplo, es una proteína con actividad de fosfatasa que ha demostrado reducir la fosforilación de Akt y ERK 1/2 cuando esta fosfatasa se reconstituye en células cancerosas de próstata, resultando en una disminución de la actividad de las cinasas mencionadas (32). Adicionalmente, la fosfatasa PTEN puede regular la activación de ERK 1/2 a través del acople y desfosforilación del adaptador SHC, reclutado a sitios fosforilados en tirosina de los receptores para factores de crecimiento, interfiriendo de esta forma en la activación de Ras, Raf y por lo tanto, ERK1/2 (33). Aunado a lo anterior, es posible que el receptor TEM5 reclute una fosfatasa serina/treonina que suprima la actividad de ERK ½ inicialmente generada en respuesta al medio condicionado.

En cambio, el receptor TEM5 estimulado con el medio condicionado de las células HT-29 modificó el patrón de activación y desactivación de las cinasas Akt, GSK3β y ERK en comparación con la condición control, pCEFL. Se ha descrito que el complejo 2 de mTOR, el blanco de la rapamicina en los mamíferos (mTORC2), fosforila la serina 473 de la cinasa Akt en diferentes líneas celulares como HEK293T, HeLa, HT-29, entre otras, promoviendo la activación máxima de esta cinasa (34). Así pues, la fosforilación de la cinasa Akt en Ser-473, ocurrida como consecuencia de la sobreexpresión de TEM5, así como en respuesta a medio condicionado HT-29 en células transfectadas con este receptor, sugiere que mTORC2 forma parte de la cascada de señalización de la sobreexpresión de TEM5.

La cinasa Akt controla respuestas biológicas fundamentales tales como el crecimiento, la proliferación y la sobrevivencia celular a través de fosforilar a sus distintos efectores. Ahora bien, la cinasa GSK3 β es un sustrato de Akt, que es inhibida como resultado de tal fosforilación, interfiriendo con su capacidad para promover eventos transcripcionales y su capacidad moduladora del metabolismo celular (35). El anticuerpo anti- GSK3 β detectó la fosforilación de la serina 9, sitio de fosforilación por Akt, cuya fosforilación correlaciona con la activación de Akt a tiempos cortos de estimulación con el medio condicionado de las células HT-29. Esta modulación por TEM5 en respuesta al medio condicionado de células HT-29 propone una regulación de la actividad proliferativa y del crecimiento celular a tiempos cortos. Sin embargo, a tiempos largos se observó una caída de la actividad de las cinasas Akt y GSK3 β , sugiriendo una regulación estricta en la temporalidad de tales señales que pudiera ser necesaria para determinar cuales de los procesos celulares anteriormente mencionados prevalecen una vez que la célula debe integrar múltiples estímulos (como los que vendrían acompañados a la estimulación con medios condicionados de células tumorales).

La cinasa S6K, sustrato del complejo sensible a rapamicina en mamíferos (mTORC1), está involucrada en la transcripción de genes, biosíntesis y crecimiento celular. Es común que cascadas de señalización que llevan a la activación de Akt conduzcan como consecuencia a la activación del complejo mTORC1 y la fosforilación de sus sustratos, tales como la cinasa S6K y el represor traduccional 4EBP. Sin embargo, en nuestros experimentos no se observó que la cinasa S6K fuera activada en respuesta al medio condicionado de las células HT-29 ni tampoco en aquellas células transfectadas con el receptor TEM5.

La migración celular contribuye al desarrollo de procesos patológicos como el cáncer. En este contexto, las GTPasas de la familia de Rho participan de manera primordial regulando el movimiento celular. La GTPasa Rac en particular, que de acuerdo a los modelos establecidos se localiza al frente de la célula en movimiento, promueve la formación de lamelipodios al favorecer la reorganización del citoesqueleto de actina. El receptor TEM5 promueve la activación de la GTPasa Rac y la migración celular. La dinámica misma de este receptor es consistente con un papel regulador de la morfología celular. Por una parte, el receptor TEM5 se localiza hacia las proyecciones de células estimuladas con medio condicionado de células HT-29. Esta relocalización de TEM5 abre camino para que la célula se desplace y forme estructuras tipo lamelipodios y filopodios, indicando una participación de la GTPasa Rac y Cdc42 respectivamente. Y, de manera espectacular, las células que expresan a TEM5 adquieren morfologías en las que destaca la existencia de múltiples proyecciones celulares, que podrían resultar de la capacidad de este receptor para promover la actividad de GTPasas de la familia de Rho a través de la activación de GEFs, cuya identidad y regulación queda como una posibilidad interesante de estudios futuros. La detección de la GTPasa Rac en su forma activa, unida a GTP, aumentó en respuesta al medio condicionado de células HT-29 en los tiempos 1', 5' y 15' así mismo ocurrió cuando se sobreexpresó al receptor TEM5. Aunque tendió a aumentar la activación de Rac a los 15 min. en presencia del receptor TEM5 en comparación con la condición testigo, no descartamos la posibilidad de que haya un efecto mayor en la GTPasa Cdc42, ya que las estructuras celulares que resultaron de la sobreexpresión de TEM5 son características de las que se observan en células transfectadas con variantes constitutivamente activas de Cdc42, sugiriendo, en este caso, la activación vía TEM5, de un GEF específico para Cdc42 en respuesta al medio condicionado.

De acuerdo a resultados preliminares de experimentos de migración celular (determinados por la técnica de cierre de herida), las células transfectadas con el receptor TEM5 avanzaron más hacia el frente de la herida en comparación con las células control en respuesta al medio condicionado de células cancerosas. Sin embargo, en condiciones control en que no se agregaron medios condicionados de células cancerosas, las células transfectadas con TEM5 mostraron una capacidad migratoria menor. Estos datos parecían contradictorios y pueden ser interpretados mediante un modelo en el cual TEM5 ejerce un efecto dual pudiendo detener la migración basal pero exacerbándola en respuesta a factores presentes en el sobrenadante de células cancerosas.

Con relación a la angiogénesis *in vitro* en células endoteliales de aorta de porcino (PAE), fue notorio que la sobreexpresión de TEM5 promovió la formación de cordones de estas células endoteliales a partir de las 2 horas. Sin embargo, en un comportamiento dual al observado en el experimento de migración celular, las células endoteliales transfectadas con el receptor TEM5 no fueron capaces de formar cordones a las 2 horas después del estímulo con el medio condicionado de las células HT-29, si no hasta las 3.5h cuando se empezó a notar un efecto ligero en la formación de cordones. Este efecto funcional también correlaciona con los datos de transducción de señales de medios condicionados de células tumorales en el modelo de células transfectadas con el receptor TEM5. En tal situación, como se mencionó previamente, la expresión de TEM5 atenuó la actividad de ERK, cinasa relacionada al crecimiento y proliferación celular. Además, datos previos en el laboratorio mostraron una activación de Rac dosis-dependiente de TEM5.

Aunque el medio condicionado favoreció la formación de cordones en la condición control en comparación con las células control en condiciones de ayuno no logró superar la formación de cordones debida a la sobreexpresión

del receptor TEM5. Adicionalmente, el VEGF, utilizado como control positivo, favoreció la formación de cordones a las 3 horas pero fueron menos cordones formados en comparación con la condición donde se sobreexpresó a TEM5.

En conjunto, nuestros resultados permitieron caracterizar las consecuencias funcionales que resultan de la expresión del marcador de endotelio tumoral 5 y su respuesta a la presencia de medios condicionados de células cancerosas. Así pues, los datos sugieren que TEM5 tiene un papel importante tanto en el proceso de angiogénesis como en migración celular y que además modula la actividad de las cinasas ERK, Akt y GSK3 β en respuesta al medio condicionado de células HT-29. Estas posibilidades se ilustran en el modelo presentado en la figura 21, en el que proponemos un esquema donde se ilustran las vías de señalización del receptor TEM5 y su capacidad para regular las acciones de otros receptores.

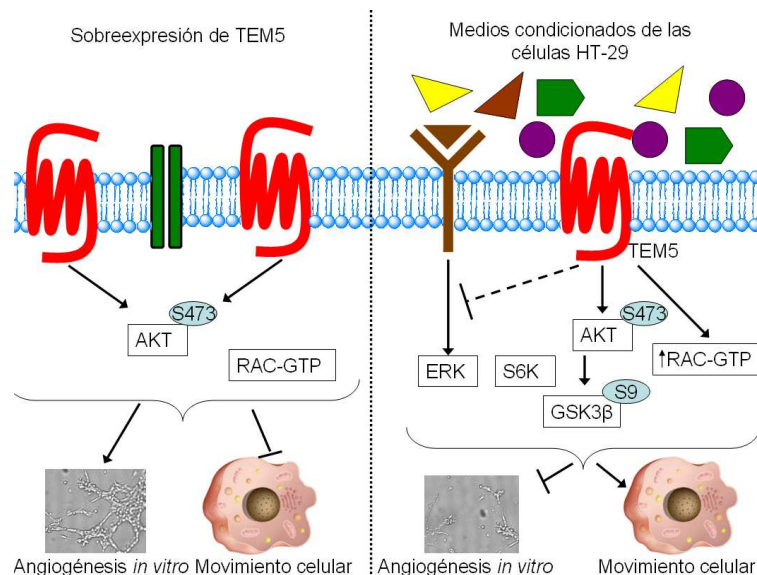


Figura 21. Modelo propuesto de la señalización de TEM5 debida a su sobreexpresión y como respuesta al medio condicionado de las células de cáncer de colon. Además, se ilustra el papel regulador que TEM5 tiene al interferir en la señalización de otros receptores que normalmente conduce a una activación crónica de la cascada de la cinasa regulada por mitógenos extracelulares (ERK).

CONCLUSIONES

1. El ARNm de TEM5 se encontró constitutivamente expresado en células endoteliales de cordón umbilical (HUVEC) y en células endoteliales de microvasculatura humana (HMEC). No obstante, en estas células el factor de crecimiento de endotelio vascular (VEGF) no afectó la expresión de TEM5 a nivel de ARNm.
2. Se obtuvieron las construcciones de dos shRNAs dirigidas contra el receptor TEM5, pEN_EmirC3_shRNA_TEM5_262 y pEN_EmirC3_shRNA_TEM5_3895, las cuales disminuyeron la expresión de proteína de TEM5 en células HEK 293T. Adicionalmente, se obtuvo el shRNA_TEM5_3895 en los vectores pDSL_hpIP/IG para generar líneas celulares estables seleccionadas con puomicina o visualizadas con la proteína verde fluorescente respectivamente.
3. La sobreexpresión del receptor de TEM5 llevó a la activación de la cinasa Akt en la serina 473 y no así para las cinasas ERK, GSK3 β ni S6K.
4. El medio condicionado de las células HT-29 promovió la activación sostenida de las cinasas ERK, GSK3 β o S6K. En tales condiciones, la expresión del receptor TEM5 atenuó significativamente la fosforilación de la cinasa ERK a tiempos largos. Por otra parte, la expresión de TEM5 promovió una mejor respuesta a los medios condicionados de células cancerosas conduciendo a una activación más efectiva de la cinasa Akt (determinada por la fosforilación de ésta en la Ser-473), así como la fosforilación de la cinasa GSK3 β en la Ser9. Esto ocurrió de manera rápida y transitoria. No obstante, la actividad de la cinasa S6K no se observó afectada.

5. A tiempos cortos, los medios condicionados de células HT-29 favorecieron la activación de la GTPasa Rac en células transfectadas con TEM5.
6. El receptor TEM5 se localizó exclusivamente en la membrana plasmática y se movilizó hacia proyecciones celulares en respuesta al medio condicionado de células HT-29.
7. El receptor TEM5 promovió la migración celular en respuesta al medio condicionado de las células HT-29.
8. La expresión de TEM5 favoreció la formación de lamelipodios-filopodios, sugiriendo la capacidad de este receptor para promover la activación de GEFs específicos para las GTPasas Rac y Cdc42.
9. El receptor TEM5 promovió la formación rápida de cordones en células endoteliales y ejerció un control negativo en la respuesta que dichas células tuvieron a los medios condicionados de células cancerosas HT-29.
10. Las células transfectadas con TEM5 mostraron efectos que las diferenciaron de aquellas en las que este receptor no fue expresado. Particularmente, en los casos en que las células fueron estimuladas con medios condicionados de las células cancerosas HT-29. Estos datos abren la posibilidad de que en los medios condicionados de células tumorales esté presente un posible ligando del receptor huérfano TEM5.

PERSPECTIVAS

1. La construcción de un receptor quimérico de TEM5, donde se cambie su porción n-terminal por una secuencia de activación por ligando conocido de un GPCR, entre otras regiones. Con la finalidad de caracterizar su señalización mediante el uso de un ligando conocido.
2. Identificar posibles interacciones de TEM5 con otras proteínas, cuya identidad pudiera sugerir la existencia de mecanismos de transducción de señales particulares a este receptor.
3. Elucidar la participación de la GTPasa Cdc42 en la señalización de TEM5 y los mecanismos que llevarían a la activación de esta GTPasa.
4. Caracterizar la posible interacción de TEM5 con RhoGEFs que contienen dominios PDZ, particularmente el GEF P-Rex1 y GEFs para Cdc42.
5. Estudiar las propiedades angiogénicas, efectos celulares y capacidad de transducción de señales de TEM5 expresado endógenamente. Emplear para ello un shRNA contra TEM5.
6. Monitorizar el receptor TEM5 fusionado a la proteína verde fluorescente en angiogénesis *in vitro* así como en migración celular.

7. Caracterizar la participación de TEM5 en eventos de angiogénesis tumoral en modelos *in vivo* así también migración.
8. Identificar el ligando del receptor TEM5 y evaluar su importancia funcional.

REFERENCIAS

1. Dachs, G. U., and Stratford, I. J. (1996) *Br J Cancer Suppl* **27**, S126-132
2. Hamalukic, M., Huelsenbeck, J., Schad, A., Wirtz, S., Kaina, B., and Fritz, G. *PLoS One* **6**(10), e26413
3. Sumpio, B. E., Riley, J. T., and Dardik, A. (2002) *Int J Biochem Cell Biol* **34**(12), 1508-1512
4. Gobeil, F., Fortier, A., Zhu, T., Bossolasco, M., Leduc, M., Grandbois, M., Heveker, N., Bkaily, G., Chemtob, S., and Barbaz, D. (2006) *Can J Physiol Pharmacol* **84**(3-4), 287-297
5. LaMontagne, K., Littlewood-Evans, A., Schnell, C., O'Reilly, T., Wyder, L., Sanchez, T., Probst, B., Butler, J., Wood, A., Liau, G., Billy, E., Theuer, A., Hla, T., and Wood, J. (2006) *Cancer Res* **66**(1), 221-231
6. Meissirel, C., Ruiz de Almodovar, C., Knevels, E., Coulon, C., Chounlamountri, N., Segura, I., de Rossi, P., Vinckier, S., Anthonis, K., Deleglise, B., de Mol, M., Ali, C., Dassonville, K., Loyens, E., Honnorat, J., Michotte, Y., Rogemond, V., Smolders, I., Voets, T., Vivien, D., Vanden Berghe, P., Van den Bosch, L., Robberecht, W., Chedotal, A., Oliviero, S., Dewerchin, M., Schmucker, D., Thomasset, N., Salin, P., and Carmeliet, P. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**(33), 13782-13787
7. Bagnasco, L., Piras, D., Parodi, S., Bauer, I., Zoppoli, G., Patrone, F., and Ballestrero, A. *Curr Cancer Drug Targets* **12**(4), 303-315
8. Morabito, A., Piccirillo, M. C., Costanzo, R., Sandomenico, C., Carillio, G., Daniele, G., Giordano, P., Bryce, J., Carotenuto, P., La Rocca, A., Di Maio, M., Normanno, N., Rocco, G., and Perrone, F. *Drugs Today (Barc)* **46**(9), 683-698
9. Hurwitz, H., Fehrenbacher, L., Novotny, W., Cartwright, T., Hainsworth, J., Heim, W., Berlin, J., Baron, A., Griffing, S., Holmgren, E., Ferrara, N., Fyfe, G., Rogers, B., Ross, R., and Kabbinavar, F. (2004) *N Engl J Med* **350**(23), 2335-2342
10. Carson-Walter, E. B., Watkins, D. N., Nanda, A., Vogelstein, B., Kinzler, K. W., and St Croix, B. (2001) *Cancer Res* **61**(18), 6649-6655
11. Rettig, W. J., Garin-Chesa, P., Healey, J. H., Su, S. L., Jaffe, E. A., and Old, L. J. (1992) *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**(22), 10832-10836
12. Huang, H. P., Hong, C. L., Kao, C. Y., Lin, S. W., Lin, S. R., Wu, H. L., Shi, G. Y., You, L. R., Wu, C. L., and Yu, I. S. *Gene Expr Patterns* **11**(5-6), 316-326
13. Tomkowicz, B., Rybinski, K., Sebeck, D., Sass, P., Nicolaidis, N. C., Grasso, L., and Zhou, Y. *Cancer Biol Ther* **9**(11), 908-915
14. Nanda, A., Buckhaults, P., Seaman, S., Agrawal, N., Boutin, P., Shankara, S., Nacht, M., Teicher, B., Stampfl, J., Singh, S., Vogelstein, B., Kinzler, K. W., and St Croix, B. (2004) *Cancer Res* **64**(23), 8507-8511
15. Halder, C., Ossendorf, C., Maran, A., Yaszemski, M., Bolander, M. E., Fuchs, B., and Sarkar, G. (2009) *Anticancer Res* **29**(11), 4317-4322

16. Dickeson, S. K., and Santoro, S. A. (1998) *Cell Mol Life Sci* **54**(6), 556-566
17. Van der Vieren, M., Crowe, D. T., Hoekstra, D., Vazeux, R., Hoffman, P. A., Grayson, M. H., Bochner, B. S., Gallatin, W. M., and Staunton, D. E. (1999) *J Immunol* **163**(4), 1984-1990
18. Cullen, M., Elzarrad, M. K., Seaman, S., Zudaire, E., Stevens, J., Yang, M. Y., Li, X., Chaudhary, A., Xu, L., Hilton, M. B., Logsdon, D., Hsiao, E., Stein, E. V., Cuttitta, F., Haines, D. C., Nagashima, K., Tessarollo, L., and St Croix, B. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**(14), 5759-5764
19. Dejana, E., and Nyqvist, D. *Sci Transl Med* **2**(58), 58ps53
20. Vallon, M., Rohde, F., Janssen, K. P., and Essler, M. *Exp Cell Res* **316**(3), 412-421
21. Sun, X., Cheng, G., Hao, M., Zheng, J., Zhou, X., Zhang, J., Taichman, R. S., Pienta, K. J., and Wang, J. *Cancer Metastasis Rev* **29**(4), 709-722
22. Carretero-Ortega, J., Walsh, C. T., Hernandez-Garcia, R., Reyes-Cruz, G., Brown, J. H., and Vazquez-Prado, J. *Mol Pharmacol* **77**(3), 435-442
23. Ledezma-Sanchez, B. A., Garcia-Regalado, A., Guzman-Hernandez, M. L., and Vazquez-Prado, J. *Biochem Biophys Res Commun* **391**(4), 1647-1652
24. Nobes, C. D., and Hall, A. (1995) *Cell* **81**(1), 53-62
25. Castillo-Lluva, S., Tan, C. T., Daugaard, M., Sorensen, P. H., and Malliri, A. *Oncogene*
26. Sandra, S. B. (2005), Centro de Investigación Y Estudios Avanzados del I.P.N., Ciudad de México, México
27. Hernandez-Negrete, I., Carretero-Ortega, J., Rosenfeldt, H., Hernandez-Garcia, R., Calderon-Salinas, J. V., Reyes-Cruz, G., Gutkind, J. S., and Vazquez-Prado, J. (2007) *J Biol Chem* **282**(32), 23708-23715
28. Yamamoto, Y., Irie, K., Asada, M., Mino, A., Mandai, K., and Takai, Y. (2004) *Oncogene* **23**(22), 3889-3897
29. Kim, E. K., Yun, S. J., Ha, J. M., Kim, Y. W., Jin, I. H., Yun, J., Shin, H. K., Song, S. H., Kim, J. H., Lee, J. S., Kim, C. D., and Bae, S. S. *Oncogene* **30**(26), 2954-2963
30. Kitamoto, S., Yokoyama, S., Higashi, M., Yamada, N., Takao, S., and Yonezawa, S. *Oncogene*
31. Santarpia, L., Lippman, S. M., and El-Naggar, A. K. *Expert Opin Ther Targets* **16**(1), 103-119
32. Chetram, M. A., Odero-Marah, V., and Hinton, C. V. *Mol Cancer Res* **9**(1), 90-102
33. Thomas, S. L., Alam, R., Lemke, N., Schultz, L. R., Gutierrez, J. A., and Rempel, S. A. *Neuro Oncol* **12**(9), 941-955
34. Sarbassov, D. D., Guertin, D. A., Ali, S. M., and Sabatini, D. M. (2005) *Science* **307**(5712), 1098-1101
35. Forde, J. E., and Dale, T. C. (2007) *Cell Mol Life Sci* **64**(15), 1930-1944