

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS
DEL INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL**

UNIDAD ZACATENCO
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA

**“Acción cooperativa de Gas1 (*Growth arrest specific1*)
y PTEN sobre la viabilidad celular”**

Tesis que presenta:

Q.F.B. Laura Sánchez Hernández.

Para obtener el Grado de:

Maestra en Ciencias

En la especialidad de

Farmacología

Director de Tesis:

Dr. José Segovia Vila.

México, Distrito Federal

Enero, 2012

Con amor y agradecimiento dedico este trabajo a mi querida familia, a todos y cada uno de ellos. Mamá, Papá, mi amado Homero, mis hermosos hijos Laurita y Alancito y a mis hermanitos Chente y Lalito.

Pero sobre todo a Dios que nunca me ha dejado de su mano, aún cuando le doy mucha lata, siempre me ayuda a salir adelante.

¡Todo mi amor para ustedes!

AGRADECIMIENTOS

Gracias Dios por esta etapa de mi vida.

Me gustaría expresar mi humilde agradecimiento a todas las personas que han estado conmigo a lo largo de este trayecto, principalmente a mi familia por el apoyo brindado y por su inmenso amor.

A mi Homerito que siempre estuvo a mi lado, gracias por escucharme, por cuidarme, por animarme, por todo, tu has sido mi mas grande apoyo, sin ti esto no hubiera pasado, las palabras no expresan lo profundamente agradecia que estoy contigo, gracias Amor.

A mis amigos que siempre me ayudaron, gracias por su amistad, enseñanzas, Cris, Nidis, Paulis, Adriana, Toño, Gil, Natan, Rubén.

Al Dr. José Segovia quien me dio esta gran oportunidad de trabajar en su laboratorio y aprender nuevas cosas, estoy profundamente agradecida por ello. Cada día que pase en este laboratorio fue un sueño hecho realidad para mí, ha sido la experiencia más maravillosa de mi vida académica.

Al Dr. Ranier y al Dr. Terrón por sus valiosos comentarios y correcciones que me permitieron enriquecer mi trabajo y ampliar mi visión. Gracias por sus enseñanzas.

Agradezco también al apoyo económico que me otorgo el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología a través de la beca de apoyo a estudios de posgrado.

Gracias a todos.

Laura

ÍNDICE

Lista de abreviaturas	06
Resumen	07
Abstrac	08
Introducción	
El ciclo celular	09
El cáncer	11
Gas1 (Growth Arrest Specific 1)	14
Estructura de Gas1	15
Gas1 y la vía de señalización inducida por GDNF	19
La función de Gas1 con la vía de señalización inducida por da por Shh	20
El efecto de la sobre-expresión de <i>gas1</i>	21
PI3K, PTEN y AKT	22
Justificación	25
Hipótesis	25
Objetivo general	25
Objetivos específicos	25
Métodos	
Cultivo de la línea celular SH-SY5Y	27
Transfección	27
Sobre-expresión de <i>gas1</i>	28
Silenciamiento de <i>pten</i>	30
Sobre-expresión de <i>gas1</i> y silenciamiento de <i>pten</i>	30
RT-PCTR	30
Western blot	31
Viabilidad celular	32
Resultados	
Caracterización de células SH-SY5Y en condiciones basales	34
Sobre-expresión de <i>gas1</i>	37
Knockdwon de <i>pten</i> con siRNA PTEN	37

Sobre-expresión de <i>gas1</i> y silenciamiento de <i>pten</i>	38
Efecto de Gas1 en presencia de PTEN sobre la Viabilidad celular	39
Efecto de Gas1 en ausencia de PTEN, sobre la viabilidad celular	40
Discusión	43
Conclusión	45
Referencias	46

LISTA DE ABREVIATURAS

AKT: Proteína de cinasa de serinas y treoninas involucrada en proceso de supervivencia, diferenciación y proliferación.

gas1: Gen de arresto específico de crecimiento, que corresponde a sus siglas en inglés de Growth arrest specific 1. Escrito en letra minúscula cursiva, se refiere al gen.

Gas1: Proteína de arresto específico de crecimiento, que corresponde a sus siglas en inglés de Growth arrest specific 1. Escrito con la primera letra en mayúscula sin cursiva, se refiere a la proteína.

GDNF: Factor neurotrófico derivado de células gliales.

GFLs: Ligandos de la familia de GDNF.

GFR's: Receptores para los ligandos de la familia de GDNF.

GPI: Glicosil fosfatidil inositol.

PIP2: Fosfatidilinositol 3,4-bisfosfato.

PIP3: Fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato.

pten: Gen del Homólogo de fosfatasa y tensina deletada en el cromosoma 10. Escrito en letra minúscula cursiva, se refiere al gen.

PTEN: Proteína de Homóloga de fosfatasa y tensina deletada en el cromosoma 10. Escrito todo con mayúsculas, se refiere a la proteína.

RET: Receptor de tirosina cinasa RET

Shh: Proteína de Sonic hedgehog

siRNA: De las siglas en inglés "Small interfering RNA", que significan pequeño RNA de interferencia.

Knock-down: Se refiere a la reducción de la expresión de un gen mediante el bloqueo de la transcripción.

Knock-out: Se refiere a la eliminación total de un gen específico.

Cdk: Proteína de cinasa dependiente de ciclina.

RESUMEN

Gas1 (Growth Arrest Specific1) promueve arresto del ciclo celular y apoptosis mediante la disminución en la auto-fosforilación de la tirosina 1062 de RET (receptor de tirosina cinasa), lo que no permite que PI3K genere el segundo mensajero PIP3 que es necesario para la activación y función de AKT. La cual es una cinasa que esta involucrada en procesos de supervivencia, proliferación y diferenciación, pero que en enfermedades como el cáncer se encuentra altamente activa. Por otro lado se encuentra PTEN, que es una fosfatasa para lípidos que antagoniza la función de PI3K, regulando a la baja la presencia de PIP3, por lo cual, tanto Gas1 como PTEN intervienen río arriba y río abajo respectivamente sobre la misma cascada de señalización para reducir la activación de AKT, con lo que disminuye la viabilidad celular. Sin embargo esto no ha sido demostrado funcionalmente. Por lo que el objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto funcional de Gas1 en presencia de PTEN, así como en ausencia de PTEN sobre la viabilidad celular. Para ello nosotros usamos células SH-SY5Y (neuroblastoma humano) que expresan un *pten* endógeno y no expresan a *gas1* en condiciones de proliferación. Para evaluar esto se sobre-expreso a *gas1* mediante el uso de un vector plasmídico y se redujo la expresión de *pten* mediante el uso de un siRNA. Fue posible observar que Gas1 ocasionó la reducción de la viabilidad celular en comparación con los grupos controles. Nosotros observamos que cuando Gas1 actúa en ausencia de PTEN, el efecto es menor comparado con las células que cuentan con Gas1 y PTEN funcional, esto porque la ausencia de PTEN incrementa notablemente la viabilidad celular y la función de Gas1 se ve reducida en ausencia de PTEN. De acuerdo a los resultados obtenidos en este estudio concluimos que existe una cooperación entre Gas1 y PTEN para disminuir la viabilidad celular en las células SH-SY5Y. Esto permitirá el desarrollo de nuevas estrategias en terapia génica para el tratamiento de enfermedades como el cáncer.

ABSTRACT

Gas1 (Growth Arrest Specific1) promotes cell cycle arrest and apoptosis by reducing the auto-phosphorylation of RET in tyrosine 1062 (receptor tyrosine kinase), which does not allow PI3K generate the second messenger PIP3 which is necessary for the activation and function of AKT. A kinase involved in processes of survival, proliferation, differentiation, and highly active in diseases such as cancer. On the other hand PTEN, a lipid phosphatase that antagonize PI3K, thereby decreasing the presence of PIP3, so both Gas1 and PTEN are involved upstream and downstream, in the same signaling cascade respectively, and regulating AKT, thus decreasing cell viability. However, this has not been demonstrated functionally. Thus the aim of this study was to evaluate the functional effect of Gas1 both in the presence of PTEN, and in its absence of PTEN on cell viability. For this we used SH-SY5Y cells (human neuroblastoma) that expressed functional PTEN endogenous and do not expressed Gas1 in condition proliferation. To assess this, we over-expressed Gas1 by using a plasmid vector and reduced PTEN expression using a siRNA. It was possible to observe that Gas1 expression resulted in the reduction of cellular viability compared whit control groups. We also observed that when Gas1 acts in the absence of PTEN, the effect is minor compared whit cells in which has Gas1 and PTEN are functional, thus the absence PTEN significantly increases cell viability and function of Gas1 is reduced in the absence of PTEN. According to the results obtained in this study we conclude that there is cooperation between Gas1 and PTEN to decrease cell viability in SH-SY5Y cells. This will allow the development of new strategies in gene therapy for the treatment of diseases such as cancer.

INTRODUCCIÓN

El ciclo celular

El ciclo celular es un conjunto ordenado de eventos que conducen al crecimiento de la célula. La división de la célula en dos células hijas es un proceso ordenado que requiere de las etapas G_1 , S, G_2 y M. A las células que se encuentran dentro del ciclo celular se les denominan “proliferantes”, mientras que aquellas que permanecen en la fase G_0 se les llama “quiescentes”.

En una breve descripción podemos decir que durante la fase G_1 las estructuras citoplasmáticas aumentan en número. En la fase S los cromosomas se replican. En la fase G_2 , comienza la condensación de los cromosomas así como el ensamblado de las estructuras especiales requeridas para la mitosis y la citocinesis. Durante la mitosis los cromosomas duplicados son distribuidos entre los dos núcleos hijos. Finalmente, en la citocinesis el citoplasma se divide separando a la célula madre en dos células hijas. En la Figura 1 se observan las diferentes fases del ciclo celular así como los eventos que ocurren durante cada fase (Biología-Helena Curtis 6ªEd).

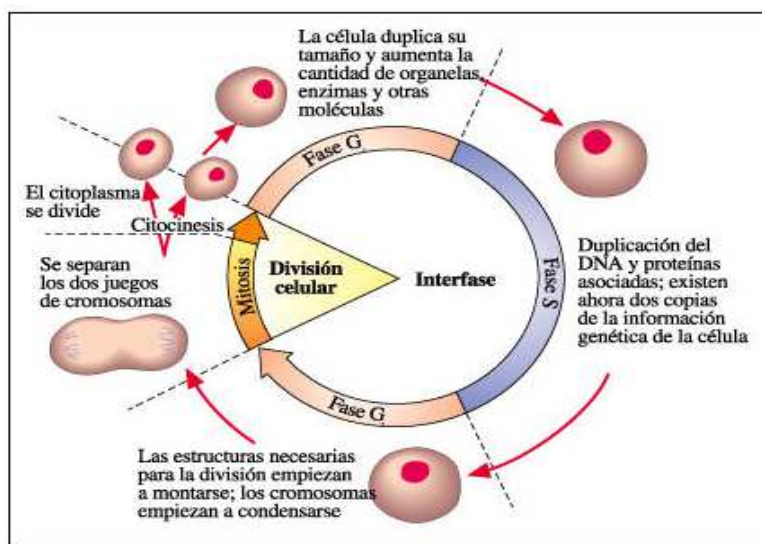


Figura 1. Fases del ciclo celular. El ciclo celular está compuesto por dos fases de crecimiento. La síntesis de material genético y la división celular. Para que una célula se pueda dividir debe pasar por varias fases; desde la G_1 , S, G_2 para finalmente poder dividirse. Durante las diferentes fases la célula

El paso de la célula a través del punto R depende de la integración del conjunto de señales externas e internas que recibe. El sistema de control del ciclo celular está basado en dos tipos de familias de proteínas clave: las ciclinas y las proteínas cinasas dependientes de ciclinas (Cdk), las cuales responden al citado conjunto de señales (véase la Figura 2; Biología-Helena Curtis 6ªEd./ Pollard & Earnshaw/Cell Biology 2ª Ed).

El cáncer

La regulación del ciclo celular es crítica para el desarrollo normal de los organismos multicelulares. La pérdida del control en última instancia conduce al cáncer, una enfermedad que causa la muerte a una de cada seis personas en el mundo. Las cifras estimadas por organizaciones mundiales como la OMS, indican que a nivel mundial se le atribuyen 7,6 millones de defunciones ocurridas en 2008 (aproximadamente, un 13% del total de la población mundial).

Como se muestra en la tabla 1 y 2, el cáncer afecta a personas de todo el mundo. De acuerdo a los datos reportados por Agencia internacional de investigación del cáncer los lugares con más incidencia y mortalidad hasta el momento son; Europa central, África, América central y las regiones con bajo desarrollo.

Las proporciones de la incidencia entre los países desarrollados respecto a las regiones en desarrollo son; 1,8 en hombres y 1,6 en mujeres. Mientras que en la misma proporción, la tasa de mortalidad es mucho más baja; 1,2 para hombres y casi 1,0 en las mujeres. Las mujeres que viven en el África tienen el mismo riesgo de morir de cáncer que las mujeres que viven en Europa Central y Oriental. Sin embargo, un factor determinante, es la detección temprana del cáncer así como el acceso a los sistemas de salud y los tratamientos disponibles.

En los países desarrollados, el cáncer de próstata, mama y colorectal se asocian con una supervivencia bastante alta. Mientras que el cáncer de hígado, estómago y esófago tienen un peor pronóstico, siendo más comunes en las regiones menos desarrolladas.

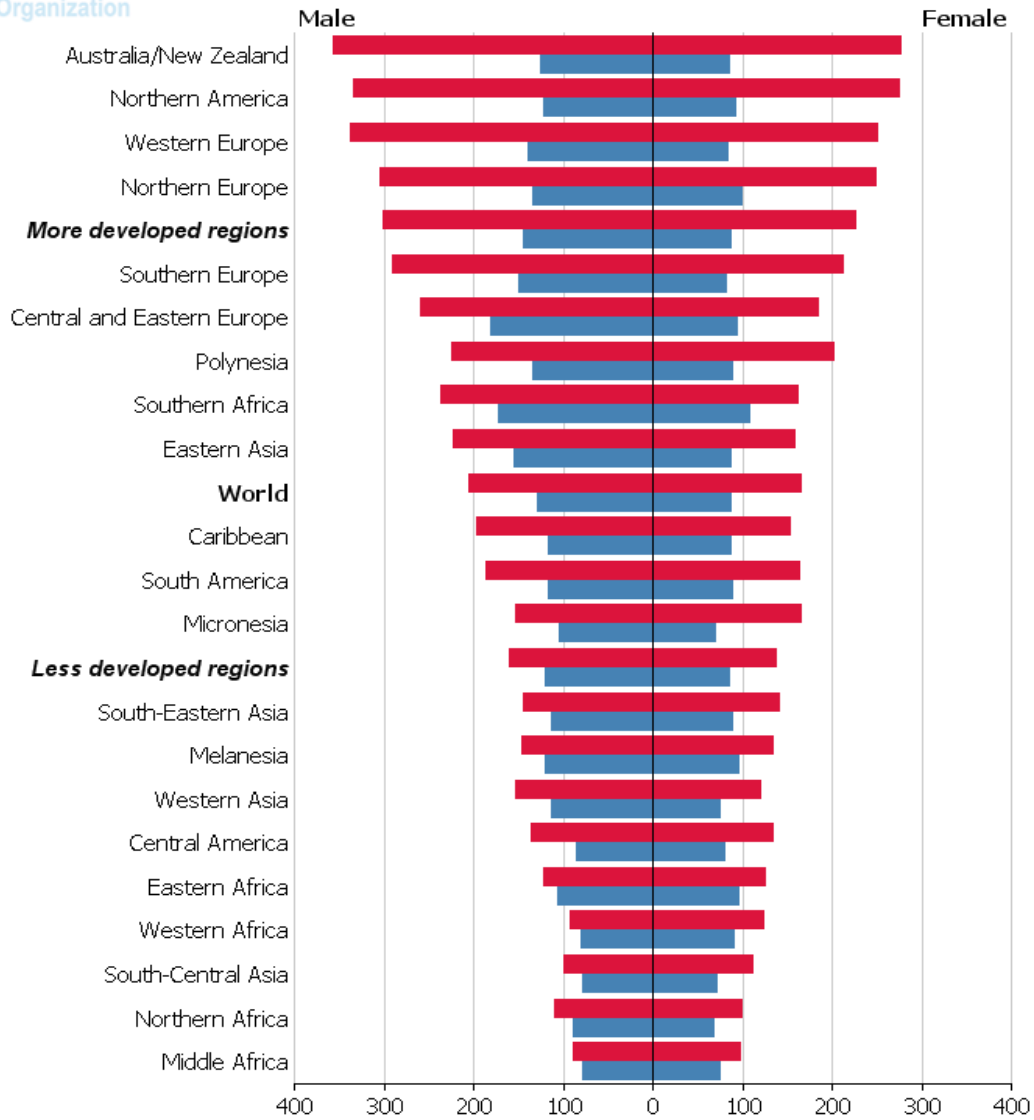
Tabla 1.- Incidencia y mortalidad de cáncer mundial 2008.

Número estimado (en miles)	Hombres		Mujeres		Ambos sexos	
	Casos	Muertes	Casos	Muertes	Casos	Muertes
Mundial	6617	4219	6044	3345	12661	7564
Regiones más desarrolladas	2964	1522	2591	1222	5555	2744
Las regiones menos desarrolladas	3653	2697	3453	2122	7106	4819
OMS África (AFRO)	253	209	318	226	571	435
OMS región de las Américas (OPS)	1276	611	1233	568	2509	1179
OMS del Mediterráneo Oriental región (EMRO)	214	169	214	144	428	313
OMS región de Europa (EURO)	1812	1038	1610	822	3422	1860
OMS Sur de Asia Sudoriental (SEARO)	742	567	910	565	1652	1132
Región del Pacífico Occidental (WPRO)	2316	1621	1755	1016	4071	2637

<http://globocan.iarc.fr/factsheets/cancers/all.asp>

Tabla 2.- Incidencia y mortalidad de Cáncer a nivel mundial 2008

International Agency for Research on Cancer



GLOBOCAN 2008 (IARC)

■ Incidence
■ Mortality

<http://globocan.iarc.fr/factsheets/cancers/all.asp>

Las células cancerosas tienen una elevada tasa de proliferación con una división más allá de los límites normales, causando invasión del tejido circundante y a veces metástasis. Estas alteraciones genéticas dan como resultado cambios en el crecimiento y supervivencia de las células de forma descontrolada. Los genes identificados en estas implicaciones han sido clasificados como oncogenes, los cuales se activan para promover la malignidad. Mientras que los supresores de tumores al estar inactivos o suprimidos permiten la transformación celular.

Se sabe que las células normales al tener contacto con células vecinas, inhiben su reproducción para no invadir tejidos, pero las células malignas no tienen este freno. Estas propiedades diferencian a los tumores malignos de los benignos ya que usualmente los tumores benignos no invaden ni producen metástasis.

Las investigaciones realizadas han identificado numerosos genes que regulan estos procesos que son la base del diseño de fármacos o terapias utilizadas. En nuestro laboratorio, trabajamos con Gas1 para el diseño de terapias génicas que permitan inducir tanto la detención del ciclo celular como la apoptosis en células cancerosas.

Gas1 (Growth Arrest Specific 1)

Scheider & colaboradores en 1988 aislaron un grupo de genes que se expresaban específicamente en la fase G₀ del ciclo celular en células de fibroblasto de ratón NIH3T3, a los cuales llamaron **genes específicos de arresto de crecimiento** o **gas (Growth Arrest Specific)**. Hasta el momento se conocen al menos 9 de ellos. Como se puede ver en la Figura 3, existen varios genes de *gas*, los cuales van de *gas1* hasta *gas9*. Estos genes están involucrados en diferentes procesos celulares como diferenciación, apoptosis, arresto celular, así como la re-entrada al ciclo celular.

El gen de **gas1** está involucrado en procesos del mantenimiento del arresto de crecimiento celular y apoptosis, regulando el ciclo celular de manera negativa previniendo la síntesis de DNA así como la entrada a la fase S del ciclo celular (Del Sal et al., 1992).

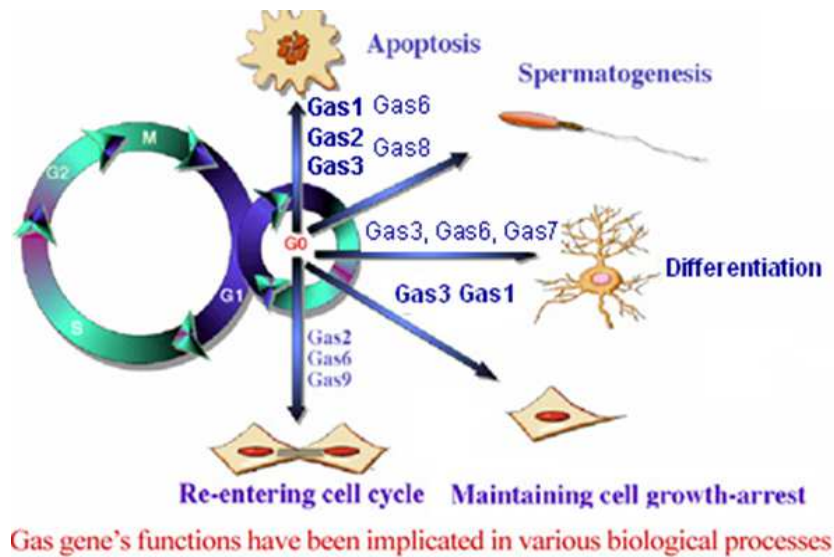


Figura 3. Implicación de los genes de *gas* en varios procesos biológicos. Los genes de *gas* se expresan durante la fase G_0 . Hasta el momento se conocen a 9 de ellos, los cuales están implicados en diferentes procesos biológicos tales como; apoptosis, diferenciación, mantenimiento del arresto del crecimiento y re-entada al ciclo celular. **Figura tomada de Lih, C.J., Lin Chao, S. 1996 / You JJ, Lin Chao., 2010**

Estructura de Gas1

El gen *gas1* codifica para la proteína Gas1 que tiene un peso de 37 kDa, se encuentra insertada en la cara externa de la membrana celular a través de un ancla de glicosil-fosfatidil-inositol (Stebel et al., 2000). Esta proteína muestra una alta similitud estructural con los $GFR\alpha_1$ de casi un 25 %. En la Figura 4 se muestra un modelo de la similitud del dominio D-N de Gas1 con $GFR\alpha_1$ (Schueler-Furman et al., 2006).

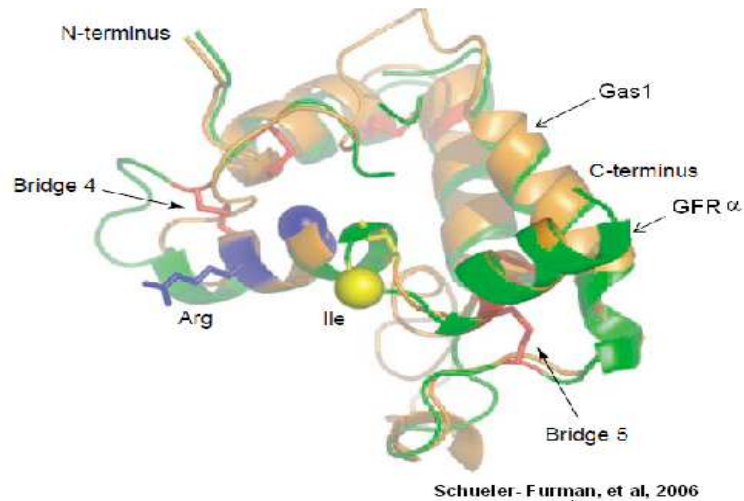
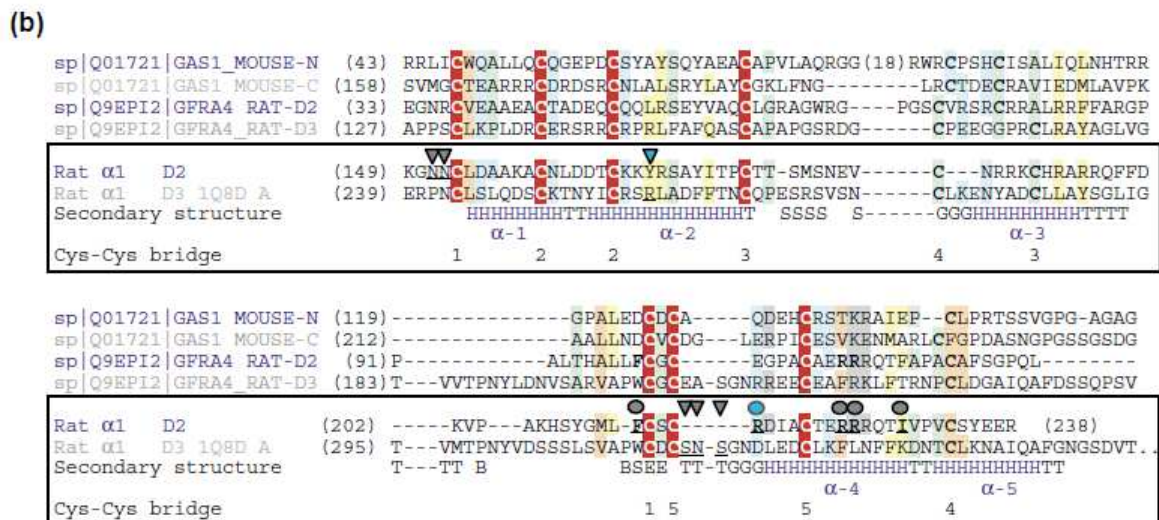


Figura 4. Modelo estructural del dominio D-N de GAS1. El modelo (naranja) muestra superpuesto la estructura de Gas1 con GFR α_1 (verde). Tomado del artículo de **Schueler-Furman et al., 2006**

A través del programa ProtoNet 4.0 se encontró que Gas1 muestra una similitud significativa con GFR α_{1-4} en aves, roedores y primates. En la Figura 5, se muestra una representación del dominio principal de Gas1 y GFR α , que tienen una similitud del 20 al 25% que corresponde alrededor de 120-150 aminoácidos. La estructura secundaria de Gas1 está conformada por α -hélices y una extensa región carboxilo terminal. También se encontró que Gas1 muestra el mismo plegamiento que el dominio D3 de GFR α_1 de rata (Schueler-Furman et al., 2006)



Schueler-Furman, et al, 2006
TRENDS in Pharmacological Sciences

Figura 5. Representación del dominio principal de Gas1 y GFR α . a) La flecha indica el sitio aceptor de serina para el ancla de glicosil-fosfatidilinositol (GPI). El extremo N-terminal con el péptido señal se muestra en color morado. La organización de los cinco puentes disulfuro se muestran en función de la estructura que se extiende en el dominio D3 de GFR α_1 (AP código 1q8d). (b) la alineación de secuencias múltiples de los dominios D2 y D3 de rata GFR α_4 y D-N y D-C de ratón de Gas1. Los dominios N-terminal (-N) (indicados en azul a la izquierda) y los dominios C-terminal (-C) (indicado en gris) están alineados a la izquierda. Residuos clave en el dominio D2 de la rata GFR α_1 que han demostrado por mutagénesis en la línea celular, el factor neurotrófico derivado de la glía (GDNF) que se une a GFR α_1 están marcadas por círculos grises y triángulos. Los residuos que son específicos para la cinasa RET que dependen de la interacción están marcados con símbolos azules (círculo y triángulo) por encima de la secuencia. El subconjunto de los residuos cruciales que son idénticos en los dominios D2 de GFR α_4 y GFR α_1 (Phe213, Arg224 y Arg225) se muestran en negrita. Los residuos subrayados son los amino ácidos clave involucrados en la unión a GDNF-GFR α_1 que fueron detectados por Wang et al. Residuos conservados de cisteína se muestran en blanco sobre un fondo rojo. Cisternas que no están totalmente alineadas, pero se espera que participen en los puentes disulfuro se muestran en negrita. Los diez cisteínas que forman los cinco puentes disulfuro están marcados con los números correspondientes. Tomado del artículo de Schueler-Furman et al., 2006

Los ligandos de los GFR α son los GFLs, que incluyen al factor neurotrófico derivado de la glía (GDNF), neurturina (NRTN), artemina (ARTN) y persefina (PSPN). Estos interactúan con los receptores GFR α_1 , GFR α_2 , GFR α_3 y GFR α_4 . En la Figura 6 se puede observar esta especificidad de acuerdo a su receptor. El GDNF y NRTN pueden interactuar con GFR α_1 y GFR α_2 , ARTN con GFR α_1 y GFR α_3 . Mientras que PSPN interactúa solo con GFR α_4 . Los GFR α generalmente, están unidos a la membrana por un ancla GPI, pero pueden producirse formas solubles por el corte de una fosfolipasa o proteasa desconocida. En experimentos que se usaron proteínas purificadas o proteínas sobre expresadas en líneas celulares, se demostró que RET (es receptor transmembranal que contiene 4 repeticiones parecidas a E-cadherina en el dominio extracelular y un dominio tirosina cinasa intracelular) y los GFR α pueden asociarse con baja afinidad en ausencia de ligando. En presencia de RET la especificidad de unión al ligando de los receptores GFR α se amplía, lo que les permite interactuar con diferentes ligandos de la familia GDNF (Rizaldy P. Scott, Carlos F. Ibáñez 2001)

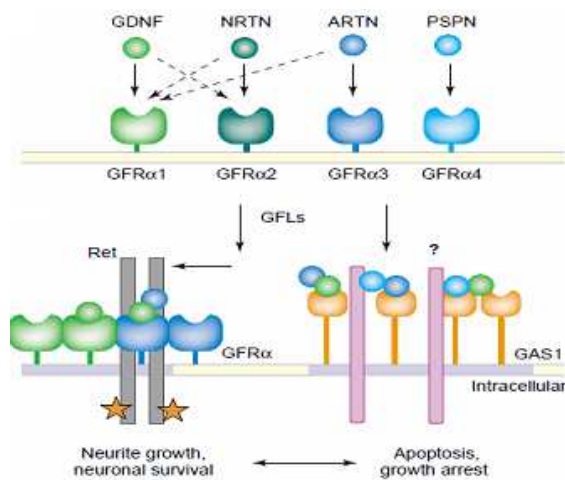


Figura 6. Ligandos de la familia de GDNF con sus receptores GFR α El ligando GDNF se une a su receptor GFR α_1 permitiendo que RET se reclute a las balsas lipídicas, desencadenando la señalización para activar a AKT. Gas1 interfiere con esta vía de señalización llevando las células al arresto del crecimiento y apoptosis. Tomado del artículo de Schueler-Furman et al., 2006

Una vez formado el complejo entre uno de los ligandos (Figura 6) como el GDNF y su correceptor GFR α_1 RET es atraído a las balsas lipídicas (Figura 7), lo que promueve su dimerización produciendo un cambio interno transformacional que auto-fosforila los sitios de tirosina de RET. Entre los sitios más importantes se encuentra la tirosina 1062, con lo que se activan las cascadas por la señalización de PI3K, AKT entre otras (Airaksinen et al., 2002, Saavedra et al., 2008 / Charis Eng, 2010 RET Proto-Oncogene in the Development of Human Cancer).

Gas1 y la vía de señalización inducida por GDNF

Se ha sugerido que Gas1 puede unirse a RET de manera dependiente del ligando y ser secuestrarlo en las balsas lipídicas alterando la señalización río abajo (Cabrera et al., 2006). En la Figura 7, se muestra un diagrama del efecto observado en las células SH-SY5Y (provenientes de un neuroblastoma humano) por acción de *gas1*, que inhibe la fosforilación de la tirosina 1062 de RET en la vía de GDNF. Esto conduce a una disminución en la actividad de AKT y en la supervivencia celular (López-Ramírez et al., 2008, Domínguez-Monzón et al., 2009).

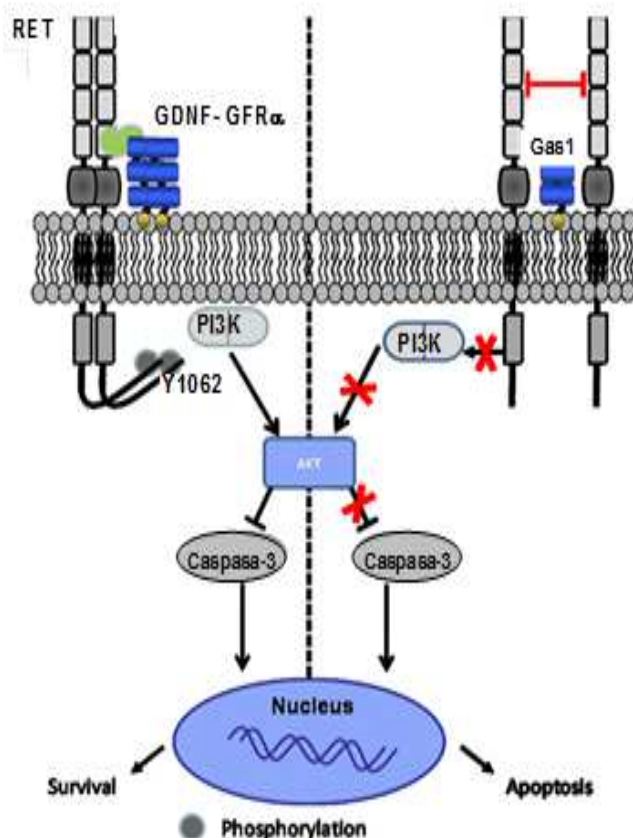


Figura 7. Vía de señalización de GDNF/GFR - Gas1. GDNF se une a su ligando GFR α . Este complejo atrae a RET a las balsas lipídicas. RET se dimeriza y sufre un cambio transformacional que permite la autofosforilación de sus sitios de tirosina (Y1062). Activando a PI3K, que a su vez, promueve la activación de AKT. Llevando a la célula a procesos de proliferación y supervivencia celular. Gas1 interviene en esta vía de señalización, disminuyendo la fosforilación de la tirosina 1062 de RET. Lo que reduce la activación de AKT, conduciendo la célula a procesos de apoptosis. **Figura tomada de Domínguez-Monzón et al., 2006.**

La función de Gas1 con la vía de señalización inducida por Sonic Hedgehog

Ha sido reportado que Gas1 interactúa con la vía de señalización mediada por Sonic Hedgehog (Shh). Aunque inicialmente se pensó como una relación antagonista (C.S. Lee et al., 2001) más recientemente se ha visto como una acción cooperativa entre estas dos moléculas durante el desarrollo (Allen et al., 2007; Martinelli and Fan, 2007a).

La vía de señalización de Sonic Hedgehog / Gli (Shh-Gli) es esencial para el desarrollo del sistema nervioso ya que se ha asociado con el origen y progresión de diferentes tumores (Wetmore, 2003; Ruiz i Altaba et al., 2004; Sotelo, 2004; Ingham and Placzek, 2006; Arsic et al., 2007; Chari and McDonnell, 2007).

En la Figura 8, se muestra un diagrama de la participación de Gas1 con la vía de Sonic Hedgehog (Shh). Como primer instancia se sabe que Shh se une a su receptor Ptch, esta unión libera a Smo de la inhibición constitutiva de Ptch, entonces Gli promueve la transcripción de genes involucrados en el desarrollo y otros procesos (Martinelli et al., 2007). Los niveles de Shh en la membrana son controlados por la regulación a nivel transcripcional por retroalimentación negativa de Ptch1 y Hip1, así como la regulación positiva por parte de Cdo y Boc. En esta vía de señalización la función de Gas1 es mantener a Shh sobre Ptch, potenciando de esta manera la señalización mediada por Shh.

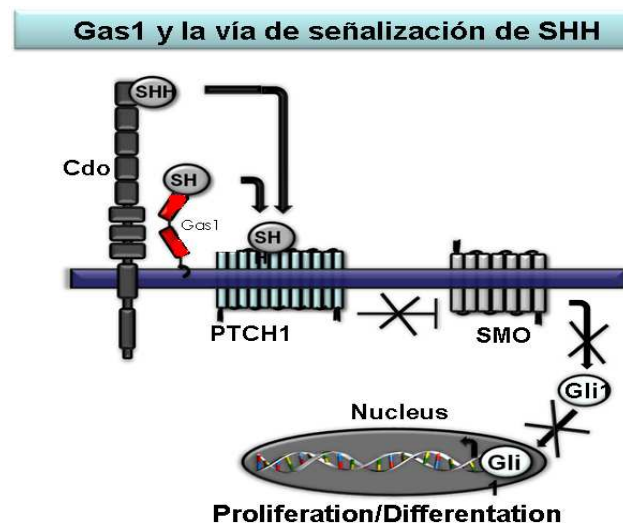


Figura 8. Participación de Gas1 en la vía de señalización de Shh/Gli. Gas1 mantiene a Shh sobre Pich, potenciando la señalización mediada por Shh.

El efecto de la sobre expresión de *gas1*

Se ha visto que en cultivos celulares, la sobreexpresión de *gas1* inhibe a síntesis de DNA durante el cambio de la fases G₀/S (Benítez et al., 2007/ Del Salt et al., 1992/ Domínguez Monzón et al., 2009). Arresta la proliferación en diversas líneas celulares como; NIH3T3 (Evdokiou & Cowled 1998a), adenocarcinoma pulmonar (Evdokiou & Cowled 1998b), glioma murino (Benítez et al., 2007 / Zamorano et al., 2003), y cultivos primarios de glioma humano (Domínguez-Monzón et al., 2009).

En cultivos de hipocampo, neuroblastoma y gliomas induce muerte celular por apoptosis (Benítez et al., 2007 / Zamorano et al., 2003 / Domínguez-Monzón et al., 2009). También se ha demostrado que la sobre expresión de *gas1* en las líneas celulares del glioma, induce la apoptosis por activación de la caspasa-3 (Zamorano et al., 2003).

También se ha demostrado que la sobre-expresión de *gas1* sin el ancla de GPI conserva su efecto, actuando de forma autocrína en la célula que lo producen y de forma parácrina en células adyacentes. Esto gracias a que la forma “truncada” puede ser secretada por las células que lo sobre-expresan (López Ornelas et al. 2011).

Por otro lado, Gas1 se expresa en varios órganos durante la embriogénesis. En el ratón se ha visto que se expresa en cerebro, corazón, riñón, extremidades, pulmón y gónadas. En las células de las extremidades, Gas1 promueve la muerte interdigital en los embriones murinos (Lee et al., 2001b).

Los ratones Knockout de Gas1 (*gas1*^{-/-}) tienen un cerebro maduro que es de la mitad del tamaño normal debido a una reducción en el número de células granulares y glia de Bergman (Liu et al., 2001). Estos ratones además muestran microftalmia, transdiferenciación del epitelio pigmentado de la retina ventral (Lee et al 2001a) así como defectos cráneo encefálicos (Seppala et al., 2007).

Los ratones mutantes para *gas1* y *shh* muestran defectos aún mas marcados en el fenotipo que cada uno mantiene de forma individual, debido a la relación de Gas1 con la vía de señalización mediada por Shh (Martinelli y Fan 2007a). Por lo anterior, se puede apreciar que Gas1 tiene un papel importante en el desarrollo de mamíferos.

Dado que la disminución en la expresión de Gas1 se ha correlacionado con la malignidad de cáncer de próstata, tiroides (Bettuzzi et al., 2000 / Huang et al ., 2001 / Rizzi et al., 2008),

recurrencia en el cáncer colorrectal (Zheng Jiang MD et al 2010,) y de cáncer gástrico, se ha considerado que Gas1 puede actuar como un supresor de tumores. Otro reporte indicó que la supresión de Gas1 en cáncer gástrico, promueve la resistencia a la quimioterapia con Epirubicina (Zao et al., 2009).

PI3K, PTEN y AKT

Como se había mencionado en la Figura 7, PI3K (cinasa de fosfatilinositol de membrana) es importante para la activación de AKT, ya que se activa mediante señales generadas por receptores como RET (receptor de tirosina cinasa) lo que desencadena una serie de eventos que permiten a PI3K fosforilar el PIP2 (fosfatidilinositol 3,4-bisfosfato) en la posición 3 transformándolo en PIP3 (fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato). Tal como se ilustra en las Figuras 10 y 11, el PIP3 resultante es el segundo mensajero que permite el reclutamiento de AKT a la membrana plasmática para que posteriormente pueda ser activada por PDK1 y PDK2 en dos sitios específicos: Thr-308 y Ser-473, respectivamente. Una vez que AKT es activada, se desprende de la membrana para fosforilar a sus proteínas blancas implicadas en la proliferación y supervivencia celular. En condiciones patológicas como el cáncer, AKT se encuentra altamente activa.

Por otro lado se encuentra PTEN (fosfatasa para lípidos) que antagoniza la función de PI3K, llevando el PIP3 a PIP2. Esto le permite regular la presencia de PIP3 en la membrana citoplasmática, con lo que ayuda a disminuir la activación de AKT. Esto se ilustra en la Figura 9 y 10 (Pollard & Earnshaw/Cell Biology 2ª Ed).

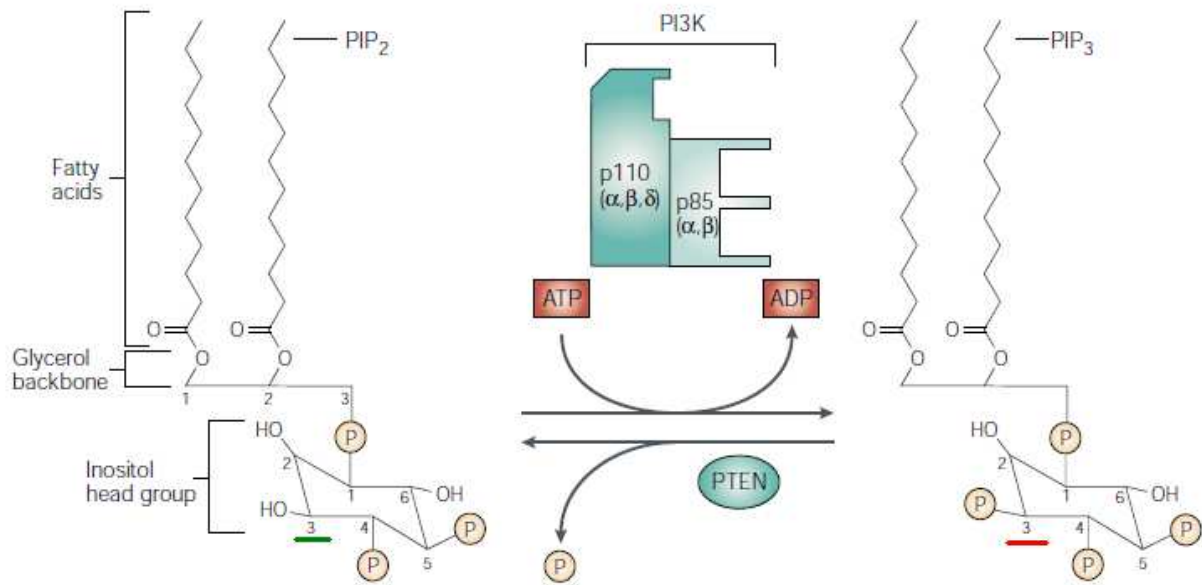


Figura 9. Ciclo de PIP3 mediado por PI3K y PTEN. El fosfolípido PIP2 es fosforilado en la posición 3 por PI3K, convirtiéndolo en PIP3. PTEN antagoniza la función de PI3K al desfosfoliar el PIP3 en la posición 3 para regresarlo a PIP2. Tomado de Nature reviews, Cancer, Vol 2, July 2002, pp 489

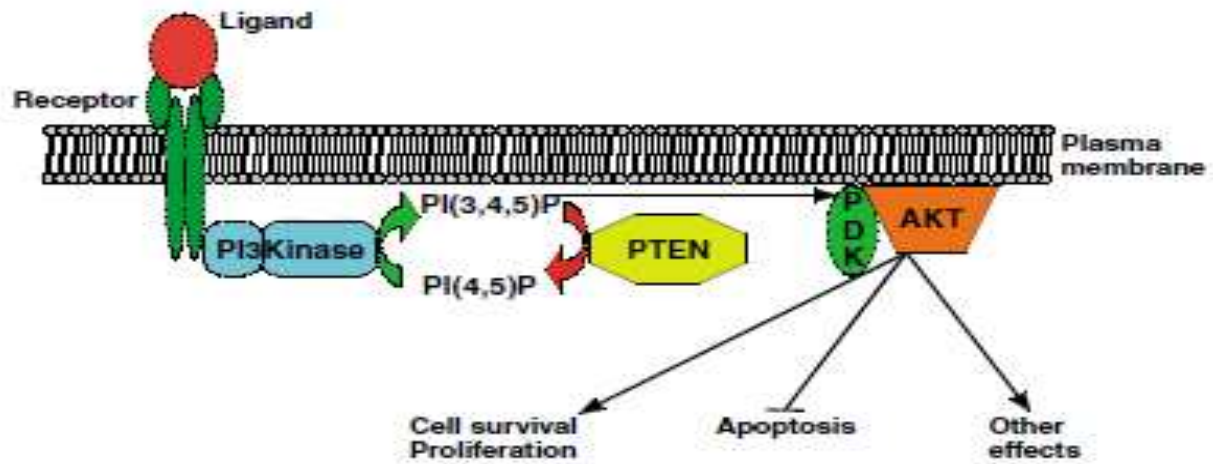


Figura 10. Vía clásica de PTEN. La unión del ligando al receptor desencadena una señal que le permite a PI3K generar PIP3. El cual es necesario para que AKT sea reclutada a la membrana. AKT es activada por PDK1 y PDK2 con lo que puede realizar funciones relacionadas con supervivencia e inhibición de apoptosis. La función de PTEN es transformar el PIP3 a PIP2 con lo que se inhibe la activación de AKT. Tomado de Sarah M. et al. 2007 Journal of Cell Science 121, 249-253

El gen de *pten*, es considerado uno de los más importantes supresor de tumores al inhibir la vía de señalización de PI3K/AKT (George L. Metter, 2001). Un mal funcionamiento de PTEN puede deberse a deleciones homologas o mecanismos de mutaciones tal como ocurre en varios tipos de canceres. Algunos ejemplos se muestran en la tabla 3.y 4.

Tabla 3. Resumen de mutaciones de *pten* en líneas celulares tumorales y tumores primarios.

Summary of *PTEN* mutations in tumor cell lines and primary tumors.

Tumor sample	Tissue of origin	Codon	Mutation*	Predicted effect
LNCaP	Prostate	6	AAA to A	Frameshift
534T†	Glioblastoma	15	AGA to AGAGA	Frameshift
U87MG	Glioblastoma	54	49 bp deletion	Frameshift
MDA-MB-468	Breast	70	44 bp deletion	Frameshift
132T†	Glioblastoma	129	GGA to AGA	Gly to Arg
DU145	Prostate	134	ATG to TTG	Met to Leu
U373MG	Glioblastoma	241	TTT to TTT TT	Frameshift
BT549	Breast	274	GTA AAT to TAA AT	Stop
DBTRG-05MG‡	Glioblastoma	274–342	Delete 204 bp	In-frame deletion
134T†	Glioblastoma	337	4 bp deletion	Frameshift

*Mutations are indicated in the sense orientation. †Primary tumors. All other samples are tumor cell lines. The mutations in the primary tumors were not found in matched blood DNA. ‡DBTRG-05MG has a genomic deletion of 180 bp within exon ET-1, which includes the splice donor site. Because of this deletion, the transcript contains an in-frame deletion of codons 274 to 342.

Tomado de Jing Li et al., 1997 / Science, vol. 275, 28 1997

Tabla 4. Deleciones y mutaciones esporádicas en diferentes tipos de tumores.

PTEN Lesions (Deletion and/or Mutation) in Sporadic Human Malignancies

Site	Tumor type	PTEN inactivation		Comment
		Range	Average	
Brain	Glioblastoma	17–70%	48% (107/224)	Mostly LOH
Breast	Ductal carcinoma	15–48%	37% (37/100)	Mostly LOH
Endometrium	Endometrioid carcinoma	34–83%	42% (139/334)	LOH and mutation
Prostate	Adenocarcinoma	17–41%	33% (49/149)	Mostly LOH
Ovary	Cystadenocarcinoma	6–45%	33% (65/198)	LOH and mutation
Skin	Melanoma	32–33%	33% (18/55)	Mostly LOH
Thyroid	Carcinoma	37%	37% (19/51)	Mostly LOH

LOH, loss of heterozygosity.

Tomado de Multer, 2001/American Journal of Pathology, Vol. 158, No. 6, June 2001

Justificación

Las terapias disponibles contra el cáncer son solo parcialmente eficaces y muy agresivas, por lo que es necesario desarrollar tratamientos más efectivos.

Hipótesis

Gas1 coopera con PTEN de forma positiva disminuyendo la viabilidad celular ya que ambos intervienen regulando la disponibilidad de PIP3 en la membrana citoplasmática río arriba y río abajo, respectivamente. Por tanto, la acción cooperativa de Gas1 y PTEN produce una disminución mayor de la viabilidad celular, con respecto de la acción individual de Gas1 (en ausencia de PTEN) (véase la Figura 11).

Objetivo general

Investigar el efecto fisiológico de la función de Gas1 en células SH-SY5Y en presencia de PTEN así en ausencia de PTEN sobre la viabilidad celular.

Objetivos específicos

Determinar el estado inicial del mRNA de *gas1* y *pten*, así como las proteínas de Gas1, PTEN y AKT en condiciones de proliferación.

Sobre-expresar a *gas1* y analizar su efecto sobre la viabilidad celular.

Analizar el efecto de silenciar a *pten* sobre la viabilidad celular.

Evaluar el efecto de sobre-expresar a *gas1* y de silenciar a *pten* simultáneamente sobre la viabilidad celular.

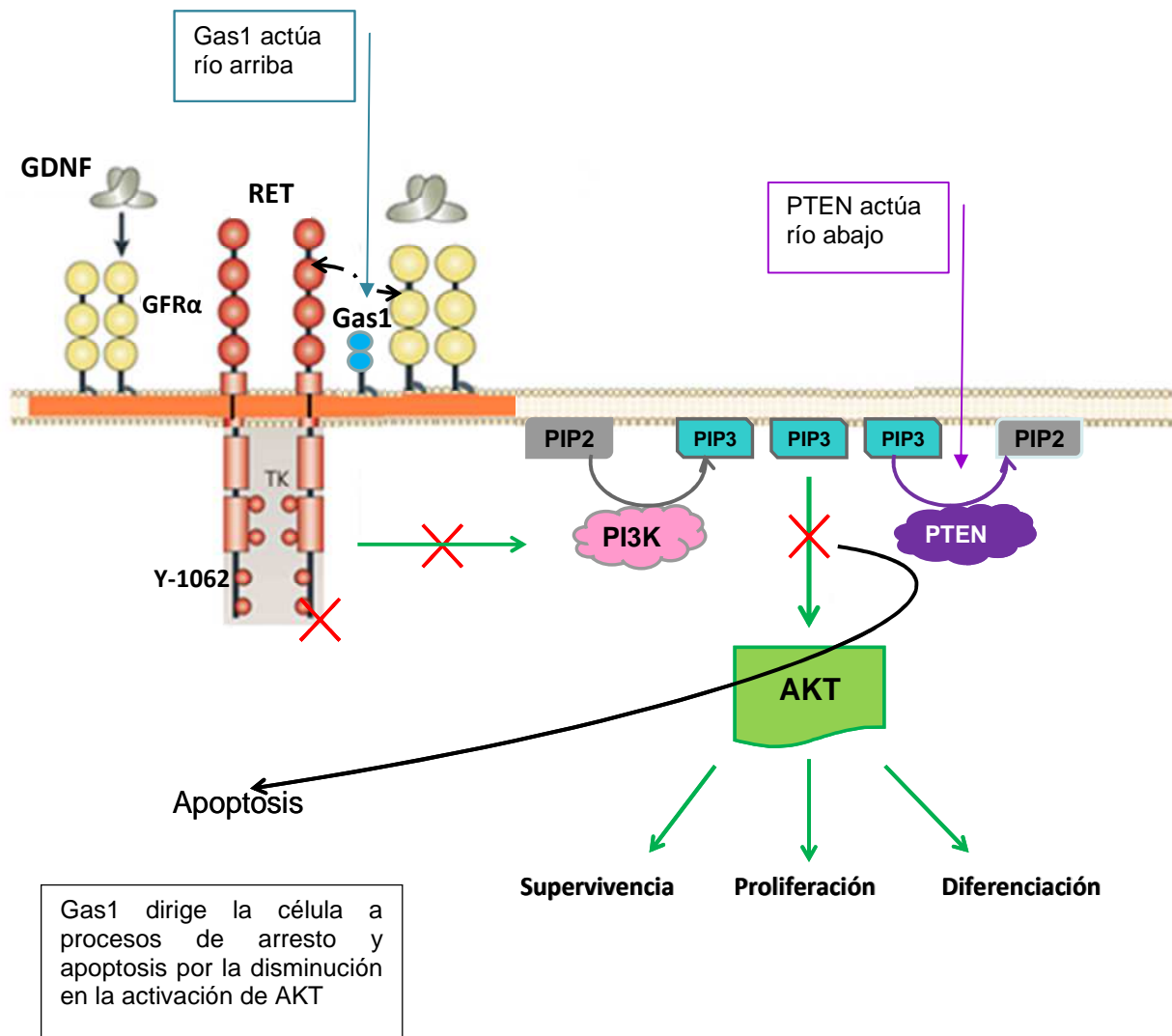


Figura 11. Hipótesis de la cooperación de Gas1 y PTEN para disminuir la viabilidad celular.

Debido a que Gas1 tiene cierta homología con la estructura de los GFR α puede actuar río arriba, al disminuir la fosforilación de la tirosina 1062 de RET no permite que PI3K genere el PIP3 necesario para la activación de AKT, llevando la señalización celular a procesos de apoptosis. Por su parte PTEN actúa río abajo antagonizando la función de PI3K disminuyendo el PIP3 en la membrana citoplasmática, con lo que se frena la activación de AKT. Por lo que es plausible que Gas1 y PTEN cooperan en la disminución de la viabilidad celular.

MÉTODOS

Cultivo de la línea celular SH-SY5Y

Se utilizaron células SH-SY5Y derivadas de neuroblastoma humano, se muestra una imagen representativa de la morfología en la Figura 12. Estas fueron crecidas en el medio modificado de Dulbecco de alta glucosa (Dulbecco's modified Eagle medium High-Glucose Invitrogen), enriquecidas con 10% de suero fetal de bovino (SFB-Invitrogen), aminoácidos esenciales (Sigma Aldrich), 1% penicilina/estreptomicina al 1% (P/E Invitrogen) a 37°C con ambiente de 0.5% de CO₂ en ambiente húmedo. En la Figura 13 se muestra una foto representativa de la morfología de las células.

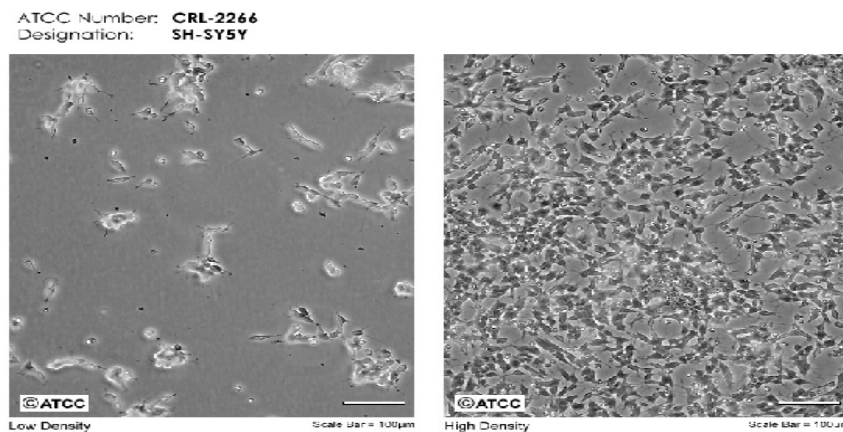


Figura 12. Foto representativa de la morfología de las células SH-SY5Y, tomadas de la página de ATCC.

Transfección

El proceso de transfección consiste en la introducción de material genético externo en células eucariotas mediante plásmidos, vectores u otras herramientas. Existen varias formas de llevar a cabo dicho proceso incluyendo métodos químicos que propician la formación de agregados, choque osmótico, electroporación o el uso de lípidos catiónicos, donde el complejo tiene afinidad por la membrana de tal forma que la incorporación de liposomas permiten la entrada del DNA o RNA al citosol de la célula.

La introducción de un plásmido que contiene la secuencia codificante (CDS) de una proteína de interés, bajo el control de un promotor (constitutivo, regulado) permite la producción de la proteína deseada, que puede estar o no etiquetada, o bien acompañada de un gen reportero tal como la proteína verde fluorescente (green fluorescent protein; GFP) lo que permite observar la expresión del gen de interés. En este trabajo, se utilizó el vector pAdTrack-CMV/*gas1* para sobre-expresar a *gas1*; este vector cuenta también con el transgen de la GFP con lo cual puede observarse la eficiencia del proceso de transfección.

Por otro lado, con el fin de disminuir la expresión de un gen se utilizan herramientas como los siRNA's, que son secuencias con una longitud de 20 a 25 nucleótidos altamente específicos que interfieren con la expresión del gen respectivo. Los experimentos con siRNA's deben realizarse paralelamente con un siRNA-control, que es una secuencia con una longitud de 20-25 nucleótidos no específicos, diseñado como un control negativo que no interfiere con la expresión de ningún gen.

En este trabajo se utilizó un siRNA PTEN (Santa Cruz Biotechnology) para disminuir o "silenciar" la expresión de *pten* y un siRNA Control (Santa Cruz Biotechnology) como control negativo.

Sobre-expresión de *gas1*

Para sobre-expresar a *gas1* se utilizó el vector pAdTrack-CMV/*gas1*. Inicialmente este vector se amplificó en *E. coli* DH5 α , se realizó el maxi-prep, para luego realizar una digestión con las enzimas de restricción *Bgl-II* y *Hind-III* con el fin de corroborar la presencia del transgen de *gas1*, en la Figura 15 se observa el mapa del vector que se utilizó así como el lugar donde se cortó con las enzimas de restricción así como el gel de la electroforesis del producto de la digestión.

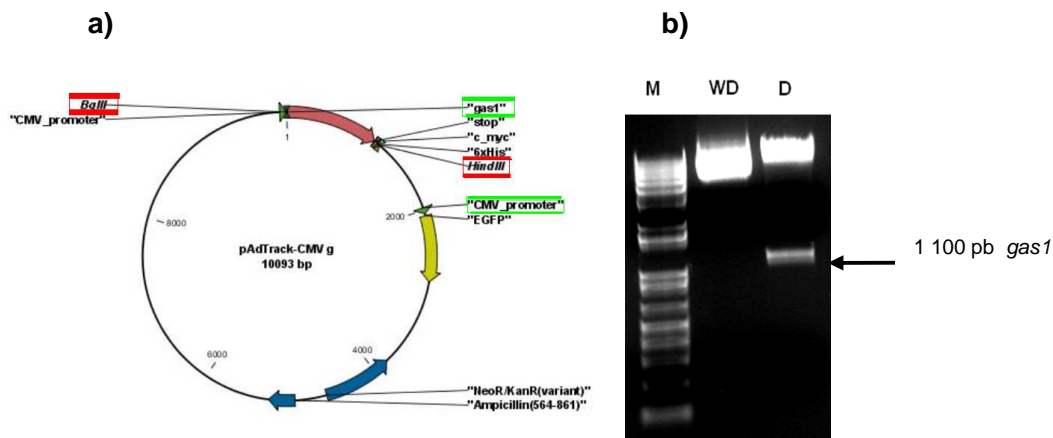


Figura 15. Vector pAdTrack-CMV/gas1. En a) se observa el mapa del vector con el transgen de *gas1* y su promotor CMV, el cual puede ser cortado por las enzimas de restricción *Bgl-II* y *Hind-III*. También se observa la secuencia de la proteína verde fluorescente GFP con su promotor CMV así como los genes de resistencia para Neomicina/Kanamicina y Ampicilina; el vector completo consta de 10093 pb. En b) se observa la electroforesis en gel de agarosa al 1%. En el primer carril se encuentra el marcador, después se observa el vector sin digestión (WD) seguido por el producto de la digestión del vector con las enzimas *Bgl-II* y *Hind-III* la fracción de 110 pb que se observa corresponde al transgen de *gas1*.

Una vez que se confirmó que el vector podía ser usado, se procedió a realizar los ensayos de transfección. Se sembraron 1×10^6 células en cajas de 60 mm; 24 horas después se transfectaron con el plásmido pAdTrack-CMV/*gas1* (el cual contiene la secuencia codificante del gen *gas1* humano y por otro lado se empleó como control de la transfección el vector pAdTrack-CMV el cual no tiene el transgen de *gas1*) (Jiménez-Hernández, 2009) empleando lipofectamina 2000 (Invitrogen). Para esto se utilizaron 8.0 μg de plásmido y 20.0 μl de lipofectamina en 1000 μl de OptiMEM (Gibco). Los complejos fueron agregados a las células y posteriormente se incubaron a 37° C durante 6 horas para luego cambiar el medio. Las proteínas fueron extraídas 24 horas después de la transfección utilizando un buffer de lisis suplementado con inhibidores de proteasas.

Silenciamiento de *pten*

Se sembraron 1×10^6 células en cajas de 60 mm, 24 hrs posteriores se transfectaron con siRNA-PTEN (Santa Cruz Biotechnology) (el cual contiene una secuencia codificante para reprimir la expresión del gen de *pten* humano y por otro lado se empleo como control de la transfección el siRNA-control (Santa Cruz Biotechnology) el cual no interfiere con la expresión de ningún gen) empleando lipofectamina 2000 (Invitrogen), para esto se utilizarón 200 pmol de siRNA PTEN y 10.0 μ l de lipofectamina en 1000 μ l de OptiMEM (Gibco), los complejos fueron agregados a las células y posteriormente se incubaron a 37°C/6hrs, al finalizar este tiempo se les cambio el medio. Las proteínas fueron extraídas 24 hrs post-transfección utilizando un buffer de lisis suplementado con inhibidores de proteasas.

Sobre-expresión de *gas1* y silenciamiento de *pten*

Se sembraron 1×10^6 células en cajas de 60 mm, 24 hrs posteriores se transfectaron de forma simultanea con el plásmido pAdTrack-CMV/*gas1* más el siRNA-PTEN empleando lipofectamina 2000 (Invitrogen), para esto se utilizaron 8.0 μ g del plásmido pAdTrack-CMV/*gas1* + 200 pmol de siRNA-PTEN con 30.0 μ l de lipofectamina 2000 en 1000 μ l de OptiMEM, los complejos fueron agregados a las células y posteriormente se incubaron a 37°C/6hrs, al finalizar este tiempo se les cambio el medio. Las proteínas fueron extraídas 24 hrs post-transfección utilizando un buffer de lisis suplementado con inhibidores de proteasas.

RT-PCR

En la RT-PCR el molde inicial es RNA y mediante la retrotranscriptasa se obtiene el cDNA (DNA complementario), este cDNA es posteriormente amplificado por PCR.

La extracción del RNA total de las células se realizó utilizando el protocolo comercial del reactivo ®Trizol (Invitrogen). Se utilizó M-MLV transcriptasa reversa (Invitrogen) usando OligodT (Invitrogen) como iniciador.

La PCR fue realizada con Taq polimerasa (Invitrogen) usando para *gas1* los iniciadores: 5'-CTGTGCCTGATGGCGCTGCTGC-3', 5'-GAGGGCCGAGATGCAGTGA-3', para *pten* 5'-TCACGCACGATTTCCC-3' , 5'-TGGCACCACACCTTCTACA-3' y para *-actina* humana 5'TCA-CGC-ACG-ATT-TCC-C 3' y 5'TGG-CAC-CAC-ACC-TCC-TAC-A 3'.

Las condiciones de PCR para **gas1** fueron un ciclo a 94°C por 5 minutos seguido de 35 ciclos (94°C/ 30 seg, 57°C/ 30 seg y 72°C/ 30 seg) con un ciclo de extensión final de 72°C por 10 minutos, para PCR **pten** fueron un ciclo a 94°C por 5 minutos seguido de 35 ciclos (94°C/ 30 seg, 51°C /30 seg y 72°C/ 30 seg) con un ciclo de extensión final a 72°C por 10 minutos, para PCR **actina** fueron un ciclo a 94°C por 5 minutos seguido de 35 ciclos (94°C/ 30 seg, 55°C/ 30 seg y 72°C/ 30 seg) con un ciclo de extensión final a 72°C por 10 minutos.

Western blot

La obtención de proteínas totales, se realizó con el uso de un buffer de lisis con inhibidores de proteasas. (Tris pH=8 20 mM, NaCl 150mM, Glicerol al 10%, Triton al 1%, EDTA 2mM, PMSF 1mM, Na₃VO₄ 1mM, Compleat 1X, NaF 10 mM)..

Los extractos protéicos fueron cuantificados por el ensayo de ácido bicinoninico. Se utilizaron 50 µg de proteína para correr un gel de SDS-PAGE al 12%, las proteínas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa (BioRad). Las membranas fueron bloqueadas con una solución al 5% de leche libre de grasa, BSA al 1% en PBS-0.05% Tween-20 durante 1h. Posteriormente las membranas fueron incubadas con los anticuerpos primarios contra Gas1 (1:200, ProSci) , PTEN (1:500 Santa Cruz B.) , AKT (1:5000 Santa Cruz B.) durante toda la noche en cuarto frío.

Posteriormente se realizó el stripping para después detectar β-actina (1:5000 CINVESTAV-Dr. J.M. Hernández).

Las membranas fueron lavadas con PBS e incubadas por 1 hrs con los anticuerpos secundarios acoplados a peroxidasa anti-conejo para Gas1, PTEN y AKT (1:5000, Jackson ImmunoResearch), mientras que anti-ratón fue usado para β-actina (1:5000, Zymed). Las proteínas fueron reveladas mediante un sistema de quimioluminiscencia (PerkinElmer) y vistas con en el equipo de UV transilluminator UVP.

Ensayo de Viabilidad celular

La medición de la viabilidad celular se realizó utilizando la técnica de Azul de tripano, el cual es un colorante azóico que se utiliza para ensayos de viabilidad celular, ya que permite diferenciar células vivas de células muertas. En las células viables el azul de tripano no es absorbido; pero si en las células que tiene comprometida la integridad de su membrana, es decir en las células muertas.

Para evaluar el efecto de *Gas1* sobre la viabilidad celular, se sembraron 5×10^4 células por pozo en caja de 24 pozos, 24 hrs posteriores se transfectaron con 0.8 μg del plásmido pAdTrack-CMV/*gas1* y 2.0 μl de lipofectamina, en 100 μl de OptiMEM, (de igual forma se utilizó el vector sin el transgén de *gas1*, pAdTrack-CMV, como control negativo), los complejos fueron agregados a las células y posteriormente se incubaron a 37°C/6hrs, al finalizar este tiempo se cambio el medio, dejando las células en incubación por 24 hrs adicionales. Para la determinación de la viabilidad celular primero se retiro el medio de cultivo del pozo, después se dio un lavado con PBS al 1%, las células se despegaron utilizando 350 μl de Tripsina (Invitrogen), se preparo una dilución 1:10 de la suspensión de células con azul de tripano al 1% (Sigma), las células se contaron en cámara de Neubauer con ayuda del microscopio (Nikon TMS). El ensayo se realizó por triplicado.

Para evaluar el efecto del silenciamiento de PTEN, sobre la viabilidad celular se sembraron se sembraron 5×10^4 células por pozo en caja de 24 pozos, 24 hrs posteriores se transfectaron con 20 pmol de siRNA-PTEN y 1.0 μl de lipofectamina en 100 μl de OptiMEM, (de igual forma se utilizó el siRNA control, como control negativo), los complejos fueron agregados a las células y posteriormente se incubaron a 37°C/6hrs, al finalizar este tiempo se cambio el medio, dejando las células en incubación por 24 hrs adicionales. Para la determinación de la viabilidad celular primero se retiro el medio de cultivo del pozo, después se dio un lavado con PBS al 1%, las células se despegaron utilizando 350 μl de Tripsina (Invitrogen), se preparo una dilución 1:10 de la suspensión de células con azul de tripano al 1%, las células se contaron en cámara de Neubauer con ayuda del microscopio (Nikon TMS). El ensayo se realizó por triplicado.

Para evaluar el efecto, de la sobre-expresión de *gas1* y el silenciamiento de PTEN de forma simultanea sobre la viabilidad celular, se sembraron se sembraron 5×10^4 células por pozo en caja de 24 pozos, 24 hrs posteriores se transfectaron con 0.8 μg del plásmido pAdTrack-CMV/*gas1* más 20 pmol de siRNA-PTEN con 3.0 μl de lipofectamina en 100 μl de OptiMEM, los complejos fueron agregados a las células y posteriormente se incubaron a 37°C/6hrs, al finalizar este tiempo se

cambio el medio, dejando las células en incubación por 24 hrs adicionales. Para la determinación de la viabilidad celular primero se retiro el medio de cultivo del pozo, después se dio un lavado con PBS al 1%, las células se despegaron utilizando 350µl de Tripsina, se preparo una dilución 1:10 de la suspensión de células con azul de tripano al 1%, las células se contaron en cámara de Neubauer con ayuda del microscopio (Nikon TMS). El ensayo se realizó por triplicado.

RESULTADOS

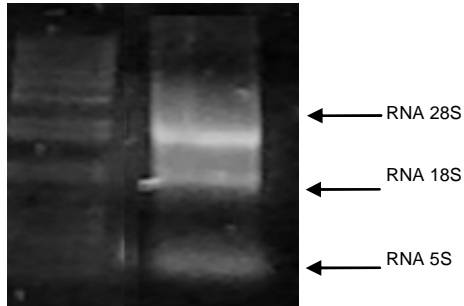
Debido a que las células SH-SY5Y cuentan con los componentes de la vía de señalización GDNF/ GFR/ RET, (Cabrera et al., 2006 / López Ramírez et al., 2008) , con el gen de *pten* wt (que presenta mutaciones) lo que resulta en la generación de una proteína funcional (J. Muñoz et al., 2004) y que no expresa la proteína de Gas1 en condiciones de proliferación, se procedió a determinar el estado inicial del mRNA sólo para *gas1* y *pten*, así como el estado inicial de las proteínas sólo de Gas1, PTEN y AKT en condiciones de proliferación.

Caracterización molecular de las células SH-SY5Y en condiciones basales

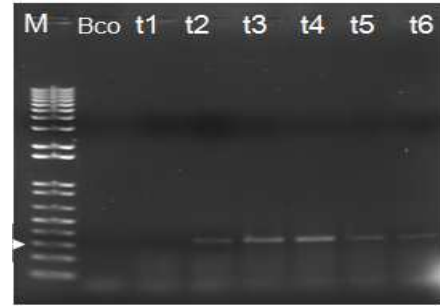
Debido a que en nuestro laboratorio es la primera vez que se trabaja con el gen de *pten*, fue necesario diseñar los oligos para amplificar una región del gen lo que nos permitió identificarlo en las células. Como primer instancia se diseñó un programa para PCR con gradiente de temperaturas, para poder determinar las condiciones óptimas de alineación de los oligos de *pten*, las temperaturas fueron; t1 = 44.0° C / t2=45.3° C, / t3=46.9° C, / t4=50.4° C /, t5=52.7° C / t6=54.1° C, de estas, la t4 fue la que mostró una mejor amplificación, con base en esto se diseñó el programa para PCR para amplificar una región del gen de *pten* humano. Esto se muestra en la Figura 13a, 13b.

Una vez que se obtuvieron las condiciones óptimas de alineación, se procedió a extraer el RNA de células en proliferación, realizar la RT-PCR y mediante PCR buscar la presencia del mRNA de *pten*, esto se muestra en la figura 13, también se realizó la PCR para *gas1*, sin embargo el mRNA de *gas1*, no fue detectado, lo cual es correcto por que *gas1* no se expresa en condiciones de proliferación en las células SH-SY5Y. (Del Sal et al., 1992 / López Ramírez et al., 2008 / J Muñoz et al., 2004)

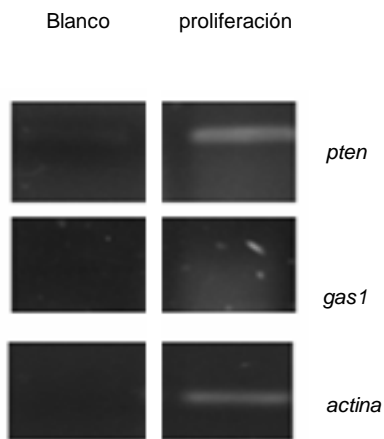
SH-SY5Y
 Marcador en proliferación



a) Electroforesis del producto extracción de RNA de RNA de células SH-SY5Y en proliferación se observan las subunidades 28S, 18S y 5S.



b) Electroforesis en gel de agarosa al 1% de los productos de PCR, utilizando un gradiente de temperaturas para encontrar la temperatura óptima de alineación de los oligos de *pten*.



c) Expresión de *pten*, determinado por RT-PCR en células SH-SY5Y en condiciones de proliferación.

Figura 13. Caracterización de células SH-SY5Y en proliferación. En a) se observan las 3 subunidades del RNA de células SH-SY5Y en condiciones de proliferación, con el cual se realizó la RT-PCR. b) Gradiente de temperaturas para definir la temperatura óptima de alineación para PCR con los oligos de *pten*, c) expresión de *pten* en SH-SY5Y en condiciones de proliferación, *gas1* no se expresa en estas condiciones, se muestra actina como control positivo, como control negativo no se colocó muestra de DNA.

En condiciones de proliferación, se detectó la proteína de PTEN y AKT, no así a Gas1 (Figura 14), ya que como se mostró en la Figura 13 en estas condiciones no se encontró el mensajero de *gas1*, por lo cual era de esperarse que no se encontrara la proteína. Como control del wester blot (WB) se utilizo la proteína de Gas1 Recombinate como control positivo de la detección de Gas1.

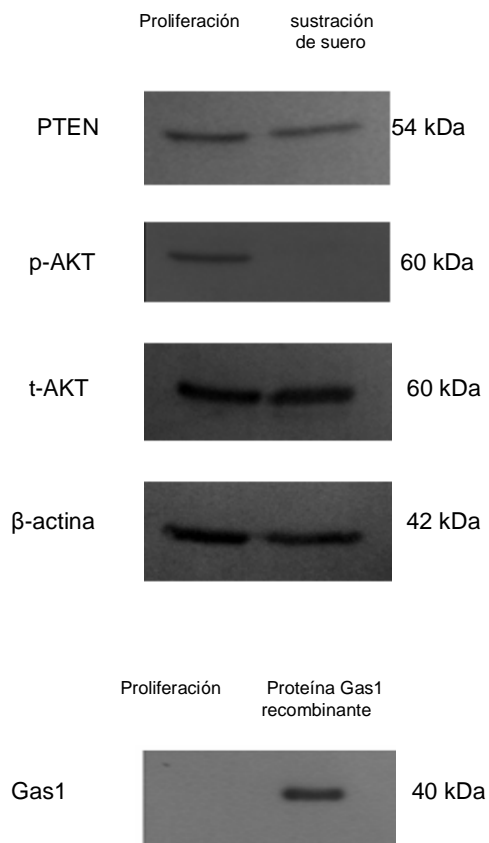


Figura 14. Caracterización de células SH-SY5Y en condiciones de proliferación. Detección de las proteínas PTEN y AKT, en células SH-SY5Y en condiciones de proliferación por Western blot. Se muestra β -actina como control de carga. Gas1 no es expresado en condiciones de proliferación, por lo que se utilizo la proteína de Gas1 Recombinante como control positivo del WB.

Sobre-expresión de *gas1*

Se evaluó la eficiencia de la transfección del vector pAdTrack-CMV/*gas1* mediante la fluorescencia de la GFP. En la Figura 16 se muestran fotos representativas de la transfección.

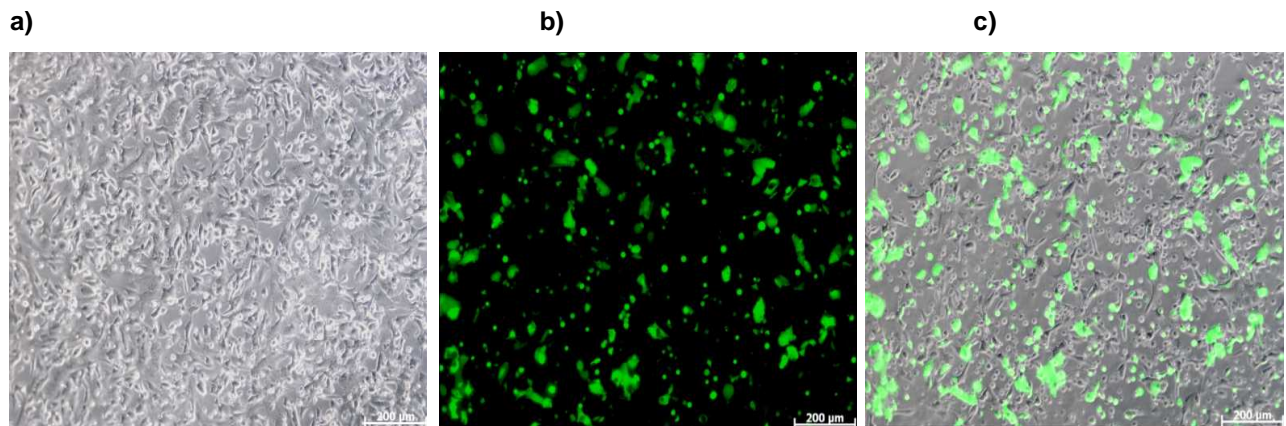


Figura 16. Fotos representativas de la transfección de células SH-SY5Y con pAdTrack-CMV/*gas1*

En a) se observan las células en campo claro, en b) se observa la fluorescencia que indica la transfección con *gas1* y en c) se observa el empalme de a) con b). Fotos tomadas en microscopio Zeiss axion vision D1 con objetivo 10X

Se logró obtener una eficiencia de transfección del 33.5 %, la cual fue suficiente para inducir muerte celular. Con estos resultados se procedió a realizar los ensayos de sobre-expresar a *gas1* para evaluar el efecto de Gas1 sobre la viabilidad celular.

Knockdown de *pten* con siRNA PTEN

Para disminuir la expresión de *pten*, se utilizó un siRNA PTEN (Santa Cruz Biotechnology) con el que se logró reducir hasta en un 68% la expresión, con respecto a las células que no se les trató con el siRNA PTEN. Esto se muestra en la Figura 17. Una vez logrado esto, se procedió a realizar los ensayos de silenciar a *pten* y evaluar el efecto de la ausencia de PTEN sobre la viabilidad celular.

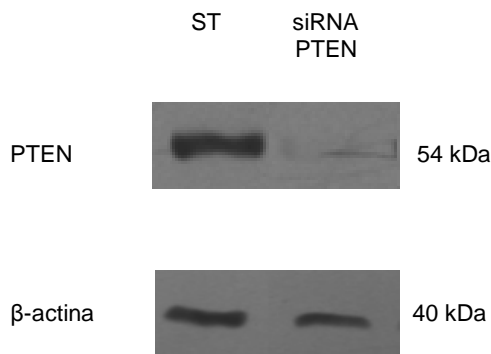


Figura 17. Reducción de la expresión de *pten* determinado por western-blot. En células SH-SY5Y transfectadas con siRNA PTEN, se logró reducir la expresión de *pten* en un 68%, se muestra β -actina como control de carga.

Sobre-expresión de *gas1* y silenciamiento de *pten*

Se sobre-expreso a *gas1* y se silencio a *pten* de forma simultanea, cada cual con su control correspondiente, pAdTrack-CMV y el siRNAControl respectivamente. Se extrajeron las proteínas totales de cada uno de los ensayos con buffer de lisis, se cuantificaron las proteínas y se realizaron western blot con 50 μ g de proteína para identificar a Gas1, PTEN y β -actina. Como se puede observar en la Figura 18, Gas1 se pudo detectar solo en las células que transfectaron con el vector de *gas1*, mientras que PTEN disminuyó solo en las células que se transfectaron con el siRNA PTEN. Esto nos indica que las trasnfecciones se realizaron de manera exitosa.

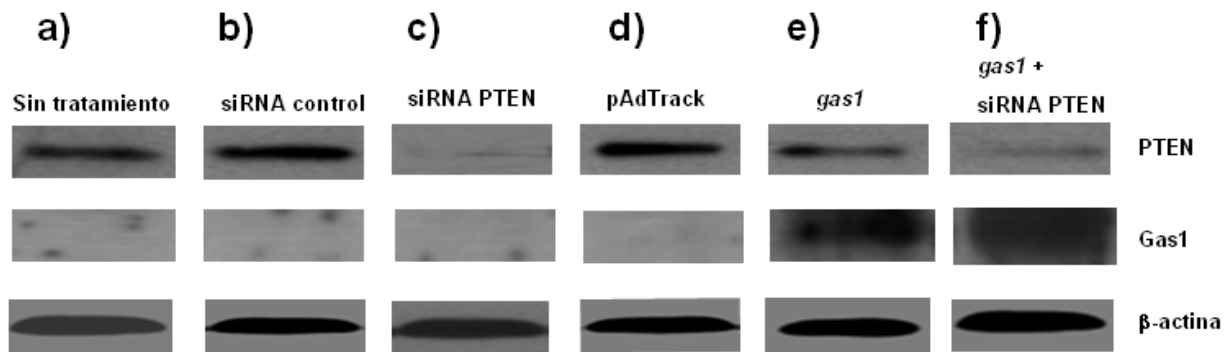


Figura 18. Efecto de sobre-expresión de *gas1* y silenciamiento de *pten* en células SH-SY5Y. Células SH-SY5Y en condiciones de proliferación, fueron sometidas a diferentes tratamientos, se muestran los WB de; a) Células que no recibieron ningún tratamiento, b) Células que fueron transfectadas con siRNA Control como control del silenciamiento de *pten*, c) Células que fueron transfectadas con siRNA PTEN para silenciar a *pten*, d) Células que fueron transfectadas con el vector pAdTrack como control de la sobre-expresión de *gas1*, e) Células que fueron transfectadas con vector pAdTrack-CMV/*gas1* para sobre-expresar a *gas1*, f) Células cotransfectadas con pAdTrack-CMV/*gas1* más siRNA PTEN para sobre-expresar a *gas1* y silenciar a *pten* de forma simultánea..

Como se observa en la Figura 18 se logró sobre-expresar a *gas1* y silenciar a *pten*, de tal forma que ahora entonces podríamos, estudiar el efecto de sobre-expresar a *gas1* sobre la viabilidad celular en un modelo con y sin PTEN gracias a la ayuda del siRNA PTEN.

Efecto de Gas1 en presencia de PTEN sobre la viabilidad celular

Para determinar la posible cooperación funcional de Gas1 y PTEN en la disminución de la viabilidad, se realizaron experimentos para evaluar el efecto de Gas1 cuando PTEN está presente y cuando no lo está. Se definieron dos tiempos de evaluación de efecto siendo el primero a 24 hrs y el segundo a 48 hrs posteriores a la transfección correspondiente. Los ensayos se realizaron por triplicado para cada experimento, se realizó un análisis estadístico de anova post-tukey utilizando el programa GradPad Prisma, estos resultados se graficaron y se presentan en las gráficas 1 y 2.

Teniendo en consideración que las células SH-SY5Y cuentan con un PTEN wt y que no sobre-expresan a Gas1 en condiciones de proliferación, se diseñó el primer experimento en el cual únicamente se sobre-expresó a *gas1*. 24 y 48 hrs posteriores se determinó el efecto de Gas1 sobre la viabilidad celular. El efecto observado fue significativamente diferente al de todos los grupos, ya que Gas1 fue capaz de reducir la viabilidad celular en casi un 47% respecto al grupo que no recibió tratamiento, un 32 % respecto al grupo en el que se silenció a PTEN, y en un 47 % respecto al grupo donde se sobre-expresó a *gas1* y se silenció a *pten* de forma simultánea. (ver gráficas 1 y 2)

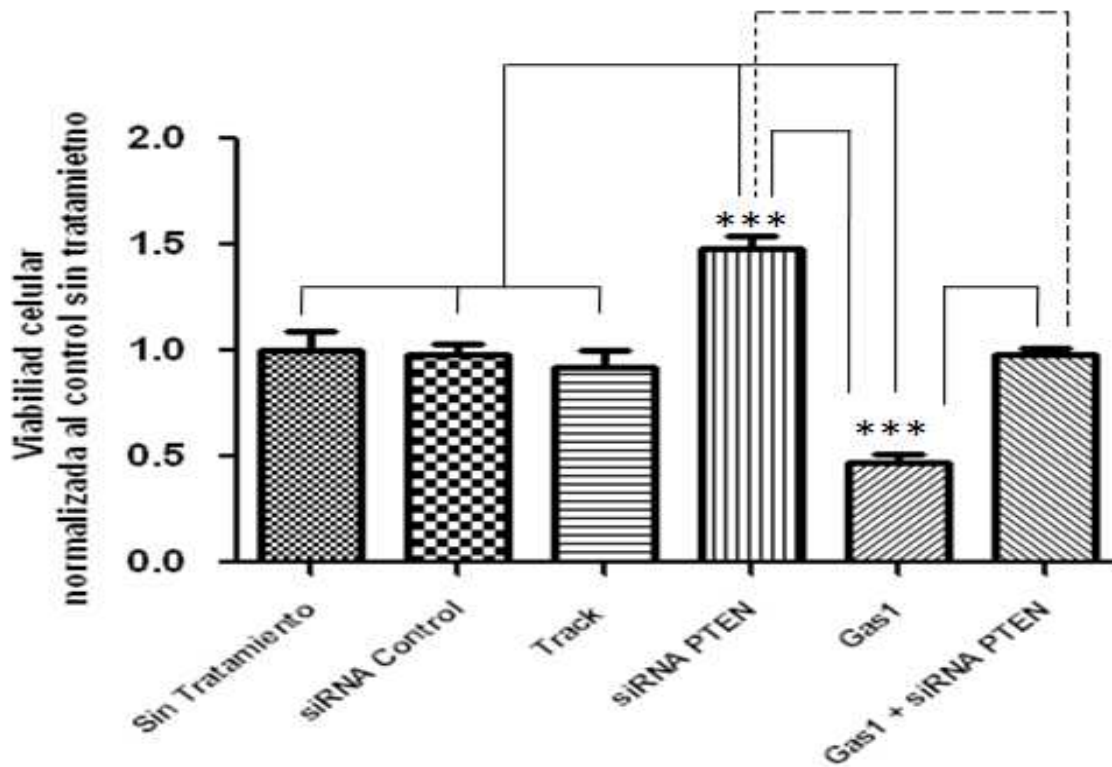
Efecto de Gas1 en ausencia de PTEN sobre la viabilidad celular

Para evaluar el efecto de Gas1 en ausencia de PTEN se diseñó el segundo experimento que consistió en silenciar a *pten* así como evaluar su efecto sobre la viabilidad celular. El efecto del silenciamiento de *pten* propició un aumento en la proliferación celular del 48% más que el grupo que no recibió tratamiento, que fue significativamente diferente a todos los demás grupos. (Gráfica 1 y 2).

El tercer experimento consistió en sobre-expresar a *gas1* y de forma conjunta silenciar a *pten*: El efecto de Gas1 en ausencia de PTEN en la viabilidad celular nos permitió observar como Gas1 es capaz de disminuir la viabilidad celular casi al mismo nivel respecto al grupo control que no recibió tratamiento ya que la falta de PTEN disminuye la función de Gas1. Este grupo tuvo diferencias significativas con respecto al grupo donde sólo se sobre-expresó a *gas1* y respecto al grupo donde sólo se silenció a *pten*, pero no hubo diferencias significativas respecto al grupo que no recibió tratamiento.

Con estos resultados fue posible confirmar la hipótesis que teníamos de que Gas1 coopera con PTEN para disminuir la viabilidad celular. Ya que Gas1 tiene un efecto mayor sobre la disminución en la viabilidad celular cuando coopera con PTEN respecto a cuando no está PTEN.

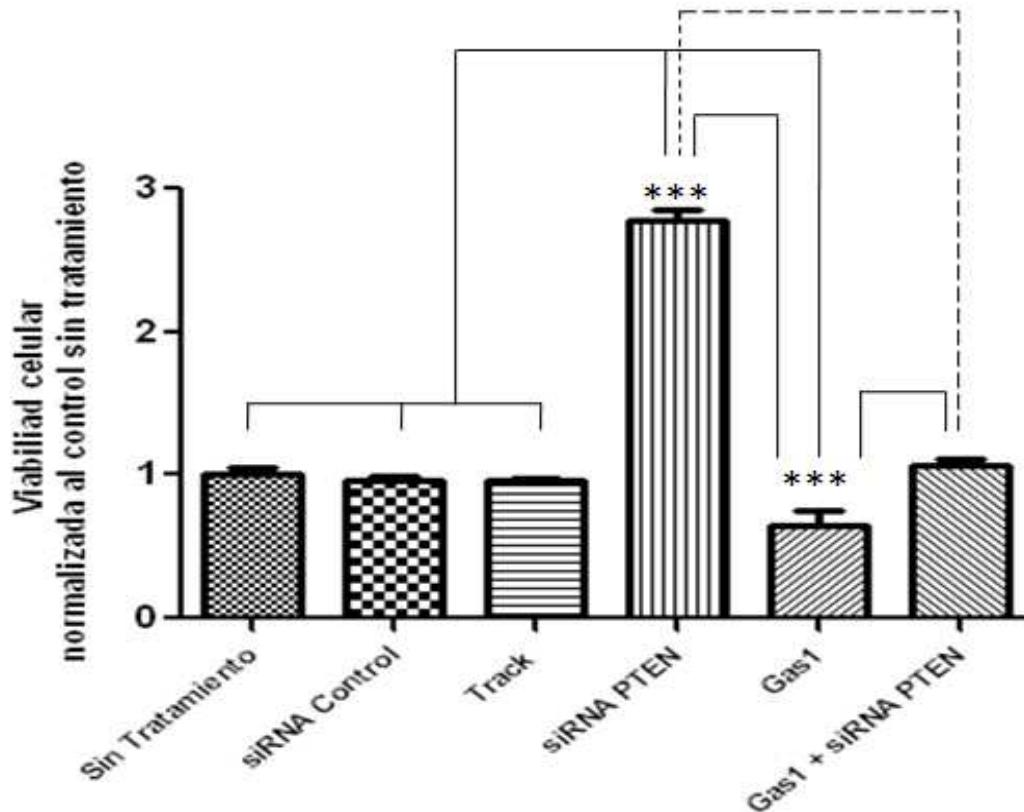
Viabilidad celular 24 Hrs



Grafica 1. Efecto de cooperación de Gas1 con PTEN sobre la disminución en la viabilidad celular.

Gas1 coopera con PTEN para disminuir la viabilidad celular en células SH-SY5Y. Las células que no recibieron tratamiento no muestran diferencias significativas respecto a las células con siRNA Control y Track. También se puede observar que la disminución en la viabilidad celular de las células que expresan *gas1* y *pten* funcional (Gas1) es mayor en comparación con las células que sobre-expresan a *gas1* en ausencia de PTEN (Gas1 + siRNA PTEN). Por otro lado, tanto las células que tienen disminuida la expresión de *pten* (siRNA PTEN) como las que sobre-expresan a *gas1* (Gas1) muestran una diferencia significativa con todos los grupos. El grupo donde simultáneamente se sobre-expresó a *gas1* y se disminuyó la expresión de *pten* (Gas1 + siRNA PTEN) muestra una diferencia significativa respecto a las células que expresan *gas1* (Gas1), pero no muestran diferencia significativa respecto a las células que no recibieron tratamiento. La viabilidad celular fue determinada con la técnica de azul de tripano, 24 hrs después de las transfecciones correspondientes. Los datos fueron analizados utilizando un programa de estadística de anova y turkey.

Viabilidad celular 48 Hrs



Grafica 2. Efecto de cooperación de Gas1 con PTEN sobre la disminución en la viabilidad celular.

Gas1 coopera con PTEN para disminuir la viabilidad celular en células SH-SY5Y. Se observa que el efecto de Gas1 es semejante al observado en los ensayos a 24 hrs. Las células que no recibieron tratamiento no muestran diferencias significativas respecto a las células con siRNA Control y Track. También se puede observar que la disminución en la viabilidad celular de las células que expresan *gas1* y *pten* funcional (Gas1) es mayor en comparación con las células que sobre-expresan a *gas1* en ausencia de PTEN (Gas1 + siRNA PTEN). Por otro lado, tanto las células que tienen disminuida la expresión de *pten* (siRNA PTEN) como las que sobre-expresan a *gas1* (Gas1) muestran una diferencia significativa con todos los grupos. El grupo donde simultáneamente se sobre-expresó a *gas1* y se disminuyó la expresión de *pten* (Gas1 + siRNA PTEN) muestra una diferencia significativo respecto a las células que expresan *gas1* (Gas1), pero no muestran diferencia significativa respecto a las células que no recibieron tratamiento. La viabilidad celular fue determinada con la técnica de azul de tripano, 24 hrs después de las transfecciones correspondientes. Los datos fueron analizados utilizando un programa de estadística de anova y turkey.

DISCUSIÓN

El cáncer se ha convertido en una pandemia, quizás la mayor en la historia de la humanidad. Actualmente, las cifras reportadas por organizaciones internacionales como la OMS indican que en 2005 murieron de cáncer 7,6 millones de personas y en los próximos 10 años, si no se toma ninguna medida, morirán otros 84 millones. En México como en otros países se realizan investigaciones con el fin de aportar mas información que ayude a encontrar la solución a este problema de salud a nivel mundial. En nuestro laboratorio se trabaja con Gas1 que es una proteína que tiene la propiedad de detener el ciclo celular llevando las células a arresto y a procesos de apoptosis; sin embargo, aún existen aspectos de la actividad de Gas1 que deben conocerse mejor antes de pasar al siguiente nivel y diseñar fármacos o terapias génicas que sean capaces de detener el crecimiento descontrolado de las células cancerosas.

La terapia génica ofrece una posibilidad para desarrollar terapias específicas y efectivas. El objetivo principal de la terapia génica en enfermedades como el cáncer es la destrucción de las células malignas.

Uno de los genes de interés para el uso de terapias génicas es *gas1*, ya que puede detener la proliferación celular y llevar a las células a procesos de apoptosis. Hasta el momento se sabe que el mecanismo que utiliza Gas1 en las células SH-SY5Y es por la vía de GDNF/GFR/AKT, ya que como sabemos, Gas1 tiene una alta similitud estructural con los receptores GFR α (Schueler-Furman et al., 2006) lo que le permite reducir la fosforilación de la tirosina 1062 de RET, disminuyendo la activación de AKT, y llevando por tanto a las células a procesos de arresto y muerte (López-Ramírez et al., 2008).

Las células SH-SY5Y derivadas de un neuroblastoma humano que fueron usadas en este trabajo no expresan *gas1* de forma endógena. Pero si expresan *pten* funcional, el cual de cierta forma ayuda a disminuir la activación de AKT, ya que PTEN antagoniza la función de PI3K.

La PI3K transforma el PIP2 de la membrana citoplasmática en PIP3, mismo que es esencial para el reclutamiento de AKT a la membrana, esto permite que PDK1 y PDK2 activen a AKT para que pueda realizar su función en procesos relacionados a la supervivencia.

Por su parte PTEN actúa de forma antagónica a PI3K, ya que su función como fosfatasa para lípidos le permite transformar el PIP3 en PIP2, disminuyendo así la activación de AKT.

Tanto Gas1 como PTEN convergen sobre la misma cascada de señalización ya que ambas proteínas influyen sobre la activación de AKT, solo que Gas1 actúa río arriba y PTEN río abajo. Así es como surge la hipótesis de que Gas1 coopera con PTEN para poder ejercer su efecto sobre la disminución de la viabilidad celular en células cancerosas.

Para evaluar esta hipótesis nosotros diseñamos experimentos con la línea celular SH-SY5Y (neuroblastoma humano) la cual cuenta con características esenciales para lograr el objetivo de este trabajo; no expresa *gas1* en condiciones de proliferación, cuenta con los integrantes de la vía GDNF/GFR/RET y expresa un *pten* funcional endógeno.

Es importante enfatizar que estas células no expresan *gas1* de forma endógena en condiciones de proliferación, por ello se utilizó un vector previamente construido en el laboratorio que expresa a Gas1 junto con la GFP, lo que permite observar la eficiencia de la transfección del vector.

En la primer etapa se evaluó el efecto de la sobre expresión de *gas1* sobre la viabilidad celular en presencia de un PTEN wt. En el siguiente paso se midió el efecto de Gas1 cuando PTEN no está presente, silenciándolo con el uso de un siRNA para reducir la expresión de PTEN. A pesar de que el silenciamiento de PTEN fue de un 68%, los resultados obtenidos fueron satisfactorios. Finalmente se evaluó el efecto de la sobre expresión de *gas1* de forma conjunta con el silenciamiento de PTEN sobre la viabilidad celular.

Como resultados de los experimentos se observó una disminución de la viabilidad celular cuando *gas1* fue sobrepresado respecto al grupo que no recibió tratamiento ya que Gas1 logra matar a un gran número de células.

Cuando solo se silenció a PTEN, la viabilidad celular se incrementó notablemente con respecto al grupo control, corroborando que PTEN funciona como un freno para AKT.

Sin embargo, cuando de forma simultánea se sobre expresó a *gas1* y se silenció a PTEN, el efecto observado en la viabilidad celular fue casi al mismo nivel que el grupo control, una posible razón de este comportamiento es que Gas1 puede contrarrestar la deficiencia de PTEN. Es decir, que aunque no este PTEN, Gas1 no permite que las células proliferen más que el grupo control. Otro punto importante fue el hecho de que aún cuando solo se obtuvo un 33.5% de eficiencia de transfección de *gas1*, este fue suficiente para generar un efecto terapéutico capaz de disminuir la viabilidad celular contrarrestando la falta de PTEN.

En todos los experimentos el efecto generado por Gas1 fue significativo, poniendo en evidencia que Gas1 coopera con PTEN para generar una disminución en la viabilidad celular. Esto nos da herramientas para poder continuar con las investigaciones para el diseño de terapias génicas contra enfermedades como el cáncer.

Como perspectiva, proponemos el investigar si el efecto de *gas1* observado en este trabajo, se puede observar en un modelo celular que no cuente con un PTEN wt, para eliminar por completo la participación de PTEN.

CONCLUSIÓN

De acuerdo a los ensayos realizados en este trabajo fue posible observar que Gas1 coopera con PTEN de forma positiva para decrementar la viabilidad celular, ya que Gas1 genera una mayor muerte celular cuando esta presente PTEN respecto a cuando se silencio a PTEN.

También se logro observar que Gas1 puede contrarrestar la ausencia de PTEN llevando la viabilidad celular a niveles comparables con el grupo control frenando el aumento en la viabilidad celular descontrolada causa por la ausencia de PTEN.

REFERENCIAS

- Airaksinen MS, Saarma M. The GDNF family: signalling, biological functions and therapeutic value. *Nat Rev Neurosci* 2002;3(5):383-94.
- Allen BL, Tenzen T, McMahon AP. The Hedgehog-binding proteins Gas1 and Cdo cooperate to positively regulate Shh signaling during mouse development. *Genes Dev* 2007 15;21(10):1244-57.
- Benitez JA, Arregui L, Vergara P, Segovia J. Targeted-simultaneous expression of Gas1 and p53 using a bicistronic adenoviral vector in gliomas. *Cancer Gene Ther* 2007;14(10):836-46.
- Benítez JA, Domínguez-Monzón G, Segovia J. Conventional and gene therapy strategies for the treatment of brain tumors. *Curr Med Chem* 2008;15(8):729-42.
- Biología- Sexta Edición en español. Helena Curtis, N. Sue Barnes. <http://preujct.cl/biologia/curtis/inicio.htm>
- Boulay A, Breuleux M, Stephan C, Fux C, Brisken C, Fiche M, Wartmann M, Stumm M, Lane HA, Hynes NE. The Ret receptor tybreast cancer. *Cancer Res* 2008 15;68(10):3743-51.
- Brandan ME, Villaseñor Y. Detección del Cáncer de Mama: Estado de la Mamografía en México. *Cancerología 1* (2006): 147-162.
- Cabrera R, Sanchez-Pulido L, Rojas AM, Valencia A, Mañes S, Naranjo JR, Mellström B. Gas1 is related to the glial cell-derived neurotrophic factor family receptors and regulates Ret signaling. *J Biol Chem* 2006 19;281(20):14330-9. 48
- Cancer Facts & Fig. 2008.
- Cobourne MT, Miletich I, Sharpe PT. Restriction of sonic hedgehog signalling during early tooth development. *Development* 2004;131(12):2875-85.
- Del Sal G, Ruaro ME, Philipson L, Schneider C. The growth arrest specific gene, gas1, is involved igrowth suppression. *Cell* 1992 21;70(4):595-607.
- Domínguez-Monzón G, Benítez JA, Vergara P, Lorenzana R, Segovia J. Gas1 inhibits cell proliferation and induces apoptosis of human primary gliomas in the absence of Shh. *Int J Dev Neurosci* 2009;27(4):305-13.
- Essegir S, Todd SK, Hunt T, Poulsom R, Plaza-Menacho I, Reis-Filho JS, Isacke CM. A Role for glial cell-derived neurotrophic factor-induced expression by inflammatory cytokines and RET/GFRa1 receptor up-regulation in breast cancer. *Cancer Res* 2007 15;67(24):11732-41.

- Evdokiou A, Cowled PA. Tumor-suppressive activity of the growth arrest-specific gene gas1 in human tumor cell lines. *Int J Cancer* 1998 9;75(4):568-77.
- Evdokiou A, Webb GC, Peters GB, Dobrovic A, O'Keefe DS, Forbes IJ, Cowled PA. Localization of the human growth arrest-specific gene (GAS1) to chromosome bands 9q21.3-q22, a region frequently deleted in myeloid malignancies. *Genomics* 1993;18(3):731-3.
- George L. Mutter. PTEN, a Protean Tumor Suppressor. *American Journal of Pathology, Vol. 158, No. 6, June 2001*
- Gobeil S, Zhu X, Doillon CJ, Green MR. A genome-wide shRNA screen identifies GAS1 as a novel melanoma metastasis suppressor gene. *Genes Dev* 2008 1;22(21):2932-40.
- Harrison´s Principles of Internal Medicine.17th Ed. <http://www.accessmedicine.com>
- Igor Vivanco and Charles L. Sawyers. The Phosphatidylinositol 3-Kinase–Akt Pathway In Human Cancer. *Nature Reviews | Cancer Volume 2 | July 2002 | 489*
- Incidencia y mortalidad de cáncer mundial <http://globocan.iarc.fr/factsheets/cancers/all.asp>
- Jiménez Hernández Adriana. Tesis de maestría. Determinación del efecto de Growth arrest specific1 (Gas1) sobre la proliferación y supervivencia de líneas celulares de cáncer de mama y próstata Cinvestav Zacatenco, 2009
- Jing Li, *et al.* PTEN, a Putative Protein Tyrosine Phosphatase Gene Mutated in Human Brain, Breast, and Prostate Cancer. *Science* 275, pp 1943,1997
- Jing Zhou and Luis F. Parada. A motor driving PTEN. *Nature cell biology Volume 11 | Number 10 | October 2009.*
- Jorge Muñoz, Paula Lázcoz, Mariía del Mar Inda, Manuel Nistal, Angel Pestaña, Ignacio J. Encio and Javier s. Castresana. Homozygous deletion and expression of PTEN and DMBT1 in human primary neuroblastoma and cell lines. *Int. J. Cancer: 109, 673–679 (2004)*
- Lee CS, Buttitta L, Fan CM. Evidence that the WNT-inducible growth arrest-specific gene 1 encodes an antagonist of sonic hedgehog signaling in the somite. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001 25;98(20):11347-52. (b).
- Lee CS, May NR, Fan CM. Transdifferentiation of the ventral retinal pigmented epithelium to neural retina in the growth arrest specific gene 1 mutant. *Dev Biol* 2001 1;236(1):17-29. (a).
- Liu Y, May NR, Fan CM. Growth Arrest Specific Gene 1 Is a Positive Growth Regulator for the Cerebellum. *Dev Biol* 2001 1;236(1):30-45.

- López-Ramírez M.A, Domínguez-Monzón G, Vergara P, Segovia J. Gas1 reduces Ret tyrosine 1062 phosphorylation and alters GDNF-mediated intracellular signaling. *Int J Dev Neurosci* 2008;26(5):497-503.
- Martinelli DC, Fan CM. Gas1 extends the range of Hedgehog action by facilitating its signaling. *Genes Dev* 2007 15;21(10):1231-43.
- Pollard & Earnshaw/Cell Biology 2^a Ed, Saunders.
- Rochlitz CF. Gene therapy of cancer. *Swiss Med Wkly* 2001 12;131(1-2):4-9.
- Ruaro ME, Stebel M, Vatta P, Marzinotto S, Schneider C. Analysis of the domain requirement in Gas1 growth suppressing activity. *FEBS Lett* 2000 15;481(2):159-63.
- Sarah M. Planchon, Kristin A. Waite and Charis Eng. The nuclear affairs of PTEN. *Journal of Cell Science* 121, 249-253 Published by The Company of Biologists 2008
- Sariola H , Saarma M. Novel functions and signalling pathways for GDNF. *J Cell Sci* 2003 1;116(Pt 19):3855-62.
- Schneider C, King RM, Philipson L. Genes specifically expressed at growth arrest of mammalian cells. *Cell* 1988 9;54(6):787-93.
- Schueler-Furman O, Glick E, Segovia J, Linial M. Is GAS1 a co-receptor for the GDNF family of ligands? *Trends Pharmacol Sci* 2006;27(2):72-7.
- Stebel M, Vatta P, Ruaro ME, Del Sal G, Parton RG, Schneider C. The growth suppressing gas1 product is a GPI-linked protein. *FEBS Lett* 2000 15;481(2):152-8.
- Zamorano A, Lamas M, Vergara P, Naranjo JR, Segovia J. Transcriptionally mediated gene targeting of gas1 to glioma cells elicits growth arrest and apoptosis. *J Neurosci Res* 2003 15;71(2):256-63.
- Zhao L, Pan Y, Gang Y, Wang H, Jin H, Tie J, Xia L, Zhang Y, He L, Yao L, Qiao T, Li T, Liu Z, Fan D. Identification of GAS1 as an epirubicin resistance-related gene in human gastric cancer cells with a partially randomized small interfering RNA library. *Biol Chem* 2009 25;284(39):26273-85.

FIRMAS

Director de Tesis:

Dr. José Segovia Vila.

Investigador titular del departamento de
Fisiología Biofísica y Neurociencias
del CINVESTAV-IPN

Comité tutorial.

Dr. José Antonio Terrón Sierra

Investigador titular del departamento de
Farmacología del CINVESTAV-IPN.

Dr. Ranier Gutiérrez Mendoza

Investigador titular del departamento de
Farmacología del CINVESTAV-IPN.