



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
UNIDAD ZACATENCO
DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA, BIOFÍSICA Y NEUROCIENCIAS

Mecanismos moleculares del arresto celular inducido por GAS1

TESIS

Que presenta

M. en C. GILBERTO PÉREZ SÁNCHEZ

Para obtener el grado de

DOCTOR EN CIENCIAS

EN LA ESPECIALIDAD DE

NEUROBIOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR

Director de tesis

DR. JOSÉ SEGOVIA VILA

Ciudad de México

AGOSTO 2018

Agradecimientos

Al Dr. José Segovia, por permitirme formar parte de su grupo de investigación, por la confianza depositada en mí para este proyecto.

Al Dr. Fidel de la Cruz y la Dra. Febe Cázares, por su valiosa asesoría.

Al Dr. Guillermo Mendoza (Q.E.P.D.), quien con su experiencia en el área en espectrometría de masas, contribuyó de manera sustancial al presente trabajo.

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) el apoyo económico brindado para este proyecto (Convenio No. 239516), así como la beca doctoral otorgada durante mi estancia doctoral (Convenio No. 309142).

Dedicatoria

Con mucho cariño, dedico esta tesis a mis padres.

CONTENIDO

RESUMEN	5
ABSTRACT	6
INTRODUCCIÓN	7
Quiescencia celular	7
Gas1, una proteína de arresto celular	7
Pleiotropismo de Gas1	8
Gas1 y su rol en la supresión de tumores	9
Expresión de Gas1 durante el desarrollo y etapa adulta	11
Bases moleculares en los roles de Gas1	12
Gas1 y Shh durante la proliferación y diferenciación	12
Gas1 y GDNF durante la apoptosis	13
Efectos de Gas1 en gliomas	16
Gas1 y p53	17
JUSTIFICACIÓN	19
HIPÓTESIS	20
OBJETIVO GENERAL	21
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	21
MÉTODOLOGÍA	22
Cultivo celular	22
Recolección de células	22
Ensayo de viabilidad celular	23
Perfiles proteómicos por electroforesis bidimensional (E-2D)	23
Extracción de proteínas	23
Cuantificación de proteínas	24
Isoelectroenfoque (Primera dimensión)	24
SDS-PAGE (Segunda dimensión)	24
Espectrometría de masas	25
Identificación de proteínas	26
Extracción de ARN	26

PCR cuantitativa o PCR en tiempo real (RT-qPCR)	27
Obtención de clonas NIH3T3 con expresión inducible de GAS1.....	29
Ensayos de proliferación con las clonas NIH3T3-iGAS1	32
Inmunodetección por Western Blot.....	32
Validación funcional de los efectos de GAS1	35
RESULTADOS	36
Spots proteicos diferenciales entre Pro/NIH3T3 y PS/NIH3T3.....	36
Identificación de proteínas por espectrometría de masas (ESI-LC-MS/MS)	38
Regulación a la alta de Anxa1, Anxa2, eEf3f y Dyrk1B por privación de suero en células NIH3T3 (PS/NIH3T3)	60
Inhibición de la proliferación en las clonas NIH3T3-iGAS1 por la sobreexpresión de GAS1.....	62
Regulación a la alta de Anxa1, Anxa2 y Dyrk1B inducida por GAS1	64
Validación funcional de la relación GAS1-Dyrk1B	66
DISCUSIÓN	68
Spots diferenciales en células PS/NIH3T3	68
Identificación por espectrometría de masas	69
Validación de la expresión diferencial	69
Arresto celular inducido por GAS1.....	70
Validación funcional GAS1-Dyrk1B	71
GAS1 y Anxa1	71
GAS1 y Anxa2	72
GAS1 y Ncl.....	73
GAS1 y Dyrk1B.....	73
CONCLUSIÓN	76
PERSPECTIVAS.....	77
BIBLIOGRAFÍA	78

RESUMEN

GAS1 es una proteína pleiotrópica que ha sido ampliamente investigada debido a su capacidad para inducir proliferación, arresto celular, y apoptosis, dependiendo del contexto celular o fisiológico en el que se exprese. A la fecha, se cuenta con información acerca de los mecanismos por los cuales GAS1 induce proliferación y apoptosis; pero muy pocos estudios se han enfocado en elucidar los mecanismos por los cuales GAS1 induce arresto celular. Con el objetivo de ampliar el conocimiento sobre los mecanismos que GAS1 ejerce para inducir arresto celular, este trabajo se enfocó en la búsqueda de proteínas que fueran diferencialmente expresadas en células NIH3T3 arrestadas por la privación de suero, usando como testigo células NIH3T3 en proliferación. Ésta búsqueda se realizó a través de la obtención de perfiles proteómicos en geles bidimensionales y la posterior identificación de proteínas diferenciales por espectrometría de masas. Como resultado, se lograron identificar 17 proteínas diferencialmente expresadas en células NIH3T3 en arresto celular. Entre estas 17 proteínas, se encontró que la anexina A1, Anexina A2, la cinasa Dyrk1B (*dual specificity tyrosine-phosphorylation-regulated kinase 1B*), y el factor iniciador de la traducción elf3f (*eukaryotic translation initiation factor 3f*) se encontraban reguladas a la alta a nivel transcripcional con respecto a las células testigo en proliferación. Además, se demostró que la anexina A1, anexina A2 y Dyrk1B también fueron reguladas a la alta tanto a nivel transcripcional como traduccional cuando se indujo la sobreexpresión de GAS1 en las células NIH3T3. Por lo tanto, en el presente trabajo se demostró que GAS1 induce la regulación a la alta de Anexina A1, Anexina A2 y Dyrk1B, al mismo tiempo que induce el arresto de las células NIH3T3, resultados que sugieren una estrecha relación funcional de estas proteínas con GAS1 durante el arresto celular. Finalmente se demostró, que Dyrk1B colabora con GAS1 para inducir el arresto celular y para mantener la viabilidad celular durante el arresto.

ABSTRACT

GAS1 is a pleiotropic protein that has been investigated because of its ability to induce cell proliferation, cell arrest, and apoptosis, depending on the cellular or the physiological context in which it is expressed. At this point, we have information about the molecular mechanisms by which GAS1 induces proliferation and apoptosis; but very few studies have been focused on elucidating the mechanisms by which GAS1 induces cell arrest. With the aim of expanding our knowledge on this subject, we first focused our research on finding proteins that were preferentially expressed in cells arrested by serum deprivation. By using a proteomics approach and mass spectrometry analysis, we identified 17 proteins in the 2-DE protein profile of serum deprived NIH3T3 cells. Among them, Annexin A1 (*Anxa1*), Annexin A2 (*Anxa2*), dual specificity tyrosine-phosphorylation-regulated kinase 1B (*Dyrk1B*) and Eukaryotic translation initiation factor 3, F (*elf3f*) were upregulated at transcriptional level regarding proliferative NIH3T3 cells. Moreover, we demonstrated that *Anxa1*, *Anxa2*, and *Dyrk1B* are upregulated at both the transcriptional and translational levels by the overexpression of GAS1. Thus, our results suggest that the upregulation of *Anxa1*, *Anxa2*, and *Dyrk1B* could be related to the ability of GAS1 to induce cell arrest and maintain cell viability. Finally, we provided further evidence showing that GAS1 through *Dyrk1B* leads not only to the arrest of NIH3T3 cells but also maintains cell viability.

INTRODUCCIÓN

Quiescencia celular

La quiescencia o fase G₀ es una etapa del ciclo celular en la que la célula se mantiene en un estado no-proliferativo o en estado de arresto celular, pero que es reversible, es decir, la célula puede entrar nuevamente al ciclo celular. La programación celular para entrar a la quiescencia incluye no solamente genes involucrados en la regulación del crecimiento y división celular, sino también genes supresores de la apoptosis, supresores de la diferenciación celular y aquellos genes involucrados en la comunicación intercelular. Dos factores que pueden llevar a una célula al estado quiescente, son la falta de nutrientes o falta de factores de crecimiento, y la inhibición por contacto-célula-célula. Existen otros estados de arresto celular que son irreversibles, como son la senescencia y la diferenciación terminal, los cuales a su vez son conducidos por diferentes grupos de genes (Coller et al., 2006).

Gas1, una proteína de arresto celular

La proteína Gas1 (*Growth Arrest Specific 1*) es una proteína que se expresa preferencialmente en células que se encuentran en arresto del ciclo celular, cuando éste es inducido por la privación de suero (Schneider et al., 1988; Manfioletti et al., 1990). El gen que codifica a la proteína Gas1 de ratón (*gas1*) se localiza en el cromosoma 13, en las bandas B3-C2 (Webb et al., 1992); mientras que el gen que codifica a la proteína GAS1 de humano (*GAS1*) se localiza en el brazo cromosómico corto 9q, en las bandas q21.3-q22 (Evdokiou et al., 1993). Dada la especificidad de la expresión del gen Gas1 durante el arresto celular, así como su capacidad para inhibir la síntesis de ADN (Del Sal et al., 1992), y sumado a su localización cromosómica en una región de eliminación en la leucemia mieloide, Gas1 despertó especial interés como “gen supresor de tumores”.

El gen *GAS1* codifica una proteína con una estructura primaria de 345 aminoácidos que contiene un péptido señal en el extremo amino-terminal. Este péptido señal tiene la función de dirigir a la proteína al retículo endoplásmico, en

donde sufre modificaciones pos-traduccionales, que consisten en la eliminación del péptido señal (aminoácidos 1-39), una *N*-glicosilación (asparagina 117) y la adición de una molécula glicosil fosfatidil inositol (GPI) en el extremo carboxilo-terminal (serina 318). La proteína GAS1 tiene un peso molecular aparente de 37 kDa y se encuentra ampliamente distribuida en la cara externa de la membrana celular debido a que la molécula GPI le sirve de ancla a la bicapa lipídica (Stebel et al., 2000), como se describe gráficamente en la Figura 1.

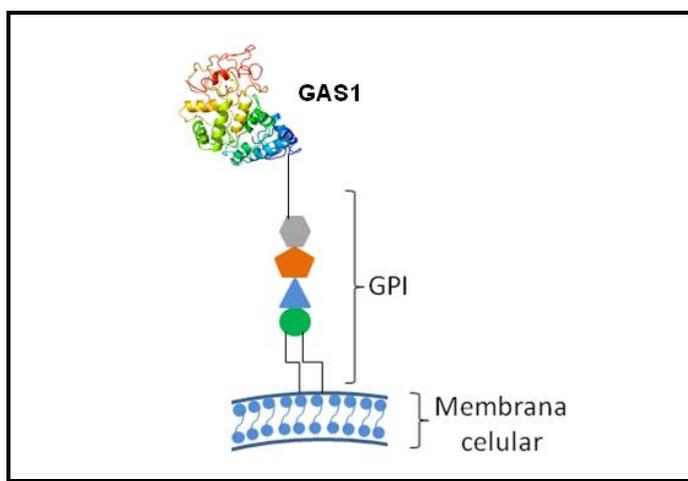


Figura 1. Anclaje de GAS1 a la membrana celular. La proteína GAS1 se localiza en la cara externa de la membrana celular por medio de un anclaje a la bicapa lipídica a través de una molécula GPI (estructura 3D de GAS1 obtenida de *Phyre2 web portal for protein modeling*).

Pleiotropismo de Gas1

Actualmente se sabe que Gas1 es una proteína pleiotrópica, ya que participa en diversos procesos celulares y biológicos (Segovia y Zarco, 2014). Numerosos estudios han demostrado que la sobreexpresión de Gas1 no sólo induce arresto del ciclo celular (Ruaro et al., 2000; Zamorano et al., 2003; Stebel et al., 2000; Evdokiou y Cowled 1998a; Del Sal et al., 1992), sino que también es capaz de inducir apoptosis (Mellstrom et al., 2002; Benitez et al., 2007; Dominguez-Monzon et al., 2009; Zarco et al., 2012) y funcionar como un regulador positivo de la proliferación celular en el cerebelo durante el desarrollo del ratón (Liu et al., 2001)

Gas1 y su rol en la supresión de tumores

Otros estudios, han revelado el papel que juega Gas1 en diversos procesos relacionados con el cáncer, lo que la convierte en una proteína de especial interés en este campo, “como supresora tumoral”. Se sabe que Gas1 tiene la capacidad de suprimir la metástasis (Gobeil et al., 2008) y el crecimiento tumoral (Evdokiou and Cowled, 1998b). En particular, se ha reportado que la proteína GAS1 tiene la capacidad de inhibir el crecimiento de gliomas, a través de la activación de dos mecanismos: arresto celular y apoptosis (Dominguez-Monzon et al., 2009; Lopez-Ornelas et al., 2011; López-Ornelas et al., 2014; Zamorano et al., 2004). Además, recientemente se reportó que GAS1 inhibe el crecimiento tumoral y la angiogénesis en un modelo murino de cáncer de mama (Jiménez et al., 2014).

El reciente estudio de Jiménez et al., (2014) reveló que la actividad anti-tumoral y anti-angiogénica de GAS1 se debe a su capacidad para interrumpir la vía de señalización ARTN/ERK1/2, de una forma no-dependiente de la proteína RET (Jiménez et al., 2014). El efecto anti-tumoral y antiangiogénico de GAS1 se probó en un modelo murino de cáncer de mama, en donde se demostró que la administración directa de lentivirus sobreexpresores de GAS1 en los tumores redujo considerablemente su tamaño (Figura 2A-C). En el mismo modelo, se demostró que el tratamiento con GAS1, a través de la administración de lentivirus, fue capaz de reducir de manera significativa la vascularización de los tumores, la cual fue medida a través del marcador de vascularización VE-caderina (*vascular endothelial cadherin; VE-cadherin*) (Figura 3A-B). Cabe señalar que la proteína GAS1 utilizada en este modelo, corresponde a una forma truncada (tGAS1), de manera que no posee el sitio de glicosilación GPI, lo que evita que se ancle a la membrana celular y por consiguiente se secrete al medio, consiguiendo un efecto parácrino.

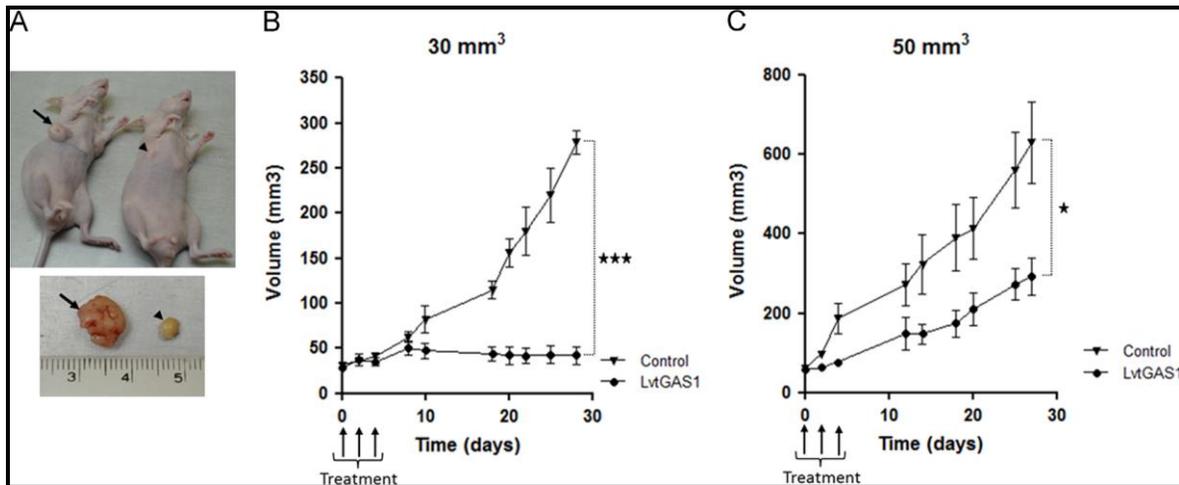


Figura 2. Efecto anti-tumoral de GAS1 en un modelo murino de cáncer de mama. La proteína truncada y secretable de GAS1 (tGAS1) reduce el crecimiento de tumores implantados de células MDA MB 231 en las glándulas mamarias de ratones desnudos (nu/nu). Los tratamientos se realizaron a diferentes estadios de crecimiento del tumor (30 o 50 mm³). A) Imagen representativa de un ratón con tumor mamario tratado con tGAS1 por medio de inoculación directa de lentivirus sobreexpresores de tGAS1 (derecha) y un ratón con tumor mamario como testigo sin tratamiento con tGAS1 (izquierda). En la imagen inferior se muestran los tamaños de los tumores extraídos. B) Efecto antitumoral de tGAS1 (LtGas1) sobre un tumor de 30 mm³. C) Efecto antitumoral de tGAS1 (LtGas1) sobre un tumor de 50 mm³ (tomado de Jiménez et al., 2014).

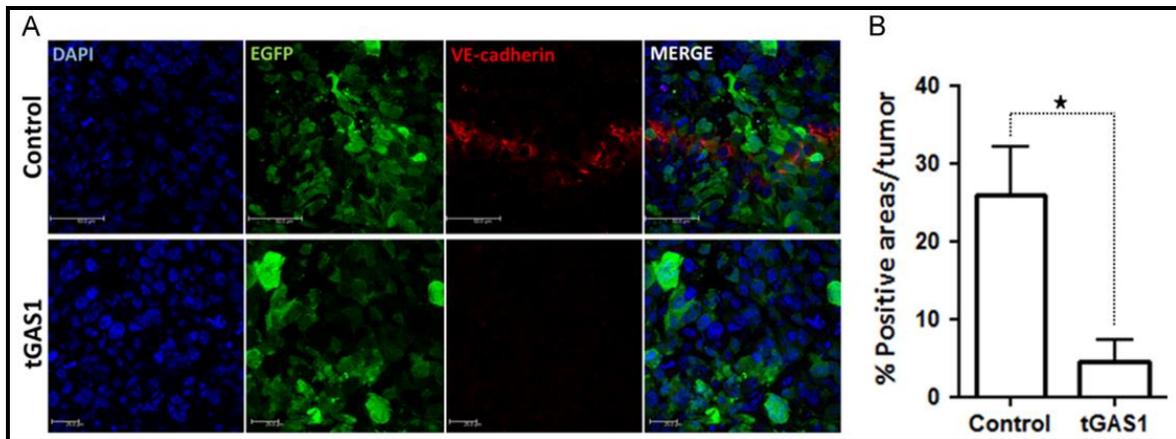


Figura 3. Efecto anti-angiogénico de GAS1. La forma secretable de GAS1, tGAS1, reduce la vascularización de tumores en un modelo murino de cáncer de mama: inyección de lentivirus sobreexpresores de tGAS1. A) Imagen representativa de un ensayo por inmunohistoquímica para detectar VE-cadherina (rojo) en tumores, como marcador de vascularización. B) Porcentaje de áreas positivas para VE-cadherina por tumor. Imágenes de microscopía confocal (tomado de Jiménez et al., 2014).

Expresión de Gas1 durante el desarrollo y etapa adulta

Los patrones de expresión de Gas1 también son ampliamente conocidos a través de diversos trabajos de inmunohistoquímica. Se sabe que Gas1 se expresa en cerebro, corazón, riñón, extremidades, pulmón y gónadas en el embrión de ratón. En los estudios mencionados, se demostró que Gas1 inhibe el crecimiento celular en estadios tempranos del desarrollo embrionario. De igual forma, se ha reportado que Gas1 tiene la capacidad de inducir muerte celular en las regiones interdigitales del feto (Lee et al., 2001).

En contraste, otros estudios han reportado la capacidad de Gas1 para funcionar como un regulador positivo de la proliferación celular en el cerebelo durante el desarrollo (Liu et al., 2001); además, se ha visto que Gas1 se expresa en diferentes tipos de células progenitoras (Izzi et al., 2011; Kann et al., 2015), lo que demuestra que Gas1 juega un papel importante durante el desarrollo embrionario (Lee y Fan, 2001; Martinelli y Fan 2007; Lee et al., 2001). De hecho, se ha

reportado que Gas1 está presente en células progenitoras durante el desarrollo del giro dentado y de la corteza (Estudillo et al., 2015), así como también en neuronas y células astrogiales del cerebro de ratón adulto (Zarco et al., 2013). Por lo tanto, los antecedentes demuestran que Gas1 puede actuar tanto como un regulador de la proliferación celular, o bien como un inductor de muerte celular, por medio de mecanismos finamente controlados de forma espacio-temporal.

Un estudio reciente, demostró la presencia de Gas1 en líquido cefalorraquídeo y su expresión en los plexos coroideos de ratas adultas; además, se describió la presencia de Gas1 en otros fluidos corporales, tales como orina y plasma (Ayala-Sarmiento et al., 2016; Van Roeyen et al., 2013).

Bases moleculares en los roles de Gas1

Gas1 y Shh durante la proliferación y diferenciación

Algunos estudios se han enfocado en elucidar los mecanismos moleculares asociados a la activación de la proliferación celular y la apoptosis, cuando estas son mediadas por Gas1. Como resultado de estos estudios, ha sido posible demostrar que Gas1 interactúa con la proteína Sonic hedgehog (Shh) para activar los procesos de proliferación celular y las vías de señalización de supervivencia. En ausencia de Shh, la proteína transmembranal smoothed (Smo) se encuentra constitutivamente inhibida por la proteína transmembranal Patched1 (Ptch1), que es el receptor de Shh. Cuando Shh se une a su receptor Ptch1, suprime la inhibición que Ptch1 ejerce sobre Smo. Esta liberación da como resultado una serie de eventos intracelulares mediados por los factores de transcripción de la familia Gli, que activan la proliferación y diferenciación celular. En este proceso de señalización, Gas1 juega un papel importante, ya que se ha demostrado que se une a Shh, funcionando como un regulador positivo de esta vía (Martinelli y Fan, 2007a; Allen et al., 2007; Martinelli y Fan, 2009; Allen et al., 2011; Izzi et al., 2011; Pineda-Alvarez et al., 2012; Segovia y Zarco, 2014), como se puede apreciar en la Figura 4.

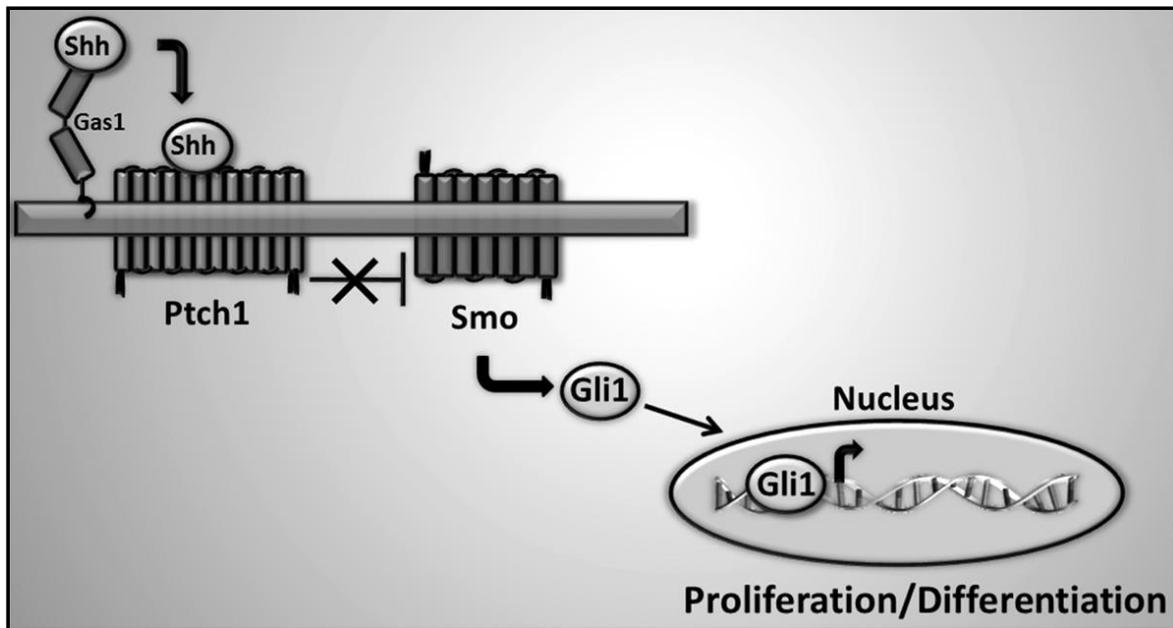


Figura 4. Interacción entre Gas1 y Shh. Gas1 se une a Shh, y éste a su vez se une a su receptor Ptch1, suprimiendo así la inhibición que Ptch1 ejerce sobre Smo. Esta liberación de Smo da como resultado una serie de eventos intracelulares mediados por los factores de transcripción de la familia Gli, que activan la proliferación y diferenciación celular (tomado de Segovia y Zarco, 2014).

Gas1 y GDNF durante la apoptosis

La apoptosis es otro de los procesos en los que se ha estudiado la participación de Gas1. Esta función pro-apoptótica de Gas1, puede explicarse debido a la homología estructural que existe entre Gas1 y la familia de receptores $GFR\alpha$ (*glial-cell-derived neurotrophic factor -GDNF- receptor*). Gas1 y $GFR\alpha$ comparten aproximadamente un 25 % de identidad en su secuencia (≈ 150 aa). Estudios de predicción de estructura secundaria han revelado que Gas1 tiene una estructura formada por α -hélices, separadas por pequeñas regiones de estructuras β -plegadas, además de una región C-terminal no-estructurada. Con base en esta información, y con estudios estructurales reportados para $GFR\alpha_1$, se ha logrado establecer la homología estructural entre Gas1 y $GFR\alpha_1$ en los dominios D2 y D3, respectivamente (Cabrera et al., 2006; Schueler-Furman et al., 2006), como se observa en la Figura 5. Entre otras características que comparten ambas proteínas

son: el anclaje a la membrana celular a través de una molécula GPI, una secuencia péptido señal en el extremo N-terminal, un dominio con dos repeticiones en tándem de aproximadamente 110 aa, y cinco enlaces por puentes disulfuro que se encuentran conservados en ambas proteínas (Schueler-Furman et al., 2006).

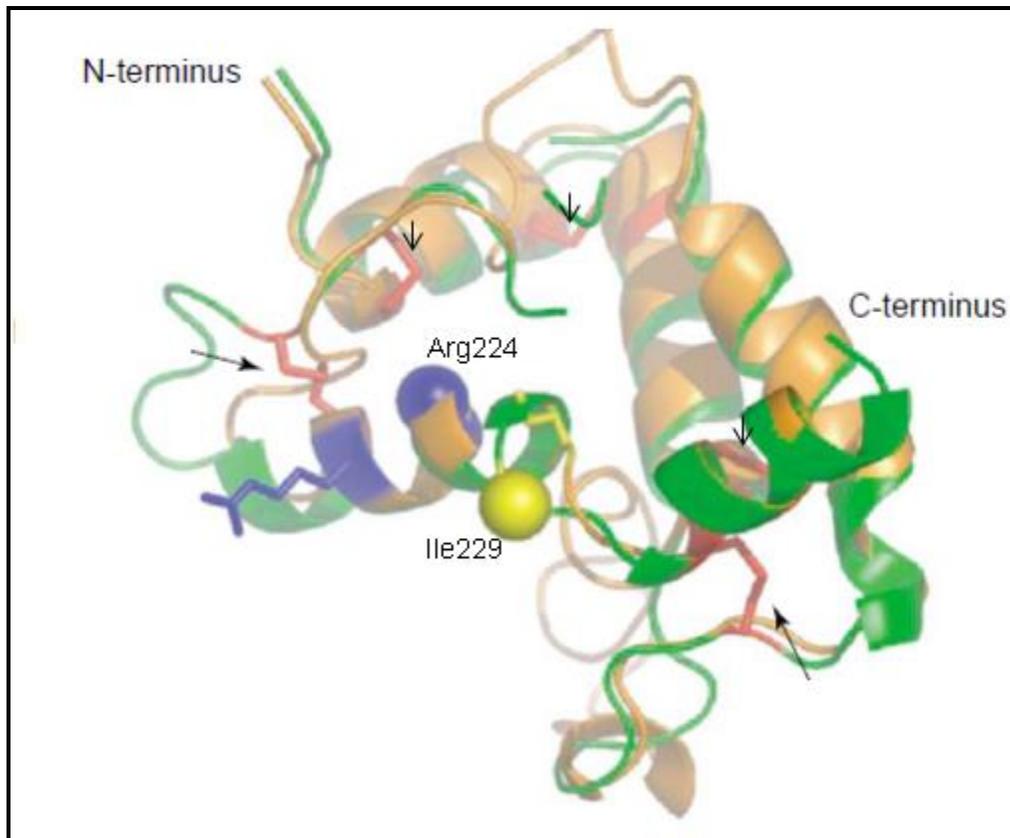


Figura 5. Análisis estructural comparativo entre Gas1 y GFR α 1. Imagen superpuesta de los dominios D2 y D3 de Gas1 y GFR α 1, respectivamente. Las flechas indican los cinco puentes disulfuro que se encuentra conservados entre Gas1 y GFR α 1; así como la Arginina 224 (Arg224, esfera en color morado) y la Isoleucina 229 (Ile229, esfera en color amarillo) (modificada de Schueler-Furman et al., 2006).

Cuando los receptores GFR α son activados por su correspondiente ligando (GDNF, artemina, neurturina y persefina), el resultado es la autofosforilación de

Ret y la activación de Akt, vías involucradas en la supervivencia y la proliferación celular. Sin embargo, se ha demostrado que en presencia de GAS1, la señalización mediada por GDNF-GFR α es interrumpida, dando como resultado una reducción en la fosforilación de Ret, Akt y Bad. Todo esto lleva a la liberación del citocromo-c de la mitocondria al citosol. Esto a su vez desencadena la activación de las caspasas 9 y 3, y finalmente la muerte celular (Lopez-Ramirez et al., 2008; Domínguez-Monzón et al., 2011; Zarco et al., 2012). Lo anterior demuestra, que Gas1 induce apoptosis por medio de la interrupción de la vía de señalización mediada por GDNF, como se describe en la Figura 6.

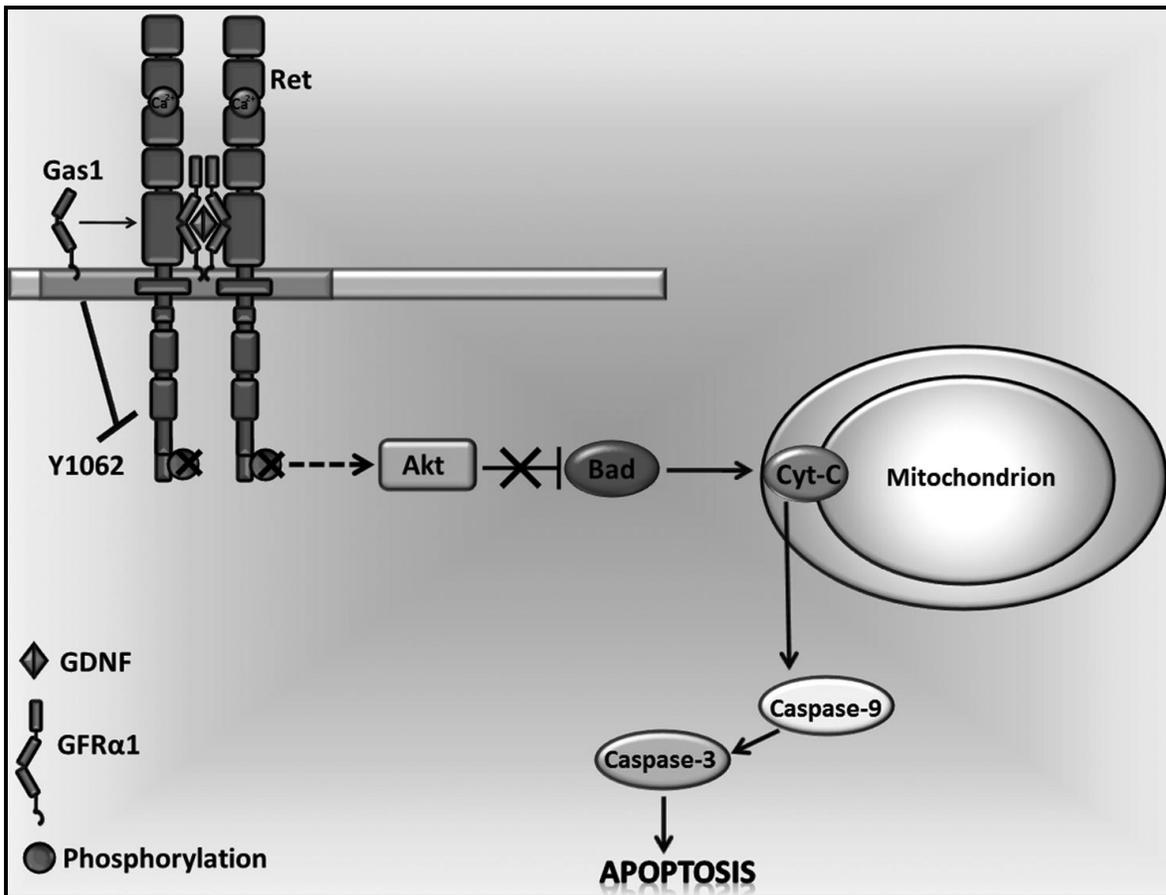


Figura 6. Apoptosis inducida por Gas1 por interrupción de la vía de señalización de GDNF. Gas1 interrumpe la señalización mediada por GDNF-GFR α , resultando en una reducción en la fosforilación de Ret, Akt, y Bad. Esto produce la translocación de Bad a la mitocondria, en donde promueve la liberación del citocromo-c al citosol, que a su vez activa a las caspasas 9 y 3, iniciando el proceso de apoptosis (tomado de Segovia y Zarco, 2014).

Efectos de Gas1 en gliomas

La estrategia anti-tumoral con Gas1 también ha sido probada en gliomas, en donde se han observado resultados muy satisfactorios. Una particularidad de los gliomas humanos, es que no expresan la proteína Shh, pero sí los componentes de la vía de señalización mediada por GDNF. En experimentos *in vitro* con cultivos primarios de gliomas humanos, se demostró que Gas1 inhibe la proliferación e

induce apoptosis en células de glioma en ausencia de Shh (Dominguez-Monzon et al., 2009). La eficacia de Gas1, ha sido probada también en experimentos *in vivo* con ratones desnudos implantados con células C6 de glioblastoma de rata; en donde Gas1 fue administrada a través de un vector retroviral. Los resultados demostraron la capacidad de Gas1 para inhibir el crecimiento de los tumores, acompañado de un incremento en la activación de la caspasa-3 (Zamorano et al., 2004). Cabe señalar que en un trabajo previo, se había demostrado que la sobreexpresión de Gas1 en células C6 tenía la capacidad de inducir apoptosis y la activación de la caspasa-3 (Zamorano et al., 2003).

Otras estrategias experimentales, se han valido de la utilización de células troncales neurales (NSCs, por las siglas en inglés de *Neural Stem Cells*), aprovechando su tropismo hacia los tumores, sirviendo como vehículo de transporte y vector de expresión inducible de la forma truncada de la proteína Gas1 (tGas1). La expresión de la forma truncada, facilita además, que los efectos de Gas1 lleguen al tumor o sitio de acción requerido. Los resultados con esta estrategia de terapia génica, demostraron la capacidad de las NSCs para llegar a un tumor de glioblastoma multiforme *in vivo*, así como su capacidad para expresar de manera inducible (con tetraciclina) a tGas1, y la eficacia de tGas1 para reducir el crecimiento del tumor e incrementar el tiempo de supervivencia de los ratones implantados con el glioblastoma multiforme (López-Ornelas et al., 2014).

Gas1 y p53

Dado que p53 es un elemento importante en la regulación del ciclo celular y la apoptosis, también se ha estudiado su papel en el desarrollo de gliomas. Por ello, se han realizado estudios para evaluar la relación de Gas1 y p53, así como el efecto conjunto de ambas proteínas sobre el crecimiento tumoral. Aunque se ha demostrado que Gas1 requiere de p53 para bloquear la proliferación celular (Del Sal et al., 1995), también se demostró que la sobreexpresión simultánea de ambas en gliomas no presenta un efecto aditivo (Benitez et al., 2007). En estudios *in vivo* durante el desarrollo del ratón, se demostró que Gas1 no es capaz de inducir arresto celular en células de las extremidades del embrión de ratón de 10 días de

gestación, en donde hay ausencia de p53; pero sí a los 12.5 días, a pesar de la ausencia de p53. Mientras que, la sobreexpresión de Gas1 en células de los tejidos interdigitales, indujo la muerte celular (K. K. Lee et al., 2001). Todo esto sugiere que Gas1 puede tomar distintas vías moleculares alternativas para llevar a cabo su función de una forma espacio-temporal.

JUSTIFICACIÓN

Actualmente, se conocen algunos mecanismos por los cuales Gas1 induce apoptosis, proliferación y activa vías de supervivencia. Sin embargo, hay escasa información acerca de los mecanismos por los cuales Gas1 regula el arresto celular. Por ello, es de especial interés realizar una investigación con el fin de elucidar las estrategias moleculares que sigue Gas1 durante el arresto del ciclo celular.

HIPÓTESIS

Dado que Gas1 es una proteína diferencialmente expresada en células NIH3T3 durante el arresto celular por privación de suero, y que su expresión induce arresto celular, la hipótesis central del presente trabajo propone que Gas1 interactúa con un conjunto específico de proteínas para conducir al arresto celular.

Por lo tanto, la identificación de nuevas proteínas diferencialmente expresadas en células NIH3T3 en arresto por privación de suero, así como posteriores experimentos de validación funcional, nos permitirá proponer mecanismos moleculares por los cuales Gas1 induce el arresto de la célula.

OBJETIVO GENERAL

Identificar los mecanismos moleculares por los cuales Gas1 induce arresto celular.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Caracterización el perfil proteómico de las células NIH3T3 en arresto por privación de suero.
2. Determinar la relación de Gas1 con las proteínas expresadas diferencialmente en las células NIH3T3 en arresto por privación de suero.
3. Proponer los mecanismos moleculares por los cuales Gas1 induce arresto celular.

MÉTODOLOGÍA

Cultivo celular

Las células NIH3T3 (ATCC) fueron cultivadas a 37°C con 95% de aire y 5% CO₂ en medio de cultivo DMEM HG (Dulbecco's modified Eagle's Medium High Glucose) (GIBCO, Grand Island, NY, USA) suplementado con glutamine 2mM (SIGMA, St. Louis, MO, USA), penicilina 100 U/mL (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), estreptomocina 100 µg/mL (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) y 10% de suero fetal bovino (SFB) (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). Las células fueron sembradas (3×10^5 células/55cm² caja petri), y después de 48 h de cultivo, el medio fue reemplazado por medio de cultivo fresco suplementado con 10% de SFB para la condición de proliferación (Pro/NIH3T3) utilizada como condición testigo; y medio de cultivo fresco sin SFB para la condición de privación de suero (PS/NIH3T3), que corresponde a la condición problema. Los cultivos celulares se mantuvieron durante 24 h bajo las condiciones mencionadas. Estos cultivos se realizaron por triplicado para los ensayos de viabilidad celular. Mientras que, para la obtención de los perfiles proteómicos por electroforesis bidimensional (E-2D), los cultivos se realizaron por triplicado para la obtención de las réplicas experimentales; y por duplicado (un segundo experimento independiente) para la obtención de las réplicas biológicas. Finalmente, las células fueron recolectadas para llevar a cabo los ensayos de viabilidad celular y la obtención de perfiles proteómicos por E-2D, como se describe a continuación.

Recolección de células

Las células se despegaron del plato de cultivo agregando 1 mL de tripsina a una concentración de 1mg/mL (GIBCO, Grand Island, NY, USA); se incubó a 37°C por 5 min y se colectaron las células flotantes por pipeteo. Posteriormente se realizó un lavado (por pipeteo) con 5 ml de solución amortiguadora de fosfatos 1X (SAF-1X) para coleccionar las células que quedaron en el plato. La suspensión celular se colectó en un tubo de 15 ml y se les agregó 6 mL de medio de cultivo DMEM HG suplementado con 10% SFB para inactivar la tripsina. Los tubos que contenían la

suspensión celular se centrifugaron a 200 x g para formar la pastilla celular, y el sobrenadante se desechó. Posteriormente se lavaron las células resuspendiendo en 5 mL de SAF-1X, este último paso se realizó con el fin de eliminar la tripsina residual. Finalmente, la suspensión celular se centrifugó a 200 x g para formar la pastilla celular, en el caso de los cultivos destinados para los perfiles proteómicos; mientras que para los ensayos de viabilidad celular, las células fueron resuspendidas nuevamente en SAF-1X.

Ensayo de viabilidad celular

Los ensayos de viabilidad celular se realizaron por la técnica de exclusión con azul de tripano con el fin de comparar la condición de proliferación (Pro/NIH3T3) y la condición de privación de suero (PS/NIH3T3). Para ambos casos, se tomaron 100 μ L de la suspensión celular y se diluyó en 900 μ L de solución de azul de tripano al 0.4%. Se realizó la mezcla por pipeteo y se tomaron 10 μ L para colocar en cada compartimento del hemocitómetro. Se contaron 4 cuadrantes por cada compartimento y se determinó el promedio. Para obtener el número de células por mililitro, el promedio obtenido se multiplicó por el factor de dilución (10) y después por 10, 000 (factor de conversión).

Perfiles proteómicos por electroforesis bidimensional (E-2D)

Extracción de proteínas

Para la obtención de los perfiles proteómicos de la condición de proliferación (Pro/NIH3T3) y la condición de privación de suero (PS/NIH3T3), se resuspendieron las células en 1 mL de *buffer* de extracción número VI del estuche comercial de la marca GE Healthcare (GE Healthcare, St. Louis, MO, USA) que contiene urea, tiourea, NDSB201 y CHAPS (fórmula protegida por el fabricante), suplementado con un cocktail de inhibidores de proteasas (Complete™; Roche, Mannheim, Germany). La pastilla celular se disgregó por pipeteo hasta disolverla totalmente y obtener el extracto proteico. Posteriormente se centrifugó a 12,000 x g para eliminar los agregados insolubles y recolectar el sobrenadante proteico. Se

realizaron alícuotas de 100 μ L y se almacenaron a -80°C hasta su cuantificación e isoelectroenfoque (IEF).

Cuantificación de proteínas

La cuantificación de proteínas se realizó por triplicado utilizando el estuche comercial 2D Quant Kit (GE Healthcare, St. Louis, MO, USA) siguiendo el protocolo establecido por el fabricante. Se utilizó albúmina sérica bovina como referencia para la curva de calibración.

Isoelectroenfoque (Primera dimensión)

Para realizar el isoelectroenfoque de las proteínas, se tomó el volumen correspondiente a 1 mg de proteína de las células en proliferación y en privación de suero (Pro/NIH3T3 y PS/NIH3T3, respectivamente). La muestra proteica se limpió utilizando el estuche comercial 2D-Clean Up Kit (GE Healthcare, St. Louis, MO, USA) siguiendo el procedimiento establecido por el fabricante. Las pastillas de proteínas obtenidas se resuspendieron con 125 μ L de Ready-Prep Rehydration buffer (BIO-RAD, Hercules, CA, USA) que contiene urea 8M, CHAPS 2%, DTT 50mM, anfolitos Bio-Lyte pH 3-10 al 0.2%, trazas de azul de bromofenol e inhibidores de proteasas (Complete™). Posteriormente, las muestras fueron cargadas a las tiras de isoelectroenfoque de 7 cm pH 3-10 con gradiente lineal (BIO-RAD, Hercules, CA, USA) y fueron mantenidas por 16 h a 25°C para su rehidratación. Después, las proteínas fueron enfocadas con el siguiente protocolo: 500 V (hold) por 1 h, 1000 V (gradient) por 1 h, 5000 V (gradient) por 1.5 h y 7,000 V (gradient) por 0.5 h, utilizando el equipo Ettan IPGPhor 3 (GE Healthcare, St. Louis, MO, USA).

SDS-PAGE (Segunda dimensión)

Al terminar el isoelectroenfoque las tiras fueron equilibradas por 15 min a temperatura ambiente con solución reductora que contiene Tris-HCl 75 mM pH 8.8, urea 6M, glicerol 30% (v/v), SDS 2% (p/v), azul de bromofenol 0.002% y DTT (ditriotreitol) 64 mM. Posteriormente, las tiras fueron incubadas por 15 min en solución de alquilación, que contiene los mismos componentes de la solución

reductora, pero reemplazando el DTT por iodoacetamida 135 mM. Después del procedimiento de reducción/alquilación, las tiras fueron cargadas en un gel SDS-PAGE 12 % y corridas a 100 V por 1.5 h. Finalmente los geles fueron teñidos con azul de Coomassie. Las imágenes de los geles fueron obtenidas utilizando el escáner Imager Scanner (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA). Las imágenes obtenidas se analizaron utilizando el software PDQuest (BIORAD, Hercules, CA, USA) para detectar los *spots* proteicos diferenciales entre ambas condiciones (Pro/NIH3T3 y PS/NIH3T3). El análisis se realizó comparando la densidad relativa de los *spots* (píxeles por área) para cada spot detectado, comparando entre ambas condiciones. La diferencia estadística se determinó por medio de un análisis de comparación de medias por el método de *t de student*, considerando una diferencia estadística cuando el valor de *p* fue < 0.05 . Se seleccionaron los *spots* que tuvieran una diferencia relativa 2:1 o mayor, para su posterior identificación por espectrometría de masas (ESI-LC-MS/MS).

Espectrometría de masas

La identificación de proteínas por espectrometría de masas en serie con ionización por electroespray (*ESI-LC-MS/MS*, *Electrospray ionization tandem mass spectrometry analysis*) se realizó como se describe a continuación (también descrito previamente por Flores y colaboradores en el 2012) (Flores et al., 2012). Los *spots* seleccionados fueron cortados del gel y procesados con solución de desteñido que contiene ácido acético 10 % (v/v) y metanol 40 %. Posteriormente fueron reducidas, alquiladas y digeridas con tripsina. Los péptidos resultantes fueron extraídos, desalados, secados por vacío y resuspendidos en 20 μ L de ácido fórmico 1 %. Los péptidos fueron identificados utilizando un equipo 3200 QTRAP LC-MS/MS System (Applied Biosystems/MDS Sciex, San Francisco, CA, USA) conformado por una fuente de ionización por nanoelectrospray (NanoSpray II y un MicroIonSpray II head) acoplado a un sistema cromatográfico nanoAcquity Ultra Performance LC system (Waters Corporations, Milford, MA, USA). Los espectros de masa/carga (*m/z*) obtenidos fueron analizados posteriormente utilizando el *software* Mascot, como se describe a continuación.

Identificación de proteínas

La identificación de las huellas peptídicas por medio de los espectros masa/carga (m/z) se realizó utilizando el *software* Mascot version 1.6b9 (Matrix Science: available at <http://www.matrixscience.com>) y haciendo la búsqueda en las bases de datos Swiss-Prot y NCBI nr para *Mus musculus*. Los parámetros de búsqueda fueron los siguientes: 1) se consideró un sitio de corte perdido con una tolerancia en la masa del precursor y los fragmentos de ± 1.2 Da y de ± 0.6 Da, respectivamente; 2) se consideraron las carbamidometilaciones en la cisteína como modificaciones fijas; y, las deamidaciones y oxidaciones como modificaciones variables en la glutamina/asparagina y metionina, respectivamente; 3) se consideraron los valores de masa monoisotópicos y valores de masa de proteína no restringidos; 4) para la identificación, se consideraron al menos dos espectros de fragmentación (MS/MS) con un 95 % de confianza ($p < 0.05$) por cada precursor; 5) se consideró un valor de ruido para los iones (*threshold ion score*) de ≥ 41 como identidad ($p < 0.05$), y menor a 41 pero mayor a 30 como homología. Adicionalmente, las secuencias peptídicas identificadas con el *software* Mascot, fueron analizadas nuevamente utilizando el *software* MS-BLAST (Washington University, Saint Louis, MO; available at: <http://genetics.bwh.harvard.edu/msblast/>) contra las bases Swiss-Prot y NCBI nr para confirmar la identificación.

Extracción de ARN

Las células de las condiciones Pro/NIH3T3 y PS/NIH3T3 se lavaron dos veces con SAF-1X. Posteriormente, se cosecharon por pipeteo con 1 mL de TRIzol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) y se extrajo el ARN total (ARNt) con base en el protocolo del fabricante. La concentración del ARN se determinó a 260 nm en un espectrofotómetro *Epoch nanodrop system spectrometer* (BioTek Instruments, Winooski, VT, USA); mientras que la calidad del ARN se verificó por electroforesis y por la determinación del cociente 260/280 nm. Finalmente, se tomó una alícuota equivalente a 1 μ g de ARNt de cada muestra para eliminar el ADN genómico

(ADNg) contaminante por medio de un tratamiento con ADNasa I (New England BioLabs, Ipswich, MA, USA), previo a la síntesis de ADN complementario (ADNc).

PCR cuantitativa o PCR en tiempo real (RT-qPCR)

El ADNc se sintetizó a partir de 1 µg de ARNt, el cual fue transcrito utilizando oligo dT como cebador y 1µL (200U) de MMLV transcriptasa reversa (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). La reacción se llevó a cabo a 42°C por 1 h y se detuvo por inactivación por calor a 70°C por 20 min. Las reacciones de PCR cuantitativa se realizaron a partir de 50 ng de ADNc, 200 nM de los oligos correspondientes, y c.b.p. 20 µL del coctel 2X SYBR Green Master Mix (Kappa Biosystems, Wilmington, MA, USA). El programa de PCR inició con un paso de desnaturalización a 95°C por 10 min, seguido de 40 ciclos de 95°C/15 sec y 60°C/30 s. Posteriormente, se realizó una curva de disociación con una rampa de temperatura de 55 a 95°C por un minuto para verificar la especificidad del producto de PCR. En el caso de β-actina, se requirió un paso adicional de alineamiento a 50°C/15 s antes del paso de extensión. La β-actina se utilizó como gen de referencia para todos los experimentos de PCR cuantitativa. La tasa de cambio relativo (*fold change*) para la expresión de cada gen se calculó con la fórmula $2^{-\Delta\Delta CQ}$. Los oligos utilizados para cada RT-qPCR se describen en la Tabla 1. Todos los ensayos se realizaron por triplicado utilizando el termociclador Eco Real-Time PCR System y el *software* Eco™ para el análisis de resultados (Illumina, Inc., San Diego, CA, USA). Como criterio de calidad para cada ensayo de RT-qPCR se realizó una curva de calibración para cada gen utilizando como sustancia estándar el producto de PCR purificado correspondiente a cada amplicón; considerando un coeficiente de determinación $R^2 \geq 0.99$, y una eficiencia de 90-110% como criterios de aceptación.

Tabla 1. Oligonucleótidos (*primers*) para RT-qPCR

Gen	sentido	antisentido	Tamaño del producto de PCR (pb)
<i>β-actina</i>	5'-TGG CAC CAC ACC TTC TAC A-3'	5'-TCA CGC ACG ATT TCC C-3'	490
<i>Anxa1</i>	5'-AGG GTG ACA TTG AGA AGT GC-3'	5'-GAA CGG GAG ACC ATA ATC CTG-3'	142
<i>Anxa2</i>	5'-GTC TAC TGT CCA CGA AAT CCT G-3'	5'-ACT CCT TTG GTC TTG ACT GC-3'	150
<i>elf3f</i>	5'-GGC TAC ACC CCG TCA TTT TG-3'	5'-TTC TAC CGA GTG CTT GTC AAC-3'	132
<i>Ncl</i>	5'-AGA TAA GGT CCG TGT TTG TGG-3'	5'-TCC AAA ATG TAG TCA GGG TAG C-3'	254
<i>Igf-1</i>	5'-GAG ACT GGA GAT GTA CTG TGC-3'	5'-CTC CTT TGC AGC TTC GTT TTC-3'	138
<i>Dyrk1B</i>	5'-TGG TCC TTT CTC TGG CTT TC-3'	5'-TGA TGT GCT TGT AGG TCT TGATG-3'	158

pb: pares de bases

Obtención de clonas NIH3T3 con expresión inducible de GAS1

Para obtener las clonas con la transfección estable y la expresión inducible de GAS1 (humano) (NIH3T3-iGAS1), se utilizaron las construcciones virales previamente descritas por Jiménez et al. (2014). Dichas construcciones, así como las clonas, fueron generadas utilizando el estuche comercial ViraPower HiPerform Gateway Expression T-Rex System (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), siguiendo el procedimiento indicado por el fabricante. El estuche comercial ViraPower contiene el vector lentiviral pLenti 3.3/TR para la expresión constitutiva del represor de tetraciclina (rT), y el gen de resistencia a geneticina como marcador de selección. También contiene el vector lentiviral pLenti 6.3/TO/V5 para la clonación del gen de interés, en este caso GAS1 (humano), bajo el control del promotor híbrido CMV/TO, un híbrido del promotor del citomegalovirus humano y el operador de tetraciclina; así como el gen de resistencia a blasticidina como marcador de selección. Previamente, el gen GAS1 humano fue clonado en el vector pENTR/DTOPO para obtener el vector pENTR/DTOPO-GAS1, el cual posteriormente fue recombinado con el vector pLenti 6.3/TO/V5 para obtener el vector lentiviral Lenti 6.3/TO/V5/GAS1. Posteriormente, los vectores lentivirales pLenti 3.3/TR y pLenti 6.3/TO/V5/GAS1 fueron transfectados de manera independiente en células 293FT, más un cocktail de empaquetamiento viral (contenido en el kit virapower) para la generación de los lentivirus Lenti 3.3/TR y Lenti 6.3/TO/V5/GAS1. Los virus fueron colectados y se utilizaron para la generación de las clonas NIH3T3-iGAS1 por co-transducción de las células NIH3T3. Las clonas se seleccionaron con los antibióticos geneticina (Lenti 3.3/TR) y blasticidina (Lenti 6.3/TO/V5/GAS1), para verificar la integración de ambos lentivirus al genoma de las células NIH3T3. Con este sistema de expresión, se indujo la expresión de GAS1 por la adición de tetraciclina (2 µg/mL) al cultivo celular de las clonas NIH3T3-iGAS1 (en presencia de SFB 10 %). Esto es debido a que las clonas NIH3T3-iGAS1 producen constitutivamente la proteína represora (rT) del operador de tetraciclina (TO), por la integración del virus Lenti 3.3/TR. La proteína represora rT se une al promotor híbrido CMV/TO y reprime la transcripción del gen GAS1 por parte del virus Lenti 6.3/TO/V5/GAS1. Al adicionar

la tetraciclina al cultivo celular, las moléculas de tetraciclina se unen a la proteína represora rT, produciendo un cambio en su conformación y reduciendo su afinidad por el operador de tetraciclina. Esto da como resultado la liberación del promotor CMV/TO y la expresión del gen GAS1. En la Figura 7 se describe gráficamente la generación de las clonas NIH3T3-iGAS, así como el sistema de expresión inducible de GAS1.

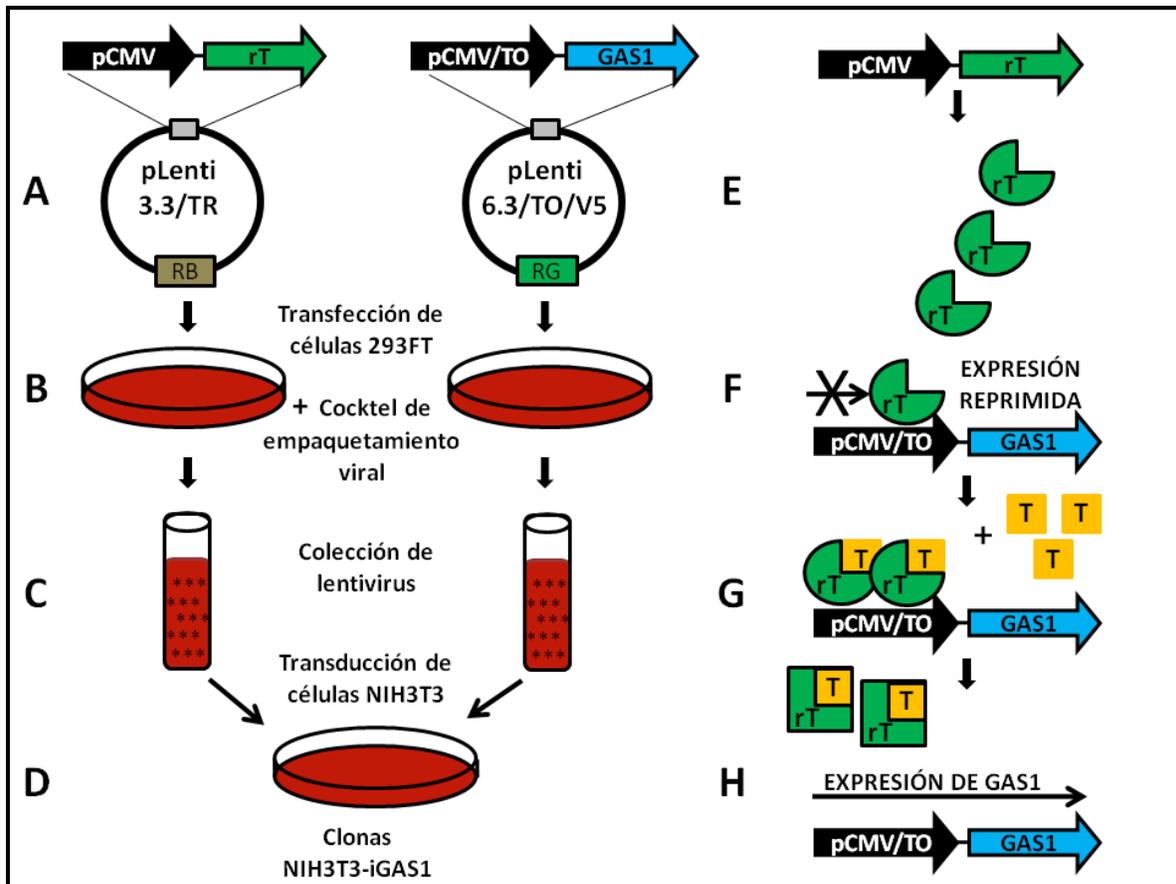


Figura 7. Sistema de expresión inducible de GAS1. A-B) Transfección de los vectores lentivirales pLenti 3.3/TR y pLenti 6.3/TO/V5/GAS1 de manera independiente en células NIH3T3 adicionadas con un cocktail de empaquetamiento viral. C) Colección de lentivirus Lenti 3.3/TR y Lenti 6.3/TO/V5/GAS1. D) Co-transducción de los lentivirus Lenti 3.3/TR y Lenti 6.3/TO/V5/GAS1 para generar las clonas NIH3T3-iGAS1. E-F) Expresión constitutiva del represor de tetraciclina (rT) en clonas NIH3T3-iGAS1, que se une al promotor híbrido CMV/TO y reprime la expresión de GAS1. G) Cambio conformacional del represor de tetraciclina por la adición de tetraciclina (T) al medio de cultivo; el cambio conformacional del represor rT disminuye su afinidad por el promotor CMV/TO. H) Liberación del promotor CMV/TO y expresión del gen GAS1. RB, gen de resistencia a blastomicina. RG, gen de resistencia a geneticina.

Ensayos de proliferación con las clonas NIH3T3-iGAS1

Para medir el efecto de la sobreexpresión de GAS1 sobre la proliferación, se utilizaron las clonas NIH3T3-iGAS1, las cuales fueron cultivadas en cajas petri (50,000 células/55cm² caja petri) y mantenidas con medio de cultivo completo (suplementado con SFB 10%) durante 48 h a 37°C. Posteriormente, las clonas NIH3T3-iGAS1 se sincronizaron reemplazando el medio de cultivo completo por medio de cultivo disminuido (SFB 1 %) y se mantuvieron en tales condiciones por 24 h a 37 °C. Finalmente, para reactivar la proliferación celular, el medio de cultivo disminuido fue reemplazado por medio de cultivo completo con tetraciclina (2 µg/mL) para sobreexpresar GAS1 para la condición problema y sin tetraciclina para la condición testigo. Los cultivos se mantuvieron por 48 h y posteriormente las células fueron cosechadas para realizar el ensayo de viabilidad celular por el método de exclusión con azul de tripano. Adicionalmente, se cultivaron las células silvestres en las condiciones Pro/NIH3T3 y PS/NIH3T3 como condiciones testigo adicionales para fines comparativos.

Inmunodetección por Western Blot

La inmunodetección de proteínas en fase sólida o *western blot*, se realizó cargando 50 µg de proteína total de cada muestra en un gel SDS-PAGE al 12 %. Al terminar la electroforesis, las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa de 0.22 µm (BIO-RAD, Hercules, CA, USA) durante 1 h a 20V en una cámara de transferencia semi-seca (BIO-RAD, Hercules, CA, USA). Posteriormente, las membranas se bloquearon con 5 % de reactivo de bloqueo (BIO-RAD, Hercules, CA, USA) en solución SAF-1X durante 2 h a temperatura ambiente. Después del bloqueo, cada membrana se incubó toda la noche (2-8°C) con su correspondiente anticuerpo primario y, después de cuatro lavados con SAF-1X, se incubó durante 2 h a temperatura ambiente con su correspondiente anticuerpo secundario (conjugado con peroxidasa) en una dilución 1:5000 con solución de bloqueo. Las membranas se lavaron cuatro veces con SAF-1X (10 min cada lavado) después de las incubaciones con los anticuerpos primario y secundario. Los anticuerpos primarios que se utilizaron se describen en la Tabla 2.

Las membranas se revelaron con el reactivo ECL Plus (GE Healthcare, St. Louis, MO, USA) y las imágenes se capturaron en el equipo UVP transilluminator system (Ultra-Violet Products Ltd, Upland, CA, USA). El análisis de las imágenes se realizó con el *software* Image J (NIH, USA) y MyImage analysis (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA 02451) para cuantificar la densidad de las bandas.

Tabla 2. Anticuerpos primarios utilizados para *western blot*

Anticuerpo	Marca	Catálogo o referencia	Dilución
anti-Dyrk1B	Santa Cruz Biotechnology, CA, USA	Sc-98507	1000
anti-Gas1	R&D Systems, MN, USA.	AF2644	1000
anti-GAS1	ProScience, CA, USA.	(Jiménez et al., 2014)	1000
anti-Annexin I	Santa Cruz Biotechnology, CA, USA	Sc-11387	1000
anti-Annexin II	Santa Cruz Biotechnology, CA, USA	Sc-9061	1000
anti-nucleolin	Santa Cruz Biotechnology, CA, USA	Sc-9893	5000
anti- β -actina	CINVESTAV	(Garcia-Tovar et al., 2001)	5000

Validación funcional de los efectos de GAS1

Para llevar a cabo la validación funcional de la relación GAS1-Dyrk1B, se utilizaron las clonas NIH3T3-iGAS1. Las clonas fueron cultivadas (50% de confluencia en cajas petri de 9 cm²) como se describe previamente en los ensayos de proliferación. Todos los experimentos se realizaron en presencia de SFB 10%, tetraciclina (2µg/mL) como inductor de la expresión de GAS1, y en presencia (230 nM) o ausencia del inhibidor de Dyrk1B (INDY; Sigma, Cat. SML1011). Los cultivos se mantuvieron en estas condiciones por 48 h. Posteriormente, se cosecharon las células y se realizó el conteo de células viables como se describe previamente en los ensayos de proliferación.

RESULTADOS

Spots proteicos diferenciales entre Pro/NIH3T3 y PS/NIH3T3

Con el fin de investigar el efecto del arresto celular por privación de suero en las células NIH3T3 sobre el perfil de proteínas, se analizaron y compararon los perfiles proteicos bidimensionales (E-2D) de las células en proliferación (Pro/NIH3T3) y en privación de suero (PS/NIH3T3), condición testigo y condición problema, respectivamente. Los perfiles representativos se muestran en la Figura 8A. Los resultados muestran que existen diversos *spots* proteicos diferenciales entre ambas condiciones, principalmente entre 75 y 35 kDa y entre los puntos isoeléctricos 5.0 y 7.5. Los *spots* 1 al 6 fueron más abundantes en PS/NIH3T3, mientras que el *spot* 7 fue más abundante en Pro/NIH3T3 (Figura 8B). La abundancia relativa de los *spots* proteicos, que tuvieron al menos una diferencia relativa 2:1, se muestra en la Figura 8C. Estos *spots* proteicos seleccionados fueron cortados del gel para su posterior identificación por espectrometría de masas (ESI-MS/MS).

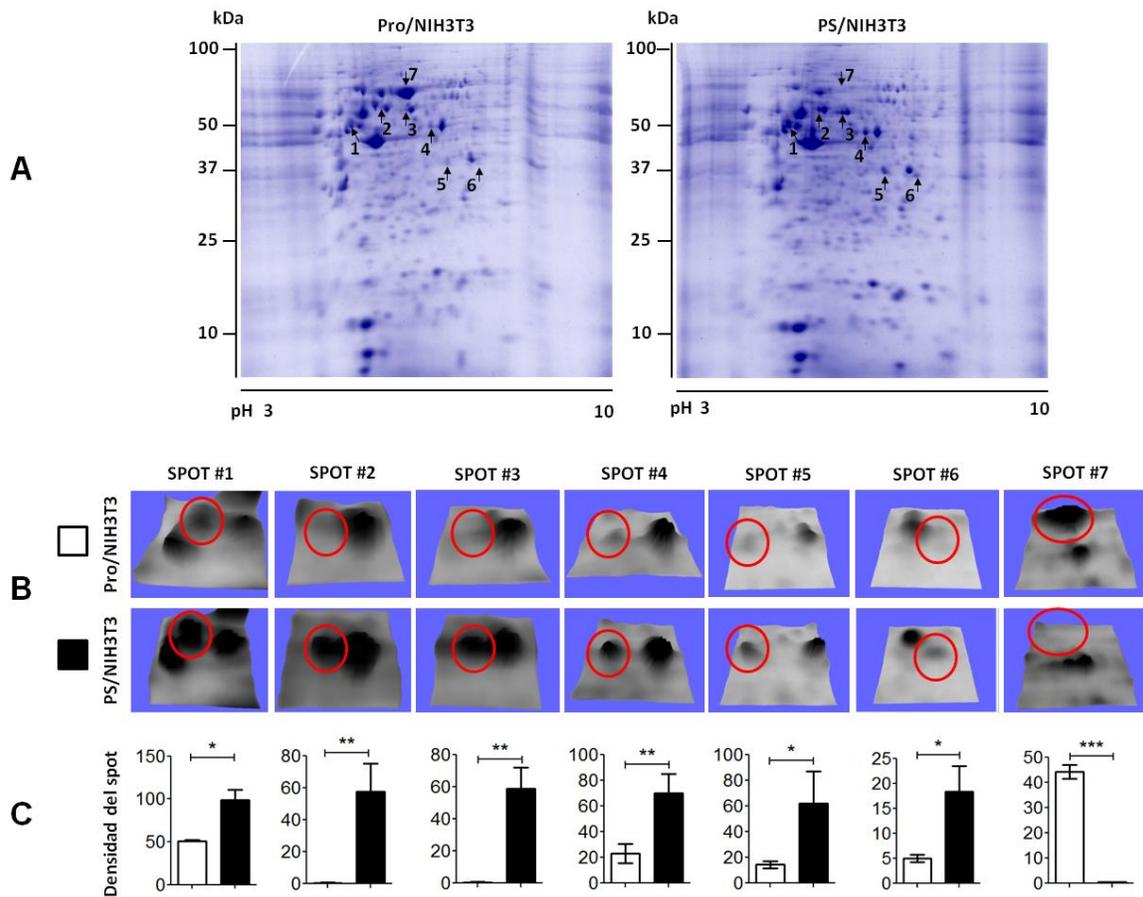


Figura 8. Perfiles proteómicos por electroforesis bidimensional de células NIH3T3 en proliferación (Pro/NIH3T3) y en arresto celular por privación de suero (PS/NIH3T3). A) Perfiles electroforéticos bidimensionales; B) Imágenes aumentadas de los *spots* diferenciales seleccionados para identificación por espectrometría de masas (ESI-MS/MS); C) Análisis densitométrico de los *spots* diferenciales. El análisis estadístico se realizó por el método *t* de *student*. Las barras representan la media \pm la desviación estándar. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$.

Identificación de proteínas por espectrometría de masas (ESI-LC-MS/MS)

Los resultados de espectrometría de masas arrojaron un total de 18 proteínas identificadas en ambas condiciones, en proliferación (Pro/NIH3T3) y en privación de suero (PS/NIH3T3). Diecisiete proteínas fueron identificadas en seis *spots* proteicos (*spots* 1-6) analizados de la condición problema PS/NIH3T3 (privación de suero). Mientras que una de ellas se identificó en la condición testigo (*spot* 7) Pro/NIH3T3 (proliferación). Como resultado del análisis ESI-LC-MS/MS se obtuvieron los espectros de masa/carga (m/z) o espectrogramas m/z de los iones de fragmentación MS/MS. En las figuras 9-26 se presentan los espectrogramas de los iones de fragmentación (MS/MS) de uno de los iones precursores (MS) identificados, como imagen representativa; así como el alineamiento de cada uno de los péptidos encontrados.

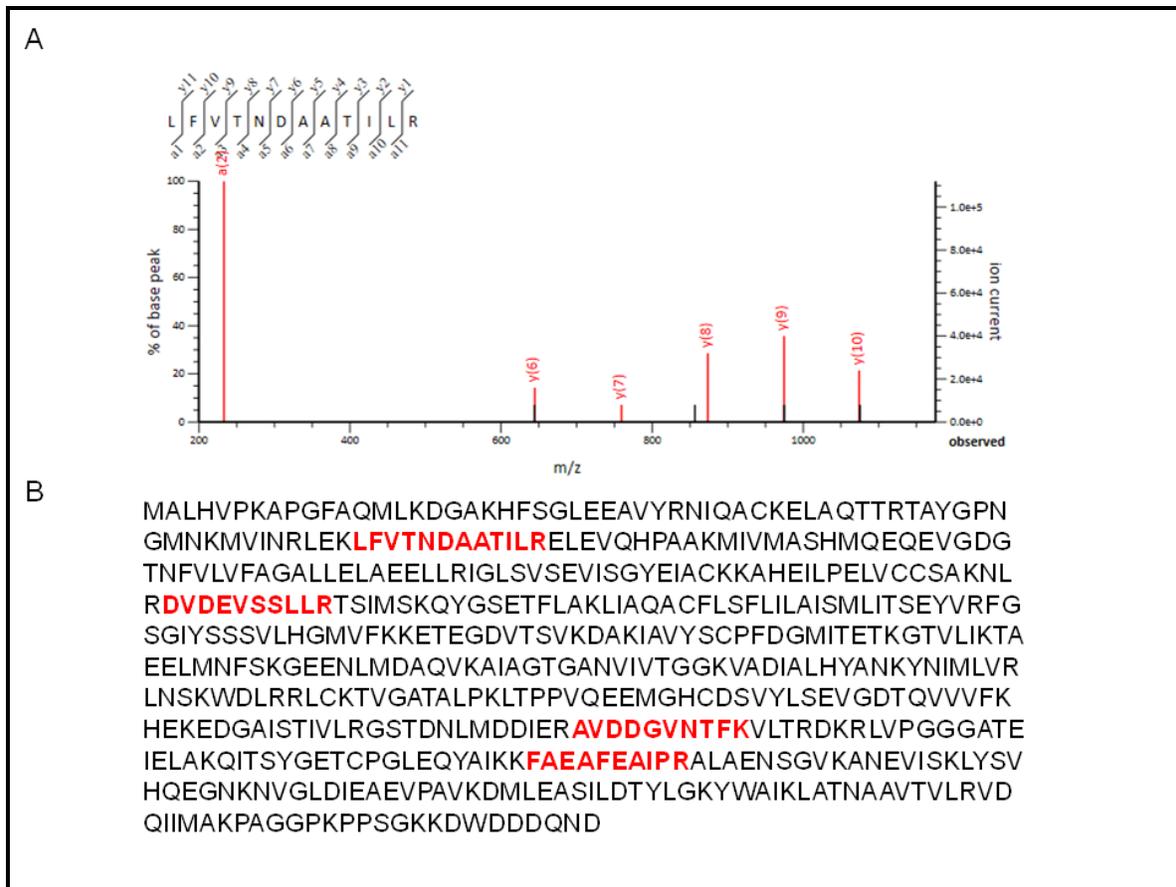


Figura 9. Espectrograma m/z para la identificación de chaperonina con subunidad teta TCP-1. A) Espectrograma m/z de los iones de fragmentación (MS/MS) (picos en color rojo) del ión precursor (MS) L F V T N D A A T I L R. Los valores de masa/carga (m/z) para cada ión de fragmentación son de 233.26, 644.67, 759.43, 873.69, 974.70 y 1073.97 para los picos a(2), y(6), y(7), y(8), y(9) y y(10) respectivamente. B) Alineamiento de todos los péptidos identificados (secuencia en rojo) contra la secuencia blanco.

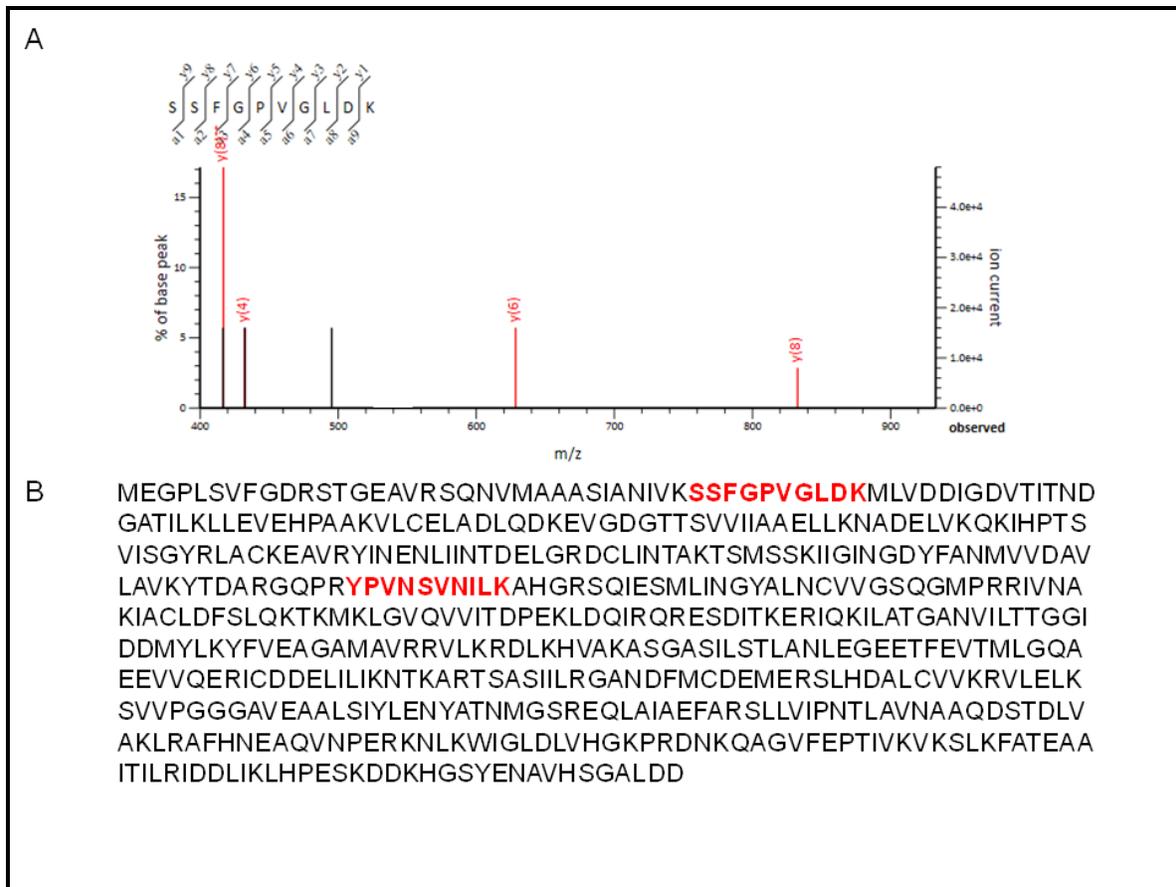


Figura 10. Espectrograma m/z para la identificación de proteína complejo-T. A) Espectrograma m/z de los iones de fragmentación (MS/MS) (picos en color rojo) del ión precursor (MS) SSFGPVGLDK. Los valores de masa/carga (m/z) para cada ión de fragmentación son de 416.93, 432.24, 628.47 y 832.68 para los picos y(8)⁺⁺, y(4), y(6) y y(8) respectivamente. B) Alineamiento de todos los péptidos identificados (secuencia en rojo) contra la secuencia blanco.

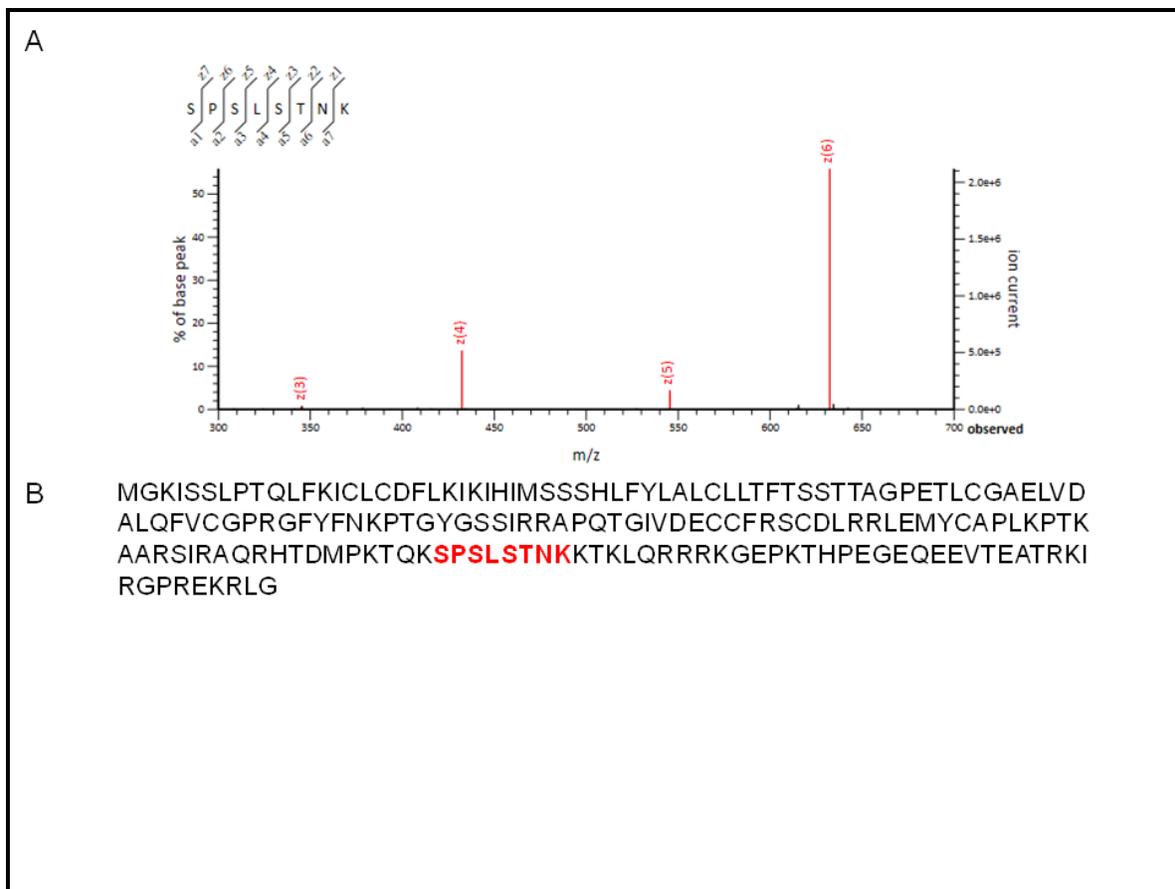


Figura 11. Espectrograma m/z para la identificación de factor de crecimiento tipo insulina. A) Espectrograma m/z de los iones de fragmentación (MS/MS) (picos en color rojo) del ión precursor (MS) SPSLSTNK. Los valores de masa/carga (m/z) para cada ión de fragmentación son de 345.48, 432.42, 545.50 y 632.42 para los picos z(3), z(4), z(5) y z(6) respectivamente. B) Alineamiento de todos los péptidos identificados (secuencia en rojo) contra la secuencia blanco.

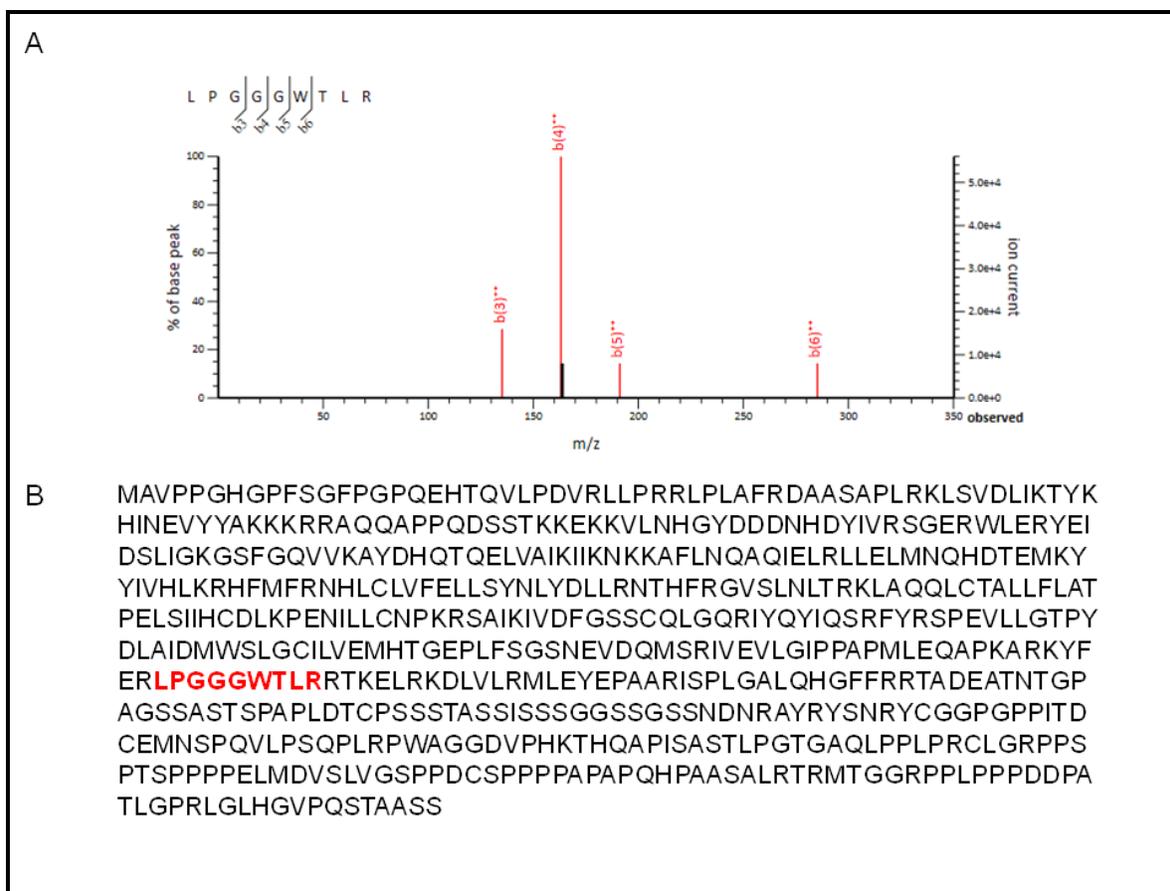


Figura 12. Espectrograma m/z para la identificación de cinasa Dyrk1B. A) Espectrograma m/z de los iones de fragmentación (MS/MS) (picos en color rojo) del ión precursor (MS) LPGGWTLR. Los valores de masa/carga (m/z) para cada ión de fragmentación son de 135.18, 163.18, 191.22 y 285.24 para los picos b(3)⁺⁺, b(4)⁺⁺, b(5)⁺⁺ y b(6)⁺⁺ respectivamente. B) Alineamiento del péptido identificado (secuencia en rojo) contra la secuencia blanco.

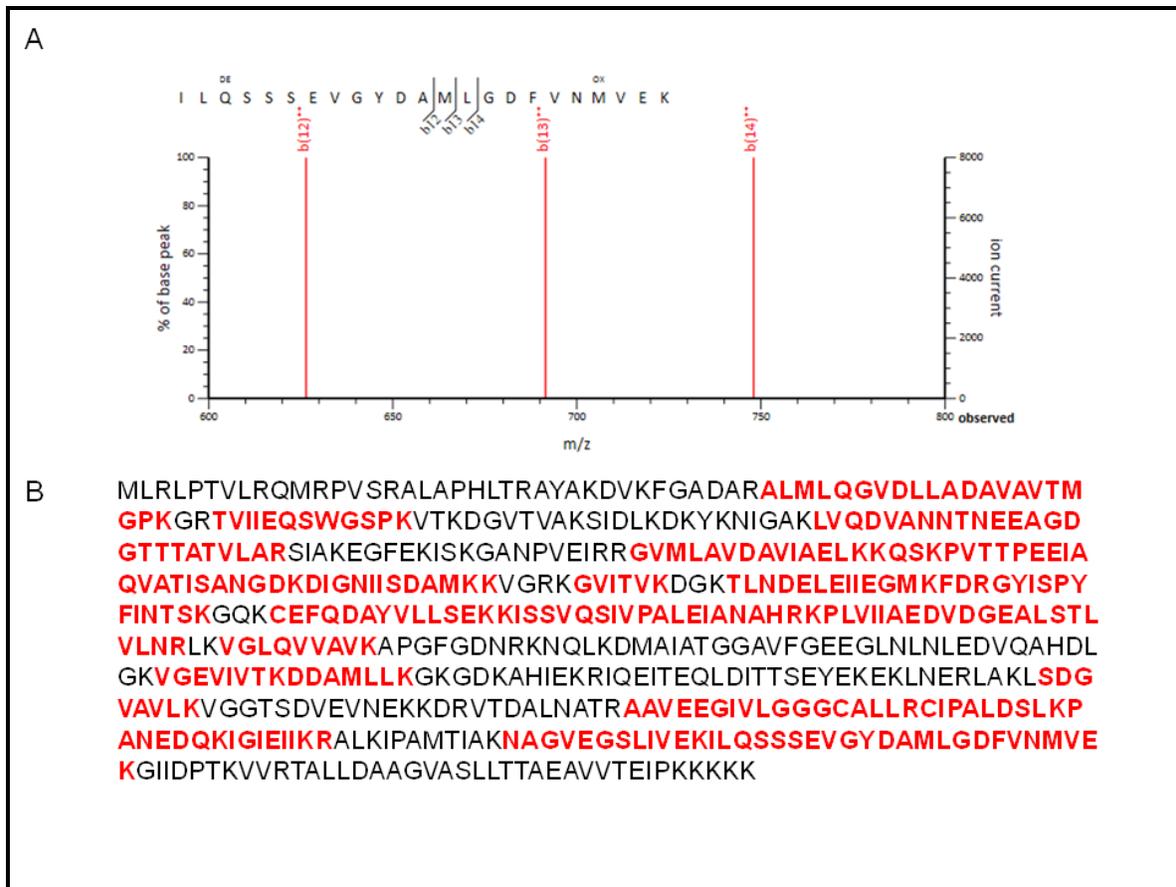


Figura 13. Espectrograma m/z para la identificación de proteína de choque térmico 60 kDa (Hspd1). A) Espectrograma m/z de los iones de fragmentación (MS/MS) (picos en color rojo) del ión precursor (MS) ILQSSSEVGYDAMLGDFVNMVEK. Los valores de masa/carga (m/z) para cada ión de fragmentación son de 626.29, 691.81 y 784.35 para los picos b(12)⁺⁺, b(13)⁺⁺ y b(14)⁺⁺ respectivamente. B) Alineamiento de todos los péptidos identificados (secuencia en rojo) contra la secuencia blanco. *DE*: deamidación; *OX*: oxidación.

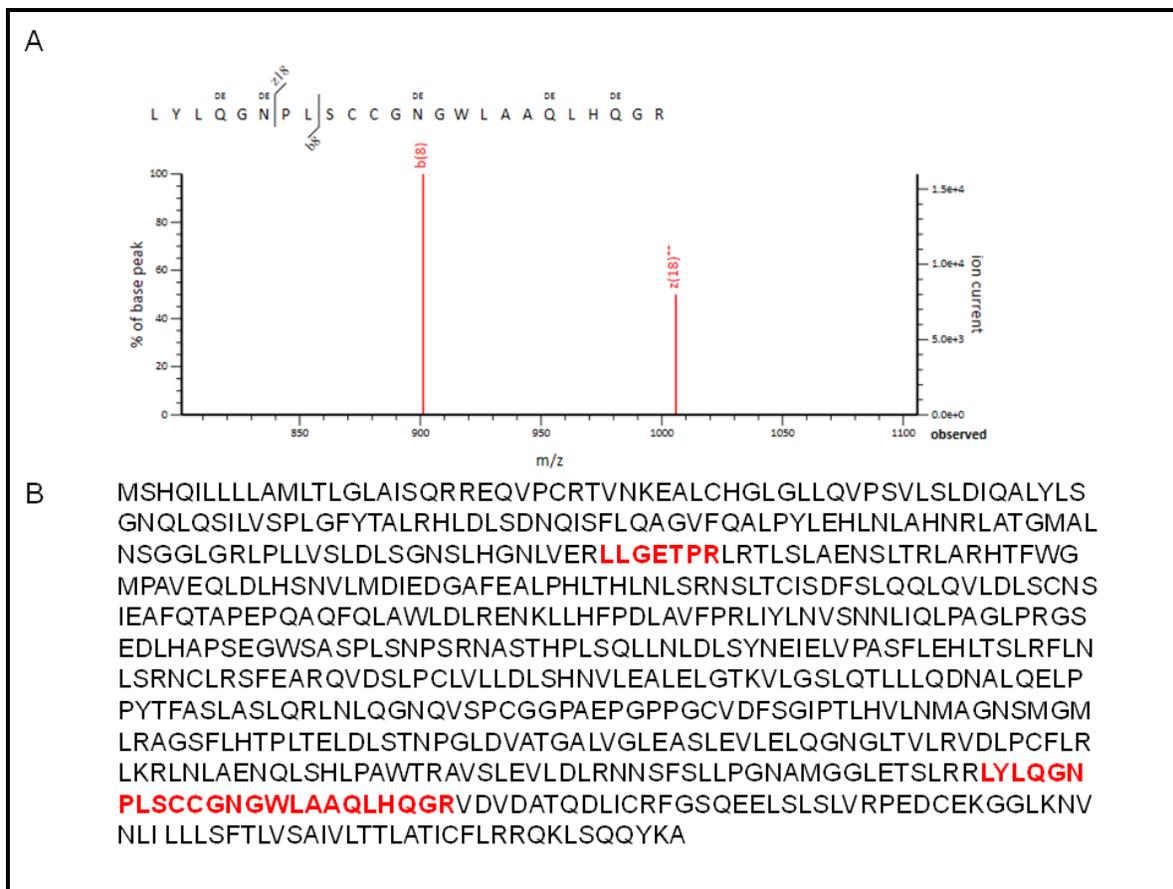


Figura 14. Espectrograma m/z para la identificación de precursor con repetidos de leucina 32. A) Espectrograma m/z de los iones de fragmentación (MS/MS) (picos en color rojo) del ión precursor (MS) LYLQGNPLSCCGNGWLAAQLHQGR. Los valores de masa/carga (m/z) para cada ión de fragmentación son de 901.46 y 1005.94 para los picos b(8) y z(18)⁺ respectivamente. B) Alineamiento de todos los péptidos identificados (secuencia en rojo) contra la secuencia blanco. *DE*: deamidación.

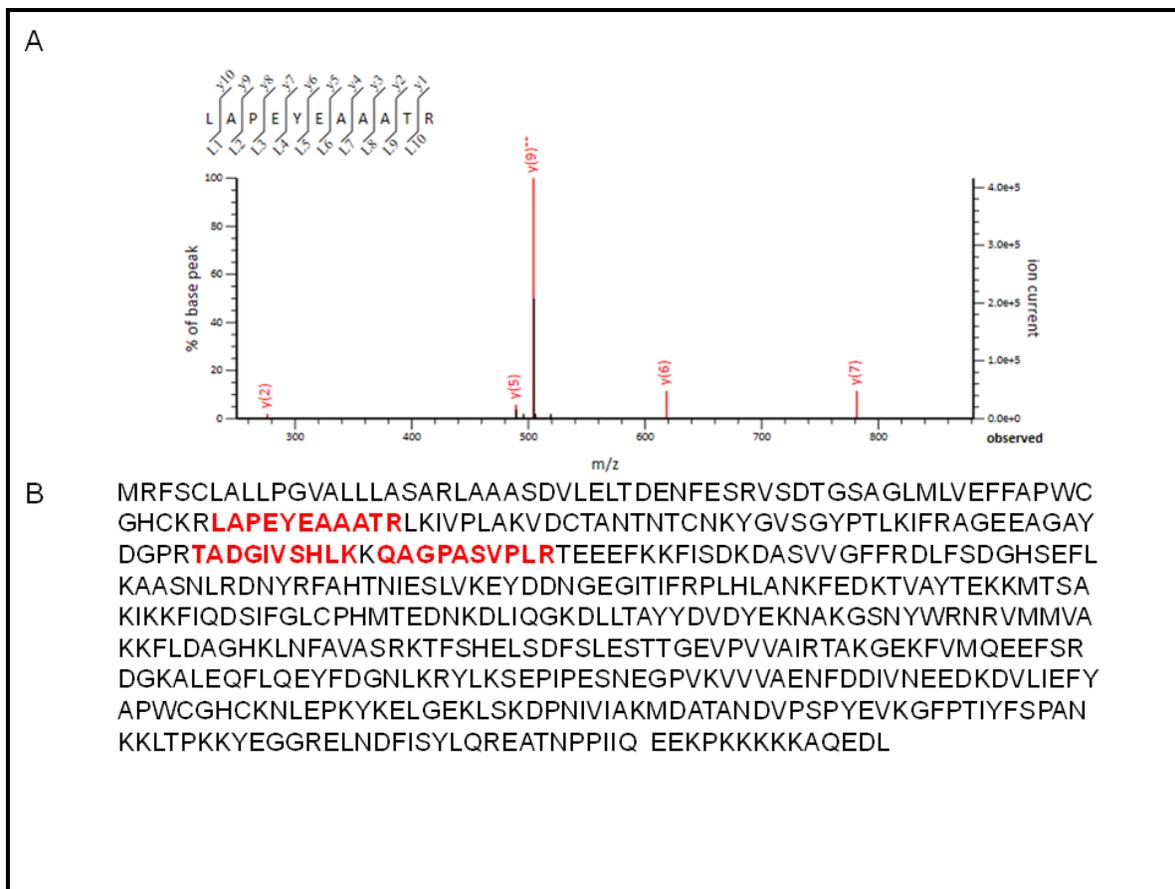


Figura 15. Espectrograma m/z para la identificación de fosfolipasa C alfa/Disulfuro isomerasa 3. A) Espectrograma m/z de los iones de fragmentación (MS/MS) (picos en color rojo) del ión precursor (MS) LAPEYEEAATR. Los valores de masa/carga (m/z) para cada ión de fragmentación son de 276.16, 489.16, 504.24, 618.32 y 781.38 para los picos y(2), by(5), y(9)⁺⁺, y(6) y y(7) respectivamente. B) Alineamiento de todos los péptidos identificados (secuencia en rojo) contra la secuencia blanco.

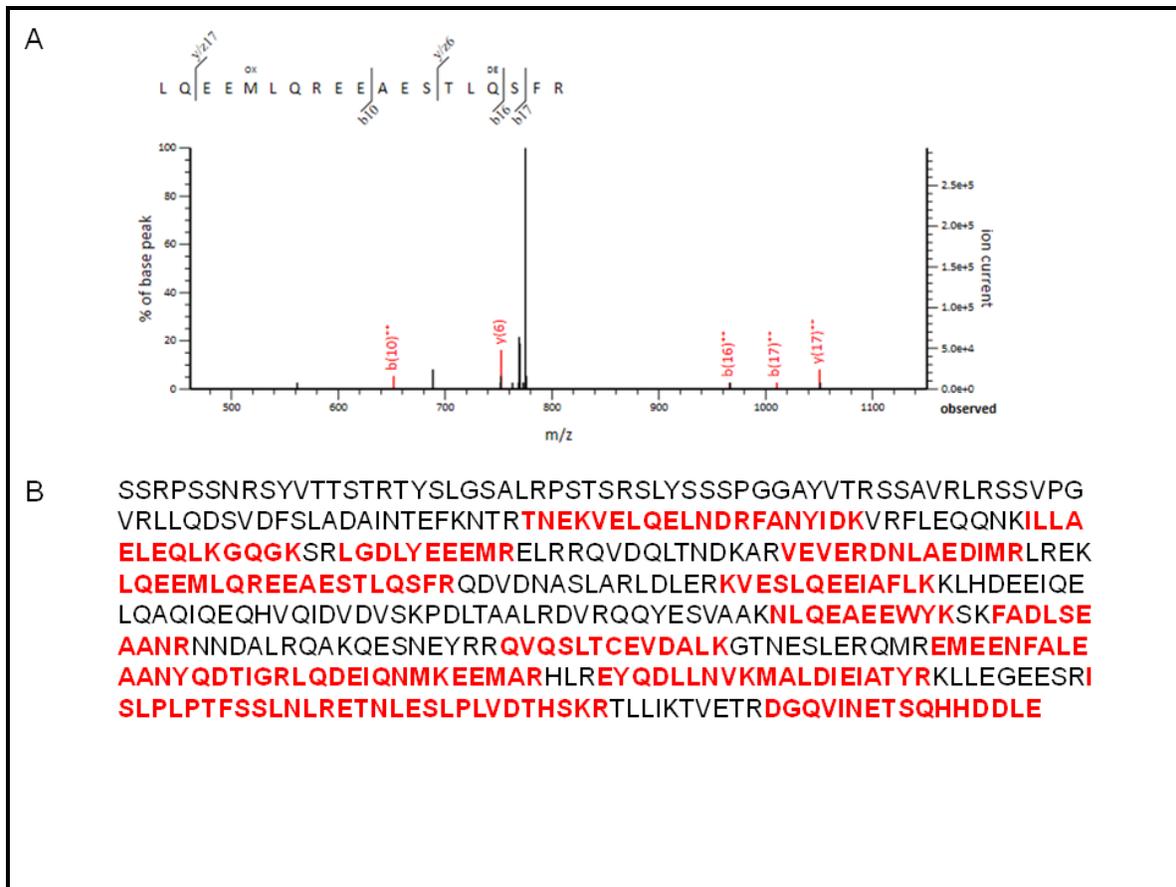


Figura 16. Espectrograma m/z para la identificación de vimentina. A) Espectrograma m/z de los iones de fragmentación (MS/MS) (picos en color rojo) del ión precursor (MS) LQEEMLQREEAESTLQSFR. Los valores de masa/carga (m/z) para cada ión de fragmentación son de 651.80, 651.34, 966.94, 1010.46 y 1050.48 para los picos b(10)⁺⁺, y(6), b(16)⁺⁺, b(17)⁺⁺ y y(17)⁺⁺ respectivamente. B) Alineamiento de todos los péptidos identificados (secuencia en rojo) contra la secuencia blanco. *DE*: deamidación; *OX*: oxidación.

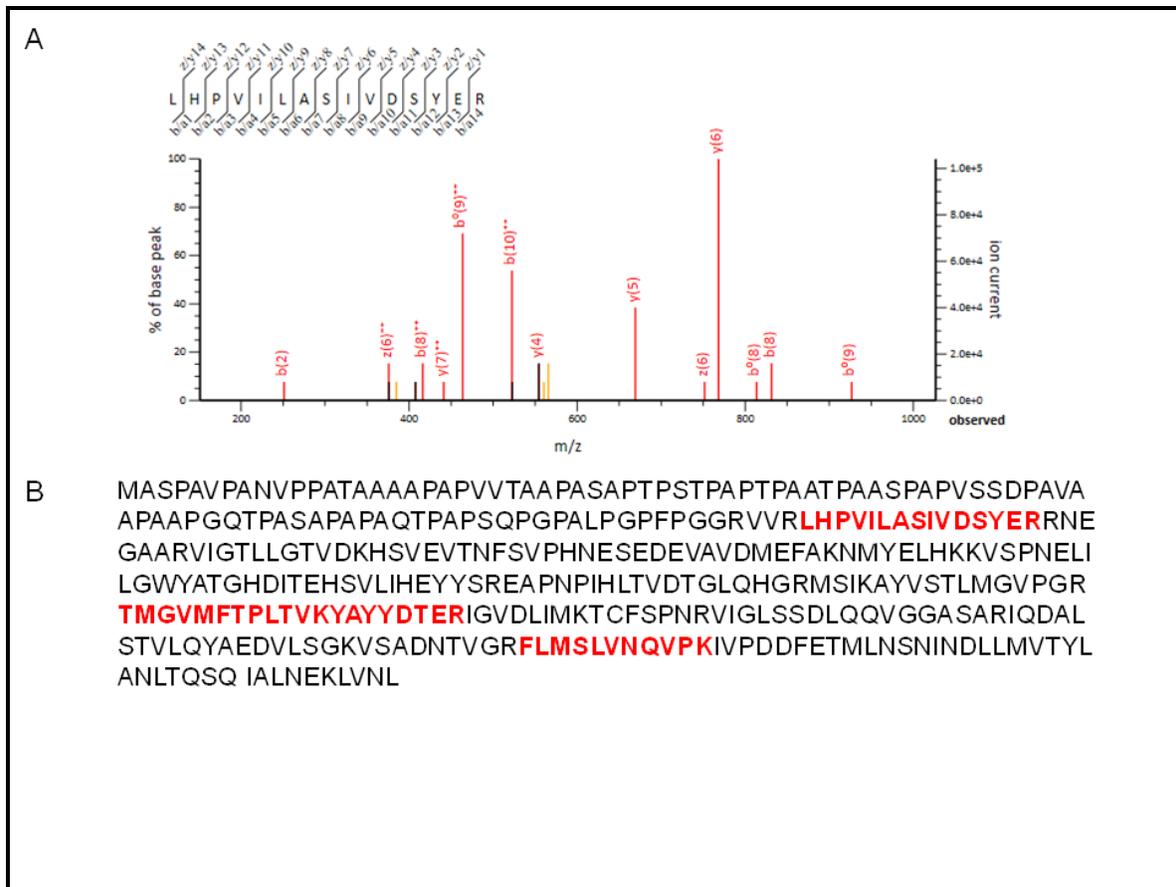


Figura 17. Espectrograma m/z para la identificación de factor eucariota de inicio de la traducción 3,F (elf3f). A) Espectrograma m/z de los iones de fragmentación (MS/MS) (picos en color rojo) del ión precursor (MS) LHPVILASIVDSYER. Los valores de masa/carga (m/z) para cada ión de fragmentación son de 251.15, 376.16, 416.25, 441.22, 463.79, 522.33, 554.25, 669.28, 751.32, 768.35, 813.49, 831.50 y 926.58 para los picos b(2), z(6)⁺⁺, b(8)⁺⁺, y(7)⁺⁺, b^o(9)⁺⁺, b(10)⁺⁺, y(4), y(5), z(6), y(6), b^o(8), b(8) y b^o(9) respectivamente. B) Alineamiento de todos los péptidos identificados (secuencia en rojo) contra la secuencia blanco.

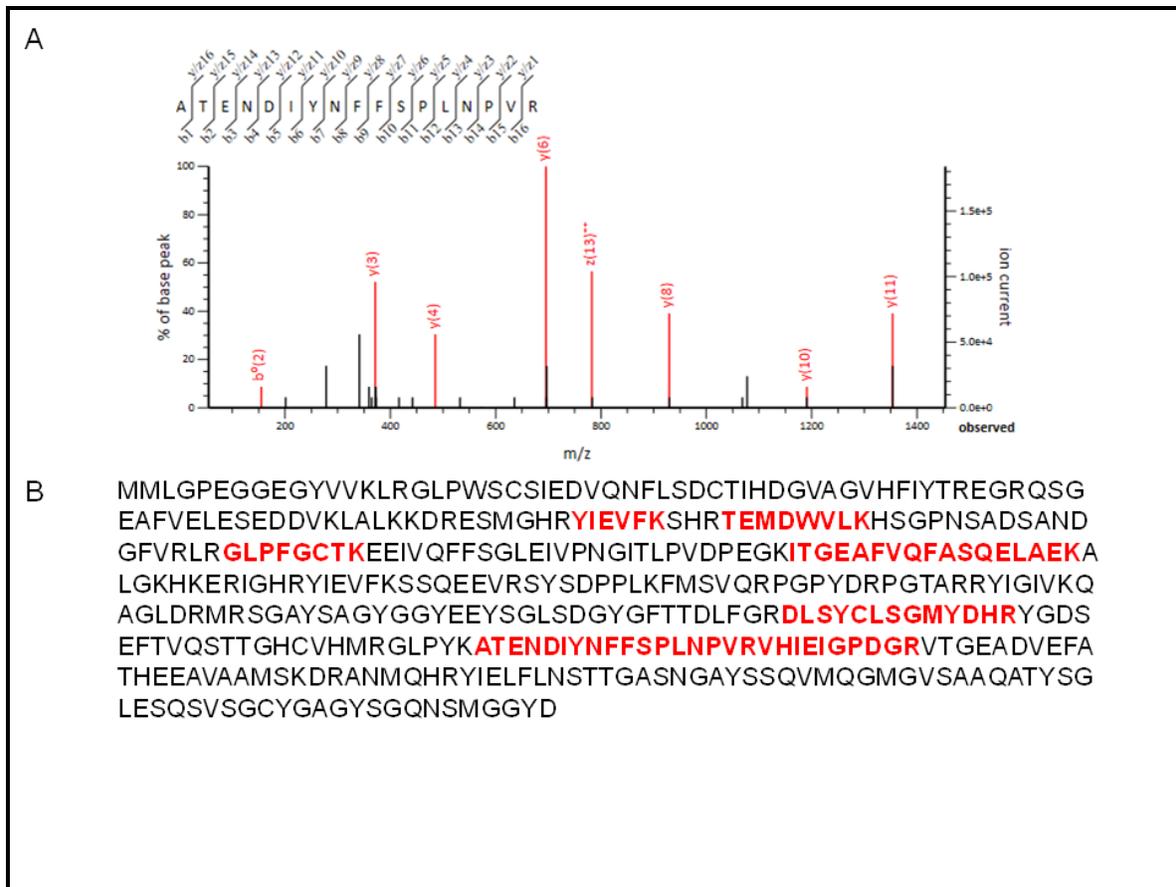


Figura 18. Espectrograma m/z para la identificación de ribonucleoproteína nuclear heterogénea F. A) Espectrograma m/z de los iones de fragmentación (MS/MS) (picos en color rojo) del ión precursor (MS) ATENDIYNFFSPLNPVR. Los valores de masa/carga (m/z) para cada ión de fragmentación son de 155.08, 371.24, 485.28, 695.41, 782.89, 929.52, 1190.63 y 1353.69 para los picos b°(2), y(3), y(4), y(6), z(13)++, y(8), y(10) y y(11) respectivamente. B) Alineamiento de todos los péptidos identificados (secuencia en rojo) contra la secuencia blanco.

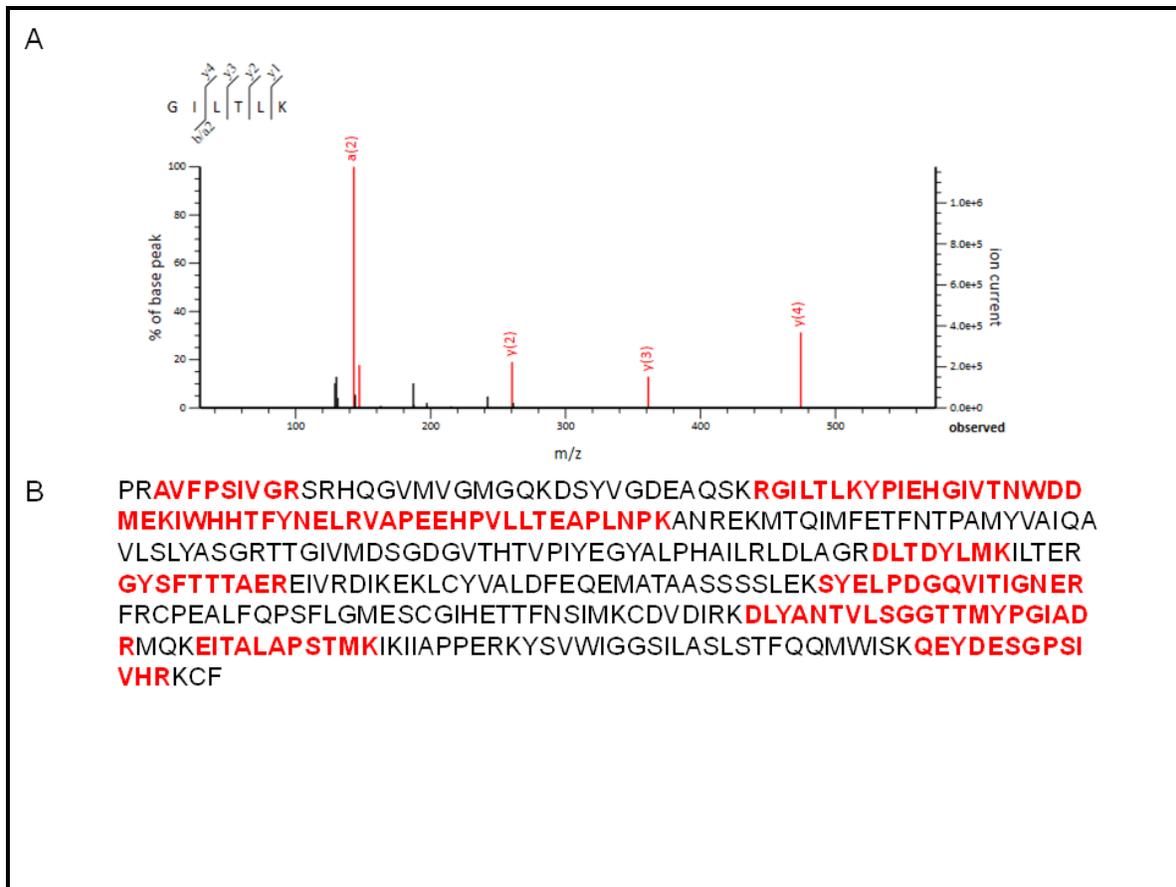


Figura 19. Espectrograma m/z para la identificación de β -actina. A) Espectrograma m/z de los iones de fragmentación (MS/MS) (picos en color rojo) del ión precursor (MS) GILTLR. Los valores de masa/carga (m/z) para cada ión de fragmentación son de 143.11, 260.19, 361.224 y 474.32 para los picos a(2), y(2), y(3) y by(4) respectivamente. B) Alineamiento de todos los péptidos identificados (secuencia en rojo) contra la secuencia blanco.

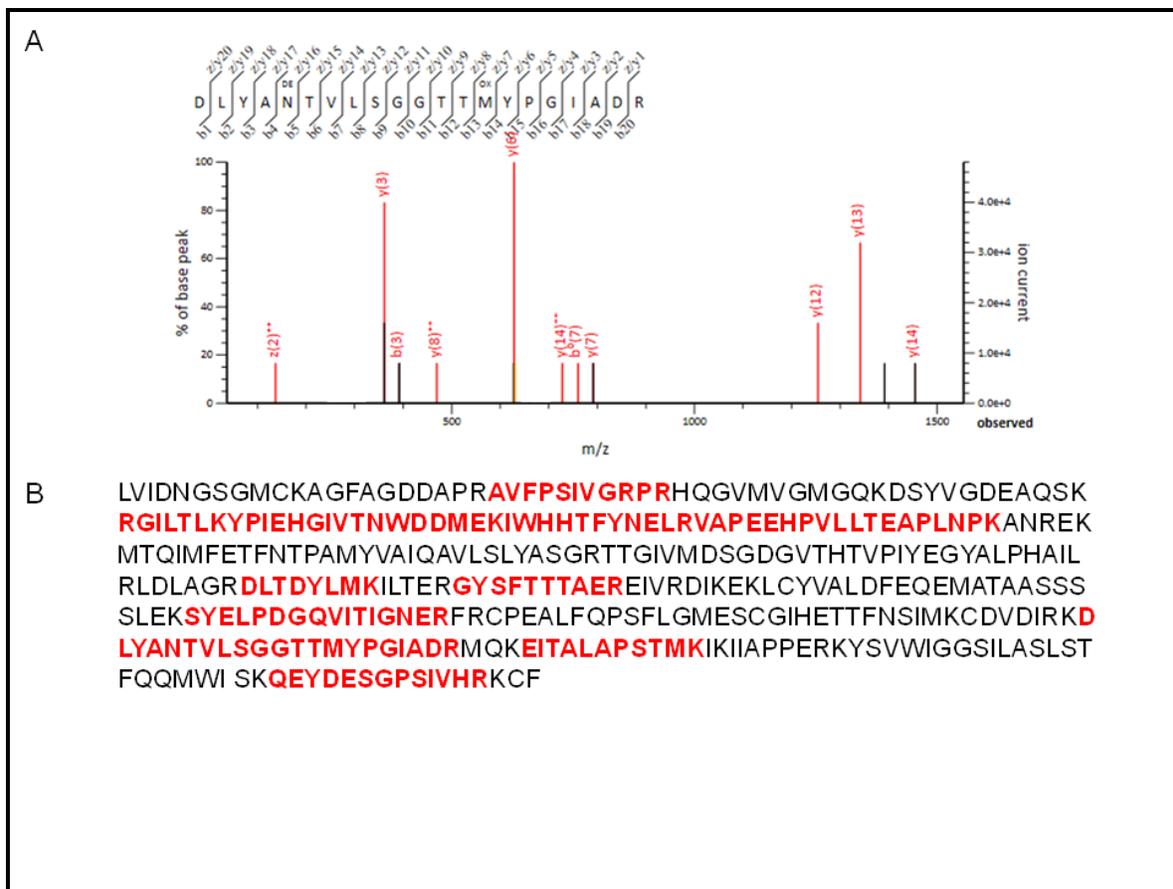


Figura 20. Espectrograma m/z para la identificación de γ -actina. A) Espectrograma m/z de los iones de fragmentación (MS/MS) (picos en color rojo) del ión precursor (MS) LFVTNDAATILR. Los valores de masa/carga (m/z) para cada ión de fragmentación son de 137.28, 361.44, 392.16, 469.38, 628.56, 7.27.92, 760.26, 791.40, 1254.48, 1341.50 y 1454.39 para los picos z(2)⁺⁺, y(3), b(3), y(8)⁺⁺, y(14)⁺⁺, b^o(7), y(7), y(12), y(13) y y(14) respectivamente. B) Alineamiento de todos los péptidos identificados (secuencia en rojo) contra la secuencia blanco.

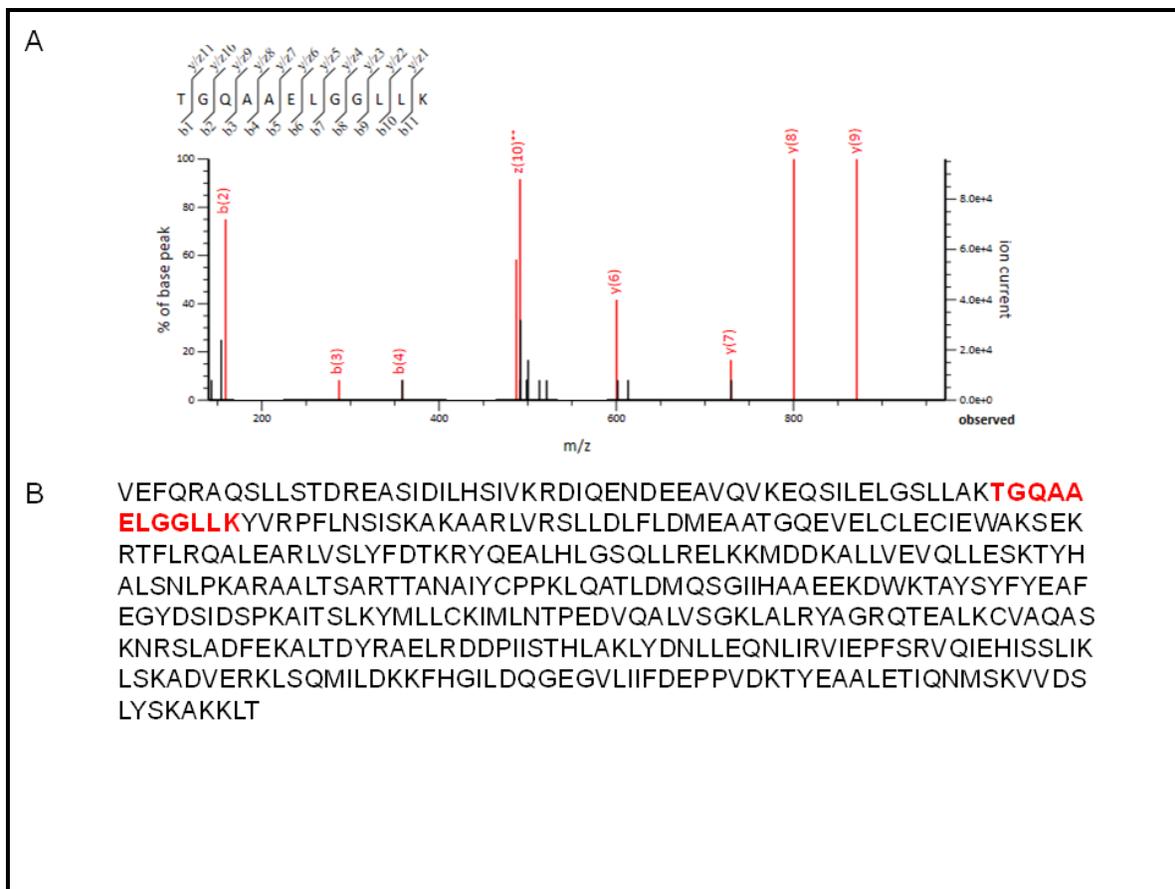


Figura 21. Espectrograma m/z para la identificación de proteína Psm11. A) Espectrograma m/z de los iones de fragmentación (MS/MS) (picos en color rojo) del ión precursor (MS) TGQAAELGGLLK. Los valores de masa/carga (m/z) para cada ión de fragmentación son de 159.09, 287.16, 358.32, 491.39, 600.36, 729.30, 800.47 y 871.38 para los picos b(2), b(3), b(4), z(10), y(6), y(7), y(8) y y(9) respectivamente. B) Alineamiento de todos los péptidos identificados (secuencia en rojo) contra la secuencia blanco.

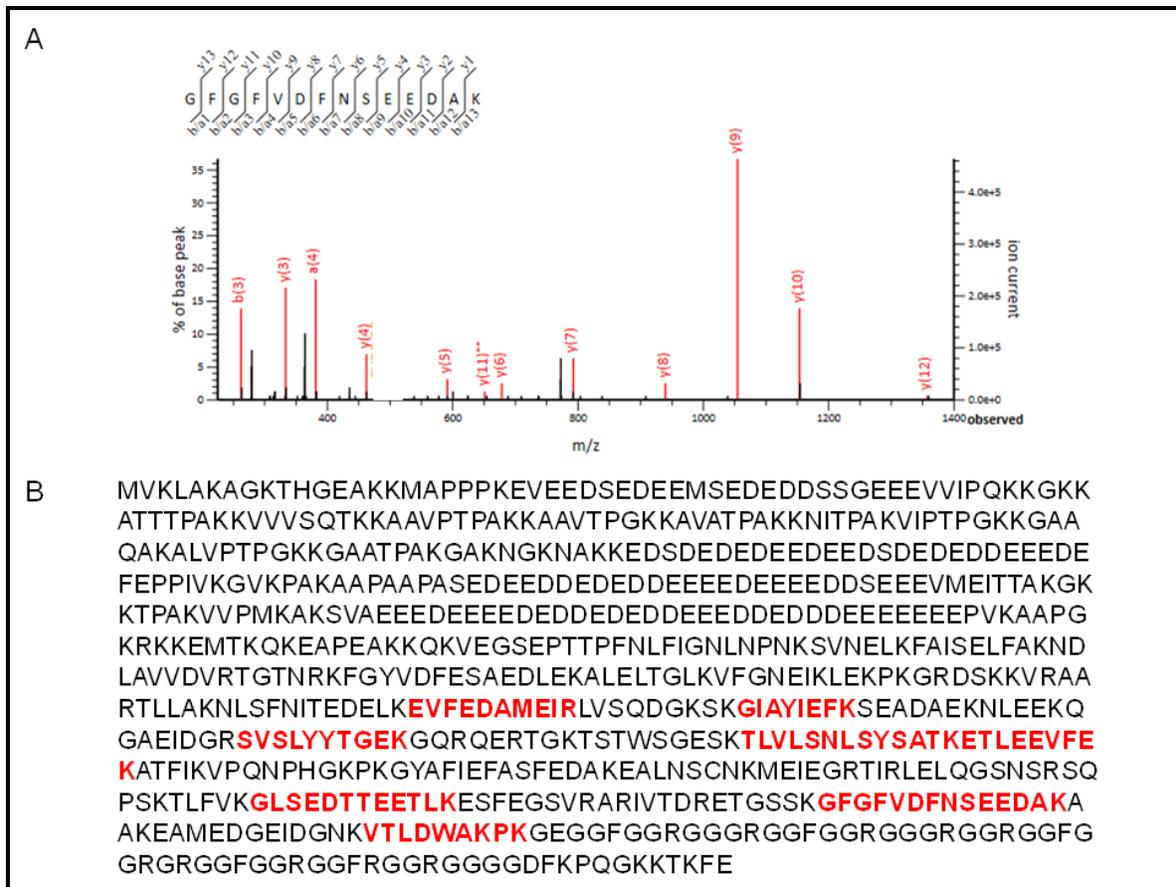


Figura 22. Espectrograma m/z para la identificación de nucleolina. A) Espectrograma m/z de los iones de fragmentación (MS/MS) (picos en color rojo) del ión precursor (MS) GFGFVDFNSEEDAK. Los valores de masa/carga (m/z) para cada ión de fragmentación son de 262.23, 333.33, 462.30, 591.44, 651.12, 678.42, 792.50, 939.45, 1054.55, 1153.50 y 1357.56 para los picos b(3), y(3), a(4), y(4), y(5), y(11)⁺⁺, y(6), y(7), y(8), y(9), y(10) y y(12) respectivamente. B) Alineamiento de todos los péptidos identificados (secuencia en rojo) contra la secuencia blanco.

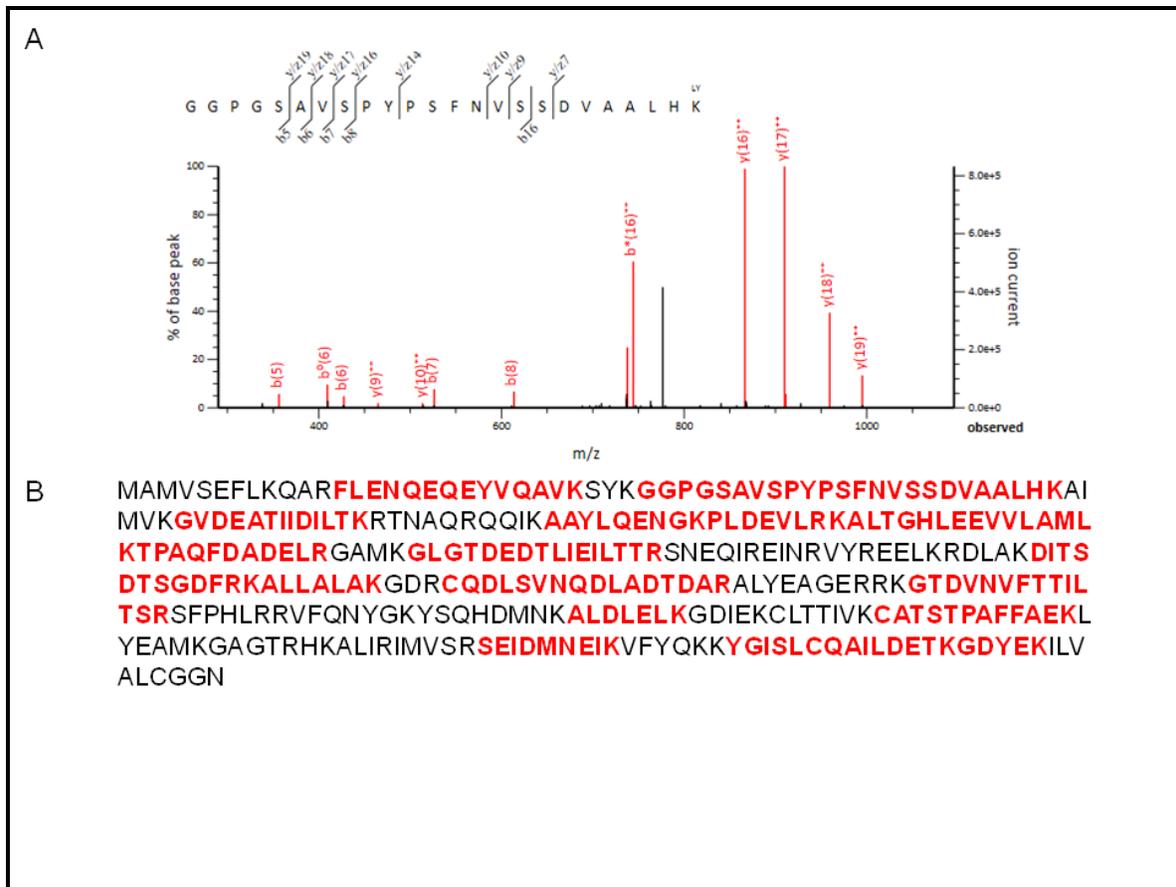


Figura 23. Espectrograma m/z para la identificación de anexina A1. A) Espectrograma m/z de los iones de fragmentación (MS/MS) (picos en color rojo) del ión precursor (MS) GGPGSAVSPYPSFNVSSDVAALHK. Los valores de masa/carga (m/z) para cada ión de fragmentación son de 356.38, 409.30, 427.37, 464.91, 513.66, 526.39, 613.68, 737.33, 866.46, 909.96, 959.41, 995.06 para los picos b(5), b°(6), b(6), y(9)⁺⁺, y(10)⁺⁺, b(7), b(8), b°(16)⁺⁺, y(16)⁺⁺, y(17)⁺⁺, y(18)⁺⁺ y y(19)⁺⁺ respectivamente. B) Alineamiento de todos los péptidos identificados (secuencia en rojo) contra la secuencia blanco.

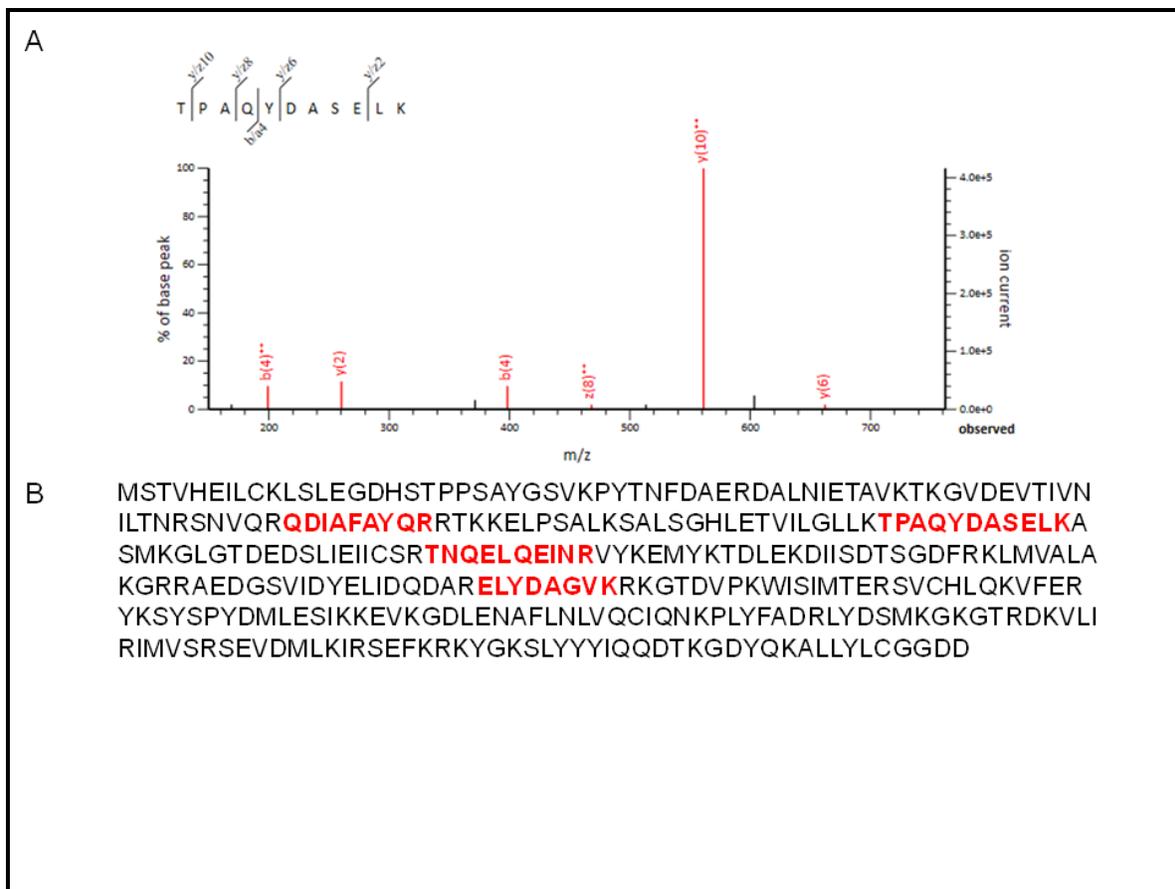


Figura 24. Espectrograma m/z para la identificación de anexina A2. A) Espectrograma m/z de los iones de fragmentación (MS/MS) (picos en color rojo) del ión precursor (MS) TPAQYDASELK. Los valores de masa/carga (m/z) para cada ión de fragmentación son de 199.21, 260.34, 398.28, 468.18, 561.226 y 662.22 para los picos b(4)⁺⁺, y(2), b(4), z(8)⁺⁺, y(10)⁺⁺, y y(6) respectivamente. B) Alineamiento de todos los péptidos identificados (secuencia en rojo) contra la secuencia blanco.

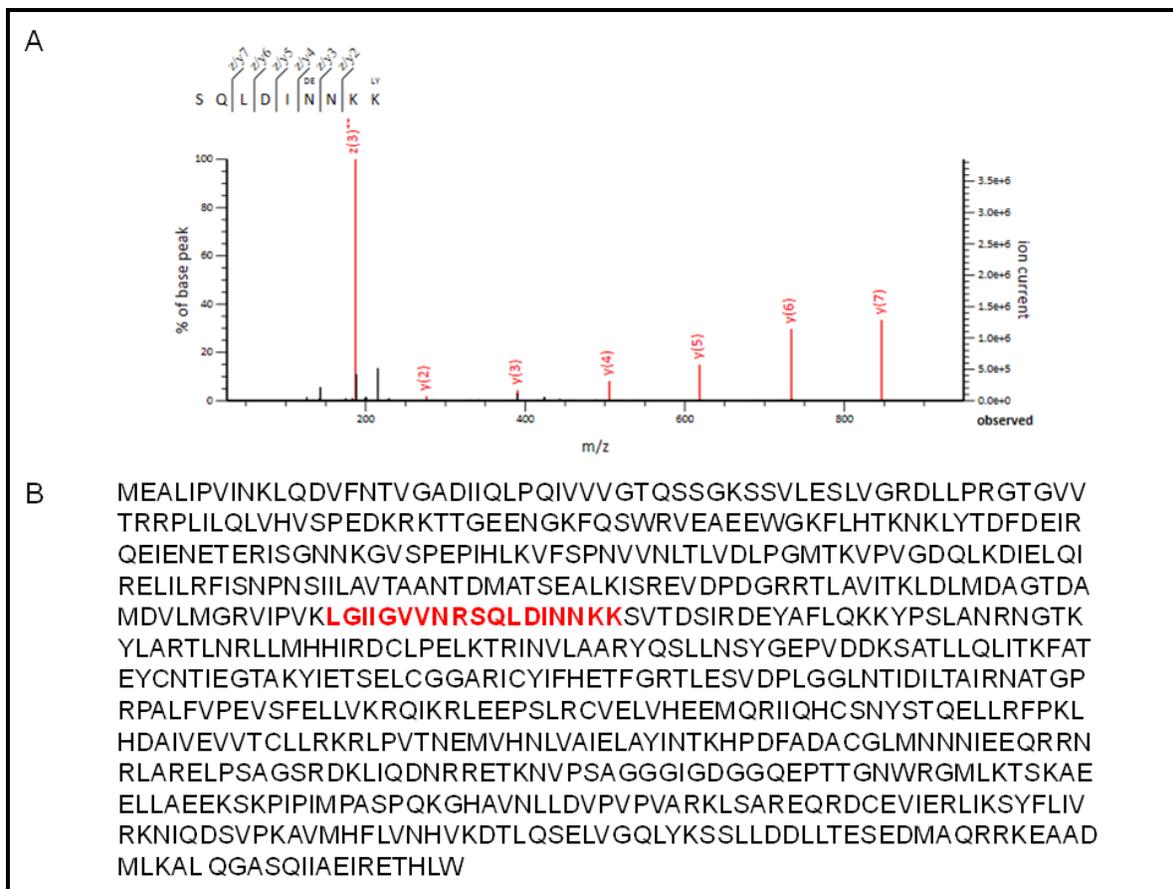


Figura 25. Espectrograma m/z para la identificación de dinamina 1. A) Espectrograma m/z de los iones de fragmentación (MS/MS) (picos en color rojo) del ión precursor (MS) SQLDINNKK. Los valores de masa/carga (m/z) para cada ión de fragmentación son de 187.25, 276.38, 390.45, 505.47, 618.52, 733.56, 846.64 para los picos z(3)⁺⁺, y(2), y(3), y(4), y(5), y(6), y y(7) respectivamente. B) Alineamiento de todos los péptidos identificados (secuencia en rojo) contra la secuencia blanco. *DE*: deamidación.

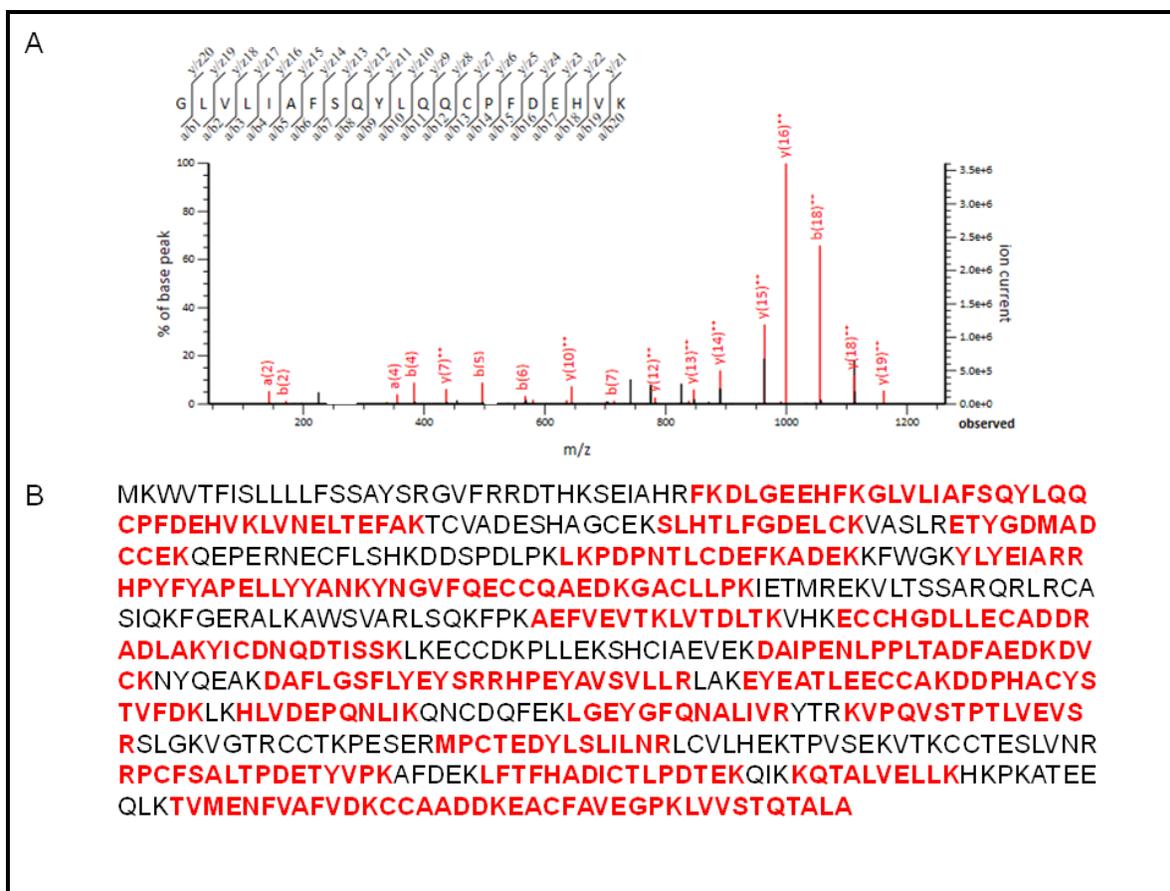


Figura 26. Espectrograma m/z para la identificación de albumina. A) Espectrograma m/z de los iones de fragmentación (MS/MS) (picos en color rojo) del ión precursor (MS) GLVLIAFSQYLQQCPFDEHVK. Los valores de masa/carga (m/z) para cada ión de fragmentación son de 143.11, 171.15, 355.43, 383.42, 436.57, 496.45, 567.58, 644.37, 714.78, 782.61, 846.65, 890.49, 999.47, 1055.59, 1112.04 y 1161.45 para los picos a(2), b(2), a(4), b(4), y(7)⁺⁺, b(5), b(6), y(10)⁺⁺, b(7), y(12)⁺⁺, y(13)⁺⁺, y(14)⁺⁺, y(15)⁺⁺, y(16)⁺⁺, b(18)⁺⁺, y(18)⁺⁺ y y(19)⁺⁺ respectivamente. B) Alineamiento de todos los péptidos identificados (secuencia en rojo) contra la secuencia blanco.

La información adicional para cada una de las 18 proteínas identificadas se encuentra descrita en la Tabla 3. Cabe señalar, que en algunos casos se identificaron más de una proteína en el mismo spot.

Tabla 3. Proteínas identificadas por espectrometría de masas (ESI-LC-MS/MS)

Proteína (spot)	Número GI (NCBI)	PM*/pI*	Péptidos encontrados	Cobertura de la proteína (%)	Secuencia de los péptidos MS/MS	Puntaje en MS-BLAST	Puntaje en Mascot
Chaperonina con subunidad teta TCP-1 (1)	gi 5295992	54/5.1	4	8	AVDDGVNTFK DVDEVSSLLR FAEAFEAIPIR LFVTNDAATILR	333 (+)	44
Proteína complejo T 1 (Tcp-1) (1)	gi 228954	60/5.8	2	4	SSFPGVGLDK YPVNSVNILK	134 (+)	61
Factor de crecimiento tipo insulina 1 (Igf1) (1)	gi 148689512	18/6.1	1	5	SPSLSTNK	53 (+)	42
Cinasa Dyrk1B (<i>Dual Specificity Tyrosine-Phosphorylation-Regulated Kinase 1b</i>) (1)	gi 6753698	65/9.1	1	2	LPGGGWTLR	64 (+)	37
Proteína de choque térmico 60 kDa (Hspd1) (1)	gi 76779273	60/8.0	22	69	GVITVK IGIEIIKR SDGVAVLK VGLQVVAVK IGIEIIKR NAGVEGSLIVEK DIGNIISDAMKK TVIIEQSWGSPK GYISPYFINTSK TLNDELEIIIEGMK GVMLAVDAVIAELKK CEFQDAYVLLSEK VGEVIVTKDDAMLLK AAVEEGIVLGGGCALLR CIPALDSLKPANEDQK ISSVQSIVPALEIANHR TLNDELEIIIEGMKFDR KISSVQSIVPALEIANHR ALMLQGVDLLADAVAVTMGPK KPLVIAEDVDGEALSTLVNLR QSKPVTTPPEEIAQVATISANGDK ILQSSSEVGYDAMLGDFVNMVEK LVQDVANNTNEEAGDGTATVLR	2343 (+)	496
Precursor con repetidos de leucina 32 (1)	gi 164607126	72/5.6	2	5	LLGETPR LYLQGNPLSCCGNGWLAQLHQGR	183(+)	43
Fosfolipasa C alfa/Disulfuro isomerasa 3 (1)	gi 200397	54/5.6	3	6	QAGPASVPLR TADGIVSHLK LAPEYEAATR	236 (+)	44
Vimentina (2)	gi 2078001	53/5.0	22	62	FANYIDK DNLAEDIMR FADLSEAANR VELQELNDR EYQDLLNVK ILLAELEQLK LGDLYEEEMR EEAESTLQSF NLQEAEEWYK MALDIEIATYR QVQSLTCEVDALK KVESLQEEIAFLK ILLAELEQLKGQK ISLPLPTFSSLNLR TNEKVELQELNDR ETNLESPLVDTHSKR ETNLESPLVDTHSK	1732 (+)	347

					VEVERDNLAEDIMR LQDEIQNMKEEMAR DGQVINETSQHHDDLE EMEENFALEAANYQDTIGR LQEEMLQREEAESTLQSFR		
Factor eucariota de inicio de la traducción 3,F (elf3f) (3)	gij47682703	37/5.2	4	12	YAYYDTER FLMSLVNQVPK TMGVMFTPLTVK LHPVILASIVDSYER	364 (+)	61
Ribonucleoproteína nuclear heterogénea F (3)	gij19527048	45/5.3	7	19	YIEVFK GLPFGCTK TEMDWVLK VHIEIGPDGR DLSYCLSGMYDHR ITGEAFVQFASQELAEK ATENDIYNFFSPLNPVR	603 (+)	109
Beta-actina (3)	gij49868	42/5.2	12	44	RGILTLK AVFPSIVGR DLTDYLMK GYSFTTTAER EITALAPSTMK QEYDESGPSIVHR IWHHTFYNELR QEYDESGPSIVHR SYELPDGQVITIGNER VAPEEHPVLLTEAPLNPK YPIEHGIVTNWDDMEK DLYANTVLSGGTTMYPGIADR	1109 (+)	279
Gamma-actina (3)	gij809561	42/5.3	12	42	RGILTLK DLTDYLMK GYSFTTTAER EITALAPSTMK AVFPSIVGRPR QEYDESGPSIVHR IWHHTFYNELR QEYDESGPSIVHR SYELPDGQVITIGNER VAPEEHPVLLTEAPLNPK YPIEHGIVTNWDDMEK DLYANTVLSGGTTMYPGIADR	1103 (+)	278
Proteína Psm11 (4)	gij33585718	46/6.0	1	3	TGQAAELGGLLK	75 (+)	41
Nucleolina (5)	gij13529464	110/4.6	8	12	GIAYIEFK VTLDWAKPK ETLEEVFEK SVSLYYTGEK EVFEDAMEIR GLSEDTEETLK TLVLSNLSYSATK GFGFVDFNSEEDAK	704 (+)	157
Anexina A1 (5)	gij124517663	35/6.6	17	94	ALLLAK ALDLELK SEIDMNEIK DITSDTSGDFR TPAQFDADEL CATSTPAFFAEK DITSDTSGDFRK GVDEATIIDLTK GTDVNVFTTILTSR ALTGHLEEVVLAMLK FLENQEQEYVQAVK GLGTDEDTLIEILTTR AAYLQENGKPLDEVLR CQDLSVNQDLADTDAR AAYLQENGKPLDEVLRK YGISLCQAILDETKGDYEK GGPGSAVSPYPSFNVSSDVAALHK	1460 (+)	257

Anexina A2 (5)	gij6996913	37/7.5	4	12	ELYDAGVK QDIAFAYQR TPAQYDASELK TNQELQEINR	226 (+)	45
Dinamina 1 (6)	gij22036081	60/6.3	2	3	LGIIGVVNR SQLDINNKK	128 (+)	84
Albumina (7)	gij30794280	69/5.5	33	73	GACLLPK LVTDLTK AEFVEVTK YLYEIAR LVVSTQTALA KQTALVELLK LVNELTEFAK FKDLGEEHFK HPEYAVSVLLR HLVDEPQNLK TVMENFVAFVDK SLHTLFGDELCK RHPEYAVSVLLR YICDNQDTISSK ETYGDMADCCEK LGEYGFQNALIVR EYEATLEECCA DDPHACYSTVFDK DAFLGSFLYEYSR LKPDPNTLCDEFK KVPQVSTPTLVEVSR MPCTEDYLSLILNR YNGVFQECCQAEDK ECCHGDLLCADDR MPCTEDYLSLILNR RPCFSALTPDETYVVK HPYFYAPELLYYANK LFTFHADICTLPDTEK CCAADDKEACFAVEGPK LKPDPNTLCDEFKADEK RHPYFYAPELLYYANK ECCHGDLLCADDRADLAK DAIPENLPPLTADFAEDKDVCK GLVLIAFSQYLQCCPFDEHVK	2903 (+)	1975

*, Valores teóricos; MW, Peso molecular (kDa); pI, Punto Isoeléctrico; (+), Identificación validada en MS-BLAST.

Regulación a la alta de Anxa1, Anxa2, eE3f y Dyrk1B por privación de suero en células NIH3T3 (PS/NIH3T3)

Los cambios en la expresión de *Anxa1*, *Anxa2*, *Dyrk1B*, *Ncl*, *Igf1* y *elf3f* se validaron por RT-qPCR. Los resultados confirmaron la regulación a la alta de dichas proteínas. En privación de suero (PS/NIH3T3), los análisis mostraron un incremento relativo de 5.8, 3.1, 30 y 7.2 en la expresión de *Anxa1*, *Anxa2*, *Dyrk1B* y *elf3f*, respectivamente; mientras que *Igf1* y *Ncl* no presentaron cambios significativos (Figura 27A). Adicionalmente, se verificó por *western blot* que Gas1, *Anxa1*, *Anxa2* y *Dyrk1B* también se regularon a la alta a nivel de proteína en PS/NIH3T3 (Figura 27B-E).

Cabe señalar que a pesar de que *Ncl* no presentó cambios en su expresión (niveles de ARN mensajero), se realizó un experimento adicional por *western blot* para verificar sus niveles de proteína, ya que está reportado que *Ncl* es una proteína que se regula a la baja por actividad auto-proteolítica en células en arresto (S H Fang y Yeh, 1993). Los resultados confirmaron la regulación a la baja de *Ncl* en PS/NIH3T3, ya que la banda de 110 kDa que corresponde a la proteína intacta observada en las células en proliferación (Pro/NIH3T3), no se detectó en las células privadas de suero PS/NIH3T3 (Figura 27F). La Figura 27G muestra los niveles de β -actina como proteína normalizadora.

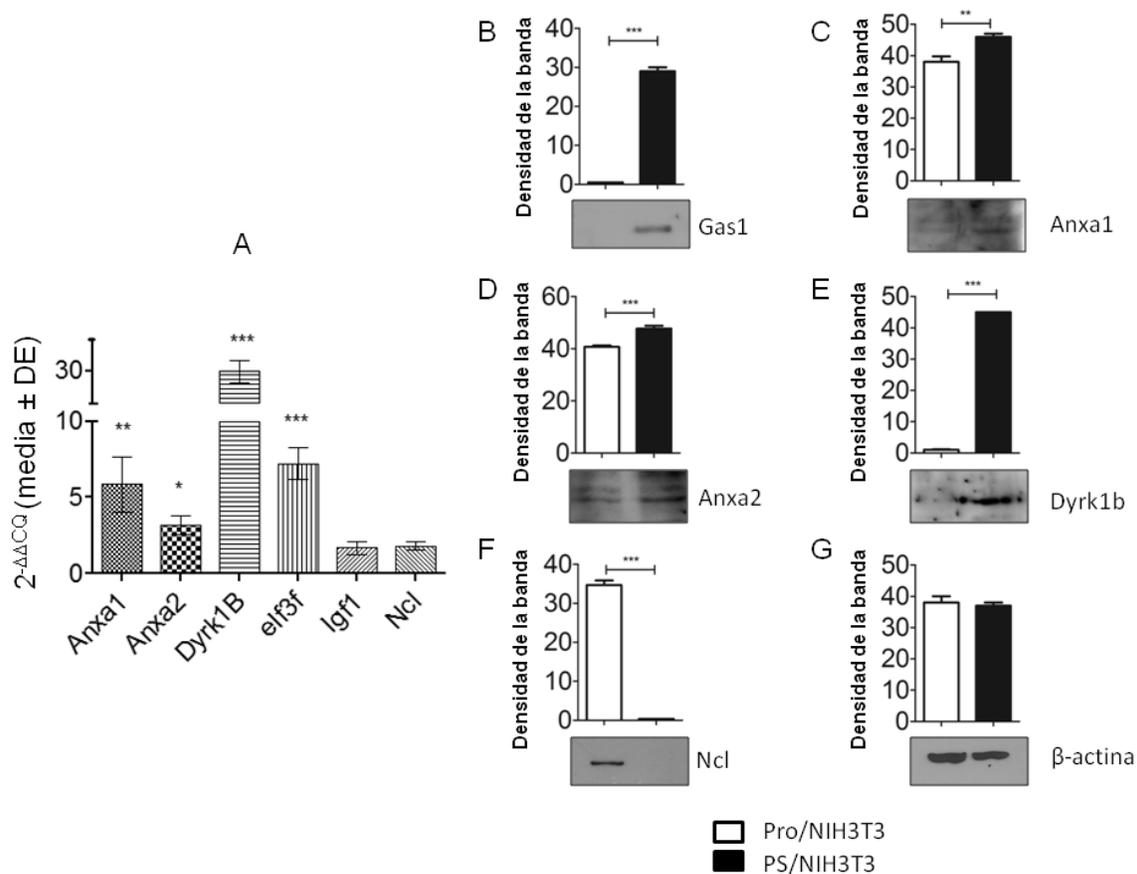


Figura 27. Cuantificación de los niveles de ARNm y proteína of Anxa1, Anxa2, Dyrk1B, elf3f, Igf1 y Ncl en Pro/NIH3T3 y PS/NIH3T3. A) Cuantificación por RT-qPCR de los niveles de ARNm en PS/NIH3T3 con respecto a Pro/NIH3T3 utilizando el método $2^{-\Delta\Delta C_T}$. B-G) Niveles de proteína en PS/NIH3T3 y Pro/NIH3T3 analizados por *western blot* y cuantificados por densitometría; la β -actina fue utilizada como proteína normalizadora. El análisis estadístico se realizó por la prueba *t* de *student*. Las barras representan la media \pm la desviación estándar (DE). *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$.

Inhibición de la proliferación en las clonas NIH3T3-iGAS1 por la sobreexpresión de GAS1

Para determinar el efecto exclusivo de la sobreexpresión de GAS1 sobre la proliferación y viabilidad celular, descartando el efecto de la privación de suero, se realizaron ensayos con los cultivos de las clonas NIH3T3-iGAS1 en presencia de 10% de suero fetal bovino (SFB 10%). Estos cultivos además, se realizaron en ausencia (-TET) o presencia (+TET) de tetraciclina (2 µg/mL) como inductor de la expresión de GAS1. Los resultados mostraron una reducción de la proliferación de 25% producida exclusivamente por la sobreexpresión de GAS1 (Figura 28A); sin embargo el porcentaje de viabilidad celular no se vió afectado significativamente (Figura 28B). Estos resultados se compararon con los resultados obtenidos por la privación de suero (PS/NIH3T3 vs Pro/NIH3T3), en donde se observó que la ausencia de suero no solamente reduce la proliferación en un 51% (Figure 28C); sino que también aumenta tres veces el porcentaje de células no-viables respecto a las células proliferantes (Figura 28D). Estos resultados dejan en claro que la privación de suero tiene un impacto mayor en la proliferación y la viabilidad celular que la sola sobreexpresión de GAS1.

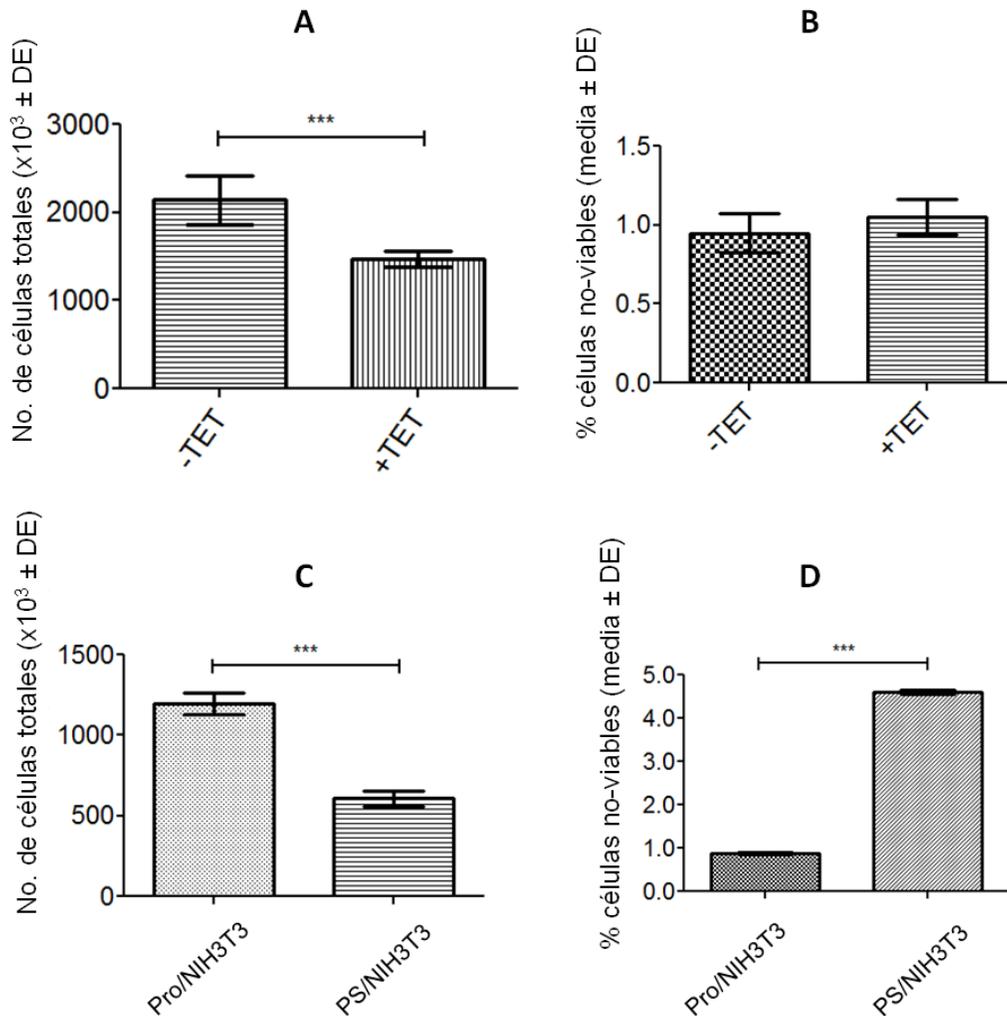


Figura 28. Ensayos de proliferación en NIH3T3-iGAS1 y NIH3T3. Método de exclusión con azul de tripano para determinar células viables y no-viables en clonas NIH3T3-iGAS1 y NIH3T3 silvestres: A-B) Clonas NIH3T3-iGAS1 sobreexpresando GAS1 por inducción con tetraciclina (+TET), y sin sobreexpresión de GAS1 (sin tetraciclina, -TET). Ambos cultivos fueron mantenidos en SFB 10%. C-D) Células silvestres NIH3T3 en condiciones de proliferación (Pro/NIH3T3) y privación de suero (PS/NIH3T3). El análisis estadístico se realizó por el método *t* de *student*. Las barras representan la media \pm la desviación estándar (DE). ***, $p < 0.001$.

Regulación a la alta de *Anxa1*, *Anxa2* y *Dyrk1B* inducida por *GAS1*

Tomando en cuenta que existen antecedentes en la literatura que relacionan a las proteínas *Anxa1*, *Anxa2*, *Dyrk 1B* y *Ncl* con el proceso del ciclo celular, estas proteínas se seleccionaron para validar si su regulación a la alta en las células privadas de suero (PS/NIH3T3) estaba relacionada con la expresión de *Gas1* en tales condiciones. Para este fin, se realizaron ensayos con cultivos de las clonas NIH3T3-iGAS1 en presencia de suero (SFB 10%) y en ausencia (-TET) o presencia (+TET) de tetraciclina (2µg/mL) como inductor de la sobreexpresión *GAS1*. Se evaluaron los niveles de proteína (*western blot*) y ARN mensajero (ARNm) (RT-qPCR) de *Anxa1*, *Anxa2*, *Dyrk1B* y *Ncl* producidos por la sobreexpresión de *GAS1* con respecto a la condición testigo (sin sobreexpresión de *GAS1*). Los resultados mostraron que la sobreexpresión de *GAS1* incrementó 53.4, 1.9, 8.6, y 4.6 veces los niveles de proteína de *GAS1*, *Anxa1*, *Anxa2*, y *Dyrk1B*, respectivamente; mientras que *Ncl* no mostró cambios significativos (Figura 29A-B). En tanto que, los niveles de ARNm de *GAS1*, *Anxa1*, *Anxa2*, y *Dyrk1B* tuvieron incrementos significativos de 14.4, 3.1, 16.8, y 7.7 veces, respectivamente, debido a la sobreexpresión de *GAS1*; los niveles de ARNm de *Ncl* no presentaron cambios significativos (Figura 29C).

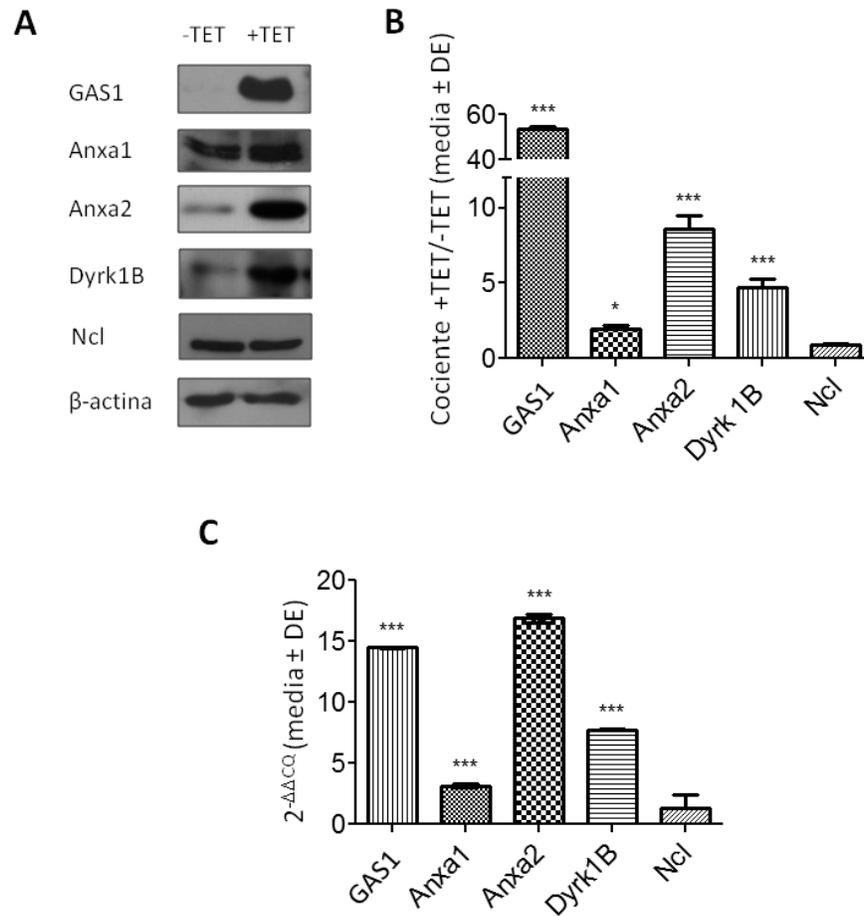


Figura 29. Regulación a la alta de Dyrk1B, Anxa1 y Anxa2 inducida por la sobreexpresión de GAS1 en las clonas NIH3T3-iGAS1. A) Análisis de los niveles de proteínas por *Western Blot* en las clonas NIH3T3-iGAS1 con sobreexpresión inducida de GAS1 por tetraciclina (+TET), y condición testigo sin sobreexpresión inducida de GAS1 (-TET). B) Análisis por densitometría de los niveles de proteína con base en el cociente de las densidades de +TET/-TET. C) Cuantificación por RT-qPCR de los niveles de ARNm en clonas NIH3T3-iGAS1 con sobreexpresión inducida de GAS1 por tetraciclina (+TET) con respecto a la condición testigo sin sobreexpresión inducida de GAS1 (-TET), utilizando el método $2^{-\Delta\Delta C_T}$. El análisis estadístico se realizó por la prueba *t* de *student*. Las barras representan la media \pm la desviación estándar (DE). *, $p < 0.05$; ***, $p < 0.001$.

Validación funcional de la relación GAS1-Dyrk1B

Se realizaron experimentos de validación funcional con cultivos de las clonas NIH3T3-iGAS1 en presencia de suero (SFB 10%), ausencia (testigo) o presencia de tetraciclina (2µg/mL) como inductor de la sobreexpresión GAS1; y además, en ausencia o presencia de un inhibidor de Dyrk1B (230 nM) (INDY). Los resultados mostraron que en condiciones de sobreexpresión de GAS1 y en presencia del inhibidor de Dyrk1B (TET+, INDY+), hubo una tendencia a la alta en el número de células totales respecto a la condición testigo (TET+, INDY-), sin embargo el aumento no fue estadísticamente significativo (Figura 30A). No obstante, el porcentaje de viabilidad mostró un aumento significativo en el número de células no-viables en presencia del inhibidor (TET+, INDY+) (Figura 30B). Estos resultados sugieren fuertemente una estrecha relación funcional entre Gas1 y Dyrk1B, así como una posible cooperación entre ambas proteínas.

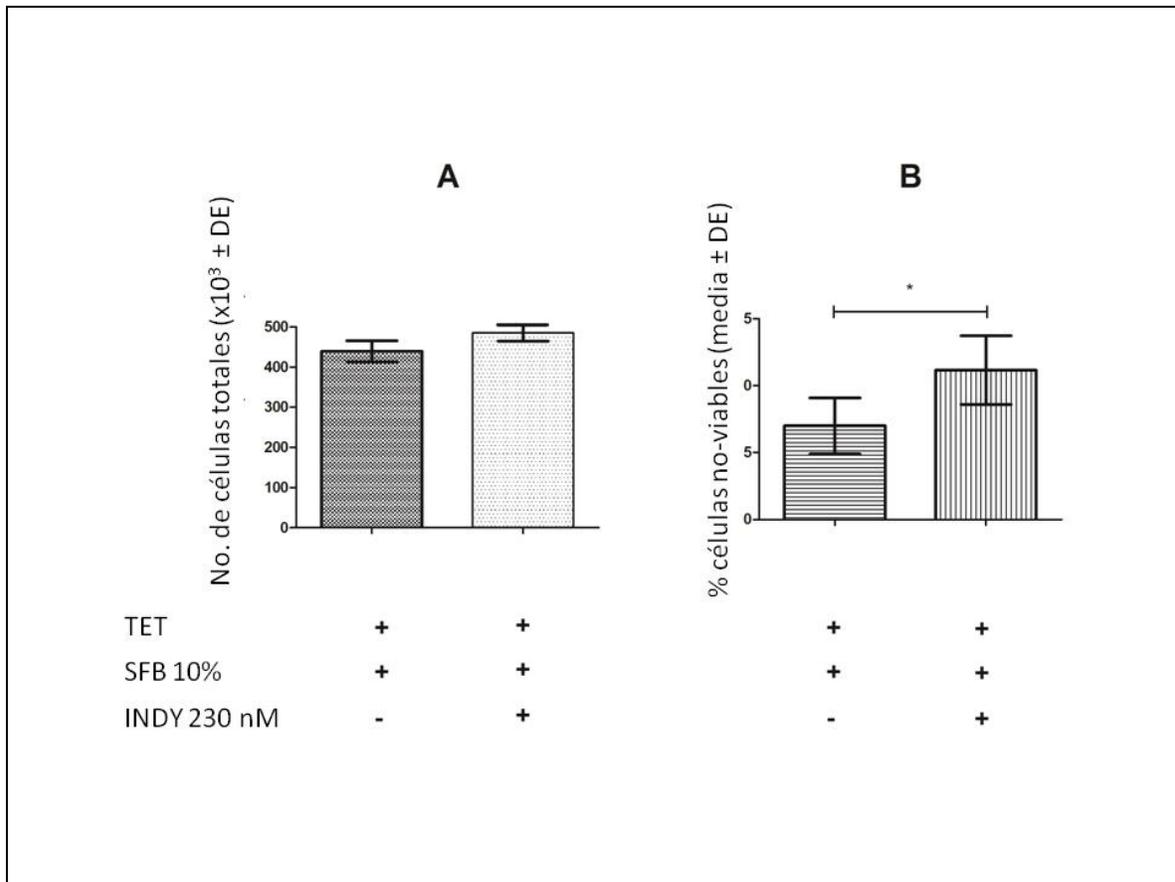


Figura 30. Validación de la relación funcional entre GAS1 y Dyrk1B. Efecto de Gas1 mediado por Dyrk1B sobre la proliferación y supervivencia celular en presencia de un inhibidor de Dyrk1B. A) Clonas NIH3T3-iGAS1 con sobreexpresión inducida de GAS1 por tetraciclina (+TET), y en presencia (+) o ausencia (-) del inhibidor INDY a 230nM (inhibidor de Dyrk1B). El análisis estadístico se realizó por el método *t* de *student*. Las barras representan la media \pm la desviación estándar (DE). *, $p < 0.05$.

DISCUSIÓN

Está ampliamente demostrado que el ARNm de Gas1 se regula a la alta en células NIH3T3 al ser privadas de suero (Schneider et al., 1988); y, que se expresa preferencialmente en células que se encuentran en arresto. En el presente trabajo, se reporta que Anxa1, Anxa2, y Dyrk1B se regulan a la alta tanto a nivel transcripcional como a nivel traduccional cuando las células NIH3T3 son privadas de suero para inducir la expresión de Gas1. Mientras que Ncl, por el contrario, fue regulada a la baja, pero solamente a nivel traduccional, ya que sus niveles de ARN mensajero se mantuvieron sin cambios. Posteriormente, se demostró que la regulación a la alta de Anxa1, Anxa2, y Dyrk1B, a nivel transcripcional y traduccional, podía ser inducido por la sola sobreexpresión de GAS1 en un sistema de expresión ectópica regulado por tetraciclina, eliminando los efectos globales de la privación de suero. En el caso de Ncl, se demostró que la regulación a la baja a nivel traduccional, observado por la privación de suero, no tiene relación con la sobreexpresión de Gas1. Con estos argumentos, se demuestra que Anxa1, Anxa2, y Dyrk1B son regulados a la alta a nivel transcripcional y traduccional inducidos por GAS1. Finalmente, se demostró que existe una relación funcional entre GAS1 y Dyrk1B, lo que sugiere fuertemente que GAS1 a través de Dyrk1B conduce a la célula no solamente al arresto celular, sino que también contribuye al mantenimiento de la viabilidad celular. Las anteriores conjeturas, serán discutidas de manera detallada más adelante.

Spots diferenciales en células PS/NIH3T3

Los perfiles proteicos bidimensionales (E-2D) mostraron una adecuada resolución en el gradiente de pH 3-10, ya que fue posible detectar siete *spots* diferenciales en tales condiciones sin necesidad de ampliar el rango de pH. Es importante señalar que a pesar de que en el perfil E-2D podemos detectar los *spots* diferenciales, es necesario realizar una validación de la expresión diferencial después de la identificación de las proteínas por espectrometría de masas, tal y como se realizó en el presente trabajo para las proteínas de interés, una validación por *Western Blot* y RT-qPCR.

Identificación por espectrometría de masas

La identificación por espectrometría de masas es una técnica analítica de alta resolución y sensibilidad; sin embargo, en el presente trabajo se utilizó para un análisis cualitativo (identificación) más que cuantitativo, por lo que posterior a la identificación de proteínas y la selección de proteínas de interés, el siguiente paso fue la validación de la expresión diferencial. Cabe señalar, que de un mismo spot se identificaron varias proteínas, como es el caso de los *spots* 1, 3 y 5, esto se debe a que a pesar de que los *spots* tienen una adecuada resolución, es posible que al momento de la manipulación para extraer las proteínas del spot, estas se contaminen con proteínas de *spots* adyacentes. Esto reafirma aún más la importancia de la validación de la expresión diferencial posterior a la identificación.

Validación de la expresión diferencial

La validación de la expresión diferencial confirmó que Anxa1, Anxa2, Dyrk1B y Ncl tienen un perfil diferencial durante el arresto celular por privación de suero (PS/NIH3T3). En el caso de Ncl, se corroboró la regulación a la baja de los niveles de proteína, como se había reportado previamente por otros autores (Shih Hua Fang y Yeh, 1993). Para Anxa1 y Anxa2, este es el primer trabajo que reporta su regulación a la alta (ARNm y proteína) en células en arresto por privación de suero. En el caso de Dyrk1B, existen reportes previos de que sus niveles aumentan en células NIH3T3 en arresto (Deng et al., 2004).

Sin embargo, hasta este punto, no se contaba con la evidencia experimental suficiente para establecer un vínculo entre Anxa1, Anxa2, Dyrk1B y Ncl y la expresión de Gas1. No obstante, este fue el primer paso para una posterior validación que nos permitiera relacionar a dichas proteínas. Esto fue posible gracias a la utilización de las clonas NIH3T3-iGAS1, que son células modificadas genéticamente por la integración a su genoma de lentivirus clonados para expresar de manera regulable la proteína heteróloga de humano GAS1 en células NIH3T3. Con esto se eliminó el efecto de la falta de nutrientes y factores de crecimiento que intervienen en el arresto celular por privación de suero.

Arresto celular inducido por GAS1

Las clonas NIH3T3-iGAS1, fueron inducidas con tetraciclina para expresar la proteína GAS1 (como se describe en la figura 7). Bajo estas condiciones, se determinó la capacidad de GAS1 para inducir arresto en este modelo celular, y se comparó con el arresto celular producido por privación de suero. Con estos experimentos, se validó la capacidad de GAS1 para inducir arresto celular. Los resultados mostraron que a pesar de que el arresto celular es mayor cuando las células son privadas de suero (PS/NIH3T3), la sola expresión de GAS1 es capaz de inducir arresto celular; y además, de mantener la viabilidad de las células arrestadas, algo que no sucede con la privación de suero. Cabe señalar que para diferenciar el efecto de la privación de suero del efecto de la expresión de GAS1, esta última se realizó en presencia de SFB 10 %. El hecho de que GAS1 sea capaz de arrestar y mantener la viabilidad celular, tiene particular importancia debido a que es una de las características del arresto celular reversible, en el cual se expresan no solamente genes involucrados en la regulación del crecimiento y división celular, sino también genes supresores de la apoptosis, supresores de la diferenciación celular y aquellos genes involucrados en la comunicación intercelular (Coller et al., 2006).

Por otro lado, por medio de las clonas NIH3T3-iGAS1, se comprobó que la expresión de Anxa1, Anxa2 y Dyrk1B es inducida por la expresión de GAS1, y no únicamente por la privación de suero. No fue el caso de Ncl, cuya regulación a la baja solo se observó en las células NIH3T3 arrestadas por privación de suero. En conjunto, estos resultados sugieren que existe una cooperación entre GAS1 y Anxa1, Anxa2 y Dyrk1B durante el arresto celular; por lo que fue necesario realizar una validación funcional para corroborar esta hipótesis.

Dados los antecedentes en la literatura que describen a Dyrk1B como una proteína involucrada en el arresto celular y el mantenimiento de la viabilidad celular, dos eventos claramente observados en el arresto celular inducido por GAS1, el presente trabajo se enfocó en la validación de la relación funcional entre GAS1 y Dyrk1B durante el arresto celular. Estos experimentos de validación

funcional se realizaron con las clonas NIH3T3-iGAS1 utilizando un inhibidor de Dyrk1B (INDY).

Validación funcional GAS1-Dyrk1B

La presencia del inhibidor de Dyrk1B (INDY) durante el arresto celular inducido por GAS1, puso en evidencia la cooperación que existe entre GAS1 y Dyrk1B. Al inhibir a Dyrk1B, se observó una ligera tendencia a incrementar el número total de células, lo que sugiere que GAS1 inhibe la proliferación a través de Dyrk1B. Es probable que para observar un efecto estadísticamente significativo, sea necesario incrementar la concentración de INDY. Por otro lado, en presencia de INDY, el número de células no-viables aumentó significativamente, lo que demuestra que Dyrk1B también está involucrado en el mantenimiento de la viabilidad celular. Ambos roles, el arresto celular y la protección celular, se han descrito previamente para Dyrk1B (Mercer y Friedman, 2006).

GAS1 y Anxa1

Anxa1 es una proteína pleiotópica que participa en diversos procesos celulares, tales como apoptosis (Shao et al., 2012; Vago et al., 2012; Li et al., 2011) y proliferación celular (Alldridge y Bryant, 2003; Petrella et al., 2008; Zhang et al., 2010). Se ha demostrado que la sobreexpresión de Anxa1 reduce la proliferación celular en diferentes líneas celulares, tales como A7r5 (células de músculo liso de rata), RAW 264.7 (macrófagos de ratón) y HEK293 (células embrionarias de riñón humano). El efecto de Anxa1 sobre la proliferación celular está estrechamente relacionado a su capacidad para regular a la baja a la ciclina D1, a través de la modulación de la activación de ERK (Alldridge y Bryant, 2003). De igual forma, se ha descrito que Anxa1 ejerce un efecto anti-proliferativo en diversas líneas celulares de leucemia por medio de la inducción de la expresión de p21, un regulador negativo de la progresión del ciclo celular, que a su vez activa de manera constitutiva a ERK (Petrella et al., 2008). Por otro lado, también se ha reportado que Anxa1 tiene actividad anti-apoptótica cuando se sobreexpresa en células ganglionares de retina de rata (RGC-5) privadas de suero; en donde se

observó que al sobreexpresar Anxa1, los niveles de ARNm de las proteínas pro-apoptóticas Bax y caspasa-3 se regularon a la baja, mientras que Bcl2 (anti-apoptótica) se reguló a la alta. Los cambios producidos por Anxa1 en las proteínas citadas anteriormente, sugieren la activación de un mecanismo pro-supervivencia mediado por Anxa1 (Shao et al., 2012). Estos resultados reportados por otros autores, son consistentes con los hallazgos descritos en el presente trabajo, en el cual se demuestra que Anxa1 se regula a la alta, a nivel transcripcional y traduccional, tanto en células NIH3T3 privadas de suero como en las clonas NIH3T3-iGAS1 sobreexpresoras de GAS1. Estos resultados sugieren que Anxa1 podría estar relacionada a la capacidad de GAS1 para inducir arresto celular, ya que se observó una reducción en la proliferación celular en las células arrestadas por la sola sobreexpresión de GAS1. Respecto a los mecanismos pro-supervivencia activados por Anxa1, no es posible establecer conjeturas claras aún; ya que, aunque el número de células no-viables encontrado en las clonas NIH3T3-iGAS1 sobreexpresoras de GAS1 se redujo significativamente, cuando el análisis se hizo con base en el porcentaje de células no-viables respecto al número de células totales, no se encontró diferencia significativa.

GAS1 y Anxa2

Anxa2 es otro de las proteínas que también se encontró regulada a la alta en células NIH3T3 privadas de suero y en las clonas NIH3T3-iGAS1 sobreexpresoras de GAS1. Anxa2 es una proteína multifuncional involucrada en diversos procesos celulares, como son la replicación del ADN y proliferación celular (Vishwanatha y Kumble, 1993; Chiang et al., 1993), la adhesión celular (Rescher et al., 2008), metástasis (Lokman et al., 2013), invasión celular y migración (Zhai et al., 2011; Liu et al., 2003), apoptosis (Huang et al., 2008; Wang et al., 2009), entre otros. En reportes previos, se ha descrito que Anxa2 se regula a la alta durante el ciclo celular, con un pico máximo en la fase de síntesis (S) (Chiang et al., 1993; Wang et al., 2009); además, su expresión es necesaria en la fase temprana de la citocinesis (Benaud et al., 2015). Recientemente, se reportó que un incremento en la expresión de Anxa2 promueve la viabilidad celular en células de cáncer cervical

(CaSki) y en células troncales progenitoras neurales de ratón (Lei Cui et al., 2017). A pesar de que no existen otros reportes que describan la regulación a la alta de Anxa2 en células en arresto o por la sobreexpresión de GAS1, en el presente trabajo se sugiere que Anxa2 podría estar involucrada en la reducción de la proliferación producida por la sobreexpresión de GAS1, como en el caso de Anxa1. Sin embargo, se requieren estudios adicionales para clarificar este punto.

GAS1 y Ncl

Ncl es una proteína de 110 kDa, y es la fosfoproteína más abundante del nucleolo; aunque también se encuentra en el núcleo y citoplasma. Es una fosfoproteína multifuncional involucrada en la maduración del ARN ribosomal (ARNr) y la biogénesis de los ribosomas (Tajrishi et al., 2011; Ginisty et al., 1998), así como en los procesos de organización de la cromatina y la proliferación celular. La expresión de Ncl correlaciona con una alta tasa de proliferación celular, mientras que sus niveles proteicos son bajos en células no-proliferantes y células en arresto por privación de suero, debido a la activación de su actividad auto-proteolítica (Tuteja y Tuteja, 1998; Ginisty et al., 1998; Fang y Yeh, 1993; Chen et al., 1991; Xu et al., 2012). En el presente trabajo, se observó, en células NIH3T3 privadas de suero (PS/NIH3T3), Ncl no sufre cambios en su regulación transcripcional, pero si se regula a la baja a nivel traduccional como se describe en reportes previos. Debido a los cambios encontrados en Ncl a nivel de proteína, se realizaron estudios posteriores para evaluar si la regulación de Ncl tenía alguna relación con la expresión de Gas1. Sin embargo, no se observaron cambios en los niveles ni de ARNm ni de proteína cuando las clonas NIH3T3-iGAS1 fueron arrestadas por la sola sobreexpresión de GAS1. Por lo tanto, la regulación a la baja de Ncl observada en las células privadas de suero, no parece tener relación con la expresión de GAS1.

GAS1 y Dyrk1B

En el presente trabajo, la proteína Dyrk1B (dual-specificity tyrosine-regulated kinase) o Mirk (minibrain-related kinase) se encontró regulada a la alta, a nivel transcripcional y traduccional, tanto en las células NIH3T3 privadas de suero como

en las células arrestadas por la sola sobreexpresión de Gas1. Dyrk1B es una tirosina cinasa que juega diferentes roles en diversos procesos celulares, tales como diferenciación (Deng et al., 2003; Deng et al., 2005), migración celular (Zou et al., 2003), proliferación (Masuda et al., 2012), supervivencia celular (Gao et al., 2012; Gao et al., 2009), progresión del crecimiento tumoral (Friedman, 2011; Yang et al., 2010) y arresto del ciclo celular (Gao et al., 2013; Mercer and Friedman, 2006).

Además, un estudio reciente mostró que Dyrk1B inhibe el crecimiento de gliomas, sugiriendo su rol como supresor tumoral (Lee et al., 2016). También se han reportado altos niveles de Dyrk1B en células NIH3T3 en arresto (Deng et al., 2004), lo cual es consistente con los resultados reportados en el presente trabajo. En el 2009, otro estudio demostró que Dyrk1B mantiene la viabilidad de células pancreáticas cancerosas, a través de la reducción de los niveles de especies de oxígeno reactivo (Deng et al., 2009). Recientemente, también se reportó una reducción en la expresión de Dyrk1B durante la muerte de células neurales inducida por hierro, indicando un aumento en la vulnerabilidad al estrés oxidativo por la disminución de Dyrk1B (Bautista et al., 2016). Adicionalmente, está demostrado que Dyrk1B fosforila y desestabiliza a la ciclina D1 y D3, lo que es esencial para la ubiquitinación y degradación de ambas en el proteosoma, y para mantener a las células arrestadas (Zou et al., 2004). Además, Dyrk1B también fosforila a p27 y p21, dos inhibidores de cinasa dependientes de ciclina, un proceso que es crítico en la regulación negativa del ciclo celular. En este proceso, Dyrk1B fosforila a p27 y la estabiliza, aumentando sus niveles en el núcleo; esto a su vez lleva a la célula a arrestarse en la fase G₀/G₁. Por otro lado, cuando p21 es fosforilada por Dyrk1B, p21 se transloca del núcleo al citoplasma, en donde funciona como mediador de supervivencia celular al bloquear moléculas pro-apoptóticas (Mercer et al., 2005).

En el presente trabajo, se demuestra que la sobreexpresión de GAS1 induce la regulación a la alta de Dyrk1B, tanto a nivel transcripcional como traduccional. Además, con experimentos de validación funcional, se demostró que Dyrk1B

contribuye al arresto celular y al mantenimiento de la viabilidad celular inducidos por GAS1. Esta conclusión se basa en el hecho de que el porcentaje de células no-viables se incrementa cuando el inhibidor de Dyrk1B está presente en los cultivos de las clonas sobreexpresoras de GAS1, lo que pone en evidencia el papel protector o pro-supervivencia de Dyrk1B inducido por GAS1. Además, en las clonas sobreexpresoras de GAS1, la proliferación celular mostró una tendencia a incrementar en presencia del inhibidor de Dyrk1B. Así, este trabajo presenta evidencia sólida de que GAS1 a través de Dyrk1B conduce a las células NIH3T3 no solamente al arresto celular, sino también al mantenimiento de la viabilidad celular.

CONCLUSIÓN

En conclusión, GAS1 es una proteína capaz de inducir arresto celular cuando se expresa de manera ectópica en células NIH3T3. Cuando GAS1 induce arresto celular, induce también la expresión de Anxa1, Anxa2 y Dyrk1B, lo que sugiere la participación de dichas proteínas durante el proceso de arresto. Finalmente, se validó la relación funcional entre GAS1 y Dyrk1B, demostrando que GAS1 induce el arresto celular mediado por Dyrk1B, la cual simultáneamente protege a la célula, manteniendo su viabilidad.

PERSPECTIVAS

Las perspectivas del presente trabajo contemplan la validación de la relación funcional entre Anxa1, Anxa2 y Gas1, e integrar la información con las evidencias generadas para Dyrk1B. Esto, en conjunto, contribuirá a enriquecer la información sobre los mecanismos moleculares inducidos por Gas1 para ejercer su rol de proteína promotora de arresto celular y protección celular durante el arresto.

Parte de los resultados aquí presentados se encuentran publicados en el trabajo **“Annexin A1, Annexin A2, and Dyrk 1B are upregulated during GAS1-induced cell cycle arrest”** en la revista Journal of Cellular Physiology. Volume 233, Issue 5 May 2018 Paginas 4166–4182. DOI: 10.1002/jcp.26226.

BIBLIOGRAFÍA

- Alldridge, L.C. and Bryant, C.E., 2003. Annexin 1 regulates cell proliferation by disruption of cell morphology and inhibition of cyclin D1 expression through sustained activation of the ERK1/2 MAPK signal. *Exp Cell Res*, 290(1), pp.93–107.
- Allen, B.L., Song, J.Y., Izzi, L., Althaus, I.W., Kang, J.S., Charron, F., Krauss, R.S. and McMahon, A.P., 2011. Overlapping roles and collective requirement for the coreceptors GAS1, CDO, and BOC in SHH pathway function. *Dev Cell*, 20(6), pp.775–787.
- Allen, B.L., Tenzen, T. and McMahon, A.P., 2007. The Hedgehog-binding proteins Gas1 and Cdo cooperate to positively regulate Shh signaling during mouse development. *Genes Dev*, 21(10), pp.1244–1257.
- Ayala-Sarmiento, A.E., Estudillo, E., Pérez-Sánchez, G., Sierra-Sánchez, A., González-Mariscal, L., Martínez-Fong, D. and Segovia, J., 2016. GAS1 is present in the cerebrospinal fluid and is expressed in the choroid plexus of the adult rat. *Histochemistry and Cell Biology*, 146(3), pp.325–336.
- Bautista, E., Vergara, P. and Segovia, J., 2016. Iron-induced oxidative stress activates AKT and ERK1/2 and decreases Dyrk1B and PRMT1 in neuroblastoma SH-SY5Y cells. *J Trace Elem Med Biol*, 34, pp.62–69.
- Benaud, C., Le Dez, G., Mironov, S., Galli, F., Rebutier, D. and Prigent, C., 2015. Annexin A2 is required for the early steps of cytokinesis. *EMBO reports*, 16(4), pp.481–489.
- Benitez, J.A., Arregui, L., Vergara, P. and Segovia, J., 2007. Targeted-simultaneous expression of Gas1 and p53 using a bicistronic adenoviral vector in gliomas. *Cancer Gene Ther*, 14(10), pp.836–846.
- Cabrera, J.R., Sanchez-Pulido, L., Rojas, A.M., Valencia, A., Manes, S., Naranjo, J.R. and Mellstrom, B., 2006. Gas1 is related to the glial cell-derived neurotrophic factor family receptors alpha and regulates Ret signaling. *J Biol Chem*, 281(20), pp.14330–14339.
- Chen, C.M., Chiang, S.Y. and Yeh, N.H., 1991. Increased stability of nucleolin in proliferating cells by inhibition of its self-cleaving activity. *J Biol Chem*, 266(12), pp.7754–7758.
- Chiang, Y., Schneiderman, M.H. and Vishwanatha, J.K., 1993. Annexin II expression is regulated during mammalian cell cycle. *Cancer Research*, 53(24), pp.6017–6021.
- Coller, H.A., Sang, L. and Roberts, J.M., 2006. A new description of cellular quiescence. *PLoS Biology*, 4(3), pp.0329–0349.
- Deng, X., Ewton, D.Z. and Friedman, E., 2009. Mirk/Dyrk1B maintains the viability of quiescent pancreatic cancer cells by reducing levels of reactive oxygen species. *Cancer Res*, 69(8), pp.3317–3324.
- Deng, X., Ewton, D.Z., Mercer, S.E. and Friedman, E., 2005. Mirk/dyrk1B decreases the nuclear accumulation of class II histone deacetylases during skeletal muscle differentiation. *J Biol Chem*, 280(6), pp.4894–4905.
- Deng, X., Ewton, D.Z., Pawlikowski, B., Maimone, M. and Friedman, E., 2003. Mirk/dyrk1B is a Rho-induced kinase active in skeletal muscle differentiation. *J Biol Chem*, 278(42), pp.41347–41354.

- Deng, X., Mercer, S.E., Shah, S., Ewton, D.Z. and Friedman, E., 2004. The cyclin-dependent kinase inhibitor p27Kip1 is stabilized in G(0) by Mirk/dyrk1B kinase. *J Biol Chem*, 279(21), pp.22498–22504.
- Dominguez-Monzon, G., Benitez, J.A., Vergara, P., Lorenzana, R. and Segovia, J., 2009. Gas1 inhibits cell proliferation and induces apoptosis of human primary gliomas in the absence of Shh. *Int J Dev Neurosci*, 27(4), pp.305–313.
- Domínguez-Monzón, G., González-ramírez, R. and Segovia, J., 2011. Molecular Mechanisms of Action of Gas1 and its Possible Therapeutic Applications. *Current signal transduction therapy*, 6(1), pp.106–112.
- Estudillo, E., Zavala, P., Perez-Sanchez, G., Ayala-Sarmiento, A.E. and Segovia, J., 2015. Gas1 is present in germinal niches of developing dentate gyrus and cortex. *Cell Tissue Res*.
- Evdokiou, A. and Cowled, P.A., 1998a. Growth-regulatory activity of the growth arrest-specific gene, GAS1, in NIH3T3 fibroblasts. *Exp Cell Res*, 240(2), pp.359–367.
- Evdokiou, A. and Cowled, P.A., 1998b. Tumor-suppressive activity of the growth arrest-specific gene GAS1 in human tumor cell lines. *Int J Cancer*, 75(4), pp.568–577.
- Evdokiou, A., Webb, G.C., Peters, G.B., Dobrovic, A., O’Keefe, D.S., Forbes, I.J. and Cowled, P.A., 1993. Localization of the human growth arrest-specific gene (GAS1) to chromosome bands 9q21.3-q22, a region frequently deleted in myeloid malignancies. *Genomics*, 18(3), pp.731–733.
- Fang, S.H. and Yeh, N.H., 1993. The self-cleaving activity of nucleolin determines its molecular dynamics in relation to cell proliferation. *Experimental Cell Research*, 208(1), pp.48–53.
- Fang, S.H. and Yeh, N.H., 1993. The self-cleaving activity of nucleolin determines its molecular dynamics in relation to cell proliferation. *Experimental cell research*, 208(1), pp.48–53.
- Flores, V., López-Merino, A., Mendoza-Hernandez, G. and Guarneros, G., 2012. Comparative genomic analysis of two brucellaphages of distant origins. *Genomics*, 99(4), pp.233–240.
- Friedman, E., 2011. The role of mirk kinase in sarcomas. *Sarcoma*, 2011, p.260757.
- Gao, J., Yang, X., Yin, P., Hu, W., Liao, H., Miao, Z., Pan, C. and Li, N., 2012. The involvement of FoxO in cell survival and chemosensitivity mediated by Mirk/Dyrk1B in ovarian cancer. *Int J Oncol*, 40(4), pp.1203–1209.
- Gao, J., Zhao, Y., Lv, Y., Chen, Y., Wei, B., Tian, J., Yang, Z., Kong, F., Pang, J., Liu, J. and Shi, H., 2013. Mirk/Dyrk1B mediates G0/G1 to S phase cell cycle progression and cell survival involving MAPK/ERK signaling in human cancer cells. *Cancer cell international*, 13(1), p.2.
- Gao, J., Zheng, Z., Rawal, B., Schell, M.J., Bepler, G. and Haura, E.B., 2009. Mirk/Dyrk1B, a novel therapeutic target, mediates cell survival in non-small cell lung cancer cells. *Cancer Biol Ther*, 8(17), pp.1671–1679.
- Garcia-Tovar, C.G., Perez, A., Luna, J., Mena, R., Osorio, B., Aleman, V., Mondragon, R., Mornet, D., Rendón, A. and Hernandez, J.M., 2001. Biochemical and histochemical analysis of 71 kDa dystrophin isoform (Dp71f)

- in rat brain. *Acta Histochemica*, 103(2), pp.209–224.
- Ginisty, H., Amalric, F. and Bouvet, P., 1998. Nucleolin functions in the first step of ribosomal RNA processing. *The EMBO journal*, 17(5), pp.1476–86.
- Gobeil, S., Zhu, X., Doillon, C.J. and Green, M.R., 2008. A genome-wide shRNA screen identifies GAS1 as a novel melanoma metastasis suppressor gene. *Genes Dev*, 22(21), pp.2932–2940.
- Huang, Y., Jin, Y., Yan, C.H., Yu, Y., Bai, J., Chen, F., Zhao, Y.Z. and Fu, S. Bin, 2008. Involvement of Annexin A2 in p53 induced apoptosis in lung cancer. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 309(1–2), pp.117–123.
- Izzi, L., Levesque, M., Morin, S., Laniel, D., Wilkes, B.C., Mille, F., Krauss, R.S., McMahon, A.P., Allen, B.L. and Charron, F., 2011. Boc and Gas1 each form distinct Shh receptor complexes with Ptch1 and are required for Shh-mediated cell proliferation. *Dev Cell*, 20(6), pp.788–801.
- Jiménez, A., López-Ornelas, A., Estudillo, E., González-Mariscal, L., González, R.O. and Segovia, J., 2014. A soluble form of GAS1 inhibits tumor growth and angiogenesis in a triple negative breast cancer model. *Experimental Cell Research*, pp.1–11.
- Kann, M., Bae, E., Lenz, M.O., Li, L., Trannguyen, B., Schumacher, V. a, Taglienti, M.E., Bordeianou, L., Hartwig, S., Rinschen, M.M., Schermer, B., Benzing, T., Fan, C.-M. and Kreidberg, J. a, 2015. WT1 targets Gas1 to maintain nephron progenitor cells by modulating FGF signals. *Development (Cambridge, England)*, 142(7), pp.1254–66.
- Lee, C.S. and Fan, C.M., 2001. Embryonic expression patterns of the mouse and chick Gas1 genes. *Mech Dev*, 101(1–2), pp.293–297.
- Lee, C.S., May, N.R. and Fan, C.M., 2001. Transdifferentiation of the ventral retinal pigmented epithelium to neural retina in the growth arrest specific gene 1 mutant. *Dev Biol*, 236(1), pp.17–29.
- Lee, K.K., Leung, A.K., Tang, M.K., Cai, D.Q., Schneider, C., Brancolini, C. and Chow, P.H., 2001. Functions of the growth arrest specific 1 gene in the development of the mouse embryo. *Dev Biol*, 234(1), pp.188–203.
- Lee, S.B., Frattini, V., Bansal, M., Castano, A.M., Sherman, D., Hutchinson, K., Bruce, J.N., Califano, A., Liu, G., Cardozo, T., Iavarone, A. and Lasorella, A., 2016. An ID2-dependent mechanism for VHL inactivation in cancer. *Nature*, 529(7585), pp.172–177.
- Lei Cui, Jian Song, Liting Wu, Luhui Cheng, Aijun Chen, Yanlin Wang, Yingdi Huang, L.H., 2017. Role of Annexin A2 in the EGF-induced epithelial-mesenchymal transition in human CaSki cells. *Oncology Letters*, 13(1), pp.377–383.
- Li, G., He, S., Chang, L., Lu, H., Zhang, H. and Chiu, J., 2011. GADD45alpha and annexin A1 are involved in the apoptosis of HL-60 induced by resveratrol. *Phytomedicine*, 18(8–9), pp.704–709.
- Liu, J.-W., Shen, J.-J., Tanzillo-Swarts, A., Bhatia, B., Maldonado, C.M., Person, M.D., Lau, S.S. and Tang, D.G., 2003. Annexin II expression is reduced or lost in prostate cancer cells and its re-expression inhibits prostate cancer cell migration. *Oncogene*, 22(10), pp.1475–85.
- Liu, Y., May, N.R. and Fan, C.M., 2001. Growth arrest specific gene 1 is a positive

- growth regulator for the cerebellum. *Dev Biol*, 236(1), pp.30–45.
- Lokman, N. a, Elder, A.S.F., Ween, M.P., Pyragius, C.E., Hoffmann, P., Oehler, M.K. and Ricciardelli, C., 2013. Annexin A2 is regulated by ovarian cancer-peritoneal cell interactions and promotes metastasis. *Oncotarget*, 4(8), pp.1199–211.
- Lopez-Ornelas, A., Mejia-Castillo, T., Vergara, P. and Segovia, J., 2011. Lentiviral transfer of an inducible transgene expressing a soluble form of Gas1 causes glioma cell arrest, apoptosis and inhibits tumor growth. *Cancer Gene Ther*, 18(2), pp.87–99.
- López-Ornelas, A., Vergara, P. and Segovia, J., 2014. Neural stem cells producing an inducible and soluble form of Gas1 target and inhibit intracranial glioma growth. *Cytotherapy*, 16(7), pp.1011–1023.
- Lopez-Ramirez, M.A., Dominguez-Monzon, G., Vergara, P. and Segovia, J., 2008. Gas1 reduces Ret tyrosine 1062 phosphorylation and alters GDNF-mediated intracellular signaling. *Int J Dev Neurosci*, 26(5), pp.497–503.
- Manfioletti, G., Ruaro, M.E., Del Sal, G., Philipson, L. and Schneider, C., 1990. A growth arrest-specific (gas) gene codes for a membrane protein. *Mol Cell Biol*, 10(6), pp.2924–2930.
- Martinelli, D.C. and Fan, C.M., 2009. A sonic hedgehog missense mutation associated with holoprosencephaly causes defective binding to GAS1. *J Biol Chem*, 284(29), pp.19169–19172.
- Martinelli, D.C. and Fan, C.M., 2007a. Gas1 extends the range of Hedgehog action by facilitating its signaling. *Genes Dev*, 21(10), pp.1231–1243.
- Martinelli, D.C. and Fan, C.M., 2007b. The role of Gas1 in embryonic development and its implications for human disease. *Cell Cycle*, 6(21), pp.2650–2655.
- Masuda, T., Itoh, K., Higashitsuji, H., Nakazawa, N., Sakurai, T., Liu, Y., Tokuchi, H., Fujita, T., Zhao, Y., Nishiyama, H., Tanaka, T., Fukumoto, M., Ikawa, M., Okabe, M. and Fujita, J., 2012. Cold-inducible RNA-binding protein (Cirp) interacts with Dyrk1b/Mirk and promotes proliferation of immature male germ cells in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109(27), pp.10885–10890.
- Mellstrom, B., Cena, V., Lamas, M., Perales, C., Gonzalez, C. and Naranjo, J.R., 2002. Gas1 is induced during and participates in excitotoxic neuronal death. *Mol Cell Neurosci*, 19(3), pp.417–429.
- Mercer, S.E., Ewton, D.Z., Deng, X., Lim, S., Mazur, T.R. and Friedman, E., 2005. Mirk/Dyrk1B mediates survival during the differentiation of C2C12 myoblasts. *J Biol Chem*, 280(27), pp.25788–25801.
- Mercer, S.E. and Friedman, E., 2006. Mirk/Dyrk1B: a multifunctional dual-specificity kinase involved in growth arrest, differentiation, and cell survival. *Cell Biochem Biophys*, 45(3), pp.303–315.
- Petrella, A., D'Acunto, C.W., Rodriguez, M., Festa, M., Tosco, A., Bruno, I., Terracciano, S., Taddei, M., Paloma, L.G. and Parente, L., 2008. Effects of FR235222, a novel HDAC inhibitor, in proliferation and apoptosis of human leukaemia cell lines: role of annexin A1. *Eur J Cancer*, 44(5), pp.740–749.
- Pineda-Alvarez, D.E., Roessler, E., Hu, P., Srivastava, K., Solomon, B.D., Siple, C.E., Fan, C.M. and Muenke, M., 2012. Missense substitutions in the GAS1 protein present in holoprosencephaly patients reduce the affinity for its ligand,

- SHH. *Hum Genet*, 131(2), pp.301–310.
- Rescher, U., Ludwig, C., Konietzko, V., Kharitonov, A. and Gerke, V., 2008. Tyrosine phosphorylation of annexin A2 regulates Rho-mediated actin rearrangement and cell adhesion. *J Cell Sci*, 121(13), pp.2177–2185.
- Van Roeyen, C.R.C., Zok, S., Pruessmeyer, J., Boor, P., Nagayama, Y., Fleckenstein, S., Cohen, C.D., Eitner, F., Gröne, H.J., Ostendorf, T., Ludwig, A. and Floege, J., 2013. Growth arrest-specific protein 1 is a novel endogenous inhibitor of glomerular cell activation and proliferation. *Kidney International*, 83(2), pp.251–263.
- Ruaro, M.E., Stebel, M., Vatta, P., Marzinotto, S. and Schneider, C., 2000. Analysis of the domain requirement in Gas1 growth suppressing activity. *FEBS Lett*, 481(2), pp.159–163.
- Del Sal, G., Ruaro, E.M., Utrera, R., Cole, C.N., Levine, A.J. and Schneider, C., 1995. Gas1-induced growth suppression requires a transactivation-independent p53 function. *Mol Cell Biol*, 15(12), pp.7152–7160.
- Del Sal, G., Ruaro, M.E., Philipson, L. and Schneider, C., 1992. The growth arrest-specific gene, gas1, is involved in growth suppression. *Cell*, 70(4), pp.595–607.
- Schneider, C., King, R.M. and Philipson, L., 1988. Genes specifically expressed at growth arrest of mammalian cells. *Cell*, 54(6), pp.787–793.
- Schueler-Furman, O., Glick, E., Segovia, J. and Linial, M., 2006. Is GAS1 a co-receptor for the GDNF family of ligands? *Trends Pharmacol Sci*, 27(2), pp.72–77.
- Segovia, J. and Zarco, N., 2014. Gas1 is a pleiotropic regulator of cellular functions: from embryonic development to molecular actions in cancer gene therapy. *Mini reviews in medicinal chemistry*, 14(14), pp.1139–47.
- Shao, Z., Shen, J., Yang, Y., Wu, D., Zhou, X. and Yuan, H., 2012. Annexin 1 protects against apoptosis induced by serum deprivation in transformed rat retinal ganglion cells. *Mol Biol Rep*, 39(5), pp.5543–5551.
- Stebel, M., Vatta, P., Ruaro, M.E., Del Sal, G., Parton, R.G. and Schneider, C., 2000. The growth suppressing gas1 product is a GPI-linked protein. *FEBS Lett*, 481(2), pp.152–158.
- Tajrishi, M.M., Tuteja, R. and Tuteja, N., 2011. Nucleolin: The most abundant multifunctional phosphoprotein of nucleolus. *Commun Integr Biol*, 4(3), pp.267–275.
- Tuteja, R. and Tuteja, N., 1998. Nucleolin: a multifunctional major nucleolar phosphoprotein. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology*, 33(6), pp.407–436.
- Vago, J.P., Nogueira, C.R., Tavares, L.P., Soriani, F.M., Lopes, F., Russo, R.C., Pinho, V., Teixeira, M.M. and Sousa, L.P., 2012. Annexin A1 modulates natural and glucocorticoid-induced resolution of inflammation by enhancing neutrophil apoptosis. *J Leukoc Biol*.
- Vishwanatha, J.K. and Kumble, S., 1993. Involvement of annexin II in DNA replication: evidence from cell-free extracts of *Xenopus* eggs. *Journal of cell science*, 105 (Pt 2), pp.533–40.
- Wang, C.-Y., Lin, Y.-S., Su, W.-C., Chen, C.-L. and Lin, C.-F., 2009. Glycogen

- synthase kinase-3 and Omi/HtrA2 induce annexin A2 cleavage followed by cell cycle inhibition and apoptosis. *Molecular biology of the cell*, 20(19), pp.4153–61.
- Webb, G.C., Cowled, P.A., Evdokiou, A., Ford, J.H. and Forbes, I.J., 1992. Assignment, by in Situ hybridization, of the growth arrest-specific gene, Gas-1, to mouse chromosome 13, bands B3-C2. *Genomics*, 14(2), pp.548–549.
- Xu, Z., Joshi, N., Agarwal, A., Dahiya, S., Bittner, P., Smith, E., Taylor, S., Piwnica-Worms, D., Weber, J. and Leonard, J.R., 2012. Knocking down nucleolin expression in gliomas inhibits tumor growth and induces cell cycle arrest. *J Neurooncol*, 108(1), pp.59–67.
- Yang, C., Ji, D., Weinstein, E.J., Choy, E., Hornicek, F.J., Wood, K.B., Liu, X., Mankin, H. and Duan, Z., 2010. The kinase Mirk is a potential therapeutic target in osteosarcoma. *Carcinogenesis*, 31(4), pp.552–558.
- Zamorano, A., Lamas, M., Vergara, P., Naranjo, J.R. and Segovia, J., 2003. Transcriptionally mediated gene targeting of gas1 to glioma cells elicits growth arrest and apoptosis. *J Neurosci Res*, 71(2), pp.256–263.
- Zamorano, A., Mellstrom, B., Vergara, P., Naranjo, J.R. and Segovia, J., 2004. Glial-specific retrovirally mediated gas1 gene expression induces glioma cell apoptosis and inhibits tumor growth in vivo. *Neurobiol Dis*, 15(3), pp.483–491.
- Zarco, N., Bautista, E., Cuéllar, M., Vergara, P., Flores-Rodriguez, P., Aguilar-Roblero, R. and Segovia, J., 2013. Growth arrest specific 1 (GAS1) is abundantly expressed in the adult mouse central nervous system. *The journal of histochemistry and cytochemistry: official journal of the Histochemistry Society*, 61(10), pp.731–48.
- Zarco, N., Gonzalez-Ramirez, R., Gonzalez, R.O. and Segovia, J., 2012. GAS1 induces cell death through an intrinsic apoptotic pathway. *Apoptosis*, 17(6), pp.627–635.
- Zhai, H., Acharya, S., Gravanis, I., Mehmood, S., Seidman, R.J., Shroyer, K.R., Hajjar, K. a. and Tsirka, S.E., 2011. Annexin A2 Promotes Glioma Cell Invasion and Tumor Progression. *Journal of Neuroscience*, 31(40), pp.14346–14360.
- Zhang, Z., Huang, L., Zhao, W. and Rigas, B., 2010. Annexin 1 induced by anti-inflammatory drugs binds to NF-kappaB and inhibits its activation: anticancer effects in vitro and in vivo. *Cancer Res*, 70(6), pp.2379–2388.
- Zou, Y., Ewton, D.Z., Deng, X., Mercer, S.E. and Friedman, E., 2004. Mirk/dyrk1B kinase destabilizes cyclin D1 by phosphorylation at threonine 288. *J Biol Chem*, 279(26), pp.27790–27798.
- Zou, Y., Lim, S., Lee, K., Deng, X. and Friedman, E., 2003. Serine/threonine kinase Mirk/Dyrk1B is an inhibitor of epithelial cell migration and is negatively regulated by the Met adaptor Ran-binding protein M. *J Biol Chem*, 278(49), pp.49573–49581.



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

13 de julio de 2018

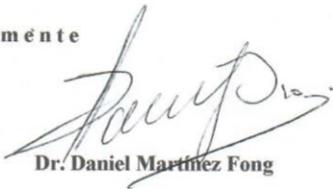
Arq. Hugo Flores Félix
Subdirector de Posgrado
Presente.

Los abajo firmantes, miembros del jurado designado para la tesis de doctorado titulada: "**Mecanismos moleculares del arresto celular inducido por GAS1**", presentada por el **M. en C. Gilberto Pérez Sánchez**, hacemos de su conocimiento que hemos revisado y aprobado la versión final de esta tesis, misma que el sustentante entregará a la Secretaría Académica.

Sin más por el momento, le saludamos.

Atentamente


Dr. José Segovia Vila


Dr. Daniel Martínez Fong


Dr. Marcos Nahmad Bensusan


Dr. Ricardo Félix Grijalva


Dr. Rodrigo Arreola Alemón


Dr. Marcos Nahmad Bensusan
Coordinador Académico del Departamento de
Fisiología, Biofísica y Neurociencias

Av. Instituto Politécnico Nacional #2508 Col. San Pedro Zacatenco, Ciudad de México, C.P.07360
Tel. 5747-3088