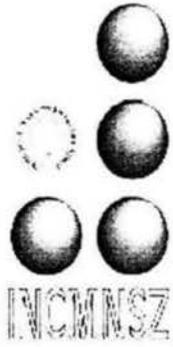


11281

2005



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
 FACULTAD DE MEDICINA

DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y DE LA NUTRICIÓN
 "SALVADOR ZUBIRÁN"

"CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DEL MODELO KNOCKOUT DEL
 FACTOR 1 EN FORMA DE TRÉBOL MEDIANTE MICROARREGLOS DE
 cDNA"

TESIS DE POSTGRADO PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
 DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:

CANDIDATO A DOCTOR: MC. LUIS FERNANDO TORRES BERNAL

TUTORES:

DR. DAVID KERSHENOBICH STALNIKOWITZ

DR. LUIS BENÍTEZ BRIBIESCA

DR. GUILLERMO RUÍZ-PALACIOS

Torres Bernal, Luis

2005

m342038



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

ÍNDICE GENERAL.

I. INTRODUCCIÓN.....9

1. EL FACTOR 1 EN FORMA DE TRÉBOL (FFT1 ó TFF1: del inglés TreFoil Factor 1/ pS2)

 a. FFT1: Del gen a la proteína..... 12

 b. Expresión, traducción y secreción del FFT1 en condiciones fisiológicas del tracto gastrointestinal..... 14

 c. Funciones y mecanismos de acción a nivel molecular del FFT1 en el aparato digestivo..... 15

2. MICROARREGLOS DE DNA complementario (cDNA)..... 25

 a. Generalidades.....25

 b. Tipos de microarreglos: Diferentes posibilidades con el mismo principio.....29

II. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO.....32

III. OBJETIVOS DEL ESTUDIO

 1. Primario.....33

 2. Secundarios.....33

IV. METODOLOGÍA.....	34
1. Modelo Knockout (KO) del FFT1/ pS2... 34	
Obtención de muestras	
Extracción RNA total y Selección RNAm	
2. Síntesis de sondas.....	35
Sondas complejas	
Sondas enriquecidas	
3. Marcaje radioactivo.....	44
4. Hibridación de Microarreglos.....	45
Estructura y Organización de Microarreglos	
Hibridación	
5. Análisis e interpretación de resultados.....	48
Lectura	
Interpretación	
6. Confirmación de resultados.....	50
Northern blot	
Microscopía electrónica	

V. RESULTADOS

1. Identificación de los genes sobre-expresados en el adenoma del modelo Knockout (KO) FFT1 $-/-$ de 8 semanas de edad mediante la hibridación de microarreglos de cDNA con sondas totales o complejas53

2. Hibridación de microarreglos de cDNA usando sondas enriquecidas o sustraídas sintetizadas de los adenomas antropilóricos de ratones knockout (KO) FFT1 $-/-$ de 8 semanas de edad.....57

3. Naturaleza de los genes sobre-regulados en el adenoma del modelo Knockout (KO) FFT1 $-/-$ de 8 semanas.....62

4. Activación de la respuesta a proteínas mal conformadas (RPMC) en los adenomas antropilóricos.....65

5. Alteraciones del retículo endoplásmico (RE) en células epiteliales del adenoma antropilórico.....72

VI. DISCUSIÓN.....	75
VII. CONCLUSIONES.....	96
VIII. PERSPECTIVAS.....	97
IX. BIBLIOGRAFÍA.....	98

ÍNDICE DE FIGURAS.

Figura 1. Estructura de los factores en forma de trébol.....	10
Figura 2. Esquema representativo de la expresión tejido-específica de los FFTs en el tracto gastrointestinal.....	11
Figura 3. Estructura genómica de la familia de factores en forma de trébol.....	13
Figura 4. Funciones del FFT1: Interacción con mucinas.....	17
Figura 5. Modelo knockout del gen FFT1/pS2. Construcción.....	22
Figura 6. Modelo knockout del gen FFT1/pS2. Hallazgos macroscópicos.....	23
Figura 7. Modelo knockout del gen FFT1/pS2. Hallazgos histopatológicos.....	24
Figura 8. Microarreglos de DNA complementario (cDNA).....	27
Figura 9. Esquema general de un experimento con microarreglos de cDNA.....	28
Figura 10. Síntesis de sonda total positiva (+) adenoma.....	37

Figura 11. Esquema general síntesis de sonda total negativa (-) antro control.....38

Figura 12. Sustracción por hibridación: sonda enriquecida positiva (+) adenoma.41

Figura 13. Atlas cDNA mouse array.....46

Figura 14. Esquema representativo del primer experimento de hibridación de microarreglos con sondas totales.....54

Figura 15. Microarreglos de cDNA hibridados con sondas totales.55

Figura 16. Esquema representativo del segundo experimento de hibridación de microarreglos con sondas enriquecidas.....59

Figura 17. Microarreglos de cDNA hibridados con sondas enriquecidas.....60

Figura 18. Algunos genes sobre-expresados en el adenoma FFT1 $-/-$, previamente involucrados en cáncer gástrico en humanos, identificados mediante microarreglos de cDNA.....64

Figura 19. Respuesta a proteínas mal conformadas activada en ausencia del TFF1, detectada mediante microarreglos de cDNA.....66

Figura 20. La activación de la RPMC en el adenoma del ratón KO FFT1 es inducida de forma transcripcional mediante el elemento de respuesta ERSE.....	68
Figura 21. Corroboración de la sobre-expresión de miembros de la RPMC en los adenomas antropilóricos del ratón KO FFT1 $-/-$ de 8 semanas de edad mediante "Northern blot".....	70
Figura 22. La RPMC es un hallazgo permanente en los adenomas antropilóricos del ratón KO FFT1 $-/-$ de 1 año de edad ("Northern blot").....	71
Figura 23. Microscopía electrónica células epiteliales del adenoma.....	74
Figura 24. La respuesta a proteínas mal conformadas I: transductores.....	83
Figura 25. La respuesta a proteínas mal conformadas II: 1er brazo.....	85
Figura 26. La respuesta a proteínas mal conformadas III: 2° brazo.....	87
Figura 27. Esquema hipotético activación de la RPMC en el desarrollo del adenoma antropilórico FFT1 $-/-$	95

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Tipos de microarreglos de DNA complementario (cDNA).....	31
Tabla 2. Iniciadores utilizados para síntesis de sondas para “Northern blot”.....	51
Tabla 3. Genes sobre expresados en el adenoma del ratón KO FFT1 -/- identificados mediante microarreglos de cDNA usando sondas totales.....	56
Tabla 4. Genes sobre expresados en el adenoma del ratón KO FFT1 -/- identificados mediante microarreglos de cDNA usando sondas enriquecidas.....	61
Tabla 5. La respuesta a proteínas mal conformadas (RPMC o UPR del inglés unfolded protein response).....	67

I. INTRODUCCIÓN.

1. EL FACTOR 1 EN FORMA DE TRÉBOL (FFT1 ó TFF1 del inglés TreFoil Factor 1).

Los factores en forma de trébol (FFTs ó TFFs del inglés TreFoil Factors) constituyen una familia de péptidos cuya característica estructural principal es la presencia de uno o más dominios P ó en trébol. Dicho dominio está representado por una secuencia de 38-39 aminoácidos, en los que seis residuos de cisteínas se encuentran asociadas por puentes bisulfuro en una configuración 1-5, 2-4 y 3-6, formando una estructura con tres hojas o asas, similar a la forma de un trébol, hallazgo que explica su nomenclatura (**Figura 1**). En los mamíferos esta familia se encuentra constituida por tres miembros: el FFT1 y FFT3 que contienen un dominio P y el FFT2 con dos dominios en trébol. Estos péptidos son expresados, sintetizados y secretados en condiciones normales por células epiteliales del tracto gastrointestinal de manera tejido-específica. El FFT1 se expresa en el estómago, el FFT2 en el estómago y el duodeno y el FFT3 a lo largo del intestino delgado y el colon (**Figura 2**). Cabe señalar que todas las células productoras de FFTs también sintetizan mucinas. Su expresión tejido-específica en condiciones normales y ectópica en condiciones ulcerativas o neoplásicas sugieren un papel importante de estos péptidos en la homeostasis gastrointestinal.

**Figura 1. Estructura de los factores en forma de trébol
(FFTs ó TFFs)**

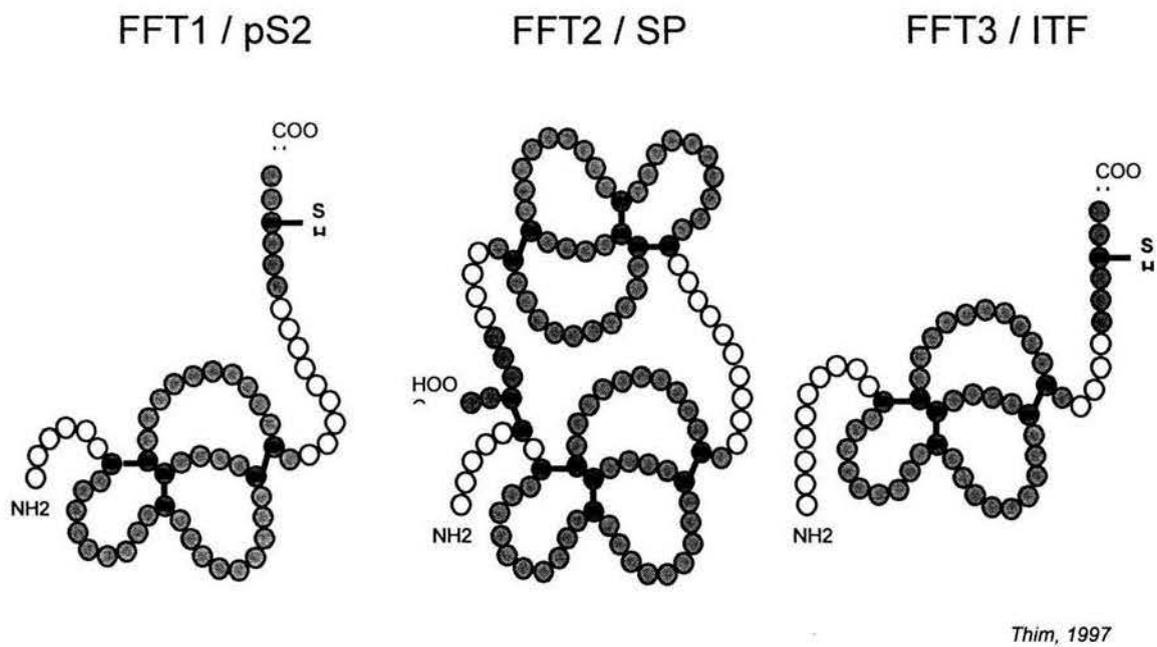


Figura 1. Los tres factores en forma de trébol (FFT): FFT1, FFT2 y FFT3. El FFT1 y FFT3 contienen un dominio en forma de trébol (en color naranja), mientras que el FFT2 está compuesto por dos de estos dominios.

Figura 2. Expresión tejido-específica de los FFTs en el tracto gastrointestinal.

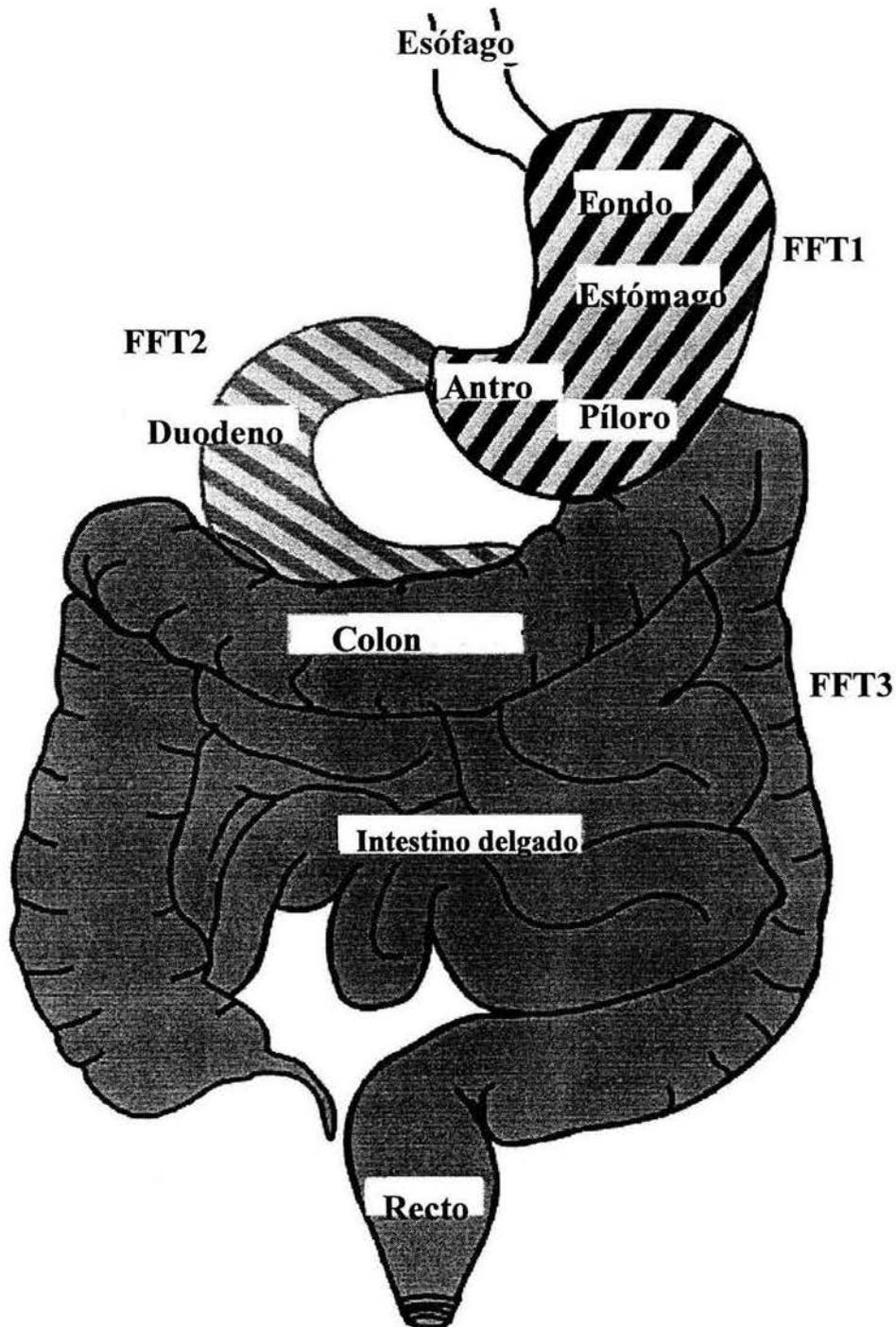


Figura 2. Los FFT muestran una expresión tejido específica en el tracto gastrointestinal. El FFT1 se expresa en el estómago (líneas en rojo/amarillo), el FFT2 en estómago y duodeno (en amarillo/azul) y el FFT3 en intestino delgado y colon (azul).

FFT1: DEL GEN A LA PROTEÍNA.

El gen *FFT1* en el humano se encuentra en la región cromosómica 21q22.3, formando parte de un fragmento de DNA genómico de aproximadamente 55 Kb que agrupa los tres genes que codifican para los tres FFT (Seib, Blin et al. 1997) (**Figura 3**). El *FFT1* tiene una longitud de aproximadamente 4.5 Kb y contiene 3 exones que codifican para el péptido señal amino-terminal, el dominio P y el motivo carboxi-terminal, respectivamente. Su región promotora contiene elementos que responden al estradiol, EGF, TPA, c-HA-ras y c-jun (Jeltsch, Roberts et al. 1987; Berry, Nunez et al. 1989; Nunez, Berry et al. 1989). Este gen codifica para una pequeña pre-proteína de 84 aminoácidos (a.a.) que contiene un péptido señal propio de proteínas secretadas (Jakowlew, Breathnach et al. 1984). La proteína madura de 6.5 kDa está formada por 60 a.a. y tiene un residuo amino-terminal piro-glutámico, un dominio P o en trébol y un residuo carboxi-terminal de cisterna (**Figura 1**) (Rio, Lepage et al. 1988).

Figura 3. Estructura Genómica de la Familia de Factores en Forma de Trébol.

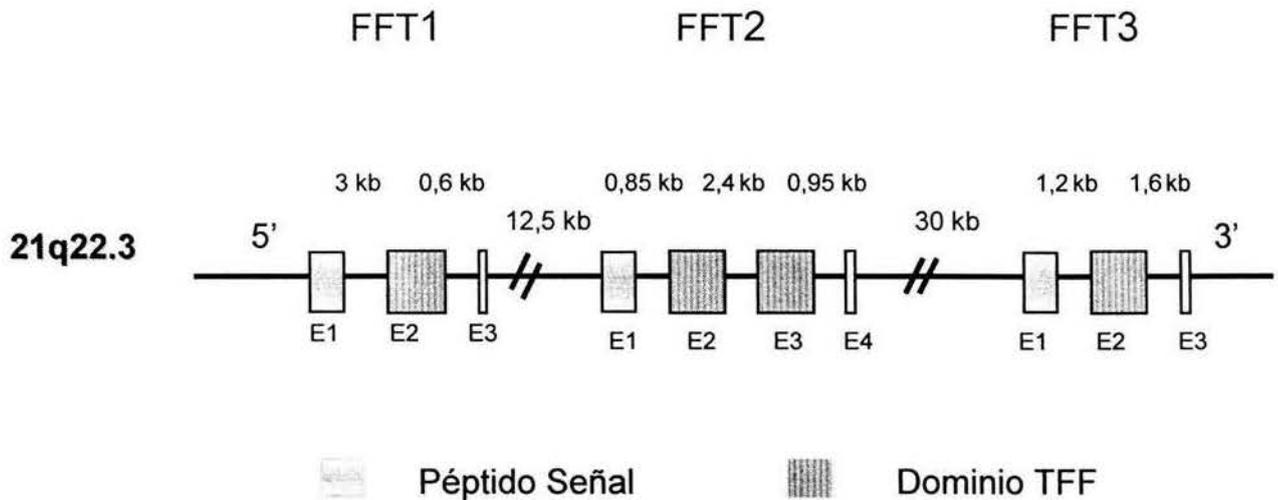


Figura 3. La región cromosómica 21q22.3 codifica en el humano para los péptidos en forma de trébol. Las regiones que codifican para los péptidos señales se representan en color liso verde, mientras que las regiones que codifican para los dominios en forma de trébol se simbolizan en color café con líneas verticales.

EXPRESIÓN, TRADUCCIÓN Y SECRECIÓN DEL FFT1 EN CONDICIONES FISIOLÓGICAS EN EL TRACTO GASTROINTESTINAL.

Los FFT se expresan de forma tejido-específica en condiciones normales en el tracto gastrointestinal. El FFT1 se sintetiza principalmente en las células superficiales del epitelio que reviste la parte superior de las fosillas del cuerpo y antro gástrico (Rio, Bellocq et al. 1988; Lefebvre, Wolf et al. 1993). El FFT2 co-localiza con el FFT1 en las células mucosas del cuello y células basales de las glándulas del cuerpo y antro gástricos; además FFT2 se expresa también en los acini y conductos distales de las glándulas de Brunner en el duodeno (Rio, Bellocq et al. 1988; Rio and Chambon 1990; Tomasetto, Rio et al. 1990; Lefebvre, Wolf et al. 1993). Por último, el FFT3 se produce en las células caliciformes de todo el intestino delgado y colon (Suemori, Lynch-Devaney et al. 1991; Podolsky, Lynch-Devaney et al. 1993).

La localización subcelular del FFT1 por estudios de inmunohistoquímica demuestra un patrón citoplasmático de las células ya mencionadas, con una acumulación peri nuclear preferencial que corresponde al aparato de Golgi, localización apropiada para una proteína susceptible de un proceso secretor (Rio and Chambon 1990; Lefebvre, Wolf et al. 1993).

La concentración fisiológica del FFT1 en el jugo gástrico ha sido calculada en aproximadamente 70 ng/ml (30-100 ng/ml). Este factor puede encontrarse en 3 formas moleculares en la mucosa y moco gástrico: monómero, dímero y como un

complejo de 25kDa. Todas ellas tienen la capacidad de interactuar con mucinas, siendo más estable la unión dímero-mucina. Aunque se ha reportado una variación circadiana de la secreción del FFT2 en el jugo gástrico con un predominio nocturno, hasta el momento no se ha estudiado de forma similar la secreción del FFT1.

FUNCIONES Y MECANISMOS DE ACCIÓN MOLECULARES DEL FFT1 EN EL APARATO DIGESTIVO.

Hasta este momento se considera la participación del FFT1 en dos eventos primordiales:

- 1) En los mecanismos de defensa del epitelio gastrointestinal como constituyente y estabilizador del moco gástrico.

La capacidad de interacción del FFT1 con mucinas específicas, Muc2 y Muc5AC está bien documentada tanto por estudios de expresión como por estudios funcionales. Esta se observa a nivel intracelular desde el co-almacenamiento que se da en los mismos gránulos intracelulares en el epitelio gastrointestinal por estudios de microscopía de luz y electrónica (Wright, Poulsom et al. 1993) hasta por estudios funcionales de dobles híbridos en donde se observan las mucinas mencionadas como proteínas asociadas al FFT1 (Tomasetto, Masson et al. 2000). Estudios de inmunohistoquímica fluorescente también demuestran una co-localización de estas mucinas por las

mismas células productoras de los FFT (Longman, Douthwaite et al. 2000) **(Figura 4 A)** . Su asociación a nivel extracelular también ha sido confirmada en la superficie del epitelio en el moco gástrico por inmunohistoquímica (Rio, Bellocq et al. 1988) y por la ausencia del moco gástrico que se hace evidente con la tinción de PAS en las muestras antro pilóricas del modelo KO del FFT1 -/- en comparación con el ratón silvestre FFT1 +/+ **(Figura 4 B2 y B1, respectivamente)**. Lo anterior demuestra que los FFTs intervienen desde el procesamiento intracelular de las mucinas hasta su estabilización extracelular en el moco. Estos aspectos adquieren vital relevancia clínica al considerar la patología ulcerosa y neoplásica gastrointestinal ya que la integración FFT-mucinas representa la primera línea de defensa contra agentes lesivos que van desde agentes infecciosos capaces de crear una úlcera hasta aquellos con potencial carcinógeno en un epitelio susceptible a un estrés celular ilimitado (Ribieras, Tomasetto et al. 1998). En el modelo knockout del FFT1 hasta el momento no se ha evaluado la expresión de marcadores de estrés celular que pudiera generarse como consecuencia de la ausencia de moco y/o más aún por la acumulación e incapacidad de secreción de mucinas que desencadena la activación de cascadas intracelulares que pueden afectar el estado de proliferación/apoptosis/diferenciación del epitelio gástrico y contribuir al desarrollo de la patología neoplásica gástrica (Lefebvre, Chenard et al. 1996; Karam, Tomasetto et al. 2004).

Figura 4. Funciones del FFT1: Interacción con Mucinas

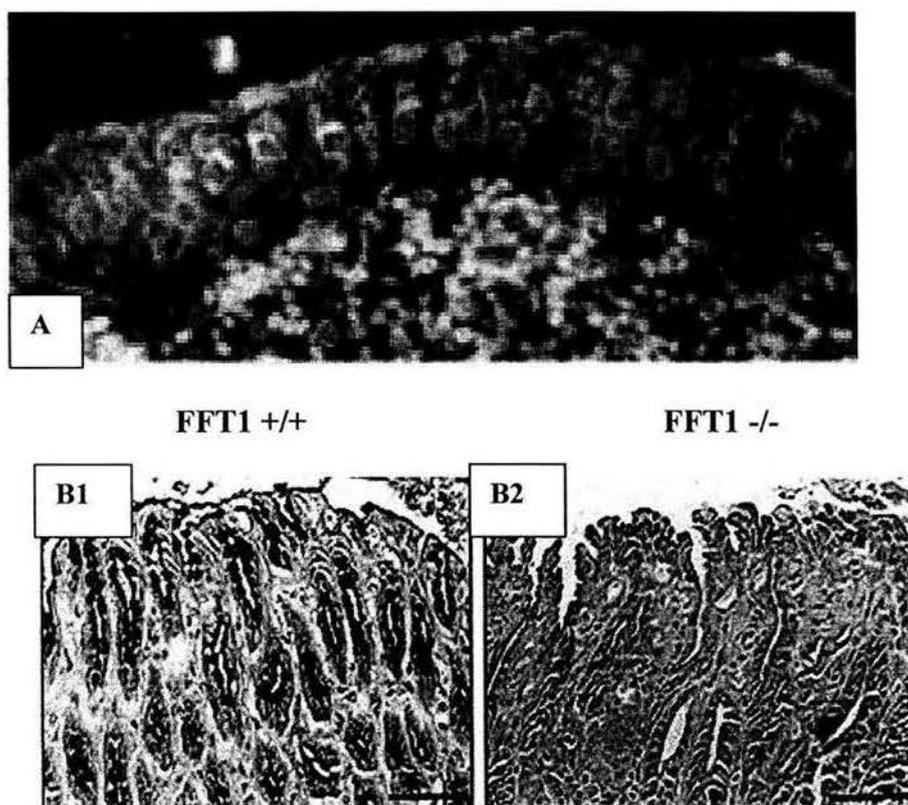


Figura 4. Interacción FFT1 con mucinas. (A) Localización de mucinas y FFT por inmunohistoquímica fluorescente. Se observa el FFT1 (verde) y MUC5AC (rojo) localizados en las células superficiales de la línea celular asociada a úlceras; la co-localización es frecuente y se observa en color amarillo-naranja. (B) Análisis histológico con tinción de ácido periódico de Schiff (PAS) en la mucosa gástrica en el ratón silvestre FFT1+/+ (B1) y ratón knockout FFT1 -/- (B2). Se observa una disminución dramática del moco gástrico en el modelo KO.

2) En los mecanismos de regulación de la proliferación, apoptosis y diferenciación del epitelio gástrico como un gen supresor de tumor gástrico.

Existen cuatro tipos de estudios que vinculan al FFT1 con el cáncer: 1) estudios de expresión en diversas neoplasias humanas, 2) modelos knockout de FFT1, 3) estudios *in vitro* con FFT recombinante y 4) recientemente, análisis estructural y funcional de los mecanismos genéticos y epigenéticos que regulan al gen FFT1.

Los estudios de expresión del gen FFT1 a nivel de RNAm o de su proteína fueron los primeros en establecer una relación entre éste y el cáncer del aparato gastrointestinal.

La expresión del FFT1 se encuentra aumentada en varios carcinomas primarios del humano que incluyen esófago, colon, páncreas, ovario (Henry, Bennett et al. 1991), la glándula mamaria (Rio, Bellocq et al. 1987), pulmón (Higashiyama, Doi et al. 1994), próstata (Yang, Chisholm et al. 1992) y vejiga (Luqmani, Ryall et al. 1992), entre otros. En todos estos casos, la proteína se expresa en las células epiteliales malignas, localizándose en el citoplasma, tal como se observa en las células normales del estómago. Esta expresión ectópica en tejidos malignos sugiere la participación de esta proteína durante el proceso de carcinogénesis.

Es importante señalar que existe una situación inversa en cuanto a la expresión del FFT1 en neoplasias gástricas. La expresión del FFT1 en adenocarcinomas

gástricos se pierde en el 43% de los casos y solo en el 18% de ellos se observa aumentada (Luqmani, Bennett et al. 1989; Henry, Bennett et al. 1991; Theisinger, Welter et al. 1991). En estos casos la proteína también se encuentra a nivel citoplasmático. Histopatológicamente, la expresión de FFT1 puede afectar tanto a carcinomas gástricos tipo intestinal como a tipo difuso, sin embargo, algunos autores han demostrado una mayor asociación con este último y aunque algunos estudios no muestran correlación con el pronóstico, otros muestran una asociación significativa entre la expresión de FFT1 y el estadio tumoral (Theisinger, Welter et al. 1991; Muller and Borchard 1993; Machado, Carneiro et al. 1996).

Tratando de dilucidar el papel de esta proteína en la homeostasis del estómago se desarrolló un modelo knockout donde se inactivó el gen FFT1 mediante la técnica de recombinación homóloga (**Figura 5**). En el 100% de los ratones deficientes en FFT1 se observó un engrosamiento de la mucosa antro pilórico al doble de lo normal a las 3 semanas de edad y posteriormente un adenoma antropilórico con hiperplasia y displasia de alto grado en sus células epiteliales. Dichas células mostraron un índice mitótico 10 veces mayor que el normal y un grado de indiferenciación marcado con ausencia del moco gástrico. A los 5 meses de edad el 30% de los ratones knockout desarrollaron carcinomas invasores (**Figura 6 y 7**). Esto demostró que el FFT1 desempeña un papel importante en el proceso de diferenciación del epitelio gástrico y podría funcionar como un gen supresor de tumor gástrico-específico dado que su ausencia promueve una intensa proliferación del epitelio gástrico (Lefebvre, Chenard et al. 1996). Este hecho concuerda con los estudios de expresión del FFT1 comentados previamente, que

demuestran la ausencia de expresión en el 43% de los carcinomas gástricos en el humano (Luqmani, Bennett et al. 1989).

Los estudios *in vitro* sobre el FFT1 se han facilitado en los últimos años gracias a la tecnología recombinante que permite analizar el efecto del FFT1 en diversas líneas celulares. El FFT1 se expresa *in vitro* en las líneas celulares Kato III y MKN-45 derivadas de un adenocarcinoma gástrico humano pobremente diferenciado, mientras que las líneas MKN-1 y MKN-38, ambas provenientes de tumores bien diferenciados, son negativas, lo que sugiere que el grado de expresión se relaciona al estado de diferenciación celular (Luqmani, Bennett et al. 1989; Takahashi, Kida et al. 1990). El efecto de la adición del FFT1 recombinante en las células AGS ha sido investigado encontrándose una disminución importante en la proliferación celular de una manera dosis-dependiente. Recientemente, este efecto anti-proliferativo del FFT1 en las líneas celulares AGS, IEC18 y HCT116 ha sido confirmado al retardar la transición entre la fase G1/S del ciclo celular, aunado a un efecto paradójico anti-apoptótico que también es observado en otros genes supresores de tumor como en el caso de el anti-oncogén VHL y el prototipo Rb (Huang, O'Reilly et al. 1997; Schoenfeld, Parris et al. 2000; Bossenmeyer-Pourie, Kannan et al. 2002; Pennaneach, Barbier et al. 2004).

Finalmente, un nuevo campo de estudio se ha iniciado tratando de detectar alteraciones genéticas o epigenéticas que influyan sobre el gen FFT1 y que por tanto contribuyan a la patogénesis del cáncer gástrico. De esta manera las mutaciones somáticas y pérdida de heterocigocidad del gen FFT1 han sido

evaluadas en adenomas y carcinomas gástricos humanos, detectándose mutaciones en el 5.5% y 16.3% respectivamente. La pérdida de heterocigocidad fué detectada en el 16.7% de los casos (Carvalho, Kayademir et al. 2002). Por otra parte algunos autores han demostrado la metilación del DNA como uno de los elementos *cis* que controlan la expresión del FFT1 en células epiteliales normales y cancerosas del estómago. De esta manera, Fujimoto et al., demostraron mediante el análisis de tejido normal, adenomas y carcinomas gástricos la asociación entre la reducción de expresión del FFT1 con la metilación de las islas CpG dentro del promotor del gen FFT1 como uno de los eventos tempranos en la carcinogénesis gástrica (Fujimoto, Yasui et al. 2000; Park, Oh et al. 2000; Park, Oh et al. 2000).

Figura 5. Modelo knockout del gen TFF1/pS2. Construcción.

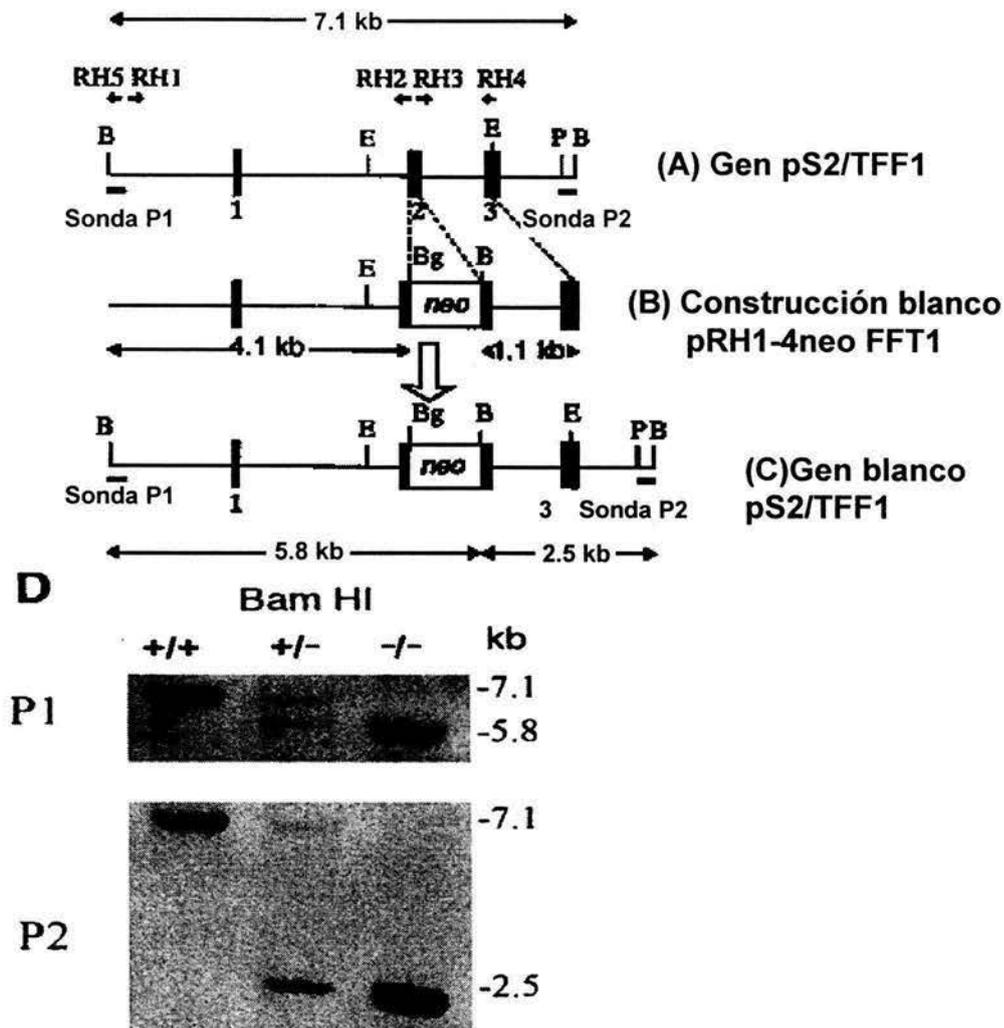


Figura 5. (A) Locus del gen FFT1. (B) Construcción blanco pRH1-4neo FFT1. Se generó un fragmento de DNA genómico de 4.1 kb por PCR con los iniciadores RH1 y RH2 y un segundo fragmento de 1.1 kb con los iniciadores RH3 y RH4, los cuales se sub-clonaron en los sitios Kpn I-Cla I de un vector pBS SK+ (Stratagene), generando los plásmidos pRH1-2 y pRH3-4, respectivamente. El fragmento de 1.1-kb Cla I-Xba I del plásmido pRH3-4 se sub-clonó en el sitio Cla I-Xba I de pRH1-2, lo que generó el plásmido pRH1-4. Un fragmento de 1.3-kb Bgl II-Bam HI PGK-*neo* se insertó en el sitio Bgl II-Bam HI de pRH1-4, lo que generó el plásmido blanco pRH1-4neo. Este se electroporó y procesó en células embrionarias de la cepa 129/Svj. Los cuadriláteros sólidos en negro indica los tres exones del gen FFT1 y las barras horizontales indican las sondas P1 y P2. B, Bam HI; Bg, Bgl II; E, EcoR I; P, Pst I. (C) El gen blanco FFT1 contiene dos fragmentos Bam HI, uno de 5.8 kb y otros de 2.5 kb. (D) Genotipificación de los ratones mediante Southern (DNA) blot. El DNA genómico se extrajo de fragmentos de colas de los ratones FFT1^{+/+}, FFT1^{+/-}, y FFT1^{-/-}. Después de una digestión con Bam HI, el DNA se fraccionó en un gel de agarosa al 0.8%, se transfirió a membranas hybond N+ (Amersham), y se hibridó con las sondas P1 o P2 radiomarcadas con ³²P, detectándose los animales homocigotos FFT1^{+/+}, heterocigotos +/- y knockout homocigotos -/- según los fragmentos encontrados.

**Figura 6. Modelo knockout del gen TFF1/pS2.
Hallazgos macroscópicos**

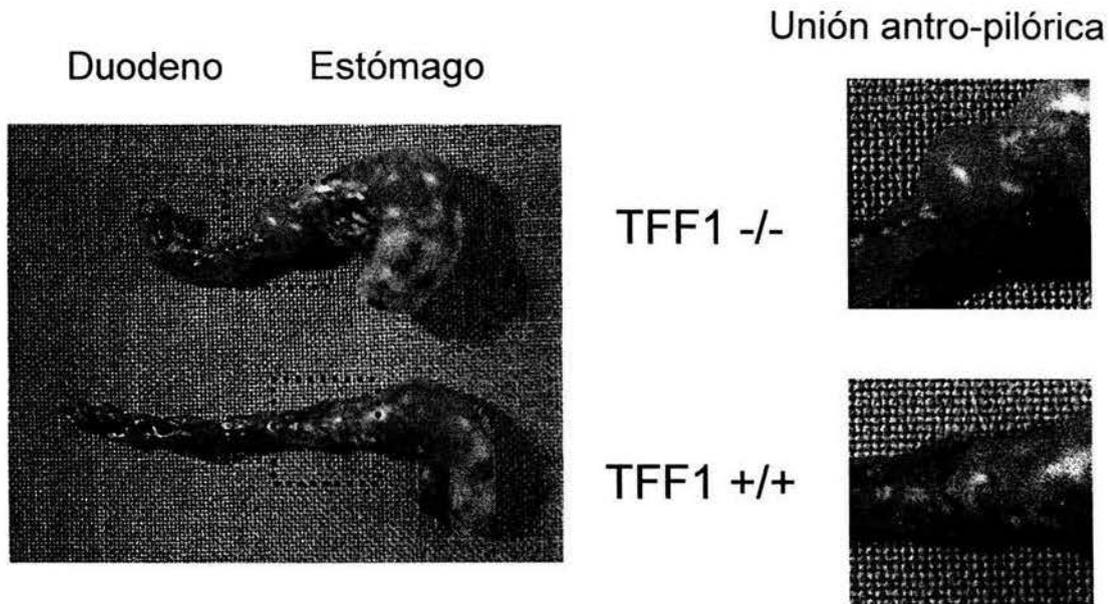
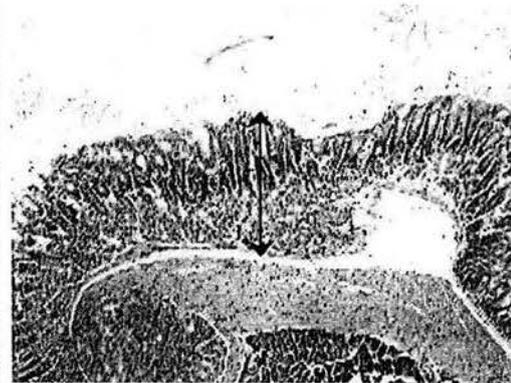


Figura 6. Hallazgos macroscópicos del ratón KO FFT1. A los 5 meses de edad el 100% de los ratones KO FFT1 -/- desarrollan adenomas antropilóricos circunferenciales (vista panorámica izquierda y acercamiento a la derecha). Los dos sexos se afectan de forma idéntica y el fenotipo tiene una penetrancia completa.

**Figura 7. Modelo knockout del gen TFF1/pS2.
Hallazgos histopatológicos**

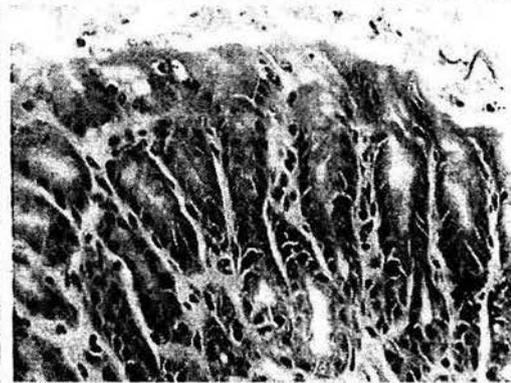
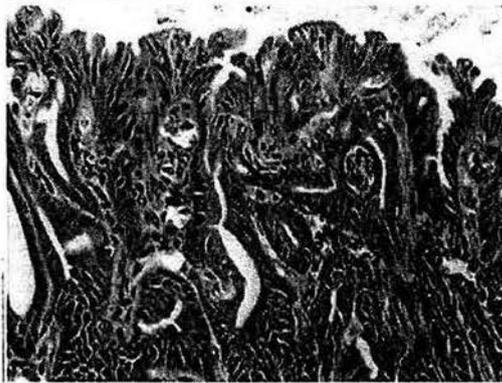
TFF1^{-/-}TFF1^{+/+}

Hiperplasia



Control

Displasia



Control

Carcinoma

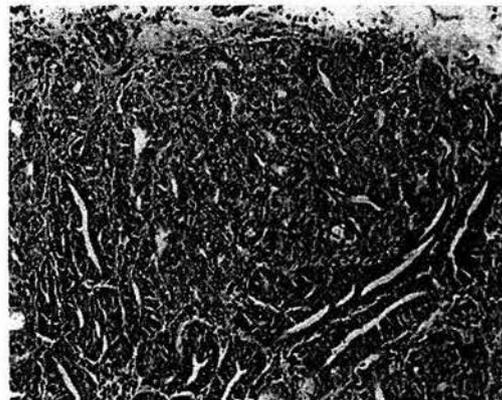


Figura 7. Hallazgos histopatológicos en el ratón KO FFT1 ^{-/-}. A la izquierda se presentan cortes histológicos de la región antro pilórica del ratón KO FFT1^{-/-} con hematoxilina/eosina a diferentes aumentos y diferentes periodos. Nótese las diferencias con los cortes del ratón silvestre, representados en la columna de la derecha. Léase el texto para la descripción histopatológica.

2. MICROARREGLOS DE DNA complementario (cDNA).

a. Generalidades.

De forma simplista podemos afirmar que enfermedades complejas como el cáncer conllevan la alteración en los patrones de expresión génica de diversas células que producen cambios celulares, histológicos, orgánicos y sistémicos que culminan en las manifestaciones clínicas de la enfermedad. Por ello el análisis de los patrones de expresión, identificando el aumento o disminución en la expresión de los genes que contribuyen en la fisiopatogenia de la enfermedad, adquiere gran relevancia clínica (Duggan, Bittner et al. 1999).

Los experimentos con microarreglos de cDNA se basan en el principio de hibridación molecular propuesto por Edwing Southern hace más de 25 años (Gillespie and Spiegelman 1965; Southern 1975). La hibridación se refiere al apareamiento específico que ocurre entre dos cadenas complejas de ácidos nucleicos con secuencias complementarias mediante la creación de puentes de hidrógeno entre las bases de dichas cadenas, con una alta fidelidad (Kafatos, Jones et al. 1979; Lennon and Lehrach 1991). Esta interacción específica es pues un proceso análogo a la reacción antígeno anticuerpo en la que se utilizan anticuerpos específicos para detectar la presencia de proteínas concretas.

Los microarreglos de cDNA permiten la medición de la expresión diferencial de genes a gran escala (Figura 8), utilizando muestras patológicas de pacientes, modelos animales y/o líneas celulares de ciertas enfermedades. Es posible entonces en el laboratorio, sintetizar una *sonda* a partir del RNAm extraído de un tejido en estudio, y *hacerla hibridar o interactuar con* una serie de secuencias de

ácidos nucleicos que representen diversos *genes conocidos*, ordenados y *fijados en un soporte sólido*, al que se le denomina *microarreglo*. La *interacción* entre las secuencias complementarias de estos dos componentes *resultará en señales radioactivas* o fluorescentes que permitirán conocer la identidad de los genes expresados en el tejido en estudio. El *mismo proceso se realiza* de forma paralela pero usando una *sonda control* la cual es sintetizada a partir del RNAm extraído de un tejido normal o control. Los *patrones de expresión* entre el tejido patológico y el tejido normal *se comparan*, *identificando los genes clave* que participan en el desarrollo del proceso biológico que se analiza (Figura 9) (Duggan, Bittner et al. 1999; Granjeaud, Bertucci et al. 1999) (Debouck and Goodfellow 1999; Granjeaud, Bertucci et al. 1999; Hardiman 2004) .

Así pues, los pasos para realizar el experimento consisten en la preparación de las sondas, la selección del microarreglo de cDNA, la hibridación, el revelado de la señal, el análisis comparativo de los patrones de expresión, la selección de experimentos confirmatorios y finalmente la interpretación biológica de los resultados.

Figura 9. Esquema general de un experimento con Microarreglos de cDNA.

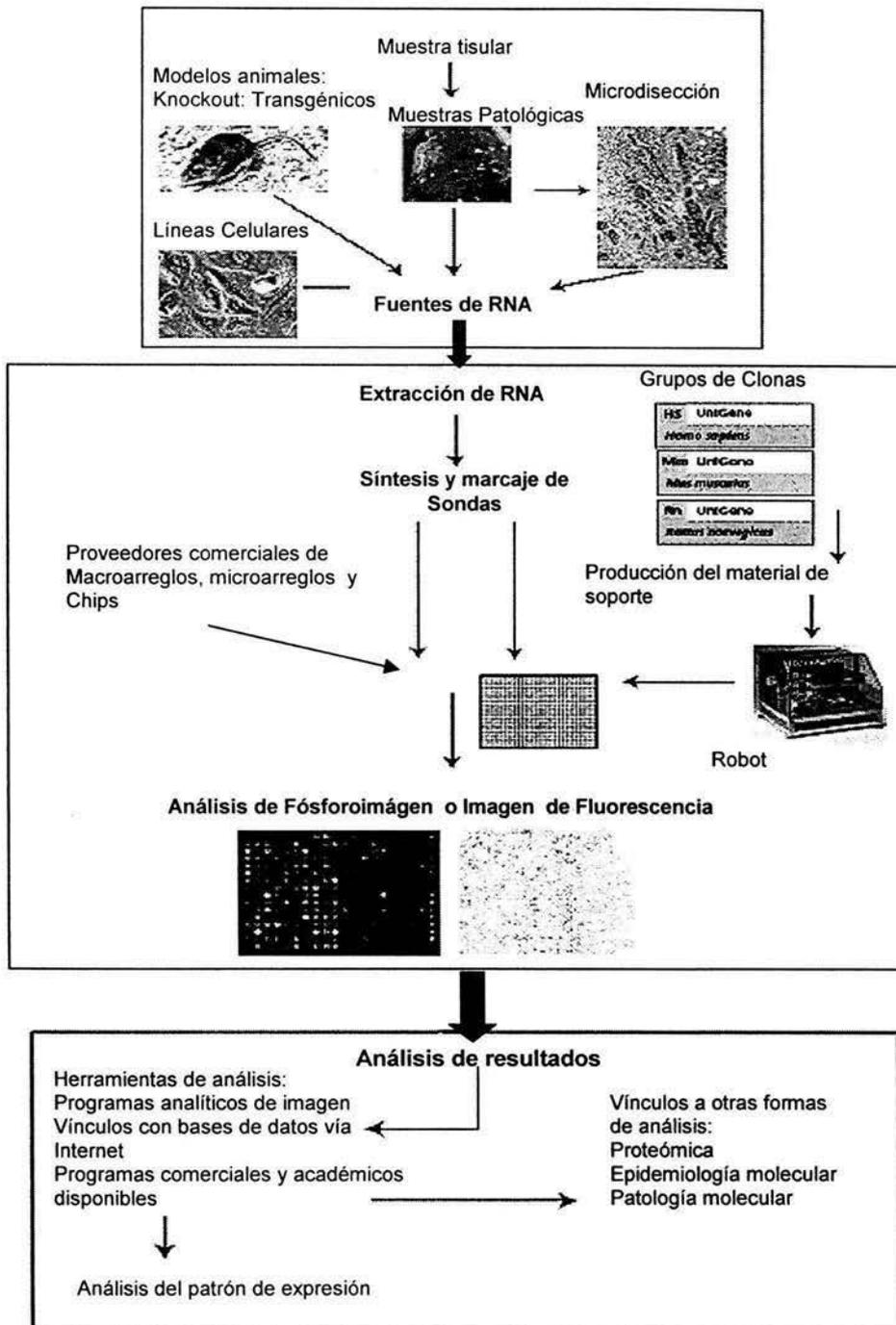


Figura 9. Diagrama de flujo que esquematiza los diferentes componentes que se requieren para la realización de un experimento con microarreglos de cDNA. Nótese la subdivisión en 3 cuadros principales: El cuadro superior corresponde al primer paso que consiste en la extracción de RNA a partir de la fuente de estudio, el cuadro intermedio representa el experimento de hibridación *per se* y por último el cuadro inferior enfatiza las diferentes herramientas de análisis de resultados. (Véase texto).

b. Tipos de microarreglos: diferentes posibilidades con el mismo principio.

Las principales características que determinan el tipo de microarreglo son:

El soporte sólido utilizado para la fijación de las secuencias

El tamaño del microarreglo y

El tipo de ácidos nucleicos colocados

El tipo de soporte sólido utilizado es la propiedad más importante que determina los diferentes tipos de microarreglos, pudiendo ser nylon, vidrio o silicón. El tamaño del microarreglo es del orden de centímetros para los soportes de nylon y de milímetros para los restantes, influyendo esta característica en la cinética de hibridación. Por último, el material fijado a este soporte, que representa las secuencias de cientos o miles de genes, puede ser colonias de cDNA, productos de PCR o secuencias pequeñas de oligonucleotidos las cuales son sintetizadas *in situ* (Debouck and Goodfellow 1999; Granjeaud, Bertucci et al. 1999; Hardiman 2004).

Los principales tipos de microarreglos que podemos encontrar son:

i. Macroarreglos de nylon

ii. Microarreglos de nylon

iii. Microarreglos de vidrio

iv. "Chips" de vidrio o silicón con oligonucleotidos

Las principales características, ventajas y desventajas de cada uno de estos microarreglos son resumidas en la **tabla 1** (Bowtell 1999; Granjeaud, Bertucci et al. 1999; Hardiman 2004).

Es importante recalcar desde este momento que durante nuestro estudio consideramos a los macroarreglos de nylon como la opción más adecuada para implementarse en los laboratorios académicos de nuestro país, ya que son membranas de nylon con medidas de 8 x 12 cm aproximadamente, en las que colonias de cDNA o productos de PCR son fijados y ordenados con un espacio entre secuencias de aproximadamente 1 o 2 mm. Estos soportes pueden ser adquiridos de forma comercial (<http://www.bdbiosciences.com>) (<http://www.genomesystems.com/GDA/>) y pueden contener decenas, cientos o miles de genes que pueden ser incluso pre-seleccionados por el investigador según su criterio de estudio. La forma de realizar el experimento y el análisis de resultados pueden ser realizados con el mismo equipo y en condiciones semejantes a un "Northern blot". Además el mismo microarreglo puede ser re-utilizado hasta en 3-5 ocasiones diferentes. Todo lo anterior hace que este sistema sea compatible con laboratorios académicos con poco presupuesto ya que el equipo necesario es el rutinario utilizado para cualquier experimento de hibridación molecular.

Tabla 1. Características de diferentes tipos de Microarreglos de cDNA

Parámetros	Macroarreglos De Nylon	Microarreglos Nylon detección radioactiva	Microarreglos Nylon detección Enzimática	Microarreglos de Vidrio	DNAChips
Blancos (cDNA)	Clonas de cDNA (Productos de PCR o Colonias bacterianas)	Clonas de cDNA (Productos de PCR)	Clonas de cDNA (Productos de PCR)	Clonas de cDNA (Productos de PCR)	Oligos sintetizados <i>in situ</i> de 20 mers
Formato y Soporte sólido	50-2000 cDNAs en una Memb Nylon de 8x12cm ²	200 cDNAs en una Memb Nylon de 0.5x0.4 cm ²	9,600 cDNAs en una Memb Nylon de 3x2cm ²	50-6400 cDNAs en laminilla de vidrio de 2x2cm ²	64,000 Oligos en un chip de 1.3x1.3cm ²
Muestra biológica inicial	25 µg RNA total o 0.5 µg RNAm	0.1 µg RNA total o 2 ng RNAm	1 µg RNAm	2 µg RNAm	10 µg RNAm
Marcaje	P32 o 33	P33	Enzimático	Fluorescente	Fluorescente
Volumen de Hibridación	10-40 ml	100 µl	10 µl	2-10 µl	200 µl
Temperatura y Duración	65 °C 20 hrs.	65 °C 48 hrs.	68 °C 12 hrs.	65 °C 18 hrs.	40 °C 40 hrs.
Análisis de Imagen	Macroscópica Escáner baja resolución	Escáner de baja resolución	Escáner de baja resolución o cámara digital	confocal	confocal
Límite de detección*¹	1/20,000	1/10,000	1/20,000	1/100,000	1/300,000
Sensibilidad*²	25x10 ⁶	0.2x10 ⁶	60x10 ⁶	20x10 ⁶	30x10 ⁶

*1 Límite de detección: Abundancia relativa del RNAm en estudio.

*2 Sensibilidad: Mínimo número de copias de una secuencia en particular que deben de estar presentes en la muestra de inicio (RNA) para que puedan ser detectadas como una señal después de la hibridación del microarreglo.

II. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

El FFT1 es un factor protector del epitelio gástrico a través de una función anti-proliferativa demostrada en el modelo knockout, en el cual la ausencia del FFT1 provoca una alteración en los eventos de proliferación/apoptosis/diferenciación del epitelio gástrico que culmina en una proliferación intensa aunada a una diferenciación defectuosa de las células del epitelio gástrico, desarrollándose adenomas antropilóricos en el 100% de los casos y carcinomas invasores en un 30%.

Hasta el momento, no se han analizado los eventos moleculares, las cascadas intracelulares y los genes que se alteran en los adenomas antropilóricos que caracterizan al fenotipo del ratón knockout FFT1.

III. OBJETIVOS DEL ESTUDIO

Primario.

Caracterizar las alteraciones moleculares que participan en el desarrollo del adenoma antropilórico del modelo knockout del gen supresor de tumor *FFT1/pS2* mediante el uso de microarreglos de cDNA.

Secundarios.

Determinar el patrón de expresión de los adenomas antropilóricos que caracterizan al modelo knockout *FFT1/ps2* de 8 semanas de edad, mediante la hibridación de sondas totales a microarreglos de cDNA.

Determinar el patrón de expresión de los adenomas antropilóricos que caracterizan al modelo knockout *FFT1/ps2* de 8 semanas de edad, mediante la hibridación de sondas enriquecidas a microarreglos de cDNA.

Comparar los patrones de hibridación obtenidos con sondas totales y enriquecidas.

Corroborar la activación de la respuesta a proteínas mal conformadas (RPMC del inglés unfolded protein response o UPR) en los adenomas antropilóricos: mediante "Northern blot".

Investigar las alteraciones a nivel sub-celular que se presentan en las células epiteliales que conforman el adenoma antropilórico mediante microscopía electrónica.

IV. METODOLOGÍA

i. Modelo Knockout (KO) del FFT1/ pS2: Obtención de muestras; extracción de RNA total y selección del RNA mensajero.

Se sacrificaron 5 ratones knockout FFT1 $-/-$ desarrollados por recombinación homóloga como se ha señalado en la sección de introducción y 5 ratones silvestres FFT1 $+/+$ de 8 semanas de edad, machos, alimentados con dieta estéril *ad libitum*, de la cepa 129/Svj. Los adenomas antro-pilóricos de los ratones knockout y las regiones antro-pilóricas correspondientes a los ratones silvestres fueron identificadas macroscópicamente, disecadas manualmente con técnica estéril y congeladas en nitrógeno líquido de forma inmediata e individual.

Los genes expresados en estas muestras estaban representados por un conjunto complejo de RNAm. Por tanto el primer paso para utilizar el sistema de microarreglos exigía la extracción del RNA total de las muestras mediante las técnicas descritas en la literatura (Auffray and Rougeon 1980; Maniatis 1982). Los adenomas de los ratones de 8 semanas de edad fueron agrupados para la extracción del RNA total usando el método de LiCl/urea/fenol ácido seguido por una precipitación con acetato de sodio como se describe previamente. El mismo procedimiento se repitió para el grupo de muestras correspondientes a las regiones antro-pilóricas de animales de 8 semanas en forma paralela. La integridad del RNA se verificó mediante geles de formaldehído (Maniatis 1982). Parte del RNA total se utilizó para realizar membranas con el RNA fraccionado

inmovilizado para realizar "Northern blots" (Maniatis 1982) con la finalidad de corroborar los resultados que serían obtenidos con los microarreglos, y la otra parte se almacenó en nitrógeno líquido.

Dado que este RNA sería utilizado como molde para la síntesis de las sondas, el grado de pureza del mismo era realmente importante para evitar las señales inespecíficas (background) durante la hibridación. Por ello realizamos la selección del RNA mensajero el cual representaba aproximadamente del 2 al 7% del RNA total. Esta selección se realizó mediante cromatografía de afinidad usando 2 pases del RNA total en columnas de oligodT celulosa (Aviv and Leder 1972).

ii. Síntesis de sondas

Las sondas se refieren al material que será hibridado al microarreglo. Estas como ya se mencionó, son sintetizadas a partir de la población de RNAm del tejido o línea celular en estudio, por lo que representan al conjunto de genes expresados, en donde cada RNAm específico se encuentra en cantidades proporcionales a su abundancia (número original de copias de ese RNAm específico, entre la población de RNA total).

A) Sondas totales o complejas.

En un primer experimento realizamos la forma más simple de escrutinio diferencial (**differential screening**) usando microarreglos de cDNA, utilizando sondas totales

o complejas para su hibridación, provenientes tanto del adenoma antropilórico de los ratones KO FFT1 a la que llamamos **sonda total positiva ADENOMA**, como de las regiones antro pilóricas del ratón silvestre FFT1, a la que nombramos **sonda total negativa ANTRO**. Las sondas totales nos permitirían identificar genes diferencialmente expresados con abundancia alta e intermedia (de 244 a 11,000 copias de cada transcrito específico por célula) en los adenomas, es decir cuando el RNAm de interés representara aproximadamente más del 0.05% del RNAm total en las célula del adenoma y menos del 0.01% en las células de la región antro pilórica normal(Maniatis 1982).

Para obtener una sonda **total** específica **del adenoma (sonda total positiva + ADENOMA)** que representara todos los transcritos expresados en el tumor se usaron 2 µg de RNA Poly A+ purificado del adenoma de 5 ratones KO homocigotos (FFT1 -/-) a las 8 semanas de edad. Este molde fué sujeto a la síntesis de cDNA de primera cadena usando transcriptasa reversa (RT) AMV como primer o iniciador (**Figura 10**). Para obtener una sonda **total control (sonda negativa - ANTRO)** que representara los transcritos expresados en la región antro pilórica de ratones silvestres (FFT1 +/-) de 8 semanas de edad se utilizaron 2 µg de RNA Poly A purificado a partir de estas regiones (**Figura 11**). En ambos casos después de la síntesis de la primera cadena de cDNA, el RNA fué removido por hidrólisis con NaOH y el cDNA fué purificado por cromatografía usando columnas de sephadex G50, concentrando el cDNA por precipitación en etanol al 100%. Cada uno de los cDNAs fué resuspendido, cuantificado y almacenado en nitrógeno líquido hasta su uso(Maniatis 1982).

Figura 10. Síntesis de Sonda Total Positiva (+) Adenoma

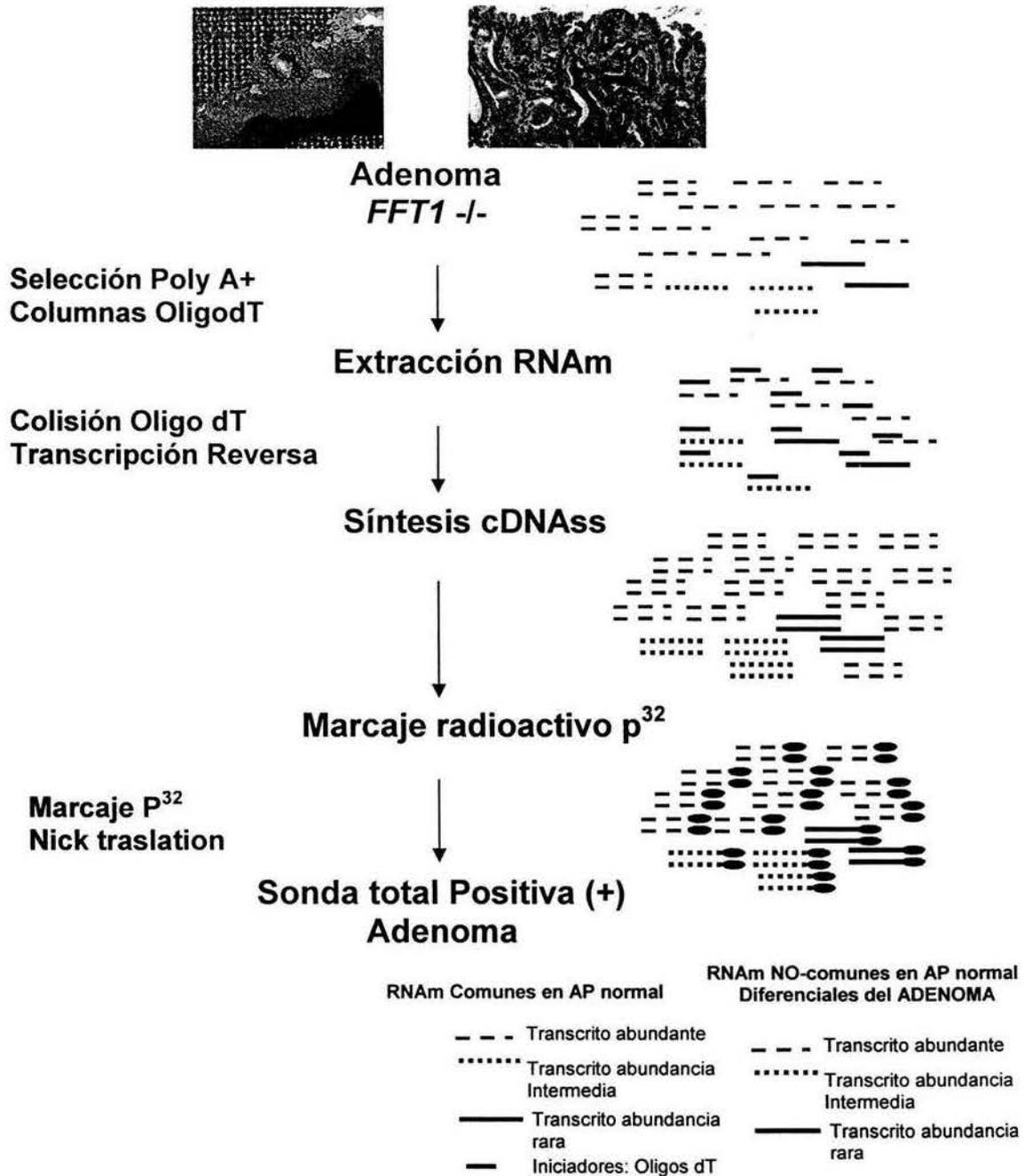


Figura 10. Diagrama de flujo que demuestra los pasos requeridos para la síntesis de una sonda total proveniente del adenoma. A la derecha se representa de forma esquemática los RNAm procesados: en azul los transcritos comunes en el adenoma y antro normal, en magenta los transcritos únicamente (diferenciales) expresados en el adenoma. Los diferentes tipos de líneas los representan según su abundancia. En rojo los iniciadores (Oligos dT).

Figura 11. Esquema general Síntesis de Sonda Total Negativa (-) ANTRO (Control)

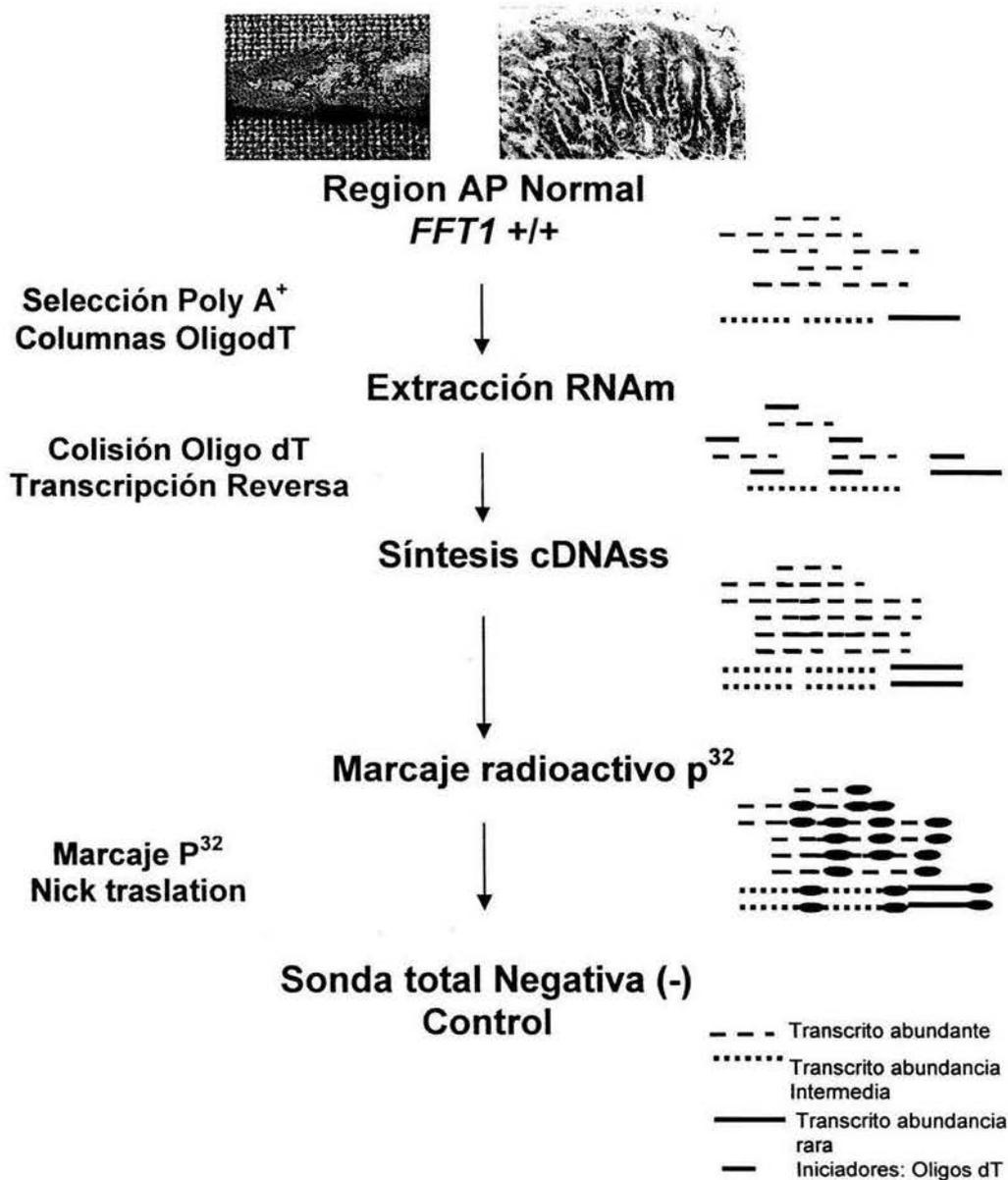


Figura 11. Diagrama de flujo que demuestra los pasos requeridos para la síntesis de una sonda total proveniente del antro normal (control). A la derecha se representa de forma esquemática los RNAm procesados: en azul los transcritos comunes en el adenoma y antro normal. Los diferentes tipos de líneas los representan según su abundancia. En rojo los iniciadores (Oligos dT).

b) Sondas enriquecidas, sustraídas o absorbidas.

Los estudios de cinética de hibridación han permitido establecer cuantos genes se expresan diferencialmente entre dos tipos celulares. Sus resultados han demostrado que una célula o tejido expresa aproximadamente 20,000 genes distintos (Axel, Feigelson et al. 1976) (representados por 300,000-500,000 copias de RNAm) (Hastie and Bishop 1976). Estos genes expresados se encuentran divididos en tres clases según su abundancia dentro de una célula: abundantes, intermedios o raros. Los genes abundantes están representados por 10 transcritos diferentes, de los que encontramos cerca de 10,000 copias de cada uno de estos transcritos diferentes por célula, por lo que representan el 22% de la población total de RNAm por célula. Los de abundancia intermedia son aproximadamente 840 transcritos diferentes, de los que se encuentran aprox. 244 copias de cada uno por célula, representando el 41% del total del RNA en una célula dada. Por último, los más interesantes, los que se expresan de forma rara están compuestos por aproximadamente 14,200 genes diferentes de los que solo encontramos un promedio de 13 copias por célula de cada uno (Hastie and Bishop 1976).

Es obvio pensar que los genes diferencialmente expresados entre dos poblaciones celulares pueden estar en cualquier clase de abundancia. Sin embargo, los mismos estudios de cinética de hibridación han demostrado que dos órganos difieren en la expresión del 20% de sus genes (Crampton, Humphries et al. 1980); los tejidos a comparar tienen un origen similar, por ejemplo linfocito T vs. linfocito B, los genes diferencialmente expresados son solo el 2% de la población total (Davis MM and Franco AD 1982). Más aún, se ha demostrado que aunque los

transcritos abundantes pueden variar entre un órgano y otro, hasta un exagerado 10% de los transcritos de abundancia intermedia y rara pueden expresarse diferencialmente de forma significativa . Estas últimas secuencias pueden ser las responsables de las diferencias observadas entre dos tipos celulares, o entre un estado normal y uno patológico. Estas observaciones indican que las diferencias entre tejidos se deben tanto a cambios cuantitativos como cualitativos (niveles de expresión alterados y/o ausencia o presencia de un transcrito en particular, respectivamente) (Hastie and Bishop 1976). Por estas razones han surgido métodos que tratan de enriquecer las secuencias intermedias y raras que existen dentro de una muestra de RNAm que será estudiada, con la finalidad de incrementar las probabilidades de aislar un mayor número de genes expresados relevantes diferencialmente. La metodología empleada por nosotros se denomina sustracción por hibridación (Sagerstrom, Sun et al. 1997) .

Con el objetivo de realizar un segundo experimento en el que se detectaran genes diferencialmente expresados en el adenoma que pertenecieran a la clase de transcritos con abundancias intermedias y raras (de 5 a 244 copias de un transcrito específico por cada célula) decidimos preparar otro tipo de sondas conocidas como enriquecidas, sustraídas o absorbidas(Maniatis 1982).

En estas sondas se aumenta la concentración de secuencias específicas a los transcritos con abundancia intermedia o rara expresados en un tejido de interés (adenoma) mediante un proceso conocido como sustracción por hibridación(Sagerstrom, Sun et al. 1997) (**Figura 12**).

Figura 12. Sustracción por Hibridación: Síntesis de Sonda enriquecida Positiva (+) Adenoma

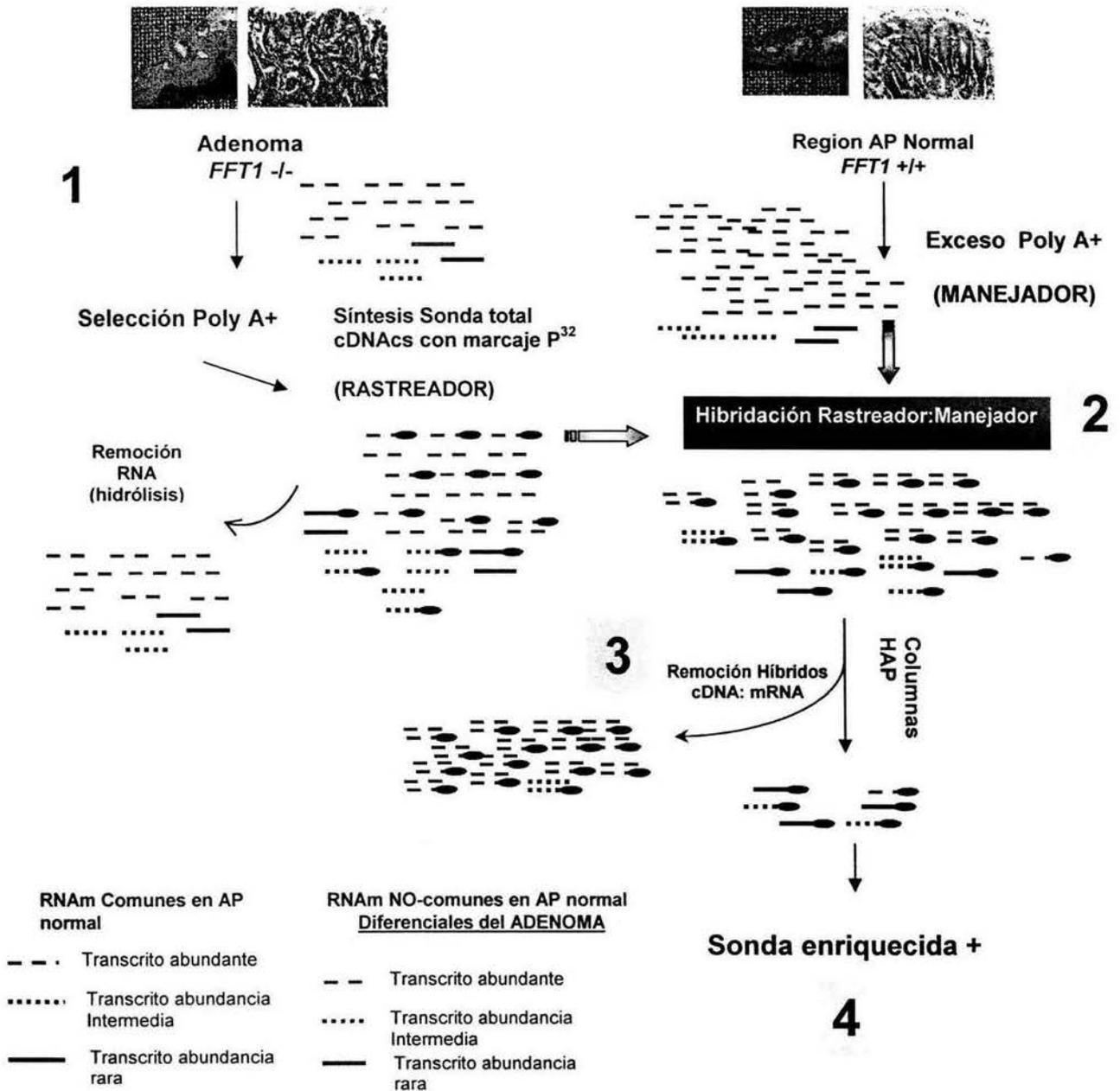


Figura 12. Diagrama de flujo de una sustracción por hibridación. Se continúa representando esquemáticamente con diferentes tipos de líneas y colores a los transcritos correspondientes, como en las figuras previas. Nótese el primer paso (esquina superior izquierda) es la síntesis de cDNAs de cadena sencilla provenientes del adenoma, a los cuales en un segundo paso (recuadro a la derecha) se les hibrida con un exceso de Poly A proveniente del antro normal. Los híbridos cDNAs: PolyA son removidos con columnas de hidroxapatita (HAP) en un tercer paso (esquina inferior) y los cDNAs restantes son recuperados y utilizados finalmente para la síntesis de una sonda enriquecida (Véase texto).

El primer paso en la realización de esta técnica consiste en la síntesis de una sonda total positiva de cDNA como ya se describió previamente. La sustracción comienza cuando esta sonda total positiva (que contiene los genes que deseamos identificar en el adenoma) es hibridada exhaustivamente con un exceso de RNAm del tejido control (región antro pilórica normal, en el que los genes de interés no se expresan). Los cDNAs que corresponden a las secuencias comunes (expresadas en ambos tipos celulares) entre el adenoma y los estómagos normales, reaccionarán formando híbridos cDNA: RNAm los cuales pueden ser separados por cromatografía en columnas de hidroxapatita, quedando solo las secuencias de cadena sencilla de cDNA que se expresan únicamente en el tejido de interés (adenoma) y que no se encuentran en el tejido control. Estas últimas secuencias representan los genes diferencialmente expresados, de abundancia intermedia o raros del adenoma y por tanto son marcadas de forma radioactiva o no radioactiva e hibridadas a los microarreglos de cDNA para conocer su identidad (**Figura 12**). Con la finalidad de tener un control que reflejara la calidad del proceso y validará nuestros resultados, realizamos el mismo proceso con la sonda total negativa, sintetizada a partir del RNAm del tejido control (representando los genes expresados en la región antro-pilórica normal de ratones silvestres FFT1), la cual fué hibridada con un exceso del mismo RNAm (Región antro-pilórica) y los híbridos cDNA:RNAm del mismo origen que representan las secuencias más abundantes fueron retiradas por cromatografía, recuperando las secuencias de cadena sencilla que representaban los genes de poca abundancia o raros expresados en el tejido control (región antro-pilórica normal), cuya identidad también fué revelada al marcarlos e hibridarlos con un microarreglo duplicado.

Antes de ser hibridados al microarreglo, las secuencias de cadena sencilla de una y otra población fueron usadas como molde para la síntesis de una cadena complementaria de DNA, la cual fue marcada con material radioactivo con una actividad específica alta usando como iniciadores oligonucleotidos al azar y DNA polimerasa.

De esta manera 2 µg de RNAs Poly A+ extraídos del adenoma a 8 semanas fueron utilizados para iniciar la síntesis de la sonda enriquecida positiva, utilizándolos como molde para formar una primera cadena de cDNA mediante iniciadores al azar, pero utilizando un rastreador que consiste en la incorporación de una pequeña cantidad de ^{32}P que permitiría detectar la efectividad de la reacción de síntesis de cDNA. De esta forma los 2 µg se convirtieron en 542 ng de cDNA de cadena sencilla. El mismo procedimiento se realizó en paralelo usando como sustrato 2 µg de RNA Poly A+ extraído de la región antro pilórica de ratones silvestres de 8 semanas de edad, convirtiéndose en 656 ng de cDNA de cadena sencilla. Estos cDNAs positivo + (adenoma) y negativo - (antro-píloro) fueron entonces sometidos a un apareamiento o hibridación de forma paralela con un exceso (15 veces; 7.5 µg para cDNA+ y 8.5 µg para cDNA -) de RNA Poly A+ extraído de la región antro pilórica de ratones silvestres de 8 semanas de edad, por 24 hrs a una temperatura de 68°C. Las mezclas cDNA+: exceso RNA Poly A -, y cDNA -: exceso RNA Poly A -, fueron sometidas a cromatografía con columnas de hidroxapatita para separar los híbridos cDNA+: exceso RNA Poly A - como material de doble cadena, de las cadenas o secuencias que no hibridaron y que

por tanto permanecieron como cDNA de cadena sencilla y que representaron en este caso las secuencias poco abundantes y las secuencias adicionales "raras" expresadas en el adenoma. El mismo procedimiento cromatográfico se utilizó para separar los híbridos cDNA -: exceso RNA Poly A -, de las cadenas sencillas que no hibridaron con el exceso, correspondientes a las secuencias poco abundantes expresadas en la región antro pilórica de ratones silvestres. Los cDNAs de cadena sencilla tanto + como - fueron entonces el 15 y el 20% de los cDNAs iniciales. En ambos casos fueron concentrados mediante precipitación en etanol 100% y lavados con solución buffer Tris 10 mM, EDTA 1 mM usando columnas centrífuga 30. 10 ng de cada cDNA + y - fueron resuspendidos en agua bidestilada y almacenados en nitrógeno líquido.

iii. Marcaje radioactivo.

a) Sondas Totales.

Para el experimento de hibridación de los microarreglos con sondas totales el cDNA obtenido del adenoma a 8 semanas y de la región antro pilórica a 8 semanas fué resuspendido en agua bidestilada de forma paralela y 50 ng de cada cDNA fueron utilizados para realizar el marcaje radioactivo mediante el sistema "High prime" con ^{32}P usando iniciadores al azar, obteniéndose una actividad de 3×10^7 cpm para la sonda compleja o total "positiva +" y 2.7×10^7 cpm para la sonda compleja o total "negativa -"(Maniatis 1982).

b) Sondas enriquecidas.

Para el experimento de hibridación de los microarreglos con sondas enriquecidas el cDNA enriquecido obtenido del adenoma a 8 semanas y de la región antro pilórica a 8 semanas fué resuspendido en agua bidestilada de forma paralela y 10 ng de cada cDNA fueron utilizados para realizar el marcaje radioactivo mediante el sistema "High prime" con ^{32}P usando iniciadores al azar, obteniéndose una actividad de 5×10^6 cpm para la sonda enriquecida "positiva +" y 3.5×10^6 cpm para la sonda enriquecida "negativa -" (Maniatis 1982).

iv. Hibridación de microarreglos con sondas

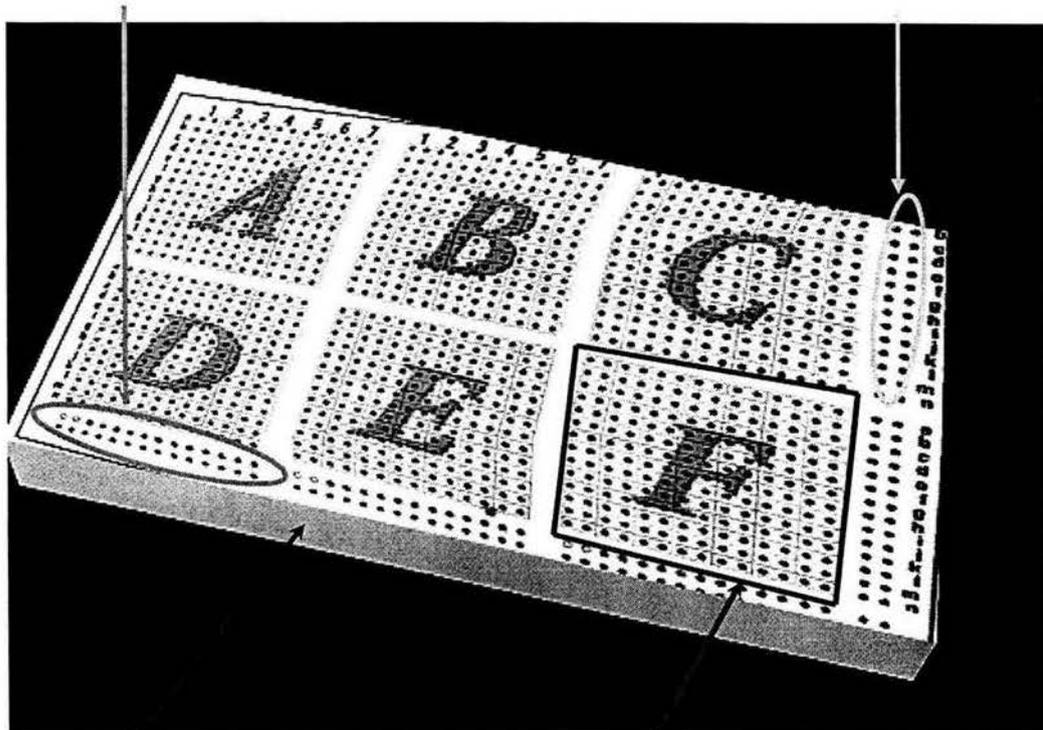
Los experimentos de microarreglos se hicieron utilizando los microarreglos de cDNA de la compañía comercial clontech (Palo Alto, CA, USA). Este microarreglo contiene 588 cDNAs de ratón inmovilizados de forma independiente y en duplicado en una membrana de nylon, y se encuentran organizados en 6 paneles que se denotan de la A a la F por la compañía (**Figura 13**). Cada panel contiene 98 cDNAs diferentes, previamente caracterizados. Los cDNAs se agrupan en cada panel de acuerdo a su función biológica según lo considera la casa manufacturadora (**URL:<http://www.clontech.com>**).

La hibridación se refiere al apareamiento específico que ocurre entre cadenas de ácidos nucleicos con secuencias complementarias mediante la creación de puentes de hidrógeno entre las bases de cada cadena. En esta interacción físico-química, la sensibilidad y especificidad dependen de la probabilidad de que las

Figura 13. Atlas cDNA mouse Array

Controles Positivos

Controles Negativos



Membrana de Nylon

6 Cuadrantes con cDNAs
divididos por Clases
funcionales

Figura 13. El "Atlas cDNA expresión Mouse Array^R" contiene 588 cDNAs divididos en 6 cuadrantes (nombrados de la A a la F) que representan diferentes clases funcionales. La parte inferior señalada contiene controles positivos y a la derecha se observan los controles negativos. Cada gen se encuentra por duplicado representado en forma de productos de PCR.

cadena de ácidos nucleicos interactúan, formando dobles hélices. Esta colisión es proporcional a la concentración de cadenas complementarias en la solución y al volumen de la solución (Mercado and Gamba 1997). Dado que el microarreglo contiene una cantidad y densidad determinada de blancos (target: cadenas de ácidos nucleicos representando un gen) específicas, la sensibilidad del análisis depende de la concentración de cDNA a ser detectado en la sonda.

Lo que hace a los experimentos de hibridación más útiles es la posibilidad de manejar el grado de especificidad conocido como estringencia. La estringencia puede aumentar o disminuir, dependiendo del manejo de las condiciones experimentales de los factores que influyen en la estabilidad de los puentes de hidrógeno que se forman entre las cadenas de ácidos nucleicos y son: la temperatura, la concentración de cationes monovalentes en la solución de hibridación, el pH, la presencia de formamida y la longitud de la sonda utilizada. En resumen la alta temperatura (>65°C), el pH alcalino, las bajas concentraciones de sal y la alta concentración de formamida (>50%) durante la hibridación y lavados del microarreglo representan condiciones de alta estringencia en donde solo las cadenas 100% complementarias se unirán y serán detectadas, por lo que la especificidad del experimento y la calidad de los resultados aumenta (Mercado and Gamba 1997).

La hibridación y los lavados de los microarreglos se realizaron siguiendo las instrucciones de la compañía comercial, en condiciones de alta estringencia. De forma breve, después del marcaje de sondas, las mismas fueron purificadas por

cromatografía con columnas G50, y la hibridación se realizó a 71°C en un horno de hibridación rotatoria (modelo 45008, Bioblock scientific, Illkirch, France) usando 1 x 10⁶ cpm/ml de sondas radioactivas por 12 hrs. Las membranas se lavaron a 68°C cuatro veces con solución sódica standard 2X y 1% de sulfato dodecil sódico, y luego en dos ocasiones con solución estándar 1X SSC, 0.1%. Los filtros fueron expuestos por 1 a 3 días a un filme kodak X-OMAT y analizados por un sistema de fósforo imagen. El desmarcaje de membranas se realizó de acuerdo a las instrucciones de la compañía siendo re-utilizados los microarreglos en tres ocasiones después de lavarlos siguiendo las instrucciones de la compañía que los fabrica (www.clontech.com)

v. Análisis e interpretación de resultados

Debido a que los microarreglos de cDNAs que utilizamos fueron marcados con métodos radioactivos, la detección de las señales correspondientes a los genes diferencialmente expresados se facilitó con el uso de sistemas de procesamiento de imágenes tipo escáner, el cual analizaba las autoradiografías que resultaban de nuestros experimentos.

Las imágenes digitalizadas se sometieron posteriormente a un proceso de normalización de señales, en donde mediante el uso de un programa de fósforo-imagen, los resultados son ajustados con respecto a las señales inespecíficas por contaminación o ruido (background), los controles positivos y negativos, obteniéndose resultados más fidedignos. Esta normalización tiene la finalidad de eliminar las diferencias lineales que existen entre la cantidad exacta de sonda

aplicada, el poder del marcaje, y la eficiencia de detección. El proceso se realiza ajustando la sensibilidad de la detección (tiempo de exposición vs. radioactividad) y considerando las señales emitidas por un subgrupo de cDNAs (controles) los cuales no se modifican bajo las condiciones ya mencionadas.

Posteriormente, se realizó un análisis comparativo semicuantitativo de los genes expresados en cada panel, identificando los genes diferencialmente expresados según su posición siguiendo las normas propuestas por la casa manufacturadora y utilizando la base de datos de su fuente bioinformática (www.clontech.com). Esto permitió organizar y procesar toda la información, obteniendo finalmente una base de datos original que representa los genes diferencialmente expresados en nuestro modelo.

Una vez obtenido el número e identidad de los genes se realizó una búsqueda bibliográfica a través de Medline (www.pubmed.ncbi.com) para encontrar una asociación entre los mismos, que permitiera una interpretación coherente y la generación de una hipótesis explicativa. Posteriormente, y siguiendo el análisis bibliográfico se seleccionaron los genes que serían corroborados por otras técnicas de biología molecular, con la finalidad de validar el conocimiento biológico original que había sido obtenido.

Esta gran cantidad de información hace que en muchas ocasiones el investigador tarde más en el análisis, organización e interpretación de sus resultados que en su adquisición.

vi. Confirmación de resultados

Debido a la naturaleza de los genes obtenidos con los experimentos realizados con microarreglos, se escogieron dos experimentos diferentes que confirmarán nuestros resultados.

Northern Blot

Realizamos esta técnica de expresión génica para corroborar los resultados obtenidos por microarreglos de cDNA usando la metodología previamente publicada (Maniatis 1982; Mercado and Gamba 1997). Para los "Northern" se sintetizaron sondas específicas correspondientes a los cDNAs identificados mediante RT-PCR convencional y subclonación en el vector pTadvantage (Clontech). Los oligonucleotidos sintéticos usados se encuentran en la **tabla 2**.

Microscopía electrónica de las células epiteliales del adenoma del modelo KO del FFT1.

Para tratar de identificar alteraciones ultraestructurales en el adenoma de los animales knockout se realizó un experimento de Microscopía electrónica. Los ratones KO y silvestres de 4 meses de edad fueron anestesiados y sacrificados por perfusión cardiaca con fijador compuesto por glutaraldeído al 2.5%, paraformaldehído al 2% y ácido tánico al 0.2% en un buffer de cacodilato sódico 0.1 M a un pH de 7.4. La región antral de los estómagos fue disecada en pequeñas piezas e inmersa en el mismo fijador por 3 h a 4°C. Después de 3

Tabla 2. Iniciadores utilizados para la síntesis de sondas para confirmación por “Northern blot”.

RNAm	Número de Acceso	Nombre	Secuencia
CHOP10	X67083	AAS43 AAS44	GGAAGTGCAT CTCATACAC CACC TGA CTGGAAT CTGGAGAGCG AGGGC
Erp72	J05186	AAS51 ABQ32	GAGAAGTTCC AGTCCAAGTA TGAGCC CAAGATCCTG CCATTTAC
GRP78	D78645	ABP107 ABP108	AGGATGCGGA CATTGAAGAC CAATTCCTCC TCTCCCTGAC
P58IPK	U28423	ABX54 ABX55	GTGCTCAAAT GTAACCCC GCTTTCTCTA AACCTTCCC
Clusterin	L08235	AAN297 AAN298	TCTGGATGAA CGGCGACCGC ATCG CTGCGGACCA AGCGGGACTT GGG
GAPDH	M32599	PX24 PX25	CCAGTATGAC TCCA CTACG GCAA TATTCATTGT CATA CCAGGA AATG
TFF1	NM009362	FFT1	cDNA Completo

lavados con la solución amortiguadora ,los tejidos fueron posteriormente fijados en tetróxido osmio al 1% reducido con ferrocianuro de potasio por 1 h Se deshidrataron las piezas en etanol y se embebieron en araldita. Los bloques se cortaron y secciones semidelgadas fueron teñidas con azul de tolueno y examinadas bajo microscopía de luz para su orientación y corte de bloque. Algunas secciones ultra delgadas fueron procesadas y teñidas con plomo-uranil para ser finalmente examinadas bajo el microscopio electrónico Phillips (C12-208 o CM10).

V. RESULTADOS

1. Identificación de los genes sobre-regulados en el adenoma del modelo Knockout (KO) FFT1 $-/-$ de 8 semanas de edad mediante la hibridación de microarreglos de cDNA con sondas totales o complejas.

El primer experimento tuvo como objetivo el identificar los genes sobre-regulados en el adenoma del modelo KO FFT1. Para ello se hibridó la **sonda total “positiva” correspondiente** a todos los transcritos (o RNAs mensajeros) expresados en el **adenoma** con el microarreglo de cDNA y de forma paralela, con la finalidad de tener un control, hibridamos la **sonda total negativa, representando** todos los transcritos expresados en la **región antro pilórica normal** del modelo silvestre FFT1 con otro microarreglo de cDNA de forma similar (**Figura 14**). Con este experimento, solo obtuvimos 10 a 20 señales positivas en cada panel. Al comparar los patrones de expresión entre los tumores y los tejidos normales se identificaron **siete genes** distribuidos en cuatro diferentes paneles diferencialmente sobre-expresados en el adenoma del ratón KO FFT1 (**Figura 15**). La identidad de los genes sobre expresados fue revelada al relacionar la localización de la señal positiva con la tabla proporcionada por la compañía manufacturadora del microarreglo (**tabla 3**) (www.clontech.com).

Figura 14. Esquema representativo del primer experimento de hibridación de microarreglos con sondas totales

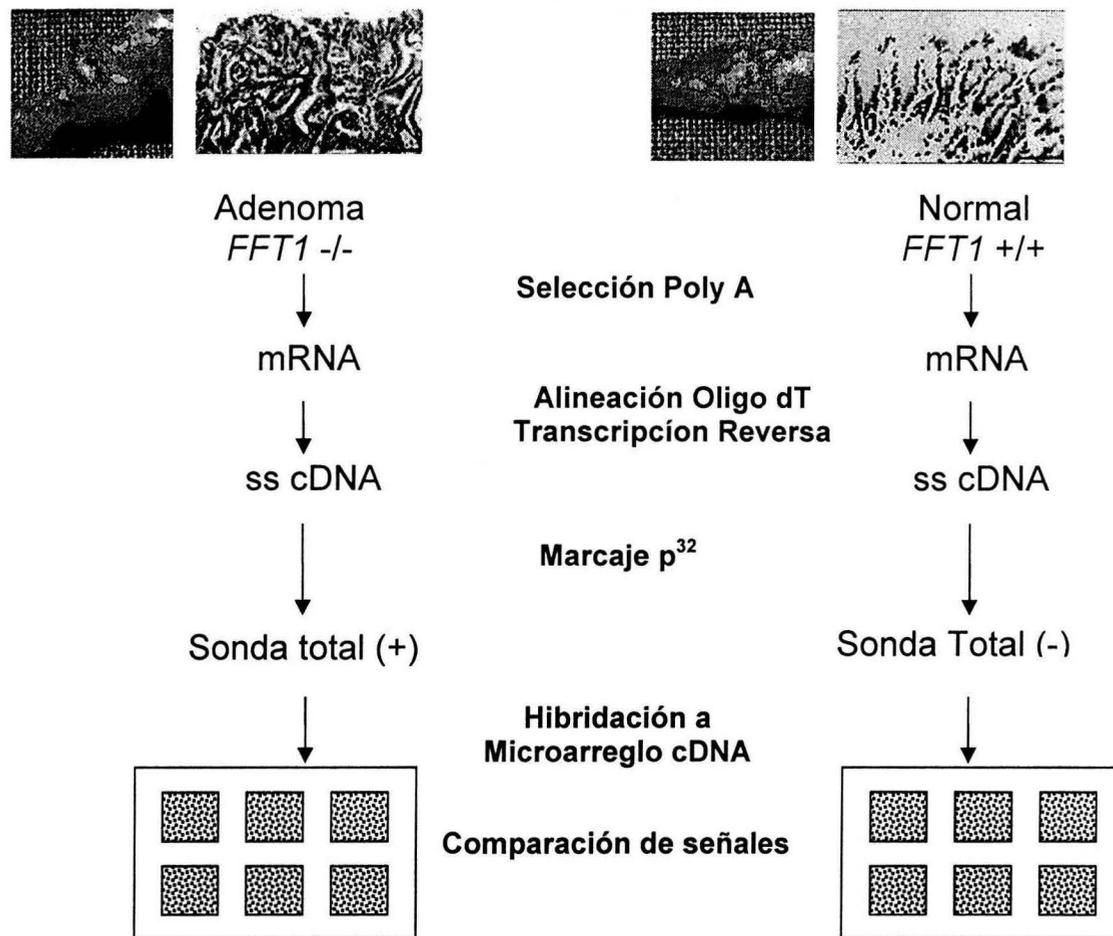


Figura 14. Estrategia usada para la obtención de patrones de expresión génica del adenoma del ratón KO *FFT1* -/- (Izquierda) y de la región antro-pilórica control (derecha) del ratón silvestre *FFT1* +/+ de 8 semanas de edad usando sondas totales.

Figura 15. Microarreglos de cDNA hibridados con sondas totales

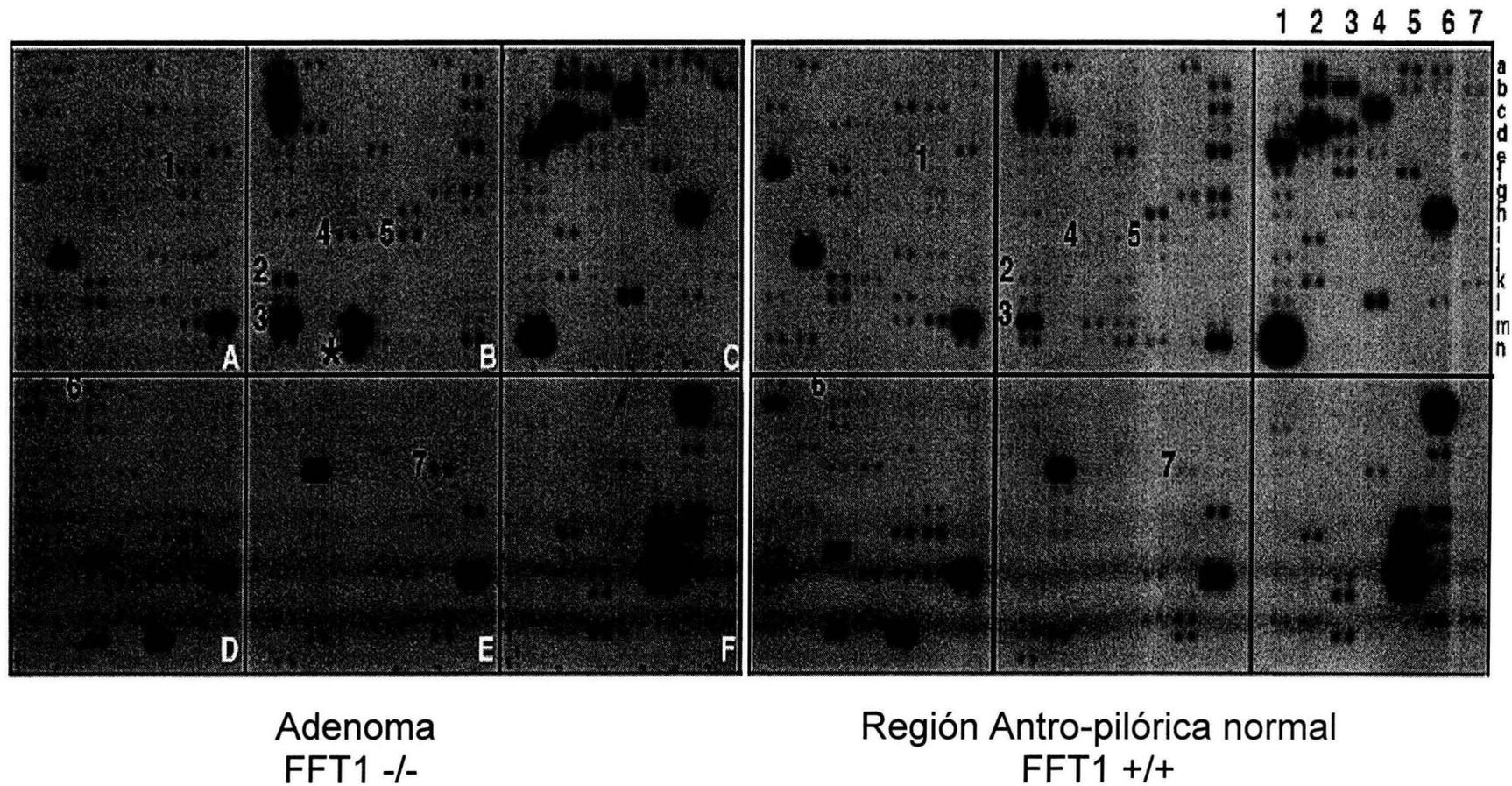


Figura 15. Se observan los patrones de expresión génica en el adenoma (izquierda) y antro normal (derecha) de 8 semanas de edad identificados al hibridar los microarreglos de cDNA con sondas totales. Los números se encuentran a la izquierda de los genes diferencialmente sobre-expresados en el adenoma. Se señalan los 6 diferentes paneles (A-F letras blancas) y las coordenadas de los puntos. *Señal por contaminación.

Tabla 3. Genes sobre expresados en el adenoma del ratón KO FFT1 identificados mediante microarreglos de cDNA usando sondas totales.

Panel	Grupo Funcional	Número / Identidad de Genes sobre-regulados	Posición
A	Oncogenes, Anti-oncogenes y Reguladores del Ciclo celular	1. Ciclina D1	A6f
B	Respuesta al estrés	2. Erp72 3. GRP78 4. P58IPK 5. uPAR1	B1k B1m B5i B3i
C	Apoptosis, síntesis y reparación del DNA	-	-
D	Factores de transcripción y proteínas de unión al DNA	6. PEA3	D3a
E	Receptores, Antígenos de superficie y adhesión celular	7. CD44	E6e
F	Comunicación intercelular, Citoesqueleto y motilidad celular	-	

2. Hibridación de microarreglos de cDNA usando sondas enriquecidas o sustraída sintetizadas de los adenomas antropilóricos y regiones antropilóricas normales de ratones knockout y silvestres FFT1 respectivamente, de 8 semanas de edad.

Para mejorar la sensibilidad en la detección se realizó un segundo experimento utilizando sondas enriquecidas o sustraídas como se señala en la sección de métodos (Figura 12). La *sonda enriquecida “positiva”* representó los **transcritos poco abundantes y raros** expresados en el **adenoma** del modelo KO FFT1, mientras que la *sonda enriquecida “negativa”* representó solo los **transcritos poco abundantes** expresados en la **región antropilórica normal** de los ratones silvestres FFT1; de esta manera el análisis de hibridación de estas sondas con microarreglos de cDNA de forma paralela y en condiciones similares permitió detectar los genes diferencialmente sobre-regulados en el adenoma que correspondieron a los transcritos poco abundante y raros expresados en el normal (Figura 16) . En comparación con el experimento anterior usando sondas totales, en esta hibridación con sondas enriquecidas obtuvimos de 50 a 70 señales positivas en cada panel. La comparación entre estos dos nuevos patrones de expresión (KO vs. Silvestre) permitió la detección de **22 genes sobre-expresados** de forma diferencial en el adenoma, que incluyeron y corroboraron los 7 genes encontrados previamente usando sondas totales. (Figura 17). El análisis con sondas enriquecidas permitió entonces identificar 15 genes adicionales a los detectados con las sondas tradicionales (sondas totales), los cuales corresponden a genes de muy poca abundancia que participan en el

fenotipo del ratón KO FFT1. La identidad de estos genes se determinó relacionando la localización de la señal radioactiva con la tabla proporcionada por la compañía manufacturadora (**Tabla 4**) (www.clontech.com).

Figura 16. Esquema representativo del segundo experimento de hibridación de microarreglos con sondas enriquecidas

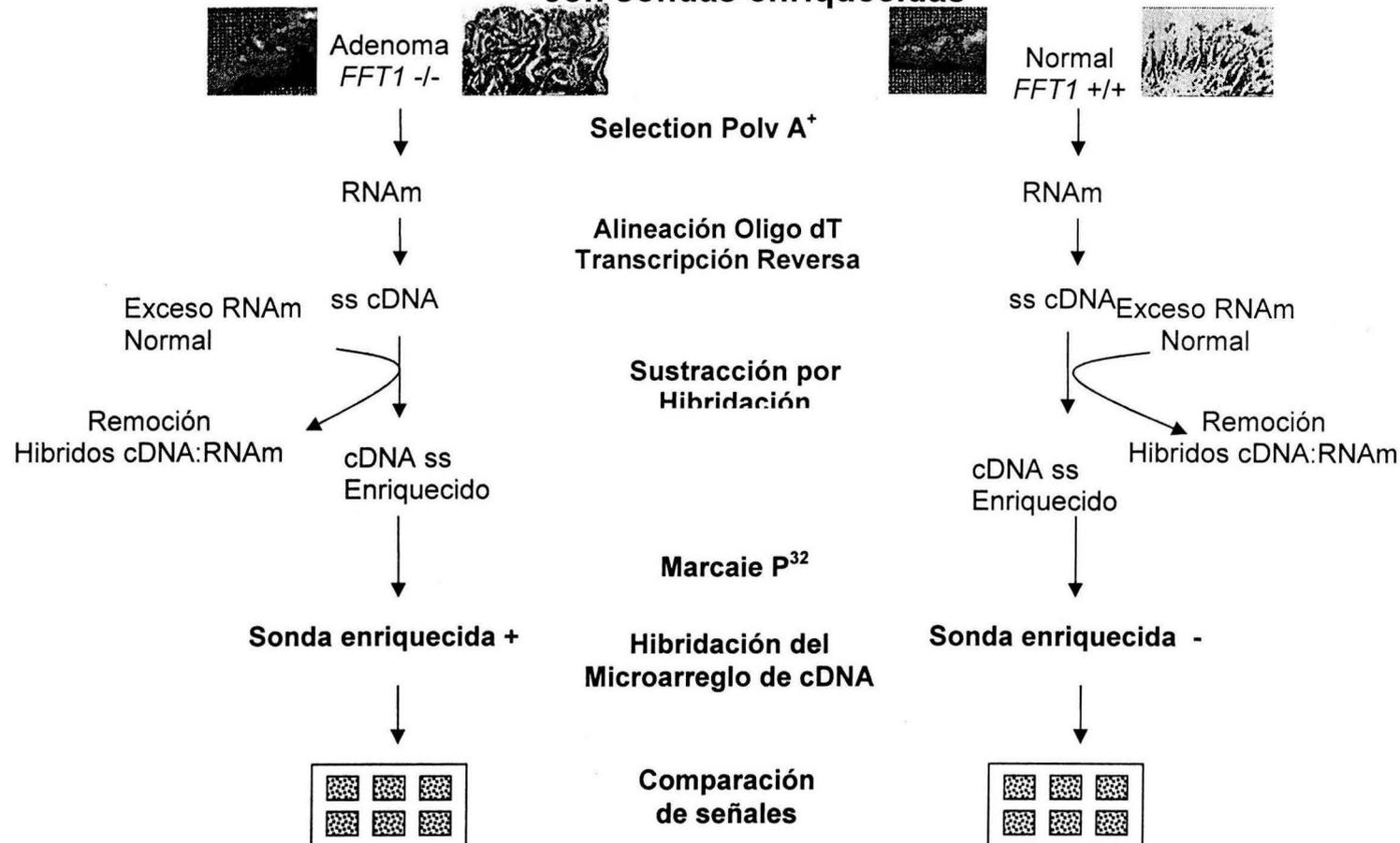


Figura 16. Estrategia usada para la obtención de patrones de expresión génica del adenoma del ratón KO *FFT1* ^{-/-} (Izquierda) y de la región antro-pilórica control (derecha) del ratón silvestre *FFT1* ^{+/+} de 8 semanas de edad usando sondas enriquecidas.

Figura 17. Microarreglos de cDNA hibridados con sondas enriquecidas.

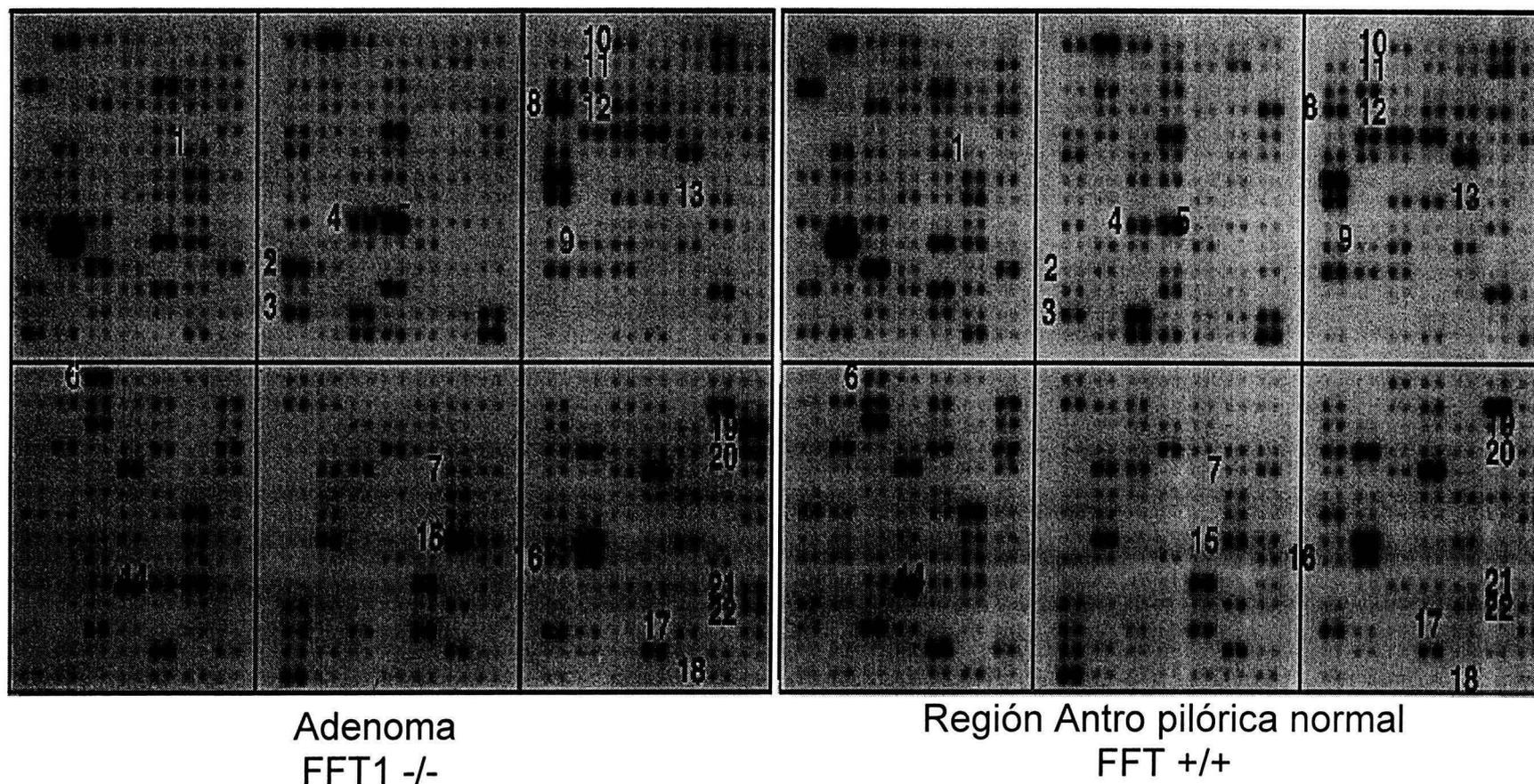


Figura 17. Se observan los patrones de expresión génica en el adenoma (izquierda) y antro normal (derecha) de animales de 8 semanas de edad identificados al hibridar los microarreglos de cDNA con sondas enriquecidas. Los números se encuentran a la izquierda de los genes diferencialmente sobre-expresados en el adenoma. Se señalan los 6 diferentes paneles (A-F letras blancas).

Tabla 4. Genes sobre expresados en el adenoma del ratón KO FFT1 identificados mediante microarreglos de cDNA usando sondas enriquecidas.

Panel	Grupo Funcional	Número en Microarreglo / Identidad de Genes sobre-regulados	Posición
A	Oncogenes, Anti-oncogenes y Ciclo Celular	1. Ciclina D1	A6f
B	Respuesta al estrés	2. Erp72 3. GRP78 4. P58IPK 5. uPAR1	B1k B1m B5i B3i
C	Apoptosis, síntesis y reparación del DNA	8. BAD 9. Blk 10. Chop10 11. Clusterin 12. DAD-1 13. HR21spA	C1d C2j C3a C3b C3d C6h
D	Factores de transcripción y proteínas de unión al DNA	6. PEA3 14. Nucleobindin	D3a D5j
E	Receptores, Antígenos de superficie y adhesión celular	7. CD44 15. CD14	E6e E6h
F	Comunicación intercelular, Citoesqueleto y motilidad celular	16. GLYCAM-1 17. MLC1A 18. Gelatinasa B 19. MMP-MT1 20. PN-1 21. SPI-2.2 22. SPI-2.4	F1i F5l F6n F7c F7d F7j F7k

3. Naturaleza de los genes sobre-regulados en el tumor antropilórico del modelo FFT1 -/- .

Los 22 genes sobre-expresados en los tumores antropilóricos del modelo FFT1 -/- se distribuyeron en los 6 cuadrantes que componen los microarreglos. Su identidad fue establecida de acuerdo a su localización en el microarreglo siguiendo la clasificación otorgada por la compañía comercial (<http://www.clontech.com>).

Como se indica en la **tabla 4** quienes correspondieron al transcrito de la proteína reguladora del ciclo celular, cíclica D1 (Panel A #1); la proteína regulada por glucosa GRP-78 y la proteína de estrés del RE, Erp72, (Panel B2 y B3) las cuales se encuentran íntimamente ligadas en la respuesta al estrés celular; el receptor de superficie del sistema activador urokinasa-plasminógeno (uPAR 1), y el inhibidor de 58 kd de la proteína cinasa activada por RNA, genes clasificados como transductores, efectores y moduladores intracelulares (Panel B4 y B5): cinco genes relacionados al proceso de apoptosis fueron identificados, el efector BAD, la cinasa de linfocito B o Bcl, el factor de transcripción de respuesta al estrés celular CHOP10, el transcrito de la proteína clusterin y el mensajero de la proteína anti-apoptótica DAD1 (Panel C8, C9, C10, C11 y C12); en el mismo panel se encontró un gen involucrado en el mecanismo de reparación de DNA (panel C13); en el siguiente cuadrante se identificaron 2 transcritos correspondientes a proteínas ligandos del DNA el factor de transcripción PEA-3 relacionado a la familia Ets y el factor conocido como nucleobindina (Panel D6 y D14); en el panel E se identificaron dos antígenos de superficie celular CD44 y CD14 (panel E7 y 15); por

último en el cuadrante F se encontraron sobre expresados el ligando endotelial de la selectina-L conocido como GLYCAM1 (F16), la proteína del citoesqueleto conocida como la isoforma fetal atrial de la subunidad ligera de miosina MLC1A (F17) los transcritos relacionados a la familia de las metaloproteinasas, gelatinasa B (Gel B) y la MMP tipo membranal 1 MT1-MMP (panel F 18 y 19) así como otros genes involucrados en la comunicación intercelular, citoesqueleto y motilidad celular, proteasa nexin 1 (PN-1) y los inhibidores de proteasas de serina 2.2 y 2.4 (Panel F20, 21 y 22). Cabe señalar que la mayoría de los genes que encontramos sobre expresados han sido previamente descritos en distintas fases del proceso de tumorigenesis en cáncer del aparato digestivo y otras neoplasias (**Figura 18**).

Figura 18. Algunos genes sobre-expresados en el adenoma FFT1 $-/-$, previamente involucrados en cáncer gástrico en humanos, identificados mediante microarreglos de cDNA.

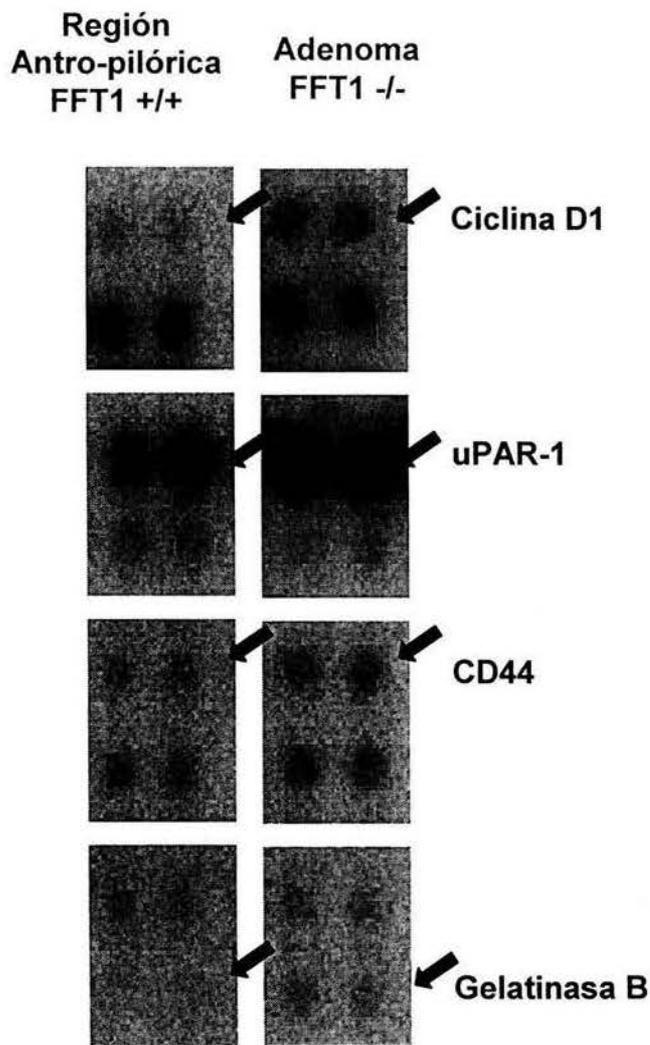


Figura 18. Amplificación de algunos fragmentos de los microarreglos de cDNA hibridados con sondas enriquecidas que corresponden a genes previamente involucrados en el cáncer gástrico. En la columna de la izquierda la expresión en regiones antro-pilóricas normales de los ratones silvestres FFT1 $+/+$ y en la columna derecha su sobre-expresión en adenomas del ratón KO FFT1 $-/-$. Las flechas indican las señales correspondientes al gen en cuestión que se encuentra por duplicado dentro del microarreglo. El resto de las señales se consideran señales controles adyacentes a los genes diferencialmente expresados.

4. Activación de la Respuesta a Proteínas Mal Conformadas (RPMC o UPR del inglés Unfolded Protein Response) en los adenomas antropilóricos.

Aunque la mayoría de los genes que identificamos sobre-regulados en el adenoma mediante microarreglos de cDNA ya han sido estudiados por otros investigadores en relación al cáncer del aparato gastrointestinal, de forma interesante observamos la importante sobre expresión de un grupo de genes que no han sido previamente relacionados con el cáncer gástrico. La activación de GRP78, y Erp72 representa un marcador biológico de lo que se conoce como la respuesta a proteínas mal conformadas (RPMC o UPR del inglés Unfolded Protein Response) (**Figura 19**). El análisis bibliográfico de nuestros resultados demostró que varias de las moléculas que habían sido encontradas sobre-expresadas en el tumor del modelo FFT1 *-/-* también participaban en esta respuesta biológica mediada por el estrés del RE (**tabla 5**). El análisis de bioinformática de los promotores de estos 4 genes reveló la presencia de un elemento de respuesta en común con la secuencia consenso, lo que sugiere una regulación transcripcional estos genes en ausencia del FFT1 (**Figura 20**) (Yoshida, Haze et al. 1998; Ubeda and Habener 2000; Yan, Frank et al. 2002), implicando una relación entre la deficiencia de FFT1 y la UPR. Por ello el siguiente paso fue corroborar la expresión de los 5 genes relacionados a esta respuesta en los tumores antropilóricos FFT1 *-/-* .

Con la finalidad de corroborar la alteración de los genes que participan en la RPMC (**tabla 5**), estudiamos la expresión de GRP78, Erp72, p58IPK, CHOP10 y clusterin usando la técnica de "Northern blot". Para ello el RNA total extraído de los tumores antropilóricos de tres ratones FFT1 *-/-* y de las regiones antro pilóricas

Figura 19. Respuesta a Proteínas Mal Conformadas activada en ausencia del FFT1, detectada mediante microarreglos de cDNA.

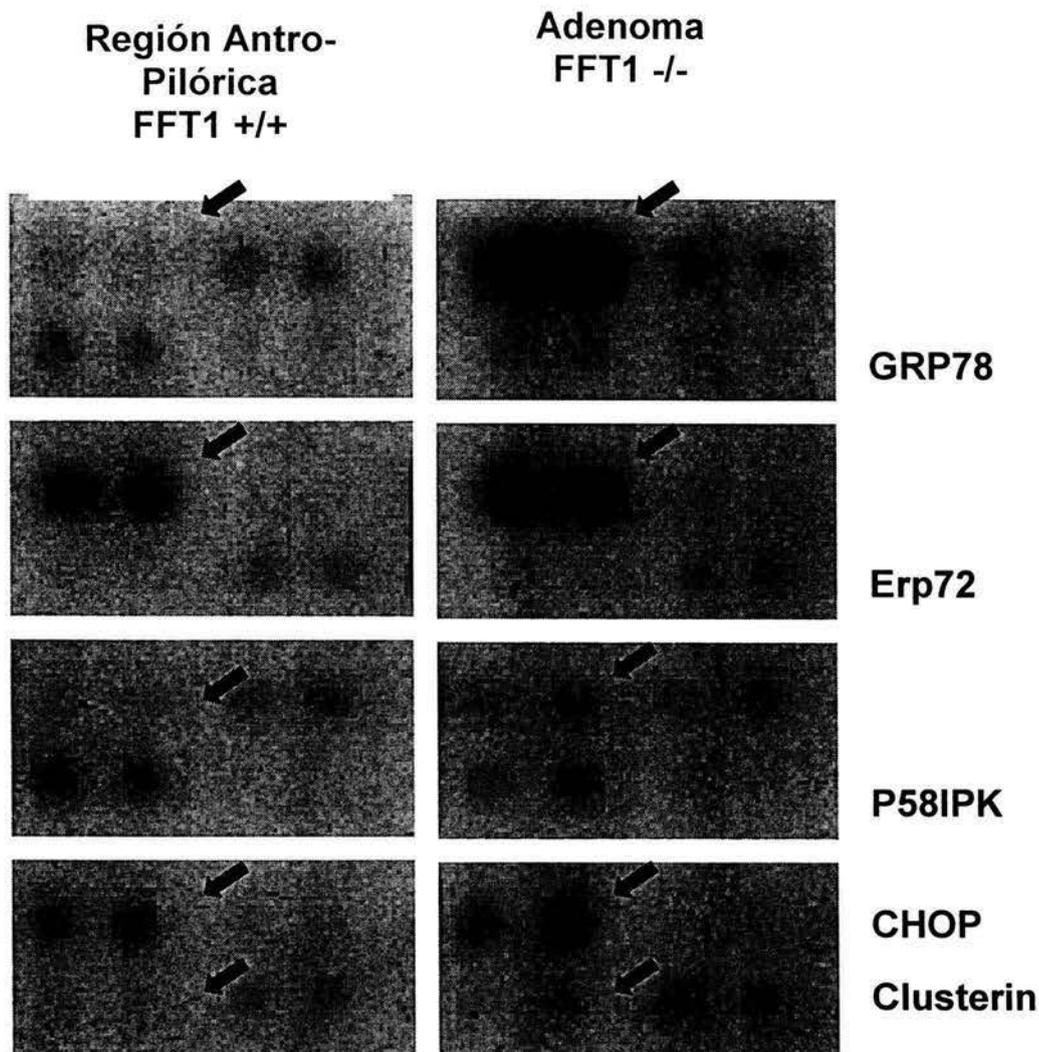


Figura 19. Amplificación de algunos fragmentos de los microarreglos de cDNA hibridados con sondas enriquecidas que corresponden a genes que forman parte de la RPMC. En la columna de la izquierda la expresión en regiones antro-pilóricas normales de los ratones silvestres FFT1+/+ y en la columna derecha su sobre-expresión en adenomas del ratón KO FFT1 -/-. Las flechas indican las señales correspondientes al gen en cuestión que se encuentra por duplicado dentro del microarreglo. El resto de las señales se consideran señales controles adyacentes a los genes diferencialmente expresados.

Tabla 5. Genes inducidos en la Respuesta a Proteínas Mal Conformadas
(RPMC ó UPR: del inglés *Unfolded Protein Response*)

Estímulo	Varios	Varios	Varios	Varios
Elemento respondedor	ERSE	ERSE	ERSE	ERSE
Secuencia consenso	CCAATN9CCACG	CCAATN9CCACG	CCAATN9CCACG	CCAATN9CCACG
Factor de transcripción	ATF6	ATF6	XBP1	XBP1
Gen blanco	GRP-78	Erp72	CHOP-10	P58-IPK
Función	Proteína chaperona	Proteína chaperona	Factor de transcripción	Inhibidor proteínas cinasas PERK y PKR.

Figura 20. La activación de la RPMC en el adenoma del ratón KO FFT1 es inducida de forma transcripcional mediante el elemento de respuesta ERSE.

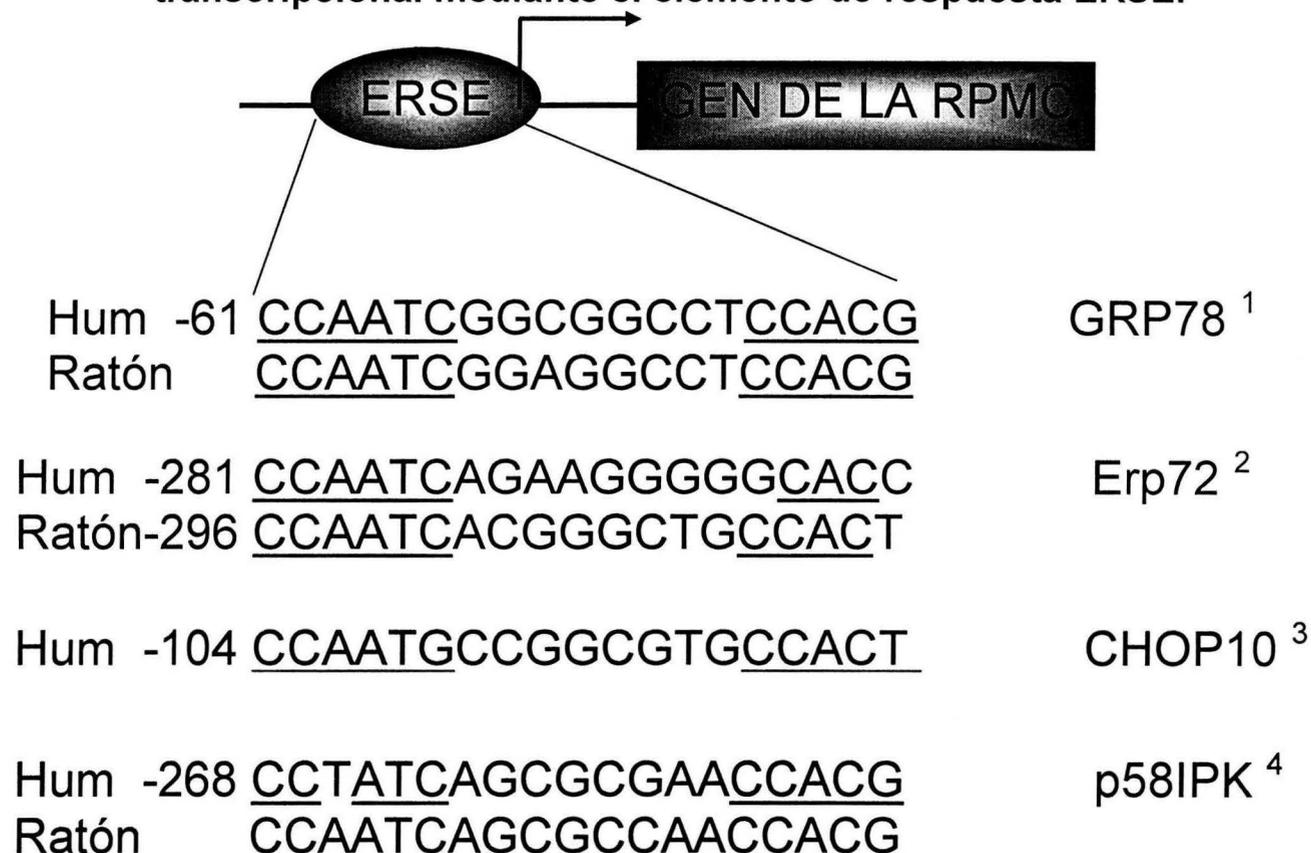


Figura 20. Los genes GRP78, Erp72, CHOP10 y p58IPK contienen un elemento de respuesta al estrés del RE (ERSE) en su promotor. En la figura se observa una alineación de secuencias en las regiones que flanquean el extremo 5' de estos genes en el humano y ratón, que corresponden a la secuencia consenso denominada ERSE. Los nucleótidos conservados se encuentran subrayados.

normales del tres ratones silvestres FFT1 +/+ fue analizado usando sondas específicas correspondientes a los genes mencionados y sintetizadas por amplificación usando la técnica de RT-PCR (ver materiales). Las sondas para FFT1 y GAPDH fueron usadas como controles. Asimismo RNA proveniente del intestino de ratones KO y silvestre fue usado como control.

En primer lugar se estudiaron tumores desarrollados en ratones FFT1 -/- de 8 semanas de edad. Como se esperaba, los cinco genes fueron sobre-expresados en todos los tumores estudiados, pero no en la región antro pilórica normal de los ratones silvestres ni en el intestino de los ratones FFT1 -/- ni en el de los silvestres FFT1 +/+. Esto demostró que la activación de la UPR caracteriza específicamente a los tumores antropilóricos desarrollados en los ratones FFT1 -/- a las 8 semanas de edad (**Figura 21**). Posteriormente, se estudió la expresión de estos cinco genes en tumores de ratones de 1 año de edad. Todos ellos se mantuvieron sobre-expresados en este período. La relación en la expresión diferencial de clusterin entre tejidos normales y tumores fué similar o mayor a la observada a las 8 semanas de edad (**Figura 22**).

Estos resultados confirmaron que la RPMC no es solo un proceso activado de forma transitoria durante el proceso de tumorigenesis sino que representa una característica constante y permanente en los tumores antropilóricos de los ratones knockout FFT1 -/-. Además esto demostró una relación preponderante entre clusterin y tumores avanzados.

Figura 21. Corroboración de la sobre-expresión de miembros de la RPMC en los adenomas antropilóricos del ratón KO FFT1 $-/-$ de 8 semanas de edad mediante Northern blot.

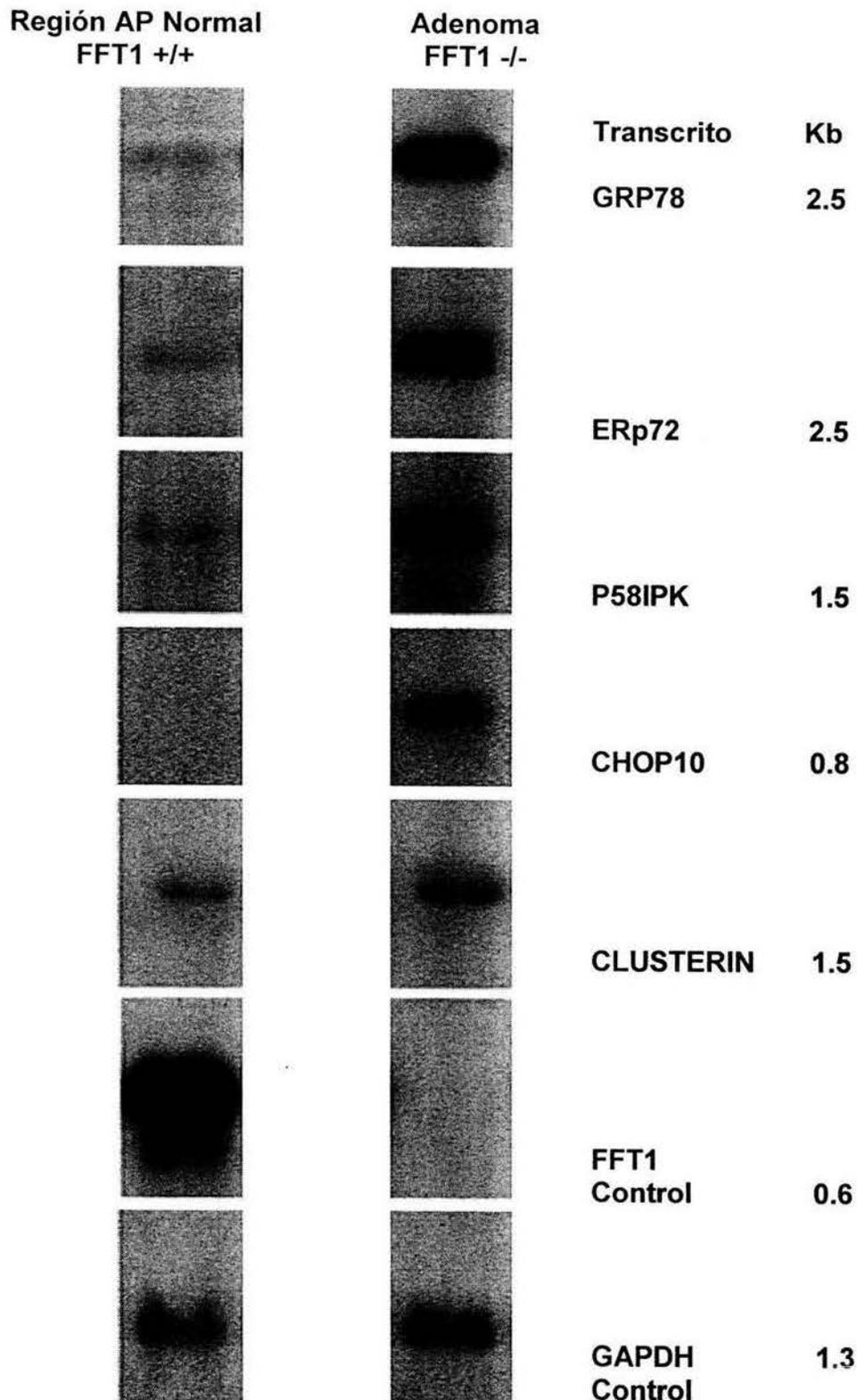


Figura 22. La RPMC es un hallazgo permanente en los adenomas antropilóricos del ratón KO FFT1 $-/-$ de 1 año de edad (Northern blot).

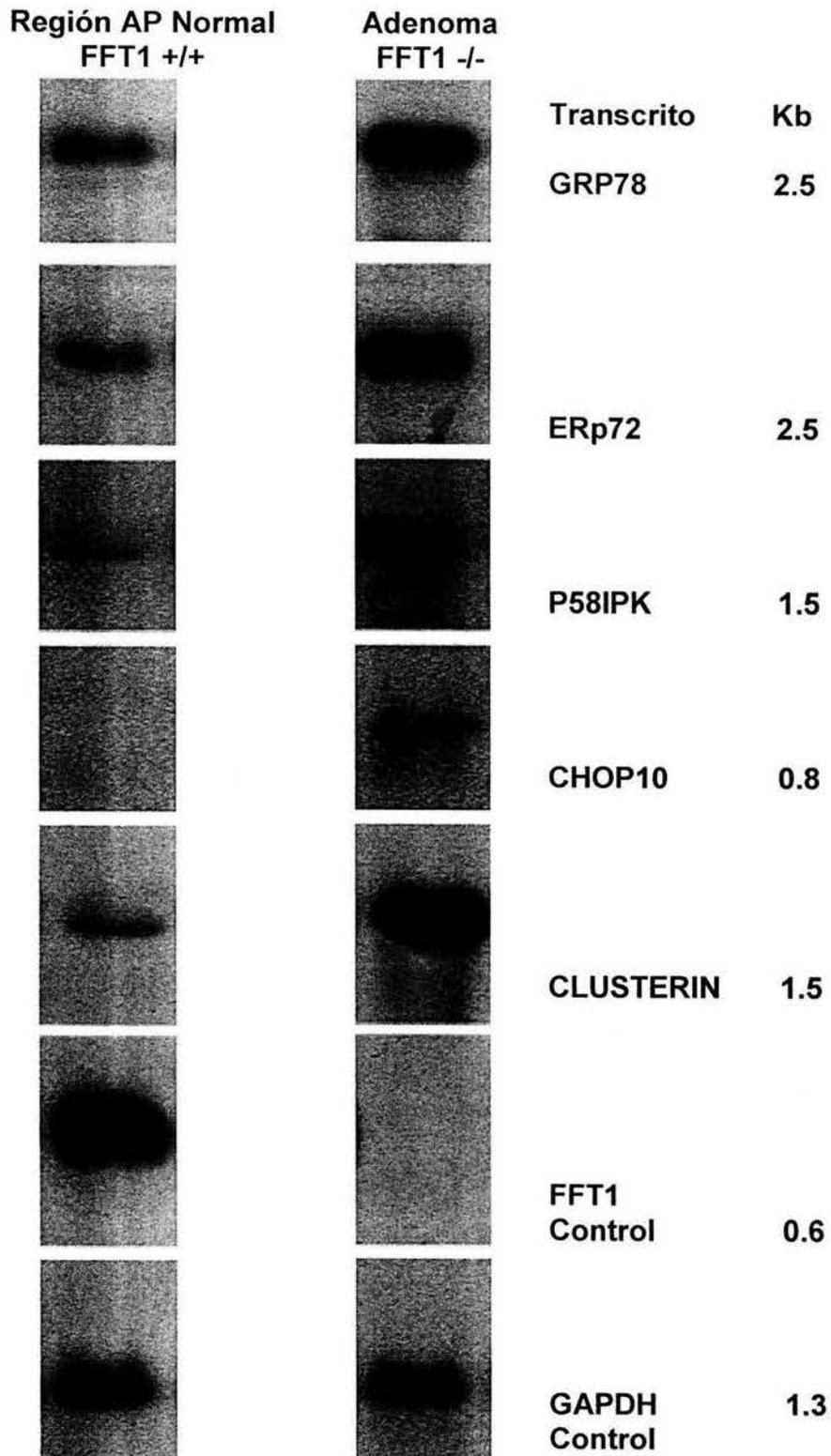


Figura 21. Análisis por “Northern blot” de GRP78, Erp72, p58IPK, CHOP10 y Clusterina. Cada carril contiene 10 µg de RNA total. La columna de la izquierda corresponde al RNA extraído de la región antro-pilórica normal de los ratones silvestres FFT1 +/+ mientras que la columna derecha representa los adenomas de los ratones KO FFT1 -/- de 8 semanas de edad. La hibridación se realizó usando sondas marcadas con P³². La sonda de GAPDH se usó como control positivo interno y la sonda FFT1 como control de la mutación FFT1 -/-. El tamaño del transcrito se indica a la derecha de cada gen.

Figura 22. Análisis por “Northern blot” de GRP78, Erp72, p58IPK, CHOP10 y Clusterina. Cada carril contiene 10 µg de RNA total. La columna de la izquierda corresponde al RNA extraído de la región antro-pilórica normal de los ratones silvestres FFT1 +/+ mientras que la columna derecha representa los adenomas de los ratones KO FFT1 -/- de 1 año de edad. La hibridación se realizó usando sondas marcadas con ³²P. La sonda de GAPDH se usó como control positivo interno y la sonda FFT1 como control de la mutación FFT1 -/-. El tamaño del transcrito se indica a la derecha de cada gen.

5. Alteraciones subcelulares en las células epiteliales del adenoma del modelo KO FFT1-/- asociadas a la activación de la RPMC.

La relación existente entre la RPMC y el FFT1 demostrada por los estudios previos adquirió un interés especial dado que esta respuesta representa un marcador inducido por estrés del retículo endoplásmico (RE). Además esta vía caracteriza algunas patologías conocidas como enfermedades conformacionales las cuales se caracterizan por el acúmulo de material intracelular, específicamente dentro del RE (Carrell and Lomas 1997; Kopito and Ron 2000) . Por otra parte se sabe que el RE es más prominente en tumores derivados de células cuyos precursores histogénicos secretan proteínas de forma abundante (Erlandson 1994).

Como ya se había mencionado el FFT1 participa desde el procesamiento intracelular de las mucinas (en el RE) hasta su estabilización extracelular en el

moco gástrico, interaccionando con las mucinas específicas, Muc2 y Muc5AC , tanto a nivel intracelular co-almacenándose en los mismos gránulos intracelulares en el epitelio gastrointestinal (demostrado por Microscopía electrónica y estudios funcionales de dobles híbridos) como nivel extracelular en la superficie del epitelio en el moco gástrico por inmunohistoquímica (Wright, Poulsom et al. 1993).

Estos hechos nos llevaron a plantear la hipótesis de la existencia de alteraciones del RE en las células epiteliales del tumor antropilórico del ratón FFT1 $-/-$, por lo que se realizó el estudio de estos adenomas a nivel subcelular mediante microscopía electrónica.

El examen por microscopía electrónica de las células epiteliales glandulares de la región antro pilórica del modelo FFT1 silvestre (+/+) mostró los dos tipos de células mucosas normales y sus progenitores; las células pre-fosita y las pre-glandulares, sin ninguna alteración (controles negativos). El examen del antro de los ratones FFT1 $-/-$ reveló la alteración del retículo endoplásmico. Se observó una dilatación de las cisternas del mismo, así como la acumulación de material electrodenso en su lumen en todas las células hiperplásicas del epitelio glandular en el antro pilórico. Esto demostró que la ultraestructura del RE se encontraba alterada en respuesta a la deficiencia de FFT1 como se observa típicamente en la respuesta a proteínas mal conformadas, evento que explica la activación de la RPMC en el adenoma y que sugiere una función intracelular del FFT1 como un probable factor fundamental en el procesamiento intracelular de mucinas (**Figura 23**).

Figura 23. Microscopía electrónica de una célula epitelial del adenoma del KO FFT1-/-.

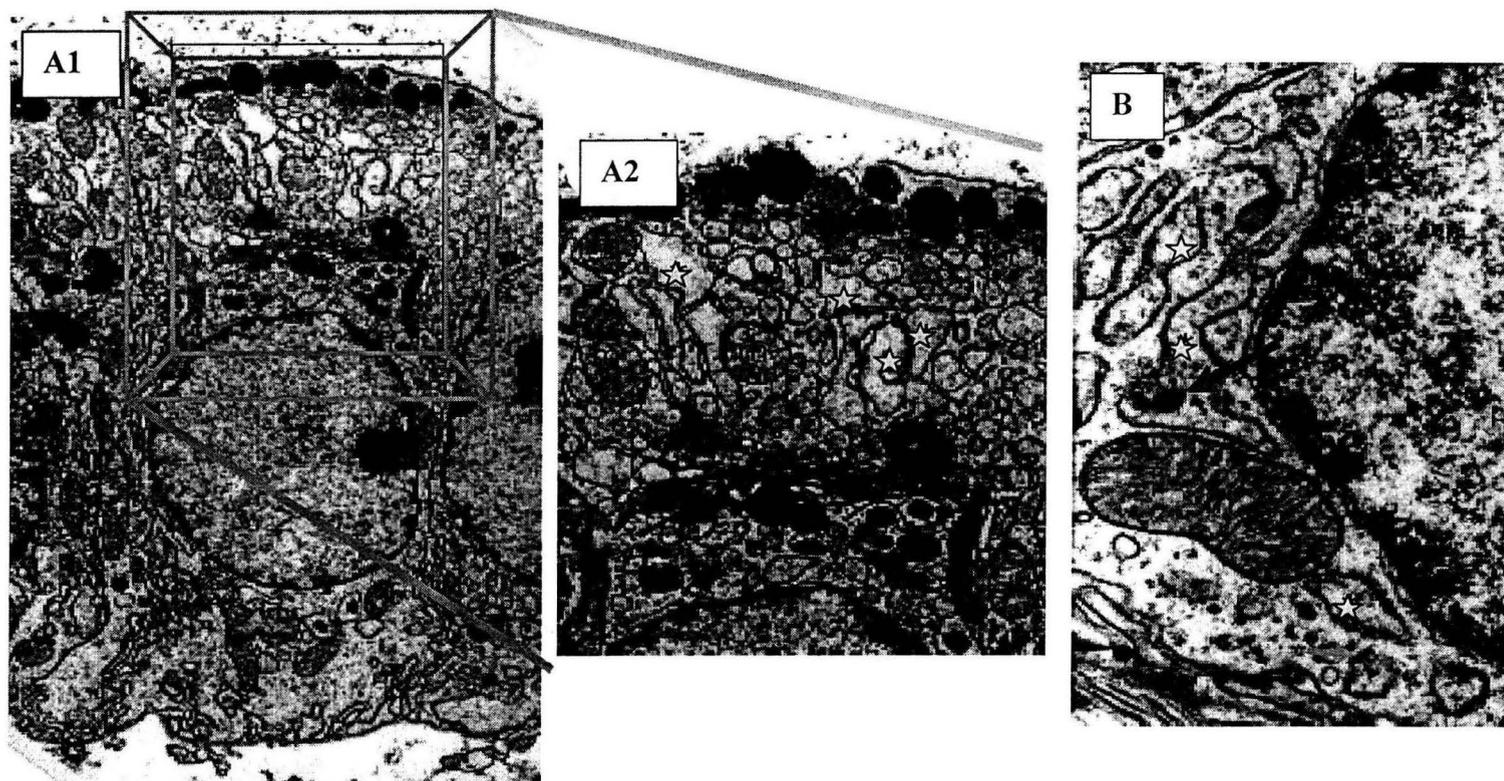


Figura 23. La micrografía electrónica en A1 demuestra una célula pre-fosita en un corte que la muestra desde su base al ápex y unida a dos células vecinas en ambos lados. La célula se caracteriza por un núcleo central eucromático y un aparato de Golgi supranuclear, prominente, productor de gránulos mucosos densos. En la superficie apical se observan algunos gránulos secretores (amplificación X4000). En A2 se ha realizado una magnificación del área señalada por el recuadro en A1 donde se demuestran los detalles del citoplasma. Nótese que entre el Golgi y los gránulos apicales, el citoplasma se encuentra lleno de las cisternas dilatadas del RE (estrellas en amarillo), también se observan algunas mitocondrias dispersas (m) (amplificación X6300). En B un acercamiento de otra célula epitelial muestra la dilatación de cisternas del RE rugoso, observándose algunos ribosomas del RE (flecha verde) y la acumulación de material secretor denso dentro del lumen del RE (flecha roja) (amplificación X16,000).

VI. DISCUSIÓN

La pérdida de la expresión del FFT1 en muestras de cáncer gástrico de humanos, el desarrollo de tumores en los ratones knockout de este gen y los estudios *in vitro* del efecto de la proteína recombinante en células cancerosas demuestran que éste es un gen supresor de tumor.

La finalidad de nuestra investigación fué la de tratar de entender los mecanismos moleculares alterados en ausencia del FFT1 *in vivo*, relacionados a la formación de neoplasias gástricas en el modelo knockout.

En nuestro trabajo decidimos usar microarreglos de cDNA dado que esta técnica nos permitiría determinar las diferencias en los patrones de expresión de cientos de genes entre los adenomas del ratón knockout FFT1 y las regiones antro-pilóricas normales de los ratones silvestres FFT1, de forma simultánea y fidedigna, lo que daría información sobre los eventos moleculares relacionados con el desarrollo de los adenomas como consecuencia de la delección del gen FFT1. Los microarreglos de la casa comercial clontech (<http://www.clontech.com>) llamados cDNA Atlas Mouse Arrays son membranas de nylon en las que aproximadamente 600 diferentes cDNA correspondientes a genes conocidos han sido colocados y ordenados en 6 cuadrantes los cuales agrupan diversas clases funcionales, controles negativos y controles positivos (**Figura 13**). Dentro de las ventajas de estas membranas se encuentra su costo (en comparación a los otros tipos de microarreglos), su flexibilidad ya que pueden contener los genes que la compañía

a pre-establecido o que el investigador requiera, así como también puede variar el número de genes representados por microarreglo y su compatibilidad con laboratorios académicos, ya que no requieren ningún equipo adicional al rutinario para la realización de un "Northern blot".

Nuestro primer experimento consistió en la hibridación de uno de los microarreglos con una sonda total positiva, correspondiente a los genes expresados (transcritos) en los adenomas de los ratones KO FFT1. Otro microarreglo idéntico fué hibridado en forma paralela con una sonda total negativa (control), correspondiente a los transcritos encontrados en las regiones antro-pilóricas normales de los ratones silvestres FFT1 (**Figura 14**). Los dos patrones de expresión fueron revelados con las mismas condiciones resultando patrones muy similares, lo cual esperábamos dado que los tejidos estudiados provenían de ratones con un antecedente genético similar, cuya única diferencia era la presencia o ausencia del gen FFT1. De los casi 100 genes de cada panel solo obtuvimos 10 a 20 señales positivas, tanto en el patrón de los ratones KO como en el de los silvestres, y solo encontramos 7 genes sobre-regulados en los adenomas de los casi 600 estudiados (**Figura 15 y Tabla 3**).

Los estudios de cinética de ácidos nucleicos (Sagerstrom, Sun et al. 1997) han demostrado que una célula determinada expresa aproximadamente 20,000 transcritos diferentes, que representan las 500,000 copias de RNAm que encontramos en una célula y los cuales se categorizan en tres clases según su abundancia, existiendo aproximadamente 10 diferentes transcritos abundantes

(con un promedio de 11,000 copias de cada uno de estos transcritos por cada célula) , 840 diferentes transcritos de abundancia intermedia (con aproximadamente 244 copias de cada transcrito por célula) y 14,200 diferentes RNAm raros, de los cuales solo se encuentra un promedio de 13 copias por célula (Hastie and Bishop 1976). Como ya se ha discutido previamente, una de las desventajas de utilizar técnicas de hibridación molecular como la de microarreglos de cDNA es después de su costo, la de tener una sensibilidad baja de detección de transcritos de abundancia intermedia y rara, teniendo una abundancia relativa detectable de 1/10,000 transcritos (Granjeaud, Bertucci et al. 1999). El resultado previamente expuesto refleja estas últimas aseveraciones, y representan el límite de sensibilidad que tienen los microarreglos cuando son hibridados con sondas totales o complejas. Esto explica el bajo número de genes sobre-expresados que fueron detectados con este primer experimento.

Dado que las diferencias entre las células en cuanto a su comportamiento biológico son el resultado de los genes que se expresan, siendo los de mayor relevancia aquellos de menor abundancia y puesto que la técnica empleada previamente no era capaz de detectar este tipo de mensajeros, decidimos realizar un segundo experimento con mayor sensibilidad utilizando sondas enriquecidas o sustraídas para tratar de detectar variaciones en la expresión de los mensajeros de abundancia intermedia y rara asociados al desarrollo del tumor en los ratones KO FFT1. Lo anterior se realizó por el método de sustracción por hibridación ya comentado en la sección de métodos (**Figura 12**). Debido a que nuestro principal interés era el detectar aquellos mensajeros sobre-expresados en el adenoma,

realizamos una sonda sustraída positiva, la cual se enriqueció en los RNAm intermedios y raros expresados únicamente en el adenoma, al ser sustraídos o absorbidos los RNAm complementarios a los expresados en la región antro-pilórica normal de los ratones silvestres FFT1.

Para tener un control, decidimos realizar una sonda sustraída negativa, la cual se enriqueció en los transcritos intermedios expresados en la región gástrica normal, al ser sustraídos los transcritos de mayor abundancia, también mediante sustracción por hibridación (**Figura 17**).

Ambas sondas enriquecidas, positiva (representando los genes de abundancia intermedia, rara y los no-comunes, siendo estos últimos únicos para el adenoma) y negativa (representando los genes intermedios y raros expresados en las regiones antro-pilóricas normales) fueron hibridadas una vez más a los microarreglos en forma paralela (**Figura 16**), revelando en esta ocasión 50 a 70 señales positivas para cada cuadrante (el cual contenía espacio para 100 señales en total). La comparación de estos patrones demostró la sobre expresión de 22 genes en los adenomas, que incluyeron los 7 genes previamente reportados con el uso de sondas totales (**Ver figura 17 y Tabla 4**). Esto demostró que el uso de sondas enriquecidas es de suma importancia al analizar los patrones de expresión usando microarreglos de cDNA, puesto que mejora la sensibilidad de la técnica, permitiendo la detección de genes diferencialmente expresados, de abundancia limitada, lo que conlleva una mejor definición de los patrones de expresión y un panorama más completo del evento biológico que se es estudiado.

El aumento en la sensibilidad del experimento nos permitió una discriminación adecuada entre las dos poblaciones de RNAm extraídos (adenoma vs. antro-píloro normal). Esto es debido a que la proporción de radioactividad correspondiente a los RNAm raros o de poca abundancia aumenta aproximadamente 10 veces en la sonda enriquecida. Además, la posibilidad de perder la detección de un RNAm raro diferencialmente expresado se reduce puesto que las secuencias abundantes que generalmente se hibridan con mayor facilidad a las secuencias insertadas en un soporte sólido (microarreglo), son removidas. En otras palabras, mediante estos dos factores, las sondas enriquecidas permiten extender el rango de detección de tal forma que RNAm expresados a un nivel de más de 5 moléculas por célula pueden ser detectados (Sagerstrom, Sun et al. 1997) .

Dentro de los 22 genes identificados encontramos aquellos que codifican para proteínas que participan en diversos eventos celulares que contribuyen al desarrollo de una neoplasia (Hanahan and Weinberg 2000), algunos de los cuales específicamente se han visto involucrados en el tracto gastrointestinal . Así pues identificamos la sobre expresión de genes que participan en el balance entre señales de proliferación y apoptosis tales como cíclica D1, PEA-3, BAD y DAD-1 (Pradeep, Sharma et al. 2004),(Witty, Jensen et al. 1998; Li and Lu 2002; Davidson, Goldberg et al. 2003; Feakins, Nickols et al. 2003; Leung, Bai et al. 2004); genes que participan en la remodelación de matriz extracelular en los procesos de migración e invasión tisular como la proteína CD44, las metaloproteinasas Gelatinasa B, MT1-MMP, el receptor uPAR, y algunos

inhibidores de serina proteasas, SPI-2.2, SPI-2.4, y la proteasa Nexin-1 (Buchholz, Biebl et al. 2003) (Herszenyi, Plebani et al. 1995) (Hsieh, Yu et al. 1999) (Lee, Bae et al. 2004) (Noel, Maillard et al. 2004) (Rha, Jeung et al. 2002). También se identificaron genes cuyos productos participan en la reparación de DNA (Rad21) (Atalay, Crook et al. 2002) y otros más cuyas funciones aún no se encuentran bien establecidas (Glycam-1, MLC1A, Nucleobindina, etc.) (de Vos, Hofmann et al. 2003) (Kubota, Miyauchi et al. 1998) (Laumen, Brunner et al. 2004) (Lin, Fischer et al. 2000). Resulta obvio señalar que es necesario ampliar estos resultados obtenidos con la finalidad de establecer su relación con las neoplasias del tracto gastrointestinal, y más específicamente con el FFT1 (**Tabla 4**).

La importante detección de otro grupo de genes, componentes clave de una respuesta celular específica conocida como la respuesta a proteínas mal conformadas (RPMC ó UPR por sus siglas en inglés Unfolded Protein Response; **Tabla 5**) (Kaufman 1999) mereció la realización de nuevos estudios que corroborarán su expresión.

Diversas situaciones que culminan en un estrés celular, en condiciones extracelulares del micro ambiente tales como cambios en el pH, la isquemia o la privación de nutrientes, o condiciones intracelulares como el acúmulo de materiales mal procesados en el RE en las enfermedades conformacionales, son capaces de inducir una respuesta adaptativa de la célula conocida como la respuesta a proteínas mal conformadas (RPMC ó UPR) (Lee 2001).

La RPMC es esencial para mantener la homeostasis celular participando en eventos como la regulación de la secreción de insulina, el estado de diferenciación de una célula con la finalidad de adaptarla a sus reservas de nutrientes o energía, logrando su supervivencia en condiciones precarias o preparándola para la producción de grandes cantidades de productos secretorios como hormonas, anticuerpos o factores de crecimiento (Yuan and Glazer 1998; Kaufman, Scheuner et al. 2002). Sin embargo, muchos aspectos de esta respuesta son citoprotectores, y diversos estudios indican que su activación puede ser crucial en el crecimiento tumoral, aunque hasta el momento no se ha determinado el mecanismo por el cual sucede lo anterior (Ma and Hendershot 2004; Zhang and Kaufman 2004).

Los componentes básicos de esta respuesta son los transductores Ire1, ATF6 y PERK, así como el regulador maestro conocido como BiP/GRP78 (**Figura 24**). El primer transductor identificado fue la proteína transmembranal cinasa/endoribonucleasa Ire1, la cual tiene dos isoformas en los mamíferos: IRE1 α e IRE1 β . El primero se expresa en todas las células del organismo, mientras que el segundo presenta una expresión restringida a las células epiteliales del tracto gastrointestinal. Esta proteína presenta un dominio N terminal censor del estrés del RE dentro del lumen de este organelo, un dominio transmembranal del RE, un dominio de cinasa de residuos de serina/treonina y por último un dominio C terminal con actividad de endoribonucleasa en el citosol. El transductor ATF6 es un factor de transcripción con un dominio N terminal b-ZIP (del inglés basic leucine zipper) en el citosol y un dominio C terminal censor del estrés dentro del RE. Por

último, la proteína cinasa similar a la cinasa del RE activada por RNA de doble cadena, PERK (del inglés double-stranded RNA-activated Protein kinase-like ER Kinase), contiene un dominio censor del estrés del RE dentro del mismo y un dominio citosólico que fosforila la subunidad α del factor 2 iniciador de traducción en eucariontes (eIF2 α). El regulador maestro es la proteína chaperona del RE, GRP78 que en condiciones de no-estrés se une e inactiva a los tres transductores, manteniéndolos dentro del RE (Zhang and Kaufman 2004).

Figura 24. La Respuesta a Proteínas Mal Conformadas I: Transductores

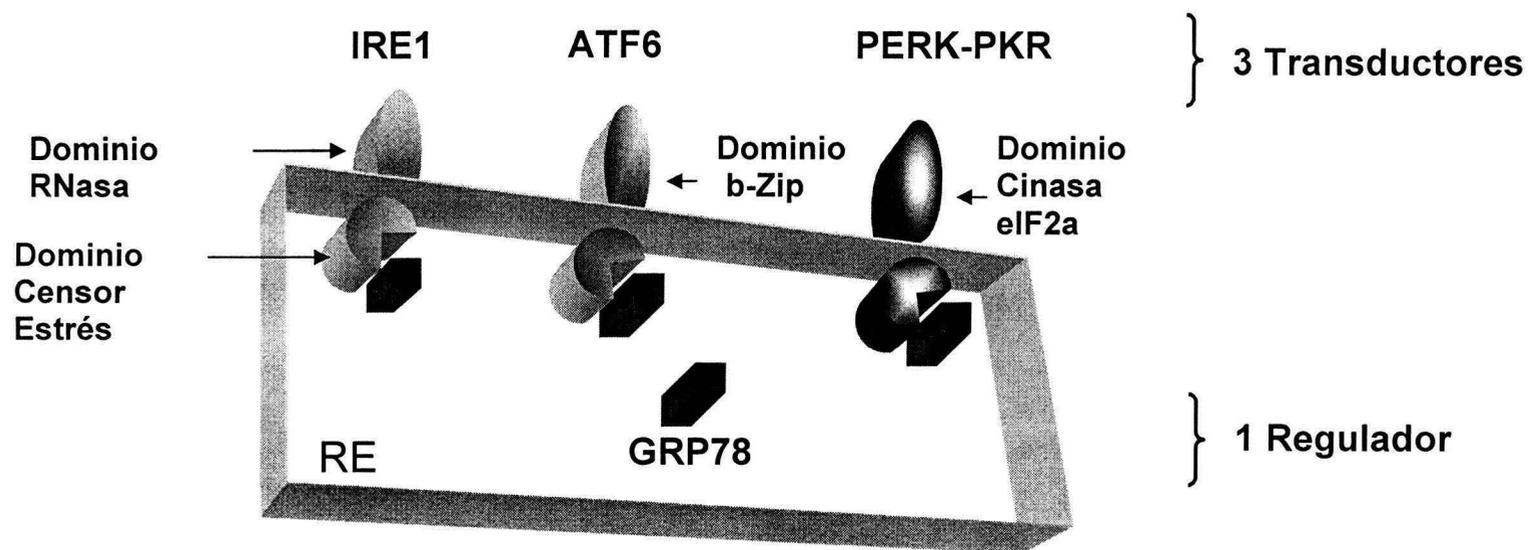


Figura 24. Esquema de los tres transductores de la RPMC y un regulador maestro. Se muestran los dominios estructurales de IRE1, ATF6 y PERK así como sus asociaciones con GRP78.

Ante la acumulación de proteínas mal conformadas en el RE por diversos estímulos que convergen en estrés celular, se activa la RPMC. Esta presenta dos brazos principales.

El primer brazo (**Figura 25**) comienza cuando el acúmulo de proteínas mal conformadas atrae a GRP78, desligándolo de los transductores de la RPMC. Así pues la homo-dimerización y trans-auto fosforilación de IRE1 activa su función de endoribonucleasa, procesando el RNAm del factor de transcripción XBP1, el cual mediante un empalme alternativo remueve un intrón de 26 nt, promoviendo la traducción de un RNAm modificado que codifica para una proteína con un nuevo dominio C terminal que actúa como un potente activador de la transcripción de diversos genes de la RPMC que comparten en su promotor la secuencia consenso conocida como ERSE /del inglés ER Stress response Element) (Yoshida, Haze et al. 1998; Ubeda and Habener 2000; Yan, Frank et al. 2002). Por otra parte, ATF6 responde al acumulo de proteínas mal conformadas transportándose al Golgi donde las proteasas del sitio 1 y 2 (S1P y S2P) lo procesan para generar un fragmento citosólico que contiene el dominio b-ZIP, el cuál migra al núcleo y potencia la función de XBP1 al unirse al ERSE de los genes de la RPMC, situándose en vías paralelas e interactuando con los otros transductores de esta respuesta. Todo lo anterior conlleva a la transcripción de diversas chaperonas y proteínas cuya función trata de mantener la homeostasis del RE.

Figura 25. La Respuesta a Proteínas Mal Conformadas I: 1er brazo

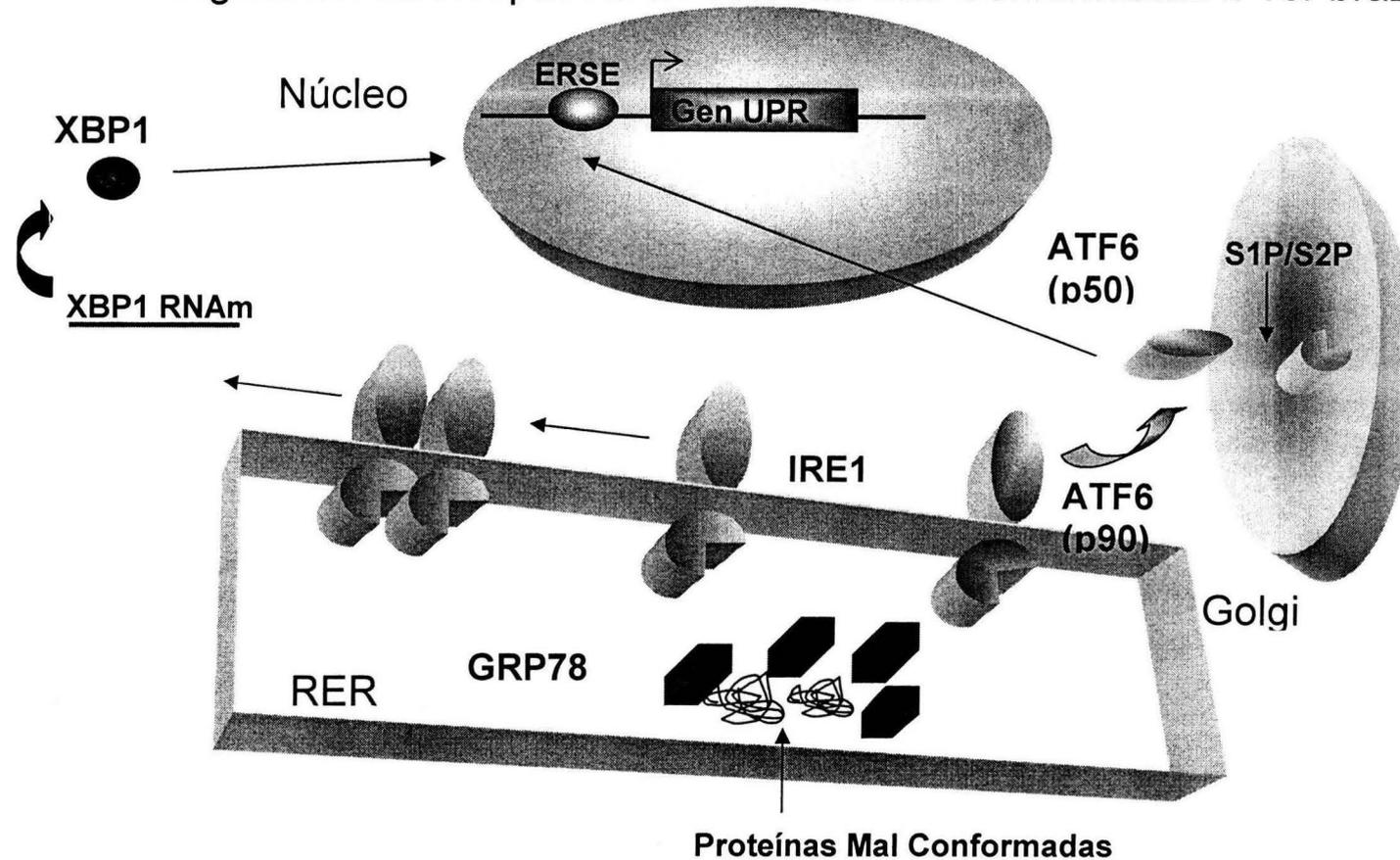


Figura 25. Señalización de la RPMC mediada por IRE1 y ATF6. Durante la acumulación de proteínas mal conformadas en el lumen del RE, la liberación de GRP78 de IRE1 permite su dimerización y la activación de su actividad de cinasa y de RNasa que inicia el empalme alternativo del RNAm de XBP1, el cual codifica para un potente factor de transcripción que se une a la secuencia ERSE de muchos de los genes blanco de la RPMC. Paradójicamente, la liberación de GRP78 de ATF6 permite su transporte al Golgi donde la proteína completa de 90kDa es modificada por las proteasas S1P y S2P para dar un fragmento citosólico de 50kDa que migra al núcleo y perpetúa la activación de genes de la RPMC.

El segundo brazo de la RPMC consiste en la activación de PERK el cual promueve la fosforilación de eIF2 α , la cual promueve a su vez el paro del ciclo celular a través de la inhibición de Ciclina D1 (Brewer, Hendershot et al. 1999; Brewer and Diehl 2000) y además promueve la traducción selectiva del RNAm del ATF4, el cual activa de forma subsecuente la transcripción de diversos genes (**Figura 26**) (Zhang and Kaufman 2004).

El panorama se torna más complejo, dado que existen datos que muestran que durante un proceso determinado, diversos brazos de esta respuesta pueden estar activados de forma independiente, mientras que otros permanecen inhibidos, lo que hace que la interpretación de la activación de la RPMC en el cáncer sea difícil y controvertida (Ma and Hendershot 2004; Zhang and Kaufman 2004).

Figura 26. La Respuesta a Proteínas Mal Conformadas II: 2º brazo

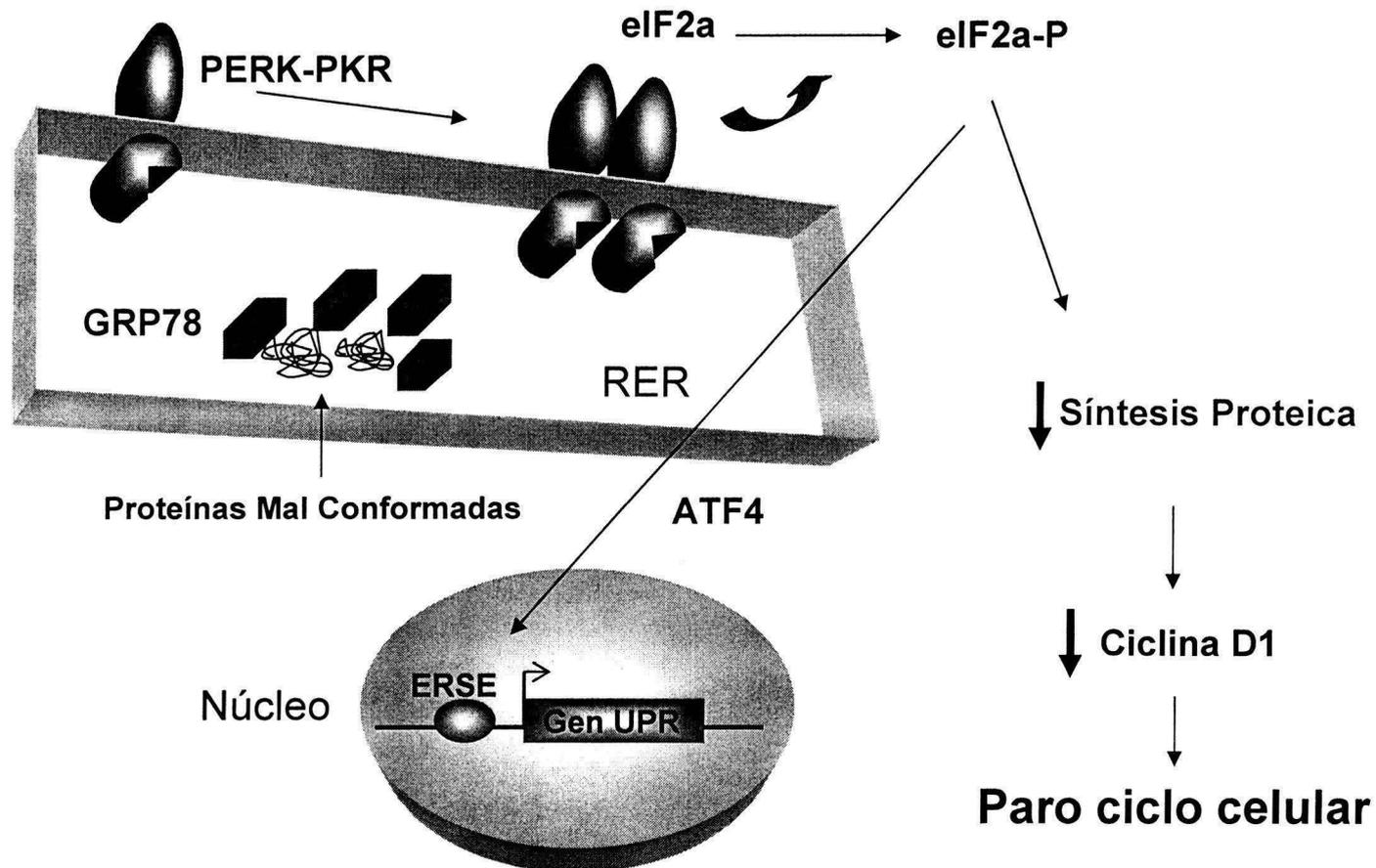


Figura 26. Señalización de la RPMC mediada por PERK. Durante la acumulación de proteínas mal conformadas en el lumen del RE, la liberación de GRP78 de PERK permite su dimerización y activación. PERK fosforila a eIF2 α lo que a su vez produce una disminución en la síntesis de algunas proteínas como ciclina D1, mientras que facilita la de otras como ATF4. La inactivación funcional de la ciclina D1 provoca el paro del ciclo celular que en ocasiones acompaña a la RPMC, mientras que la activación de ATF4 induce la expresión de otros componentes de la RPMC.

El análisis de expresión de microarreglos de cDNA reveló la sobre-expresión de 5 proteínas que protagonizan la RPMC como resultado de la delección del gen FFT1 (**Figura 19 a 22**). Bip/GRP78 es un miembro de la familia de las proteínas chaperonas HSP70, cuya función principal es la de unirse permanentemente a proteínas mal conformados, mal procesadas o mal ensambladas cuya secreción extracelular está bloqueada (Gething and Sambrook 1992). También tiene un papel esencial en el transporte de polipéptidos aberrantes destinados a la degradación por el proteosoma. Además presenta una función anti-apoptótica en condiciones de estrés, protegiendo la célula contra la apoptosis inducida por el estrés del RE formando complejos e inhibiendo las caspasas 7 y 12 (Rao, Peel et al. 2002) en condiciones tales como el crecimiento tumoral (Jamora, Dennert et al. 1996). Erp72 es una proteína disulfur-isomerasa, cuyo objetivo es el de promover el procesamiento adecuado de las proteínas dentro del reticulo endoplásmico de manera secuencial o simultánea con GRP78 formando complejos que catalizan la maduración conformacional de proteínas a secretar. La sobre-expresión de estas dos proteínas constituye el *sine-qua-non* de la RPMC, dado que en el promotor de los genes que codifican estas proteínas se identifica el elemento de respuesta del RE conocido como ERSE (por sus siglas en ingles Endoplasmic Reticulum Stress response Element) el cual es estimulado vía transcripcional de forma paralela ante el estrés del RE. (Parker, Phan et al. 2001; Yoshida, Okada et al. 2001) (**Figura 20**). Un tercer miembro de esta vía de señalización también fue sobre-expresado, p58IPK, proteína co-chaperona de la familia Hsp40, la cual también ha demostrado tener un potencial oncogénico mediante su función anti-apoptótica, protegiendo las células contra la apoptosis inducida por TNF- α y dsRNA (Melville,

Katze et al. 2000), teniendo un doble mecanismo: 1) PKR dependiente, siendo su sobre-expresión un inhibidor de PKR, y PERK, ambas cinasas que interactúan con el factor de traducción eIF2 α el cual normalmente produce la pérdida de ciclina D1, produciendo el paro del ciclo celular que normalmente acompaña la UPR (Brewer and Diehl 2000; Campo, Das et al. 2002). Un segundo mecanismo de oncogénesis sería el que su dominio J interactuara con Hsp70 para que este a su vez inactivara una proteína supresora de tumor ya sea la misma PKR u otro (Melville, Katze et al. 2000). Tanto GRP78/BiP como p58IPK han demostrado poseer un potencial oncogénico de importancia (Barber, Thompson et al. 1994; Jamora, Dennert et al. 1996; Yang, Li et al. 2000). Es importante señalar que el estudio de "Northern blot", tanto de GRP78 como de Erp72 y de p58IPK mostró una sobre-expresión tanto en los tumores antropilóricos de 8 semanas como de 1 año de edad, indicando que la activación de la RPMC no se relaciona al estadio del tumor sino a la deficiencia de FFT1 por sí misma, lo que indica claramente que su activación es un hallazgo permanente en los adenomas de los ratones KO FFT1 (**Figura 21 y 22**).

En el mismo contexto identificamos la sobre-expresión en ausencia del FFT1 de otro de los componentes de la vía apoptótica mediada por el estrés del RE, el gen CHOP, que codifica para una proteína homóloga C/EBP, también conocida como el gen 153 inducido por daño al DNA (GADD153) (Oyadomari and Mori 2004). La expresión de este gen se realiza en forma paralela a la de las chaperonas GRP78 y Erp72 en condiciones de estrés celular (Flores-Diaz, Higueta et al. 2004). (Wang, Lawson et al. 1996) mediante la activación del efector Ire1, el cual es a su vez

activado por el estrés del RE en presencia del acúmulo de proteínas mal conformadas (Wang, Harding et al. 1998). Finalmente, identificamos la sobre-expresión de una proteína de suma importancia, clusterina. Esta es una proteína sintetizada por las células epiteliales de diversos órganos cuya función no se encuentra bien establecida. La expresión de esta proteína también llamada TRPM2 (testosterone, repressed prostate messenger 2) DAG (dimeric acidic glycoprotein), apolipoproteína J o glicoproteína sulfatada 2, se ha correlacionado con la estabilización de proteínas en un estado de plegamiento competente en condiciones de estrés celular, fenómenos de reparación tisular, apoptosis así como durante el desarrollo y progresión de diversos tumores. Recientemente se le ha reconocido como un marcador biológico del cáncer en el aparato gastrointestinal, sobre-expresándose en aquellos tumores intestinales en los ratones KO Min/APC, los cuales muestran al igual que los ratones KO FFT1 fenómenos de hiperplasia epitelial, seguida por el desarrollo de tumores intestinales pobremente diferenciados, los cuales sobre-expresan clusterin, como proteína anti-apoptótica que facilita la supervivencia de las células tumorales; a nivel sub-celular se ha demostrado que la clusterina puede estabilizar el plegamiento de proteínas mal conformadas, de manera similar a las funciones de otras chaperonas con potencial oncogénico como GRP78. Al igual que los otros componentes de la RPMC activos en los adenomas antropilóricos del ratón KO FFT1, la sobre-expresión de CHOP y clusterina es un hallazgo permanente en estos tejidos, lo cual se corroboró mediante "Northern blot" (**Figura 19, 21 y 22**).

Dado que, como ya se ha mencionado, diversas enfermedades en las que se encuentra activada la RPMC se caracterizan por el acúmulo de material dentro del RE, decidimos investigar en un último experimento la existencia de alteraciones intracelulares en las células epiteliales del adenoma.

De acuerdo con lo anterior, el análisis ultraestructural mostró la alteración del RE de las células epiteliales antro pilóricas del ratón KO FFT1, documentando la dilatación de las cisternas del RE con el acúmulo de material electrodensito en su lumen (**Figura 23**). Esto podría explicar a su vez la ausencia de moco gástrico que presentan los ratones KO desde el punto de vista macroscópico. Por otra parte nuestros estudios subrayan la importancia del FFT1 no solo como un factor protector del epitelio gástrico, cuyo mecanismo de acción no es únicamente extracelular, ya que participa de forma directa en el correcto procesamiento intracelular de sus proteínas asociadas, las mucinas. Nuestros estudios apoyan la hipótesis, propuesta anteriormente por otros autores, que atribuye una función de chaperona a FFT1 en la maduración de proteínas como las mucinas.

La implicación clínica de la activación de la RPMC en el adenoma es la pregunta más importante que resulta de nuestros experimentos y que ha sido recientemente discutida por autores como Ma (Ma and Hendershot 2004).

La **figura 27** muestra un modelo hipotético explicativo sobre la activación de la RPMC en el desarrollo del adenoma que caracteriza al modelo KO FFT1/pS2. La ausencia del FFT1 tiene como consecuencia una alteración en el procesamiento

intracelular de las mucinas, que conlleva por un lado al acúmulo de material dentro del RE de las células del epitelio antro-pilórico y por otro a la ausencia del moco gástrico que constituye la primera línea de defensa del epitelio contra los efectos nocivos propiciados por la dieta, los cambios de pH y otras condiciones. Estos estímulos convergen en una situación de estrés celular, específicamente dentro del RE, que activa el brazo transcripcional de la RPMC. La inducción y sobre-expresión de dos de los genes de la RPMC podría desempeñar un papel fundamental en el desarrollo del adenoma antro-pilórico. Tanto GRP78/BiP como p58IPK han demostrado poseer un potencial oncogénico de importancia (Barber, Thompson et al. 1994; Jamora, Dennert et al. 1996; Yang, Li et al. 2000). Al respecto es importante documentar que otros autores han demostrado la sobre-expresión de el brazo transcripcional de esta respuesta mediado por XBP1 y ATF6 en muestras patológicas de carcinomas hepatocelulares, tumores gástricos y adenocarcinomas esofágicos (Song, Park et al. 2001; Chen, Ding et al. 2002; Shuda, Kondoh et al. 2003). Además, la sobre-expresión de este brazo de la RPMC también se ha confirmado en líneas celulares de cáncer gástrico como la MKN28 y MKN74 (Song, Park et al. 2001; Park, Tomida et al. 2004). Otros estudios han demostrado que la activación de esta respuesta puede proteger a las células tumorales de la apoptosis, e indican que GRP78 puede tener un papel fundamental en la progresión tumoral en modelos animales *in vivo* (Jamora, Dennert et al. 1996; Rao, Peel et al. 2002; Park, Tomida et al. 2004; Romero-Ramirez, Cao et al. 2004). Finalmente, dado que la RPMC en células cancerosas puede minar la eficiencia de un agente quimioterapéutico, y sus actores como la proteína antiapoptótica BiP correlacionan con un mayor grado de malignidad,

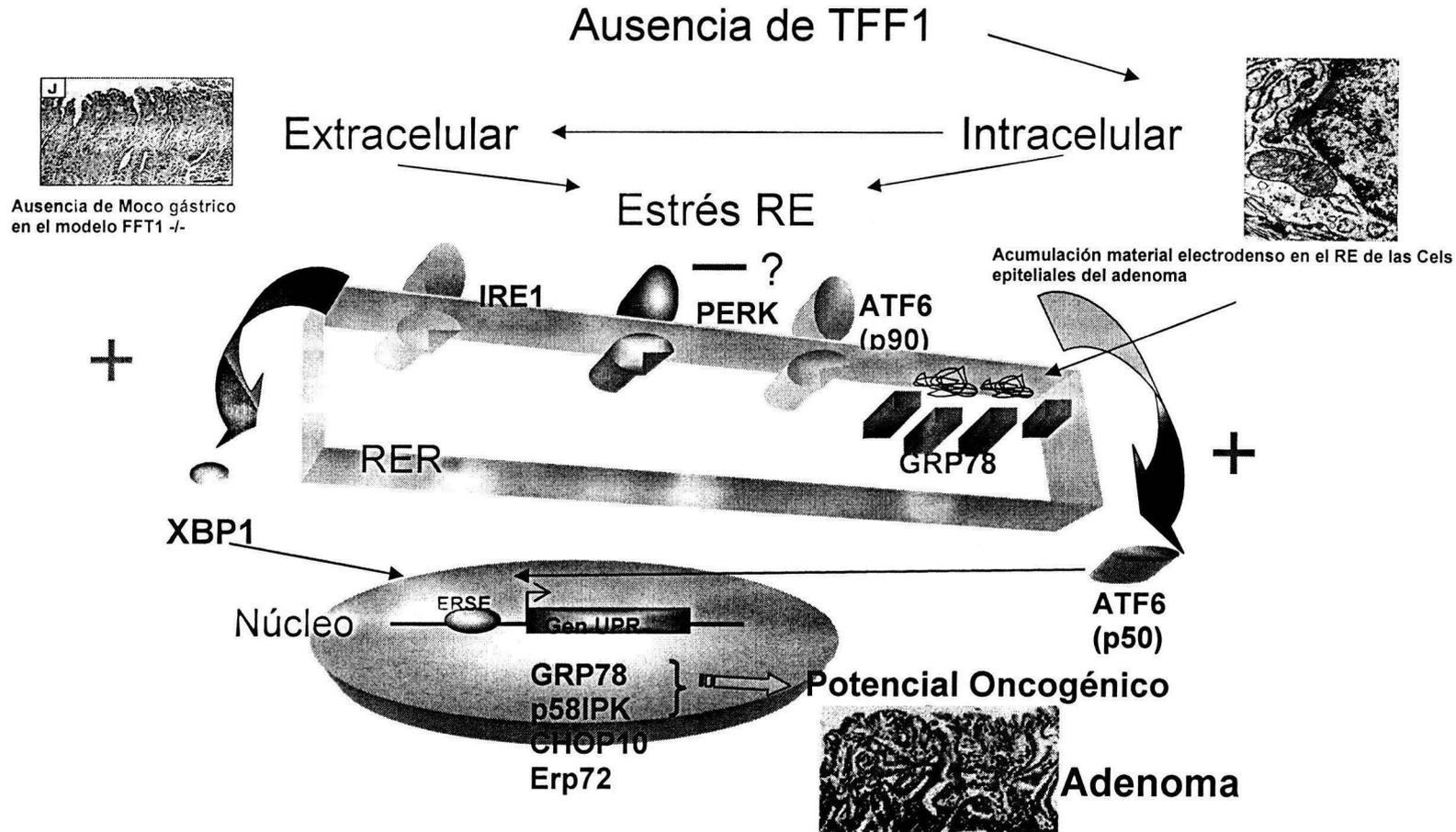
confiriendo resistencia a fármacos como el etopósido u otros (Reddy, Mao et al. 2003). Diversos estudios *in vitro e in vivo* demuestran que la disrupción de la RPMC en los tumores representa un blanco terapéutico eficaz en el tratamiento de enfermedades oncológicas como el mieloma múltiple, adenocarcinomas de la próstata, mama, ovario y estómago, los cuales se originan de células secretoras (Lee, Iwakoshi et al. 2003; Park, Tomida et al. 2004).

En nuestro modelo, hemos encontrado la activación del brazo transcripcional de la RPMC, mediada por XBP1 y ATF6. Sin embargo, no detectamos la evidencia del evento que caracteriza el 2° brazo de esta respuesta mediado por PERK, el paro del ciclo celular por la inactivación de ciclina D1. Cabe señalar que diversos estudios demuestran que un brazo de la RPMC puede activarse independientemente del otro brazo (Gass, Gifford et al. 2002). Además varios investigadores han encontrado una interacción dinámica entre diversos actores de esta respuesta. Así pues se conoce que tanto GRP78 como p58IPK pueden reprimir la actividad y los eventos celulares mediados por PERK (Bertolotti, Zhang et al. 2000; Yan, Frank et al. 2002).

Sin duda alguna se requieren nuevos estudios para dilucidar cuales brazos, actores y/o componentes de la RPMC son clave y en que momento para el desarrollo de diversos tumores en el humano. Dado la actividad independiente de cada brazo de esta respuesta, sus múltiples componentes y sus múltiples acciones, es importante comenzar a investigar el mecanismo por el cual una célula tumoral es capaz de activar específicamente el brazo de la respuesta que le

confiere una mayor supervivencia sin inducir aquellas que limitan su crecimiento o promueven su apoptosis, influenciando los eventos de proliferación/diferenciación/apoptosis en un tejido normal, inclinando la balanza entre proliferación/apoptosis y entre el estado latente y el comportamiento agresivo de una célula tumoral (Ma and Hendershot 2004).

Figura 27. Esquema Hipotético Activación de la RPMC en el desarrollo del adenoma antropilórico TFF1-/-



Este modelo hipotético explica la importancia de la RPMC en el desarrollo del adenoma. En ausencia del FFT1 tanto la acumulación de material dentro del RE como la ausencia de moco gástrico superficial provocan el estrés del RE, activando el primer brazo de la misma, mediado por IRE1 y ATF6, lo que induce la expresión de GRP78, p58IPK y otros genes parte de la RPMC con potencial oncogénico. Nótese que el segundo brazo mediado por PER, que culmina en el paro del ciclo celular, no está activo en el adenoma del ratón KO, puesto que las células epiteliales que lo componen tienen un índice mitótico 10 veces mayor a las células del ratón silvestre. Esto concuerda con las observaciones de otros autores que confirman que un brazo puede activarse de forma independiente al otro. Este esquema representa una hipótesis que merece ser estudiada en un futuro.

VII. CONCLUSIONES

Nuestros hallazgos han relacionado por primera vez a un miembro de la familia de los FFTs con la vía de señalización conocida como la RPMC. Esta cascada de señalización descubierta recientemente, no solo participa en enfermedades conformacionales sino también, como recientemente se ha propuesto, en otras enfermedades que se caracterizan por una alteración en el estado de proliferación/apoptosis/diferenciación de diversas células epiteliales, como el cáncer y su contribución al desarrollo de este tipo de patologías es un nuevo campo de estudio en el futuro. Por otra parte, corroboran la importancia del FFT1 no solo a nivel extracelular sino también abre un nuevo campo de estudio para determinar el papel intracelular que desempeña esta proteína durante el procesamiento intracelular de las mucinas.

VIII. PERSPECTIVAS

Nuestros resultados han generado varias preguntas interesantes que merecen nuestra atención en un futuro:

- 1) ¿Cual es el verdadero significado de la RPMC en el cáncer en general?

- 2) ¿Es posible rescatar el modelo KO del FFT1 al interactuar con los actores de la RPMC? En otras palabras, ¿es posible inhibir el desarrollo de los adenomas en el ratón KO FFT1 si se inhibe farmacológica o genéticamente la RPMC en este modelo (**Figura 28**)?

- 3) ¿Existe una activación de la RPMC en el cáncer gástrico en humanos? ¿En qué tipo? ¿En qué estadio?

- 4) ¿Existe una relación entre el FFT1 y la RPMC en otros tejidos donde se expresan los FFTs tales como conjuntiva, cornea, vías respiratorias y tracto urinario?



IX. BIBLIOGRAFÍA.

Atalay, A., T. Crook, et al. (2002). "Identification of genes induced by BRCA1 in breast cancer cells." Biochem Biophys Res Commun **299**(5): 839-46.

Auffray, C. and F. Rougeon (1980). "Purification of mouse immunoglobulin heavy-chain messenger RNAs from total myeloma tumor RNA." Eur J Biochem **107**(2): 303-14.

Aviv, H. and P. Leder (1972). "Purification of biologically active globin messenger RNA by chromatography on oligothymidylic acid-cellulose." Proc Natl Acad Sci U S A **69**(6): 1408-12.

Axel, R., P. Feigelson, et al. (1976). "Analysis of the complexity and diversity of mRNA from chicken liver and oviduct." Cell **7**(2): 247-54.

Barber, G. N., S. Thompson, et al. (1994). "The 58-kilodalton inhibitor of the interferon-induced double-stranded RNA-activated protein kinase is a tetratricopeptide repeat protein with oncogenic properties." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(10): 4278-82.

Berry, M., A. M. Nunez, et al. (1989). "Estrogen-responsive element of the human pS2 gene is an imperfectly palindromic sequence." Proc Natl Acad Sci U S A **86**(4): 1218-22.

Bertolotti, A., Y. Zhang, et al. (2000). "Dynamic interaction of BiP and ER stress transducers in the unfolded-protein response." Nat Cell Biol **2**(6): 326-32.

Bossenmeyer-Pourie, C., R. Kannan, et al. (2002). "The trefoil factor 1 participates in gastrointestinal cell differentiation by delaying G1-S phase transition and reducing apoptosis." J Cell Biol **157**(5): 761-70.

Bowtell, D. D. (1999). "Options available--from start to finish--for obtaining expression data by microarray." Nat Genet **21**(1 Suppl): 25-32.

Brewer, J. W. and J. A. Diehl (2000). "PERK mediates cell-cycle exit during the mammalian unfolded protein response." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(23): 12625-30.

Brewer, J. W., L. M. Hendershot, et al. (1999). "Mammalian unfolded protein response inhibits cyclin D1 translation and cell-cycle progression." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(15): 8505-10.

Buchholz, M., A. Biebl, et al. (2003). "SERPINE2 (protease nexin I) promotes extracellular matrix production and local invasion of pancreatic tumors in vivo." Cancer Res **63**(16): 4945-51.

- Campo, P. A., S. Das, et al. (2002). "Translational regulation of cyclin D1 by 15-deoxy-delta(12,14)-prostaglandin J(2)." Cell Growth Differ **13**(9): 409-20.
- Carrell, R. W. and D. A. Lomas (1997). "Conformational disease." Lancet **350**(9071): 134-8.
- Carvalho, R., T. Kayademir, et al. (2002). "Loss of heterozygosity and promoter methylation, but not mutation, may underlie loss of TFF1 in gastric carcinoma." Lab Invest **82**(10): 1319-26.
- Chen, X., Y. Ding, et al. (2002). "Overexpression of glucose-regulated protein 94 (Grp94) in esophageal adenocarcinomas of a rat surgical model and humans." Carcinogenesis **23**(1): 123-30.
- Crampton, J., S. Humphries, et al. (1980). "The isolation of cloned cDNA sequences which are differentially expressed in human lymphocytes and fibroblasts." Nucleic Acids Res **8**(24): 6007-17.
- Davidson, B., I. Goldberg, et al. (2003). "PEA3 is the second Ets family transcription factor involved in tumor progression in ovarian carcinoma." Clin Cancer Res **9**(4): 1412-9.
- Davis MM, C. D., Nielsen EA, De- and P. W. Franco AD (1982). The Isolation of B and T Cell Specific Genes. New York, E Vitetta.
- de Vos, S., W. K. Hofmann, et al. (2003). "Gene expression profile of serial samples of transformed B-cell lymphomas." Lab Invest **83**(2): 271-85.
- Debouck, C. and P. N. Goodfellow (1999). "DNA microarrays in drug discovery and development." Nat Genet **21**(1 Suppl): 48-50.
- Duggan, D. J., M. Bittner, et al. (1999). "Expression profiling using cDNA microarrays." Nat Genet **21**(1 Suppl): 10-4.
- Feakins, R. M., C. D. Nickols, et al. (2003). "Abnormal expression of pRb, p16, and cyclin D1 in gastric adenocarcinoma and its lymph node metastases: relationship with pathological features and survival." Hum Pathol **34**(12): 1276-82.
- Flores-Diaz, M., J. C. Higuera, et al. (2004). "A cellular UDP-glucose deficiency causes overexpression of glucose/oxygen-regulated proteins independent of the endoplasmic reticulum stress elements." J Biol Chem **279**(21): 21724-31.
- Fujimoto, J., W. Yasui, et al. (2000). "DNA hypermethylation at the pS2 promoter region is associated with early stage of stomach carcinogenesis." Cancer Lett **149**(1-2): 125-34.

- Gass, J. N., N. M. Gifford, et al. (2002). "Activation of an unfolded protein response during differentiation of antibody-secreting B cells." J Biol Chem **277**(50): 49047-54.
- Gething, M. J. and J. Sambrook (1992). "Protein folding in the cell." Nature **355**(6355): 33-45.
- Gillespie, D. and S. Spiegelman (1965). "A quantitative assay for DNA-RNA hybrids with DNA immobilized on a membrane." J Mol Biol **12**(3): 829-42.
- Granjeaud, S., F. Bertucci, et al. (1999). "Expression profiling: DNA arrays in many guises." Bioessays **21**(9): 781-90.
- Hanahan, D. and R. A. Weinberg (2000). "The hallmarks of cancer." Cell **100**(1): 57-70.
- Hardiman, G. (2004). "Microarray platforms--comparisons and contrasts." Pharmacogenomics **5**(5): 487-502.
- Hastie, N. D. and J. O. Bishop (1976). "The expression of three abundance classes of messenger RNA in mouse tissues." Cell **9**(4 PT 2): 761-74.
- Henry, J. A., M. K. Bennett, et al. (1991). "Expression of the pNR-2/pS2 protein in diverse human epithelial tumours." Br J Cancer **64**(4): 677-82.
- Herszenyi, L., M. Plebani, et al. (1995). "The role of urokinase-type plasminogen activator and its inhibitor PAI-1 in gastric cancer." Acta Physiol Hung **83**(3): 213-21.
- Higashiyama, M., O. Doi, et al. (1994). "Prognostic significance of pS2 protein expression in pulmonary adenocarcinoma." Eur J Cancer **30A**(6): 792-7.
- Hsieh, H. F., J. C. Yu, et al. (1999). "Molecular studies into the role of CD44 variants in metastasis in gastric cancer." Mol Pathol **52**(1): 25-8.
- Huang, D. C., L. A. O'Reilly, et al. (1997). "The anti-apoptosis function of Bcl-2 can be genetically separated from its inhibitory effect on cell cycle entry." Embo J **16**(15): 4628-38.
- Jakowlew, S. B., R. Breathnach, et al. (1984). "Sequence of the pS2 mRNA induced by estrogen in the human breast cancer cell line MCF-7." Nucleic Acids Res **12**(6): 2861-78.
- Jamora, C., G. Dennert, et al. (1996). "Inhibition of tumor progression by suppression of stress protein GRP78/BiP induction in fibrosarcoma B/C10ME." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(15): 7690-4.

- Jeltsch, J. M., M. Roberts, et al. (1987). "Structure of the human oestrogen-responsive gene pS2." Nucleic Acids Res **15**(4): 1401-14.
- Kafatos, F. C., C. W. Jones, et al. (1979). "Determination of nucleic acid sequence homologies and relative concentrations by a dot hybridization procedure." Nucleic Acids Res **7**(6): 1541-52.
- Karam, S. M., C. Tomasetto, et al. (2004). "Trefoil factor 1 is required for the commitment programme of mouse oxyntic epithelial progenitors." Gut **53**(10): 1408-15.
- Kaufman, R. J. (1999). "Stress signaling from the lumen of the endoplasmic reticulum: coordination of gene transcriptional and translational controls." Genes Dev **13**(10): 1211-33.
- Kaufman, R. J., D. Scheuner, et al. (2002). "The unfolded protein response in nutrient sensing and differentiation." Nat Rev Mol Cell Biol **3**(6): 411-21.
- Kopito, R. R. and D. Ron (2000). "Conformational disease." Nat Cell Biol **2**(11): E207-9.
- Kubota, T., M. Miyauchi, et al. (1998). "Upregulation of nucleobindin expression in human-activated lymphocytes and non-Hodgkin's lymphoma." Pathol Int **48**(1): 22-8.
- Laumen, H., C. Brunner, et al. (2004). "Myosin light chain 1 atrial isoform (MLC1A) is expressed in pre-B cells under control of the BOB.1/OBF.1 coactivator." Nucleic Acids Res **32**(4): 1577-83.
- Lee, A. H., N. N. Iwakoshi, et al. (2003). "Proteasome inhibitors disrupt the unfolded protein response in myeloma cells." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(17): 9946-51.
- Lee, A. S. (2001). "The glucose-regulated proteins: stress induction and clinical applications." Trends Biochem Sci **26**(8): 504-10.
- Lee, K. H., S. H. Bae, et al. (2004). "Relationship between urokinase-type plasminogen receptor, interleukin-8 gene expression and clinicopathological features in gastric cancer." Oncology **66**(3): 210-7.
- Lefebvre, O., M. P. Chenard, et al. (1996). "Gastric mucosa abnormalities and tumorigenesis in mice lacking the pS2 trefoil protein." Science **274**(5285): 259-62.
- Lefebvre, O., C. Wolf, et al. (1993). "The mouse one P-domain (pS2) and two P-domain (mSP) genes exhibit distinct patterns of expression." J Cell Biol **122**(1): 191-8.

Lennon, G. G. and H. Lehrach (1991). "Hybridization analyses of arrayed cDNA libraries." Trends Genet **7**(10): 314-7.

Leung, W. K., A. H. Bai, et al. (2004). "Effect of peroxisome proliferator activated receptor gamma ligands on growth and gene expression profiles of gastric cancer cells." Gut **53**(3): 331-8.

Li, Y. and Y. Y. Lu (2002). "Applying a highly specific and reproducible cDNA RDA method to clone garlic up-regulated genes in human gastric cancer cells." World J Gastroenterol **8**(2): 213-6.

Lin, P., T. Fischer, et al. (2000). "Calnuc, an EF-hand Ca(2+) binding protein, specifically interacts with the C-terminal alpha5-helix of G(alpha)i3." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(2): 674-9.

Longman, R. J., J. Douthwaite, et al. (2000). "Coordinated localisation of mucins and trefoil peptides in the ulcer associated cell lineage and the gastrointestinal mucosa." Gut **47**(6): 792-800.

Luqmani, Y., C. Bennett, et al. (1989). "Expression of the pS2 gene in normal, benign and neoplastic human stomach." Int J Cancer **44**(5): 806-12.

Luqmani, Y. A., G. Ryall, et al. (1992). "An immunohistochemical survey of pS2 expression in human epithelial cancers." Int J Cancer **50**(2): 302-4.

Ma, Y. and L. M. Hendershot (2004). "The role of the unfolded protein response in tumour development: friend or foe?" Nat Rev Cancer **4**(12): 966-77.

Machado, J. C., F. Carneiro, et al. (1996). "pS2 protein expression in gastric carcinoma. An immunohistochemical and immunoradiometric study." Eur J Cancer **32A**(9): 1585-90.

Maniatis, T., Fritsch, E.F. and Sambrook, J. (1982). Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor, NY, Cold Spring Harbor Laboratory.

Melville, M. W., M. G. Katze, et al. (2000). "P58IPK, a novel cochaperone containing tetratricopeptide repeats and a J-domain with oncogenic potential." Cell Mol Life Sci **57**(2): 311-22.

Mercado, A. and G. Gamba (1997). "[Molecular biology in medicine. VII. Molecular hybridization]." Rev Invest Clin **49**(1): 75-8.

Muller, W. and F. Borchard (1993). "pS2 protein in gastric carcinoma and normal gastric mucosa: association with clinicopathological parameters and patient survival." J Pathol **171**(4): 263-9.

Noel, A., C. Maillard, et al. (2004). "Membrane associated proteases and their inhibitors in tumour angiogenesis." J Clin Pathol **57**(6): 577-84.

Nunez, A. M., M. Berry, et al. (1989). "The 5' flanking region of the pS2 gene contains a complex enhancer region responsive to oestrogens, epidermal growth factor, a tumour promoter (TPA), the c-Ha-ras oncoprotein and the c-jun protein." Embo J **8**(3): 823-9.

Oyadomari, S. and M. Mori (2004). "Roles of CHOP/GADD153 in endoplasmic reticulum stress." Cell Death Differ **11**(4): 381-9.

Park, H. R., A. Tomida, et al. (2004). "Effect on tumor cells of blocking survival response to glucose deprivation." J Natl Cancer Inst **96**(17): 1300-10.

Park, W. S., R. R. Oh, et al. (2000). "Somatic mutations of the trefoil factor family 1 gene in gastric cancer." Gastroenterology **119**(3): 691-8.

Park, W. S., R. R. Oh, et al. (2000). "Mapping of a new target region of allelic loss at 21q22 in primary gastric cancers." Cancer Lett **159**(1): 15-21.

Parker, R., T. Phan, et al. (2001). "Identification of TFII-I as the endoplasmic reticulum stress response element binding factor ERSF: its autoregulation by stress and interaction with ATF6." Mol Cell Biol **21**(9): 3220-33.

Pennaneach, V., V. Barbier, et al. (2004). "Rb inhibits E2F-1-induced cell death in a LXCXE-dependent manner by active repression." J Biol Chem **279**(22): 23376-83.

Podolsky, D. K., K. Lynch-Devaney, et al. (1993). "Identification of human intestinal trefoil factor. Goblet cell-specific expression of a peptide targeted for apical secretion." J Biol Chem **268**(9): 6694-702.

Pradeep, A., C. Sharma, et al. (2004). "Gastrin-mediated activation of cyclin D1 transcription involves beta-catenin and CREB pathways in gastric cancer cells." Oncogene **23**(20): 3689-99.

Rao, R. V., A. Peel, et al. (2002). "Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program: role of the ER chaperone GRP78." FEBS Lett **514**(2-3): 122-8.

Reddy, R. K., C. Mao, et al. (2003). "Endoplasmic reticulum chaperone protein GRP78 protects cells from apoptosis induced by topoisomerase inhibitors: role of ATP binding site in suppression of caspase-7 activation." J Biol Chem **278**(23): 20915-24.

Rha, S. Y., H. C. Jeung, et al. (2002). "Biological phenotype determination with ex vivo model in gastric cancer for matrix-metalloproteinase inhibitor treatment." Int J Mol Med **10**(3): 251-6.

Ribieras, S., C. Tomasetto, et al. (1998). "The pS2/TFF1 trefoil factor, from basic research to clinical applications." Biochim Biophys Acta **1378**(1): F61-77.

Rio, M. C., J. P. Bellocq, et al. (1988). "Breast cancer-associated pS2 protein: synthesis and secretion by normal stomach mucosa." Science **241**(4866): 705-8.

Rio, M. C., J. P. Bellocq, et al. (1987). "Specific expression of the pS2 gene in subclasses of breast cancers in comparison with expression of the estrogen and progesterone receptors and the oncogene ERBB2." Proc Natl Acad Sci U S A **84**(24): 9243-7.

Rio, M. C. and P. Chambon (1990). "The pS2 gene, mRNA, and protein: a potential marker for human breast cancer." Cancer Cells **2**(8-9): 269-74.

Rio, M. C., P. Lepage, et al. (1988). "[Primary structure of human protein pS2]." C R Acad Sci III **307**(19): 825-31.

Romero-Ramirez, L., H. Cao, et al. (2004). "XBP1 is essential for survival under hypoxic conditions and is required for tumor growth." Cancer Res **64**(17): 5943-7.

Sagerstrom, C. G., B. I. Sun, et al. (1997). "Subtractive cloning: past, present, and future." Annu Rev Biochem **66**: 751-83.

Schoenfeld, A. R., T. Parris, et al. (2000). "The von Hippel-Lindau tumor suppressor gene protects cells from UV-mediated apoptosis." Oncogene **19**(51): 5851-7.

Seib, T., N. Blin, et al. (1997). "The three human trefoil genes TFF1, TFF2, and TFF3 are located within a region of 55 kb on chromosome 21q22.3." Genomics **40**(1): 200-2.

Shuda, M., N. Kondoh, et al. (2003). "Activation of the ATF6, XBP1 and grp78 genes in human hepatocellular carcinoma: a possible involvement of the ER stress pathway in hepatocarcinogenesis." J Hepatol **38**(5): 605-14.

Song, M. S., Y. K. Park, et al. (2001). "Induction of glucose-regulated protein 78 by chronic hypoxia in human gastric tumor cells through a protein kinase C-epsilon/ERK/AP-1 signaling cascade." Cancer Res **61**(22): 8322-30.

Southern, E. M. (1975). "Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis." J Mol Biol **98**(3): 503-17.

Suemori, S., K. Lynch-Devaney, et al. (1991). "Identification and characterization of rat intestinal trefoil factor: tissue- and cell-specific member of the trefoil protein family." Proc Natl Acad Sci U S A **88**(24): 11017-21.

Takahashi, H., N. Kida, et al. (1990). "Expression of the pS2 gene in human gastric cancer cells derived from poorly differentiated adenocarcinoma." FEBS Lett **261**(2): 283-6.

Theisinger, B., C. Welter, et al. (1991). "Expression of the breast cancer associated gene pS2 and the pancreatic spasmolytic polypeptide gene (hSP) in diffuse type of stomach carcinoma." Eur J Cancer **27**(6): 770-3.

Tomasetto, C., R. Masson, et al. (2000). "pS2/TFF1 interacts directly with the VWFC cysteine-rich domains of mucins." Gastroenterology **118**(1): 70-80.

Tomasetto, C., M. C. Rio, et al. (1990). "hSP, the domain-duplicated homolog of pS2 protein, is co-expressed with pS2 in stomach but not in breast carcinoma." Embo J **9**(2): 407-14.

Ubeda, M. and J. F. Habener (2000). "CHOP gene expression in response to endoplasmic-reticular stress requires NFY interaction with different domains of a conserved DNA-binding element." Nucleic Acids Res **28**(24): 4987-97.

Wang, X. Z., H. P. Harding, et al. (1998). "Cloning of mammalian Ire1 reveals diversity in the ER stress responses." Embo J **17**(19): 5708-17.

Wang, X. Z., B. Lawson, et al. (1996). "Signals from the stressed endoplasmic reticulum induce C/EBP-homologous protein (CHOP/GADD153)." Mol Cell Biol **16**(8): 4273-80.

Witty, J. P., R. A. Jensen, et al. (1998). "Expression and localization of Bcl-2 related proteins in human ovarian cancers." Anticancer Res **18**(2B): 1223-30.

Wright, N. A., R. Poulsom, et al. (1993). "Trefoil peptide gene expression in gastrointestinal epithelial cells in inflammatory bowel disease." Gastroenterology **104**(1): 12-20.

Yan, W., C. L. Frank, et al. (2002). "Control of PERK eIF2alpha kinase activity by the endoplasmic reticulum stress-induced molecular chaperone P58IPK." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(25): 15920-5.

Yang, G. H., S. Li, et al. (2000). "Down-regulation of the endoplasmic reticulum chaperone GRP78/BiP by vomitoxin (Deoxynivalenol)." Toxicol Appl Pharmacol **162**(3): 207-17.

Yang, Y., G. D. Chisholm, et al. (1992). "The distribution of PSA, cathepsin-D, and pS2 in BPH and cancer of the prostate." Prostate **21**(3): 201-8.

Yoshida, H., K. Haze, et al. (1998). "Identification of the cis-acting endoplasmic reticulum stress response element responsible for transcriptional induction of mammalian glucose-regulated proteins. Involvement of basic leucine zipper transcription factors." J Biol Chem **273**(50): 33741-9.

Yoshida, H., T. Okada, et al. (2001). "Endoplasmic reticulum stress-induced formation of transcription factor complex ERSF including NF-Y (CBF) and activating transcription factors 6alpha and 6beta that activates the mammalian unfolded protein response." Mol Cell Biol **21**(4): 1239-48.

Yuan, J. and P. M. Glazer (1998). "Mutagenesis induced by the tumor microenvironment." Mutat Res **400**(1-2): 439-46.

Zhang, K. and R. J. Kaufman (2004). "Signaling the unfolded protein response from the endoplasmic reticulum." J Biol Chem **279**(25): 25935-8.