



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

ESTUDIO DEL PAPEL DE LA PROTEÍNA P32 (GC1QR) EN EL
MANTENIMIENTO DEL FENOTIPO MALIGNO DE CÁNCER DE COLON.

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA:

Biól. Sara Ruth Albarrán Gutiérrez

TUTOR PRINCIPAL:

Dra. Martha Robles Flores
[Facultad de Medicina](#)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:

Dr. Ángel Alfonso Zarain Herzberg
[Facultad de Medicina](#)

Dr. Ignacio Camacho Arroyo
[Facultad de Química](#)

MÉXICO, D. F. FEBRERO, 2014



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.

Dedicatoria

A Valentín

*Nuestras almas lo sé,
van unidas por la eternidad,
no preguntes por qué...*

(Alianza)

A mis padres

Los únicos que saben soportar mis travesuras



**ESTUDIO DEL PAPEL DE LA PROTEÍNA P32 (GC1QR) EN EL MANTENIMIENTO DEL FENOTIPO
MALIGNO DE CÁNCER DE COLON.**

RECONOCIMIENTOS

Esta tesis de maestría se realizó bajo la dirección de la Dra. Martha Robles Flores, del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina, de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Se reconoce y agradece, la ayuda y asesoría técnica de la Dra. María Cristina Castañeda Patlán.

También se reconoce la asesoría técnica de la M. en C. Paula Santoyo Ramos y de la M. en C. Lucía Flores Peredo.

Se agradece al Comité Tutoral, que asesoró el desarrollo de esta tesis y enriquecieron con sus comentarios el contenido del proyecto y mi formación académica, el cual estuvo formado por:

Dr. Ángel Alfonso Zarain Herzberg	Facultad de Medicina
Dr. Ignacio Camacho Arroyo	Facultad de Química

Agradezco también, por su exhaustiva revisión, comentarios y correcciones del presente manuscrito al Jurado de Examen de Maestría conformado por:

Dra. Mahara Angélica Valverde Ramírez	Instituto de Investigaciones Biomédicas
Dr. Christopher David Wood	Instituto de Biotecnología
Dra. Marcela Lizano Soberón	Instituto de Investigaciones Biomédicas
Dra. Marina Macías Silva	Instituto de Fisiología Celular
Dr. Alejandro Zentella Dehesa	Instituto de Investigaciones Biomédicas

El proyecto recibió el apoyo de DGAPA-UNAM (IN226111) y CONACYT (CB2011-151731)

Durante los estudios de maestría goce de una beca otorgada por CONACYT.

AGRADECIMIENTOS

Primeramente a la Universidad Nacional Autónoma de México, la cual ha sido mi hogar desde hace 7 años, y donde he pasado los mejores momentos de mi vida.

A la Dra. Martha Robles, por permitirme haber sido parte de su laboratorio, quién gracias a su continuo interés, entusiasmo, apoyo y ejemplo de vida, enriquecieron en gran medida mi formación académica y personal.

A la Dra. Cristina (Cris), por brindarme su apoyo en todo momento, por sus consejos técnicos y sobre todo por su calidez humana.

A mis compañeros y amigos de lab: Rafa, Jorge, Lucy, Paula, Dora y Gabby, por su ayuda y apoyo académico, por brindarme su amistad y por todos esos buenos momentos que pasamos (con y sin alcohol). -Me la pase increíble con ustedes, gracias.

A mis padres, que me han apoyado siempre. -Papá, gracias por tus consejos, ejemplo y amor. Mamá eres mi ejemplo a seguir de esfuerzo y ternura.

A mi hermana por su apoyo incondicional y simplemente por ser quién es (la mejor).

Finalmente a Valentín, quién estuvo a mi lado durante este largo tiempo y tuvo la paciencia suficiente para soportarme durante los periodos de tutorales.

Índice

ABREVIATURAS	4
RESUMEN	5
1. INTRODUCCIÓN	6
1.1. Cáncer de colon	6
1.2. Proteína p32/gC1qR / HABP1.....	7
1.2.1. Estructura de la proteína	7
1.2.2. Localización celular y proteínas de unión a p32	9
1.2.3. Roles de p32 y sus implicaciones en cáncer	10
1.3. Efecto Warburg	11
2. ANTECEDENTES	13
3. JUSTIFICACIÓN	13
4. HIPÓTESIS	13
5. OBJETIVOS	14
5.1. Objetivo general	14
5.2. Objetivos específicos	14
6. MATERIALES Y MÉTODOS	15
6.1. Material biológico y cultivo celular	15
6.2. Western Blot	15
6.3. Análisis para ver la expresión de p32 por Citometría de Flujo	16
6.4. Selección de clones.....	16
6.5. Detección de Lactato en cultivo celular	17
6.6. Ensayo de <i>Wound Healing</i>	18
6.7. Ensayo de MTT para medir viabilidad	18
6.8. Ensayo de Proliferación con el compuesto CSFE	19
6.9. Extracción de RNA.....	20
6.10. Microarreglos y Análisis	20
6.11. RT-PCR.....	21
6.12. Xenotransplantes de células en ratones inmunocomprometidos para determinar la capacidad tumorigénica.	22

7. RESULTADOS	23
7.1. Expresión de p32 en líneas celulares	23
7.2. Relación entre p32 y el efecto Warburg	26
7.3. Efecto de p32 en la migración celular	27
7.4. Relación de p32 en la viabilidad y proliferación de las células	29
7.5. Efecto de p32 en la expresión génica	32
7.6. Efecto de p32 en la capacidad tumorigénica	36
8. DISCUSIÓN	39
9. CONCLUSIONES	45
10. PERSPECTIVAS	46
11. REFERENCIAS	47
12. ANEXOS	51

ABREVIATURAS

P32	Proteína p32
gC1qR	Receptor para las cabezas globulares del componente C1q del complemento
HABP1	Proteína de unión a ácido hialurónico 1
RNAm	Ácido ribonucleico mensajero
shRNA	Horquillas pequeñas de RNA (short hairpin RNAs)
Kd p32	<i>Knockdown</i> estable para la proteína p32
BrDU	Bromodesoxiuridina
MTT	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol
CSFE	éster de carboxifluoresceína diacetato succinimidil
LDH	lactato deshidrogenasa
RT-PCR	Reacción de la Cadena de Polimerasa en Transcripción Reversa

RESUMEN

p32 (gC1qR) es una proteína ubicua y altamente conservada evolutivamente que interacciona con varias proteínas celulares y virales y se localiza en citoplasma, mitocondria y núcleo. Su función precisa se desconoce, pero por su asociación con otras proteínas se le ha involucrado en diversos procesos biológicos. En el caso específico de cáncer, los datos acumulados hasta el momento, indican que p32 se sobreexpresa en células cancerosas y contribuye al fenotipo maligno. Sin embargo, su papel específico en cáncer aún no es claro.

En este estudio, reportamos que en las líneas celulares de cáncer de colon RKO y SW480, la proteína p32 se encuentra sobre-expresada, en comparación con la línea celular no cancerosa de colon 112CoN. Se analizaron los efectos del bloqueo estable de la expresión de p32 mediante siRNA en diferentes parámetros del fenotipo maligno. La eficiencia del knockdown se comprobó por citofluorometría, Western blot y por RT-PCR.

Los resultados demostraron que el bloqueo de la expresión de p32 en nuestro modelo de estudio de colon (líneas celulares RKO y SW480), no tiene efecto en el metabolismo canceroso, ya que no se detectaron cambios en cuanto a la producción de lactato de las células analizadas. Tampoco se encontraron diferencias en cuanto a la inducción de proliferación, entre las células con el *knockdown* de p32 y las células control.

Sin embargo, sí se encontraron diferencias en cuanto a la capacidad de migración; siendo evidente que p32 juega un papel importante en este proceso, ya que el bloqueo de su expresión disminuye la capacidad de migración de las células.

Asimismo, el análisis de microarreglos, indicó que el bloqueo de la expresión de p32 modifica la expresión de 8 genes asociados a cáncer; de los cuales HAS2, una proteína altamente asociada al fenotipo maligno, disminuyó en gran medida su expresión

Finalmente concluimos que p32 es una proteína directamente implicada en la formación de los tumores, ya que en experimentos de xenotransplantes, hubo una disminución significativa en el crecimiento del tumor cuando las células inyectadas tenían bloqueada la expresión de p32 en las células RKO.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Cáncer de colon

El epitelio intestinal constituye una barrera entre el cuerpo y el exterior, el cual consiste de una sola capa de células epiteliales organizadas en una estructura bidimensional, plegada en valles (criptas) y crestas (vellosidades) (Figura 1); el cual tiene la función de absorber líquido y electrolitos resultantes de los alimentos.

Este epitelio y en particular el de colon, se caracteriza por una alta tasa de renovación a partir de células troncales localizadas en la base de las criptas (Figura 1), haciéndolo susceptible a transformación maligna [1], ya que aumenta la probabilidad de mutaciones en genes responsables de la tumorigénesis como oncogenes, genes supresores de tumores y genes implicados en la reparación del DNA [2]. Así, la homeostasis de este epitelio depende del balance preciso entre proliferación celular, diferenciación y apoptosis. La evidencia experimental ha demostrado que la ruta de señalización “Wnt” juega un papel esencial en esta homeostasis y se ha encontrado que en la mayoría de los casos de cáncer de colon se presentan mutaciones en proteínas que forman parte de esta vía [1], generalmente en la proteína supresora tumoral APC (Adenomatous Polyposis coli).

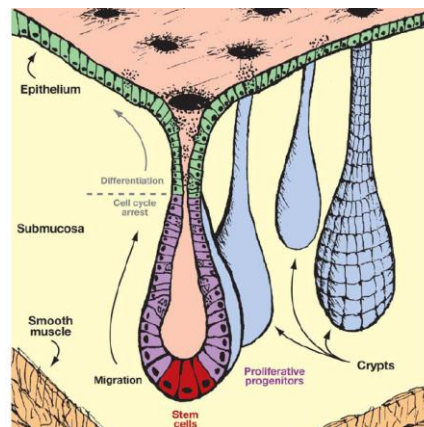


Figura 1. Estructura del epitelio de colon. Las células troncales residen en el fondo de la cripta y células progenitoras son amplificadas constantemente por divisiones a lo largo de tres cuartos de la cripta. Tomado de Sancho et al., 2004 [3].

Se sabe que en la mayoría de los casos de cáncer, la expresión de muchas proteínas se encuentra desregulada. Recientemente se ha identificado a una proteína denominada p32, la cual se encuentra sobre-expresada en muchos tipos de cáncer, incluyendo colon [4].

1.2. Proteína p32/gC1qR / HABP1

La proteína P32 (gC1qR o HABP1) se encuentra distribuida en toda la célula y es una proteína altamente conservada en la escala evolutiva, desde hongos hasta mamíferos [5]. Ésta proteína se ha asociado a diversos procesos como: inflamación, apoptosis, fosforilación oxidativa, infección y cáncer [6], sin embargo su papel principal en la célula aún se desconoce.

La proteína p32 se aisló originalmente en 1991 como un componente del factor nuclear de *splicing* SF2/ASF [7]; debido a que esta proteína migraba aproximadamente a 32 kDa en geles SDS-PAGE, se le denominó p32. En ese mismo año, se reportó una proteína capaz de unir ácido hialurónico, y se le denominó HABP1 (hyaluronic acid binding protein-1), ésta mostró identidad completa con la proteína p32 [8]. Posteriormente, se reportó como la forma madura previamente descrita de gC1qR correspondiente al receptor para las cabezas globulares del componente C1q del complemento, por lo que también se le nombró gC1qR o C1QBP [9].

1.2.1. Estructura de la proteína

El gen que codifica para la proteína p32 tiene localización cromosómica 17p13.3. El gen incluye 6055 pb, que comprende 6 exones y 5 intrones, así como una señal poli (A) a 369 pb del codón de paro [10].

El marco de lectura de la proteína p32 codifica para una pro-proteína de 282 residuos aminoácidos, que después de un corte post-traducciona l de los primeros 73 residuos, forman la proteína madura de 209 residuos. Dentro de los 73 residuos que son cortados, 13 de ellos pertenecen a una secuencia de localización mitocondrial. La proteína madura tiene un pI de 4.5, lo que indica su naturaleza ácida, y tiene un peso de 23.7 kDa, pero migra durante electroforesis desnaturalizante (SDS-PAGE) a 32kDa debido a su alta cantidad de aminoácidos polares ácidos [11].

El análisis de la estructura cristalográfica indica que p32 se asocia formando un homotrímero con estructura cuaternaria tipo “dona” (figura 2a), donde cada uno de sus monómeros están formados de 7 cadenas- β consecutivas y antiparalelas, flanqueadas por α -hélices, una N-terminal y dos C-terminales (Figura 2b). Se ha reportado que la interacción hidrofóbica

entre la hélice αB y la porción N-terminal de la hélice αC es esencial para su estabilidad, y que la parte C-terminal de la αC es esencial para la oligomerización.

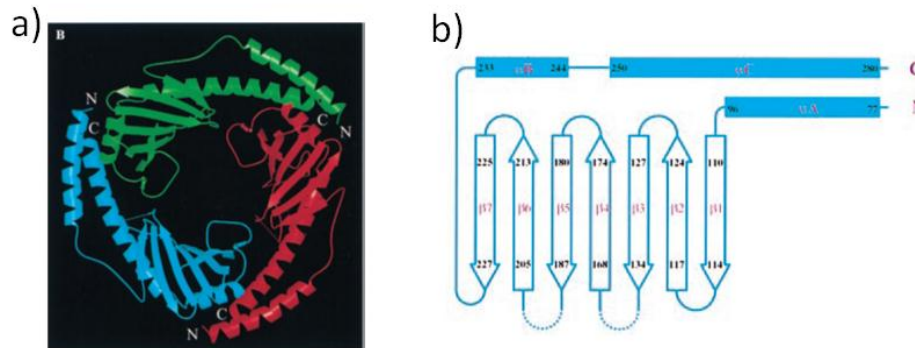


Figura 2. A) Representación de la estructura cristalográfica del trímero de p32. B) Representación del monómero de la proteína p32. Tomado de Jiang et al., 1999 [5].

La proteína madura p32 tiene como se mencionó anteriormente, una naturaleza ácida y la estructura cristalográfica revela una distribución de cargas asimétrica en la superficie (Figura 3). Uno de los lados de la dona y el canal interno tienen una alta concentración de residuos cargados negativamente, en contraste, el lado opuesto de la dona tiene cargas positivas. Esta polaridad pudiera sugerir diferentes funciones para cada lado de la proteína.

Se ha sugerido que la superficie ácida rica en residuos aspárticos y glutámicos, pudiera tener alta capacidad para almacenar cationes divalentes y por lo tanto modular la concentración de éstos en la mitocondria. Así mismo, su alta densidad de cargas negativas y distribución asimétrica, sugiere su posible unión a la membrana interna mitocondrial [5].

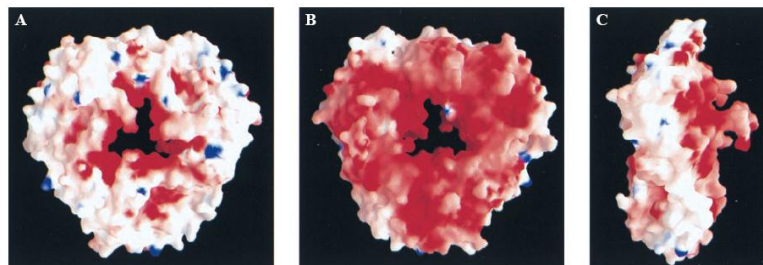


Figura 3 Distribución de los aminoácidos de superficie en la estructura cuaternaria de p32. (A) Distribución de las cargas en la superficie de la proteína, (B) distribución de cargas en la otra cara de la proteína, (C) Proteína p32 vista desde un lado, donde se muestra una asimetría en la distribución de las cargas de superficie. Los aminoácidos cargados positivamente y negativamente están indicados en azul y rojo, respectivamente. Tomado de Jiang et al., 1999 [5].

1.2.2. Localización celular y proteínas de unión a p32

Se ha detectado la presencia de p32 no sólo en la matriz mitocondrial [12], sino también en la superficie celular [8], citoplasma [13] y núcleo [14]; incluso se ha reportado que puede ser secretada por las células [15]. Cabe destacar que p32 se encuentra principalmente localizada en mitocondria y citosol (Figura 4), pero muestra una localización diferencial dependiendo de la línea celular y de las condiciones fisiológicas en la célula [14].

Su función precisa se desconoce, pero los datos hasta el momento demuestran que es capaz de unirse con una gran variedad de proteínas, aunque se desconoce si su función extiende hasta actuar como una andamio para unir plataformas de señalización, o que integre señalización entre estas proteínas (ver Figura 4), dentro de éstas proteínas se incluyendo proteínas: virales [16], plasmáticas [6,17,18], nucleares (como factores de *splicing*) [7], mitocondriales [19] y de superficie celular [15,20], incluso en las llamados “balsas lipídicas” [21].

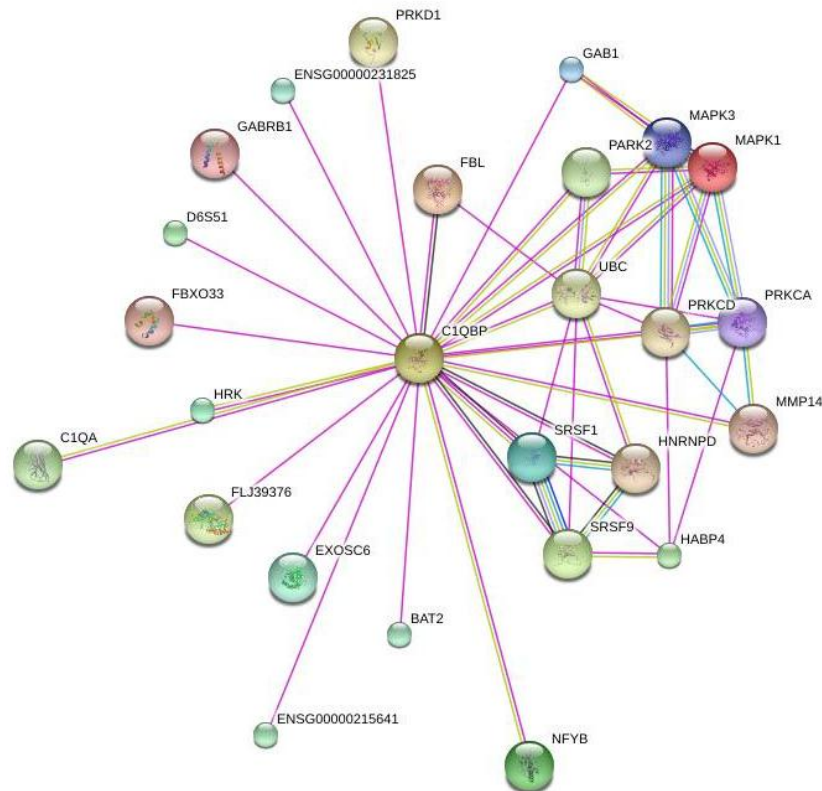


Figura 4. Red que denota las asociaciones experimentales hasta el momento descritas de p32 con otras proteínas. Las líneas representan las evidencias para la asociación; entre más líneas mayor evidencia existe de la asociación. Tomado de STRING Interaction Network (Fecha: 15/05/2013) (http://string905.embl.de/newstring.cgi/show_network_section.pl?taskId=kHq5GV0lJoWF&interactive=yes&advanced_menu=yes&network_flavor=evidence).

1.2.3. Roles de p32 y sus implicaciones en cáncer

Se ha reportado en los últimos años, que en diversos tipos de adenocarcinomas y líneas celulares malignas con alta capacidad metastásica, se presenta una sobreexpresión de p32. Ejemplos de ello son: cáncer de páncreas, gástrico, esofágico, mama, pulmón, próstata y colon [4]. También se ha demostrado, en algunos tipos de cáncer, que la expresión de p32 correlaciona directamente con la malignidad, reincidencia, resistencia a fármacos antineoplásicos y mortalidad de los pacientes [22,23]. Sin embargo, el rol de p32 en el fenotipo maligno aún no es claro [4].

Se ha encontrado que p32 juega un papel importante en la adhesión y migración de las células cancerígenas. Por ejemplo, a través de la interacción ligando-receptor con la integrina $\alpha_v\beta_v$, p32 induce la migración en células de melanoma [15]; también se ha propuesto que p32 es capaz de regular la actividad de PRKCZ, la cual es una proteína implicada en la regulación de la migración y polaridad celular [24]. Otro reporte asocia a p32 con la formación de lamelipodios; en donde es necesaria la presencia de p32 para efectuar la señalización inducida por insulina, dependiente de la activación de RTKs (receptores de tirosina cinasas) [20].

Otros estudios proponen a la proteína p32 como elemento importante durante en el proceso de apoptosis. Se ha demostrado que células tratadas con agentes pro-apoptóticos, aumentan la expresión de la proteína p32 y se ha sugerido que se transloca al núcleo luego de esta inducción [25,26]. Además, la sobreexpresión de p32 en fibroblastos, induce formación de vacuolas apoptóticas [27]. También, se ha demostrado que p32 forma un complejo con calreticulina, y se ha propuesto que el complejo evita la translocación de p32 a la mitocondria, evitando así la apoptosis [28]; por otro lado se ha propuesto que p32 interacciona con la proteína ARF, lo cual moviliza a ARF hacia la mitocondria, lo que finalmente induce apoptosis [29]. Es importante destacar que la mitocondria juega un papel importante en la regulación de la apoptosis y que p32 se ha propuesto también como proteína implicada en la función mitocondrial [30,31,32]. Por ejemplo, reportes sugieren que p32 regula la morfología y movimiento de este organelo [30].

Otros autores han reportado que la desregulación de la expresión de p32, tiene implicaciones directas en proliferación; por ejemplo se ha reportado que al bloquear la expresión de p32 en líneas celulares malignas de pulmón y mama, la proliferación disminuye [20,33]. Y se ha propuesto, que p32 pudiera estar implicado en el proceso de proliferación, a través de la

regulación de la ciclina D1, la cual es una ciclina implicada en el favorecimiento de la progresión de G1/S del ciclo celular [34]. También se ha asociado como proteína reguladora de la expresión génica. Por ejemplo, p32 interacciona directamente (físicamente) con el factor de *splicing* ASF/SF2 y es capaz de inhibir su función mediante la modificación del estado de fosforilación de ASF/SF2, haciéndolo menos afin al ARN [35], y se ha reportado que ASF/SF2 controla el *splicing* alternativo de algunos supresores tumorales como APC, BCR1/2, TP73, entre otros [36]; también interacciona con el factor de transcripción CBF/NF-Y, e inhibe la transcripción mediada por este factor [37] , el cual es un regulador de genes implicados mayormente en ciclo celular; y recientemente se ha propuesto como un factor de unión al RNA esencial para la traducción mitocondrial [38].

Se le ha descrito también como modulador de la inmunidad innata y adaptativa. Por ejemplo, inhibiendo la activación de linfocitos T (mediada por citocinas) [39] y modulando respuestas como inflamación, ya que es capaz de unirse y regular proteínas como: C1q (componente del complemento), HK (kininógeno de alto peso molecular), entre otras [6].

Recientemente, se ha reportado que la proteína p32 pudiera participar en el mantenimiento de la fosforilación oxidativa, durante el metabolismo tumoral o también llamado efecto Warburg [33].

1.3. Efecto Warburg

En la mayoría de las células, la glucosa es metabolizada por el proceso de glucólisis, obteniendo como resultado 2 moléculas de piruvato y dos de ATP por molécula de glucosa degradada, y después el piruvato continúa su proceso de oxidación entrando en su mayoría a la mitocondria, para su oxidación completa, vía ciclo de Krebs, generando ATP, CO₂ y H₂O (Figura 5, izquierda).

Sin embargo, uno de los sellos característicos de las células cancerosas es la reprogramación de este metabolismo energético, lo que se conoce como “efecto Warburg”: oxidación mitocondrial reducida, glucólisis aumentada y producción excesiva de ácido láctico, aún bajo condiciones aeróbicas (Figura 5, derecha) [40].

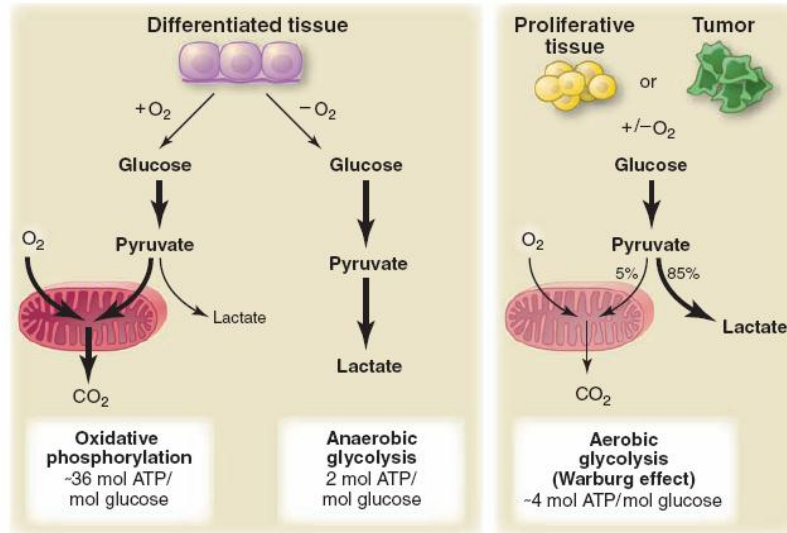


Figura 5. Representación esquemática de las diferencias entre fosforilación oxidativa, glucólisis anaeróbica y glucólisis aeróbica (efecto Warburg). En presencia de oxígeno los tejidos diferenciados o no proliferativos, metabolizan la glucosa a piruvato vía glicolisis, posteriormente durante la fosforilación oxidativa se oxida el piruvato en la mitocondria, lo cual requiere oxígeno. Cuando el oxígeno está limitado, las células redireccionan el piruvato para generar lactato (glucólisis anaeróbica). Sin embargo, en las células tumorales o tejidos proliferativos tienden a convertir la mayoría de la glucosa en lactato, aun en presencia de oxígeno. Tomado de Vander Heiden, et al., 2009 [41].

En la actualidad, se ha demostrado que este tipo de metabolismo ofrece muchas ventajas para el mantenimiento de las células tumorales, crecimiento del tumor y para la progresión maligna. Particularmente, favorece la supervivencia en los microambientes hipóxicos, frecuentemente encontrados en los tumores, e impacta directamente en la progresión maligna [42]. Sin embargo, la fosforilación oxidativa sigue siendo vital para la sobrevivencia de las células cancerígenas, ya que es necesaria para el metabolismo de la glutamina y el reciclaje del lactato [40].

En este sentido, un reporte ha implicado a p32 directamente en el mantenimiento de la fosforilación oxidativa, durante el metabolismo tipo Warburg; sugiriendo que ayuda a contrarrestar el metabolismo glicolítico [33]. También se encuentra el dato de que c-Myc, una proteína que aumenta su actividad cuando la ruta Wnt está encendida (ruta generalmente mutada en cáncer de colon), que estimula este tipo de metabolismo, lo hace en parte induciendo la expresión de p32 [43]. Esto sugiere que p32 puede jugar un papel muy importante en la regulación del metabolismo mediada por c-Myc [40].

2. ANTECEDENTES

En nuestro laboratorio, se encontró que las células malignas de colon sobreexpresan p32, en comparación con células normales. También se demostró, que la inducción de apoptosis en las células malignas de colon, provoca una disminución en la expresión de p32, tanto a nivel de proteína como a nivel de RNAm. El *knockdown* estable de la expresión de p32 mediante shRNA en células malignas RKO, mostró que p32, está involucrada en la resistencia a apoptosis ya que las células malignas de colon, que no expresan p32, son significativamente más sensibles a agentes inductores de apoptosis, como ciclosporina A (véase en anexos, figura 1). Lo cual difiere con algunos de los resultados antes publicados [28, 29], lo cual pudiera sugerir que el contexto celular es importante para determinar la respuesta que tendrá p32.

3. JUSTIFICACIÓN

El cáncer de colon humano es una de las enfermedades de mayor importancia clínica, pues ocupa el 3er. lugar de incidencia en neoplasias en México y en países desarrollados [44].

Dado que se ha propuesto que p32 está implicado en el mantenimiento del fenotipo maligno de células cancerosas, podría ser utilizado como proteína blanco para terapias contra el cáncer. Sin embargo, poco se sabe sobre esta proteína, incluso su función principal aun no ha sido determinada y ya que interactúa con muchas proteínas, pudiera tener funciones secundarias. Más aun, el mecanismo preciso de acción durante la tumorigénesis permanece inconcluso, es por ello, que es necesario determinar la función de p32 en la tumorigénesis, que permita utilizar ésta proteína como blanco terapéutico o incluso marcador tumoral.

4. HIPÓTESIS

Si p32 participa en el mantenimiento del fenotipo maligno de células cancerosas de colon, entonces el bloqueo de su expresión producirá efectos negativos en éstas, tales como: disminución de la proliferación celular, cambios en el metabolismo de glucosa así como disminución de la capacidad invasiva y tumorigénica de las células.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo general

Determinar el papel que juega p32 (gC1qR) en el mantenimiento del fenotipo maligno de líneas celulares de cáncer de colon humano.

5.2. Objetivos específicos

5.2.1. Determinar la expresión de p32 mediante western blot, en los siguientes contextos celulares: células humanas de colon no malignas 112CoN, en comparación con dos líneas celulares humanas de colon malignas RKO y SW480.

5.2.2. Verificar la eficiencia del *knockdown* de p32 (generado previamente en el laboratorio por shRNA) de las células RKO y SW480, mediante western blot y citometría de flujo (tanto en citoplasma como en la membrana plasmática).

5.2.3. Analizar qué efecto tiene el *knockdown* estable de p32 en:

- El metabolismo celular, mediante la medición de la producción de lactato.
- La viabilidad celular por ensayos con MTT
- Proliferación celular por ensayos con CSFE.
- En la migración celular por ensayos de *wound healing in vitro*.
- En la expresión de genes, mediante análisis de microarreglos (en colaboración con el Instituto Nacional de Medicina Genómica)
- En la capacidad tumorigénica, por xenotransplantes a ratones inmunocomprometidos.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Material biológico y cultivo celular

Se utilizaron las líneas celulares de cáncer de colón inmortalizadas RKO y SW480 adquiridas de AATCC (American Type Culture Collection, Manassas, E.U.) con el *knockdown* estable para la proteína p32 (Kd p32), generadas previamente en el laboratorio. El *knockdown* se obtuvo utilizando el plásmido *RNAi-Ready pSIREN-RetroQ Vector*, de la marca Clontech, que genera el shRNA para la proteína p32. Como control, se utilizaron células RKO y SW480 que contienen este mismo plásmido, pero sin la secuencia del shRNA (plásmido vacío).

También se utilizó la línea celular no maligna de colon humano normal (112 CoN), adquirida de AATCC.

Las células RKO y 112CoN se cultivaron en Dulbeco's Modified Eagle's medium (DMEM) (Sigma D5648-10L) suplementado con 10% de suero fetal bovino (Multicell 080150), antibióticos y glutamina. Las células SW480 se cultivaron en medio DMEM-F12 (GIBCO 12400-024) con 5% de suero fetal bovino, antibióticos y glutamina. Todas las células se mantuvieron a 37° en 95% de aire y 5% de CO₂.

6.2. Western Blot

Para los ensayos de Western blot, las células se lisaron en buffer de RIPA (Tris HCl 50 mM, NaCl 150 mM, IGEPAL 1%, Desoxicolato de Sodio 0.5%, 0.1% SDS, EDTA 1mM, inhibidor de tripsina 0.1 mg/mL, Leupeptina 10 µg/mL y PMSF 1 mM). Los lisados se homogenizaron 1 minuto con el dispersador "*UltraTurrax*". Se dejó reposar la muestra 30 minutos a 4°C. Del sobrenadante, se obtuvo una alícuota para la cuantificación de proteína, la cual se realizó por el método Bradford, con reactivo comercial adquirido de Bio-Rad. El resto del homogenado se diluyó con buffer Laemmli.

Cantidades iguales de proteína (50-75 µg) se separaron por electroforesis (utilizando equipos de Bio-Rad) en un gel de resolución de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 10% (gel concentrador: 2.5 mL Acrilamida-Bisacrilamida (30:0.8), 3.75 mL Tris 0.5 M pH 6.8, 8.5 mL de agua, 0.15mL de SDS al 10%, 15µL de TEMED y 150µL de Persulfato de amonio al 10%; gel separador:

Acrilamida-Bisacrilamida (30:0.8), 7.5 mL Tris 1.5 M pH 8.8, 12mL de agua, 0.3mL de SDS al 10%, 15µL de TEMED y 150µL de Persulfato de amonio al 10%) y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (Bio-Rad 1620115). Las membranas se bloquearon toda la noche a 4°C (o 2 horas a temperatura ambiente) con leche libre de grasa o BSA (libre de IgG) (Bio-Rad 170-6404). La incubación con el anticuerpo primario se realizó durante toda la noche a 4°C. Los anticuerpos primarios utilizados fueron: anti-p32 mouse (1:500, Chemicon MAB 1161) y anti-actina mouse (marca no comercial, monoclonal hecho en hibridoma 1:1000).

Las membranas se lavaron e incubaron con el anticuerpo secundario anti-mouse-HRP (1:15000, Pierce), anticuerpo conjugado a peroxidasa de rábano. Las membranas se lavaron nuevamente y se revelaron por quimioluminiscencia (kit comercial Supersignal de Pierce 34076).

6.3. Análisis para ver la expresión de p32 por Citometría de Flujo

Se desagregaron las células con EDTA (EDTA 10mM pH 7.5, disuelto en PBS) y se incubaron en esta solución por 5 minutos a 37°C; posteriormente se centrifugaron y resuspendieron en buffer de FACS (4% SFB en PBS). Se utilizaron 200 000 células por cada condición. En caso de tinción intracelular se permeabilizaron las células con Triton X-100.

Se agregó el anticuerpo primario anti-p32 mouse (1:50, Chemicon MAB 1161) y se incubó por 30 minutos a 4°C. Se realizaron 2 lavados con buffer de FACS frío. Posteriormente, se agregó el anticuerpo secundario anti-mouse-FITC (1:100, IR 115.097.003) y se incubó por 30 minutos a 4°C (protegido de la luz). Se realizaron 3 lavados a las células y se fijaron con paraformaldehído (PFA) al 4%. Las muestras se guardaron a 4°C hasta su lectura, la cual se realizó en el citómetro BD FACSCalibur, canal de fluorescencia FL1, fluorocromo Alexa Fluor 488.

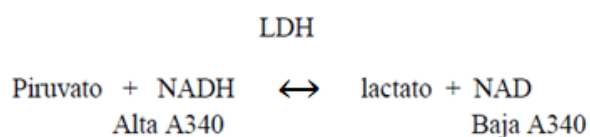
6.4. Selección de clonas

Para seleccionar las clonas con el *knockdown* más eficiente para p32, las células RKO y SW480 generadas previamente en el laboratorio con el shRNA de p32, se diluyeron y posteriormente se aislaron células (una célula por pozo en placas de 96). Cada célula se expandió en medio

con puromicina (3 µg/µL) durante tres semanas. Posteriormente, se analizó por citometría de flujo, la expresión de p32 de cada clona y se seleccionaron las clonas con mayor eficiencia de *knockdown*, las cuales presentaban mayor intensidad de fluorescencia con una población homogénea (como control negativo se utilizaron células marcadas con el anticuerpo primario).

6.5. Detección de Lactato en cultivo celular

La cantidad de lactato liberado al medio de cultivo por las células se determinó utilizando la enzima Lactato Deshidrogenasa (LDH) (Sigma-Aldrich, L3916), que cataliza la reacción:



Para medir lactato, la reacción se lleva a cabo de derecha a izquierda con un exceso de NAD, de tal modo que en presencia de LDH, aumenta la absorbancia a 340nm (por la generación de NADH), lo que resulta en una medida del lactato presente originalmente en la muestra de reacción.

Se sembraron 200 000 células para experimentos de duración de 1 y 2 días (tiempos cortos); y para experimentos de duración 5 y 6 días (tiempos largos) se utilizaron 5500 o 9000 células por pozo RKO o SW480 respectivamente. Para medir el lactato producido por las células, se recolectaron 200µL de medio de cultivo, al cual se le agregaron 400µL de ácido tricloroacético frío al 10% (diluido en agua destilada). La mezcla se agitó vigorosamente en vortex por 30 segundos y se dejó reposar en hielo por 5 min, para asegurar la precipitación de las proteínas. Posteriormente se centrifugó a 4 000 rpm por 10 min. Se recolectó el sobrenadante y para asegurar la desproteínización del medio, se volvió a centrifugar.

Aparte se preparó una mezcla por cada muestra de: 656 µL de buffer de glicina (Sigma G5418), 1.67 mg de NAD (Sigma N7004) y 1311 µL de lactato deshidrogenasa; y se mezcló por inversión.

La reacción se inició agregando a cada tubo 967 μL de esta mezcla y 33 μL del medio desproteinizado (o ácido tricloracético al 10% en el caso del blanco). Las muestras se incubaron por 30 minutos a 37°C y se leyeron a 340nm en el espectrofotómetro (Beckman DU 640).

La concentración del lactato se calculó con la siguiente fórmula:

$$\text{Lactato (mmol/L)} = (\text{Abs } 340)(1) / (6.22)(1)(0.033)$$

Donde: 1 representa el volumen final de la muestra, 6.22 el coeficiente de absorción de NADH a 340 nm. 1 el área de la celda y 0.033 es el factor de dilución.

6.6. Ensayo de *Wound Healing*

Este método básicamente mimetiza la migración celular, haciendo una herida en la monocapa de células. Para este ensayo, se sembraron 200,000 células en cajas de 24 pozos. Una vez alcanzado el 90% de confluencia, se hizo una herida en la porción media de cada pozo con una punta estéril de 200 μL . Posteriormente se lavaron los pozos con PBS para quitar las células desprendidas. Se incubó la caja hasta por 48 horas en medio sin suero fetal bovino (para evitar proliferación). También se analizó el cierre de la herida en presencia de BrDU (50 μM), ya que se sabe el BrDU reduce la tasa de proliferación celular con una buena eficiencia desde las 24 horas. [45].

Las fotos se tomaron a las 0 (justo después de realizar la herida), 24 y 48 horas después de la herida.

6.7. Ensayo de MTT para medir viabilidad

Este método se basa en la capacidad de las células metabólicamente activas de reducir el bromuro 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) (Sigma M2128), en su sal de formazán por la enzima mitocondrial succinato deshidrogenasa. El formazán, es un compuesto insoluble en agua de color morado y su absorbancia correlaciona con su concentración.

Para realizar el ensayo, se sembraron 5500 células SW480 o 6500 células RKO en cajas de 12 pozos; una vez pasado el tiempo requerido (1 -10 días), se le agregó el reactivo MTT (0.5mg/mL). Se incubó durante 3 horas a 37°C y posteriormente se retiró el medio de cultivo. Para colectar los cristales de formazán se incubó en agitación leve con isopropanol ácido (pH 4), durante 10 minutos. Una vez colectados los cristales, se centrifugaron las muestras por 1 minuto a 1000 rpm y se procedió a leer en el espectrofotómetro (570nm).

6.8. Ensayo de Proliferación con el compuesto CSFE

Este ensayo se basa en el éster de carboxifluoresceína diacetato succinimidil (CFDA-SE), el cual atraviesa pasivamente la membrana celular y se une covalentemente a los grupos amino libres de las macromoléculas intracelulares. Luego esterasas citoplasmáticas endógenas, remueven los grupos carboxil, convirtiendo al CFDA-SE no fluorescente en CFSE fluorescente. Durante la división celular, el CFSE se distribuye uniformemente entre las células hijas. Cada división celular reduce la intensidad de la fluorescencia de las células hijas por la mitad y esto se puede analizar por citometría de flujo.

Se utilizó el kit de Invitrogen CellTrace CFSE Cell Proliferation Kit (C34554), siguiendo el protocolo del kit. Se ayunaron por 24 horas las células (usando medio sin SFB). Posteriormente se lavaron 2 veces con PBS y se disgregaron las células en monocapa por tratamiento con tripsina. Se agregó medio completo, se centrifugaron (2200rpm durante 2 minutos) y se ajustó a una concentración de 1×10^6 células en 1 mL de PBS/0.1% BSA.

Posteriormente se agregó 1.4 μ L de compuesto CSFE stock (5 mM) por cada mL de células, para obtener una concentración final de 7 μ M para las células RKO; y para las células SW480 se agregó 1.2 μ L de compuesto CSFE stock, para una concentración final de 6 μ M. Las células se incubaron por 10 minutos a 37°C y se centrifugaron. Posteriormente se agregó 1mL de medio completo frío y se incubó por 5 minutos a 4°C. Después se lavaron 3 veces con medio completo. Finalmente, se contaron las células y se sembraron en placas de 12 pozos, 50 000 células para tiempos de 3 y 4 días; y 10 000 células para tiempos de 5 y 6 días.

Una vez transcurridos los días necesarios, se recuperaron las células. Para recuperar las células, se tripsinizaron y se agregó medio, luego se resuspendieron en 1mL de PBS/BSA 0.1% y nuevamente se centrifugaron y se resuspendieron en 50 μ L de PBS/BSA 0.1%. Para fijar las

células se agregaron 50 μ L de paraformaldehído al 4%. Las muestras se guardaron a 4°C hasta su análisis por citometría de flujo a 488 nm (excitación) y 517 nm (emisión).

6.9. Extracción de RNA

Se lavó la monocapa de células con PBS dos veces y se agregó 1 mL de Trizol (Invitrogen, Trizol reagent) a la caja (1 mL por caja de 35mm). Posteriormente se agregó 0.2 mL de cloroformo por cada mL de Trizol y se agitó vigorosamente la muestra por 15 segundos; luego se incubó la muestra 3 minutos a temperatura ambiente y se centrifugaron las muestras a 11500 rpm por 20 min a 4°C. Posteriormente, se transfirió la fase acuosa a un tubo nuevo y se precipitó el RNA con 0.5 mL de alcohol isopropílico. Se incubaron las muestras a temperatura ambiente por 10 minutos y se centrifugaron nuevamente a 11500 rpm por 15 min a 4°C. Se eliminó el sobrenadante y el botón obtenido de RNA se lavó dos veces con 1mL de etanol al 75% (para los lavados se centrifugó la muestra por 5 minutos a 11500 rpm a 4°C y se retiró el exceso de etanol). Finalmente se dejó secar la pastilla a temperatura ambiente y se disolvió el RNA en H₂O libre de RNasa.

6.10. Microarreglos y Análisis

Se enviaron muestras de RNA total al INMEGEN (Instituto Nacional de Medicina Genómica), de la línea celular RKO, tanto células control como de los *knockdown* de p32, para un análisis por microarreglos. Se utilizó la plataforma de Affimetrix GeneChip® Human Gene 1.0 ST Array, la cual analiza aproximadamente 36,000 transcritos.

Posteriormente se analizaron los resultados utilizando el programa IPA (*Ingenuity Pathway Analysis*), la cual es una herramienta bioinformática que permite identificar asociaciones entre genes y establecer relaciones causales.

Se realizó un análisis de red causal (*Causal Network Analysis*), basado en las veces de cambio de expresión, siendo el valor mínimo que se tomo en cuenta para realizar el análisis 1.5 veces de cambio. Este tipo de análisis, permite construir una red para descubrir proteínas cuya activación o inhibición, pudiera explicar causalmente los resultados experimentales. El

programa IPA crea cascadas de señalización probables, de los datos de expresión, generando redes regulatorias que describen los mecanismos probables de acción. IPA puede predecir que enfermedades pudieran ocurrir o que funciones biológicas están aumentadas o disminuidas, basándose en los cambios de expresión obtenidos de los microarreglos. Para establecer tales asociaciones, utiliza bases de datos de Ingenuity (Ingenuity Knowledge Base), la cual es una colección estructurada de observaciones en varios contextos experimentales reportadas en la literatura biomédica.

La configuración utilizada para la creación de las redes *in silico* fue: genes de la base de datos de Ingenuity, considerando sólo relaciones directas, experimentalmente observadas, en humano, ratón y rata, en todas las células y tejidos.

6.11. RT-PCR

Una vez cuantificado el RNA, se utilizó el kit SuperScript™ III RT/ Platinum® Taq (Invitrogen 53043), siguiendo las instrucciones del proveedor:

Buffer de Reacción 2X	12.5 µL
Primer Fw (10pmol)	1 µL
Primer Rev (10pmol)	1 µL
RNA (10ng o 50ng)	1 µL
H ₂ O	9 µL
Enzima Mix RT+Taq	0.5µL
Volumen final	25µL

Se utilizaron los siguientes oligos para amplificar:

p32 (T_m = 67°C)

Forward primer	GCCGGGGAAAAAATCACGGTC
Reverse primer	CACTCTCAGCCTCGTCTTCTTGTC

Has2 (T_m = 67°C)

Forward primer	CAGCCTCATCTGTGGAGATGGT
Reverse primer	TCCCAGAGGTCCACTAATGCAC

TNFSF15 ($T_m = 66\text{ }^\circ\text{C}$)

Forward primer CTCTGCACTGGGAACATGAACT

Reverse primer TTGGCTCAGGGTAGCTGTCTGT

Hook1 ($T_m = 63^\circ\text{C}$)*

Forward primer CCTGGTACCGAGCTTTCCTG

Reverse primer TGTCTGCAGCCAGATCATGAGG

El programa de incubación fue el siguiente: 1 ciclo a 55°C (30 min), 1 ciclo a 94°C (2 min), 28 ciclos (94°C por 30seg, T_m durante 30 seg, 68°C por 1min), 1 ciclo a 72°C (7min).

* Se agregó 10% de DMSO a la reacción.

6.12. Xenotransplantes de células en ratones inmunocomprometidos para determinar la capacidad tumorigénica.

Para generar los tumores se inocularon subcutáneamente 12 ratones desnudos (nu/nu), los cuales son ratones inmunocomprometidos (carentes de timo funcional), para probar la línea celular SW480 y 6 ratones para probar la línea RKO. En cada uno de los ratones se inyectaron 1×10^6 células por cada condición: células control del lado izquierdo y células con el *knockdown* de p32 (Kd p32) del lado derecho.

Para preparar las células, éstas se tripsinizaron por 3 minutos y se lavaron con medio completo, luego se resuspendieron en PBS y se contaron las células utilizando la cámara de Neubauer (descartando células no viables con azul de tripano). Posteriormente, se ajustaron 1×10^6 células por cada 50 μL de PBS, a lo cual se le agregó una mezcla de 25 μL de matrigel (*Growth Factor Reduced Matrigel*, BD 356230) diluido en 25 μL de PBS; obteniéndose 1×10^6 de células en un volumen total de 100 μL , lo cual fue inoculado en cada sitio.

Una vez inyectados los ratones y generados los tumores (aproximadamente de 4 a 6 semanas después), se procedió a realizarles eutanasia. Cada uno de los tumores fue removido y pesado. Los ratones se disectaron en busca de tumores secundarios.

7. RESULTADOS

7.1. Expresión de p32 en líneas celulares

Para evaluar la expresión de p32 en las células de colon normales 112CoN, en comparación con las células malignas RKO y SW480, así como de las células con el *knockdown* de p32 (Kd p32), se obtuvieron los extractos de proteína totales y se analizaron por Western Blot.

Los resultados (Fig. 6) mostraron que p32 está sobre-expresado en ambas líneas celulares malignas RKO y SW480 (control), en comparación con la línea normal de colon 112CoN. Los resultados también demostraron que la expresión de p32 había sido reducida significativamente en las líneas celulares con el *knockdown* estable de p32 (Kd p32) en comparación con las células transfectadas con el plásmido vacío (control).

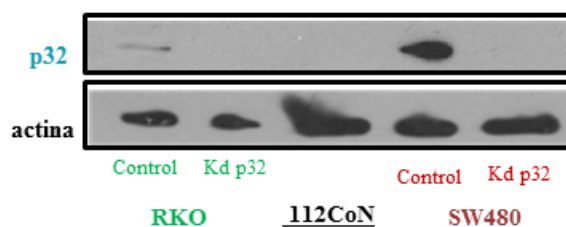


Figura 6. Expresión de p32 determinada por western blot del lisado total: carriles 1 y 2 células RKO control y con el *knockdown* de p32 (Kd p32); carril 3, células normales de colon 112CoN; carriles 4 y 5, células SW480 control y con el *knockdown* de p32 (Kd p32).

Para evaluar la homogeneidad de expresión (a nivel de población celular) en las líneas RKO y SW480 con el *knockdown* de p32, se realizó un análisis por citometría de flujo, donde se comparó la expresión de p32.

Los datos obtenidos (Fig. 7) mostraron que la población RKO así como SW480 con el *knockdown* de p32 era muy heterogénea y que una gran parte de la población (aproximadamente el 70%) seguía expresando p32, aunque en menor proporción (véase anexo, figura 2).

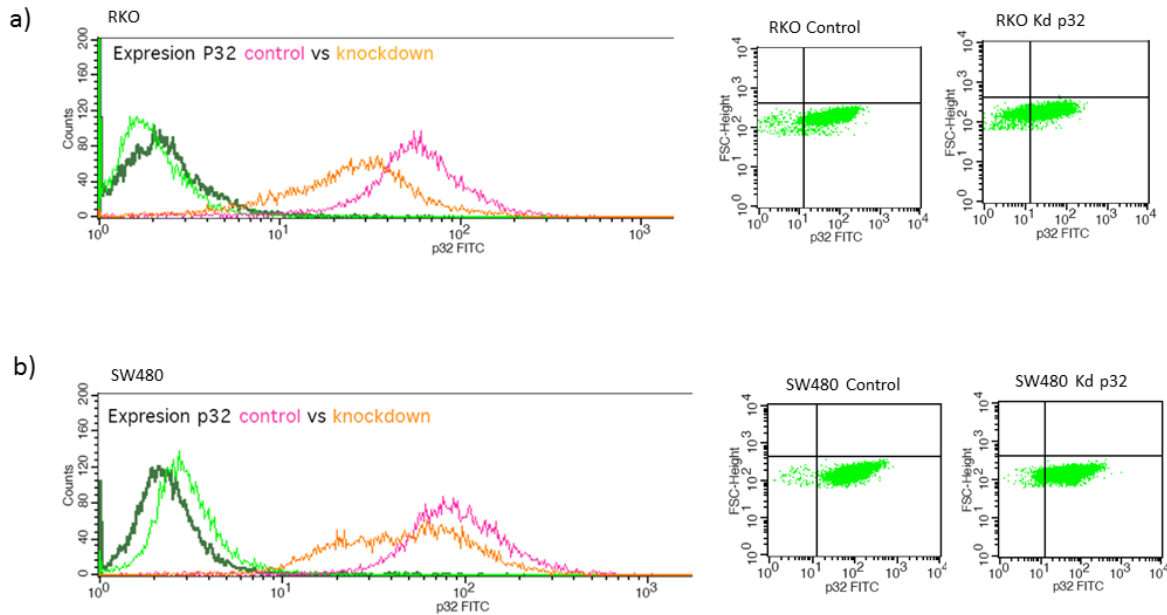


Figura 7. Análisis de la expresión de p32 mediante citometría de flujo. Del lado izquierdo se muestra el histograma y del lado derecho se muestra el dot-plot de cada población de células. a) Análisis de las células RKO control (línea rosa) y las células RKO con *knockdown* de p32 (línea naranja). b) Análisis de las células SW480 control (línea rosa) y las células SW480 con *knockdown* de p32 (línea naranja). Los controles (anticuerpo secundario y autofluorescencia) se muestran en verde.

Para homogenizar la población y aumentar la eficiencia del *knockdown*, es decir, que la mayoría de las células no expresara p32, se realizó una selección clonal. Para lograrlo, las células previamente generadas en el laboratorio de RKO y SW480 con el *knockdown*, se diluyeron y se aisló una célula por pozo: Luego, se crecieron en puromicina (ya que el plásmido que codifica para el shRNA, contiene un cassette de resistencia a puromicina). Posteriormente mediante citometría de flujo, se analizaron estas clonas para determinar cuál de ellas tenía una población mas homogénea, con menor expresión de p32.

Se analizaron 50 clonas por línea celular, de las cuales se seleccionaron dos clonas para las RKO y dos clonas para las SW480, que mostraban mayor eficiencia del *knockdown* y una población homogénea (Figura 8, anexo figura 2).

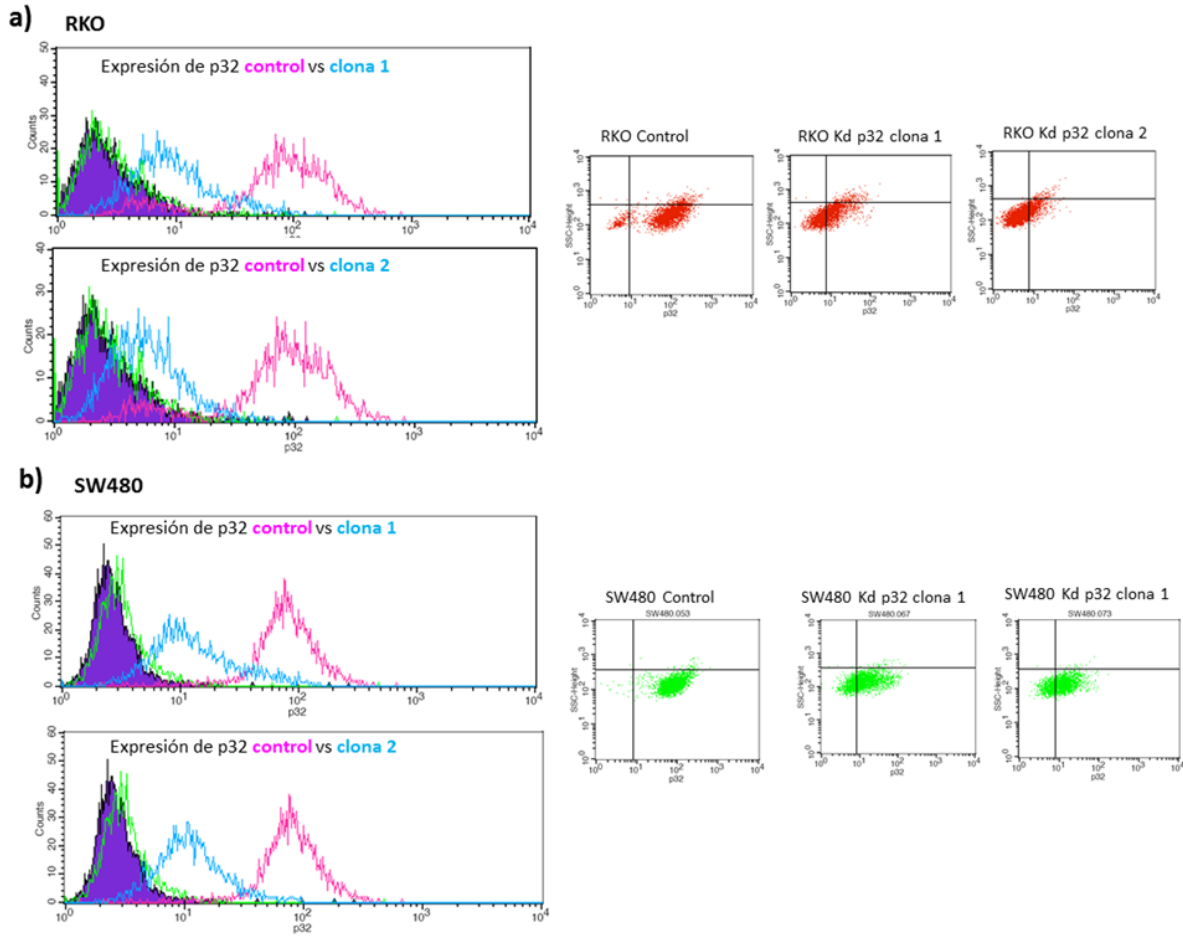


Figura 8. Análisis de la expresión de p32 por citometría de flujo de las clonas seleccionadas. Del lado izquierdo se muestra el histograma y del lado derecho se muestra el dot-plot de cada población. a) Análisis de las células RKO control (línea rosa) y las clonas 1 y 2 con *knockdown* de p32 (línea azul). b) Análisis de las células SW480 control (línea rosa) y de las clonas 1 y 2 con *knockdown* de p32 (línea azul). Los controles (anticuerpo secundario y auto-fluorescencia) se muestran en verde y morado.

Una vez obtenidas estas clonas con un eficiente *knockdown* de p32, éstas se juntaron respectivamente y se convirtieron en una sola población *knockdown* RKO y una sola población *knockdown* SW480. Tal como lo muestra la figura 9, la nueva población contenía baja expresión de p32 y era muy homogénea.

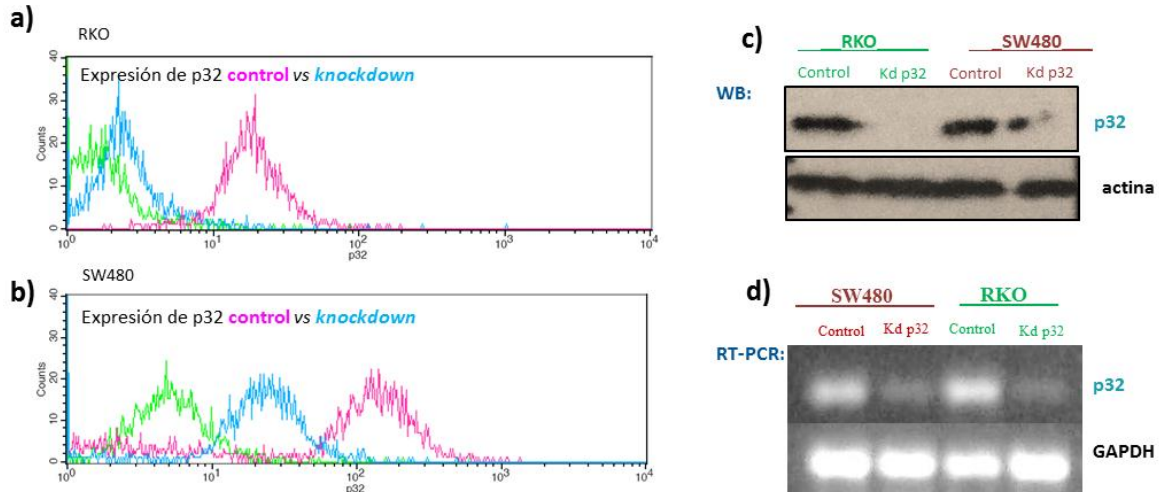


Figura 9. Análisis de la expresión de p32 de la población con el *knockdown* eficiente de p32. a) y b) muestran la citometría de flujo, c) muestra el western blot para p32, utilizando como control actina y d) muestra el RT-PCR para p32, utilizando como control GAPDH.

7.2. Relación entre p32 y el efecto Warburg

Un estudio previo había relacionado a p32 como regulador del metabolismo energético canceroso, conocido como “efecto Warburg”. En este estudio [33] reportaron que en células de cáncer de mama MDA-MB-435 y MDA-MB-231, el *knockdown* de p32 aumentaba el metabolismo energético canceroso, lo cual era evidente por la acumulación de lactato después de 4 días.

Para determinar si en nuestro modelo de cáncer de colon, p32 también era importante para la reprogramación del metabolismo, se midió la producción de lactato. Utilizando las nuevas poblaciones de RKO y SW480 que contenían un eficiente *knockdown* de p32, y comparando con las células control que lo sobreexpresan, se midió el lactato excretado al medio. Las mediciones se realizaron a tiempos cortos (día 1 y 2), así como a tiempos largos (día 5 y 6). Los resultados mostraron (Fig. 10) que no había diferencias significativas en la producción de lactato cuando se comparaba el *knockdown* de p32 con las células control que lo sobreexpresan.

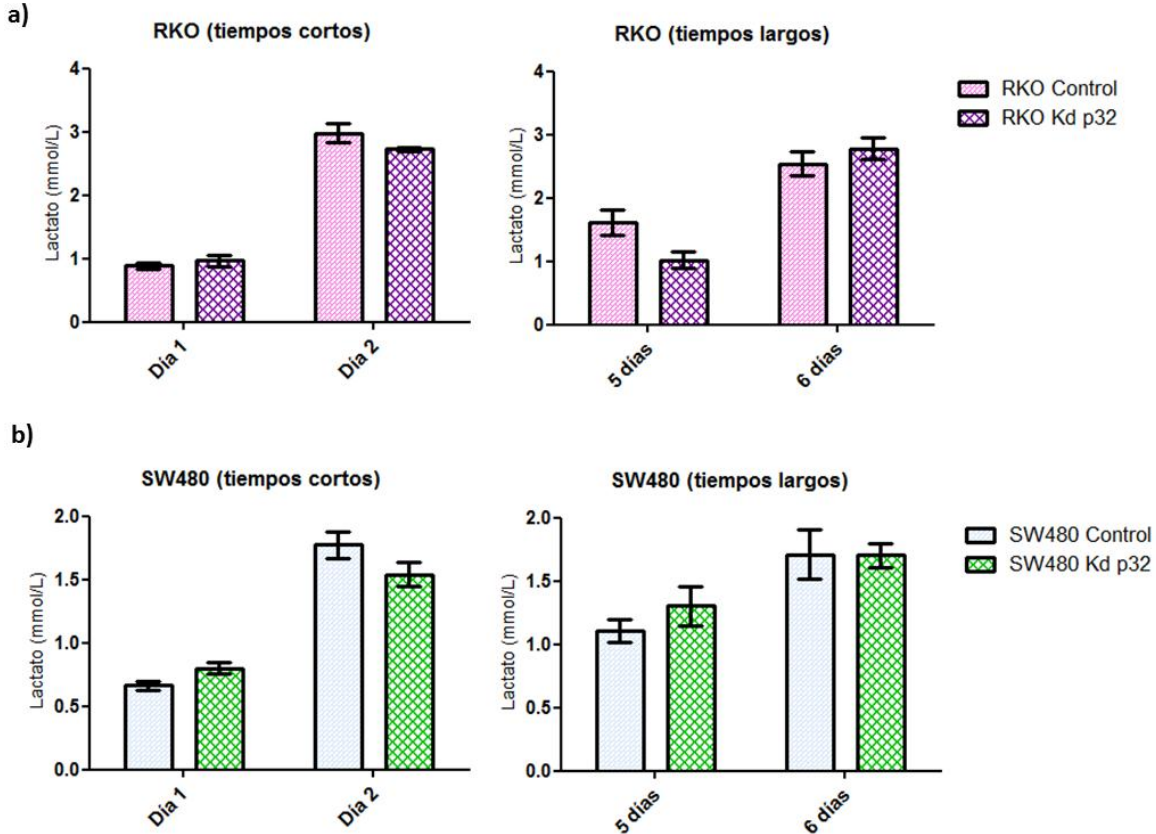


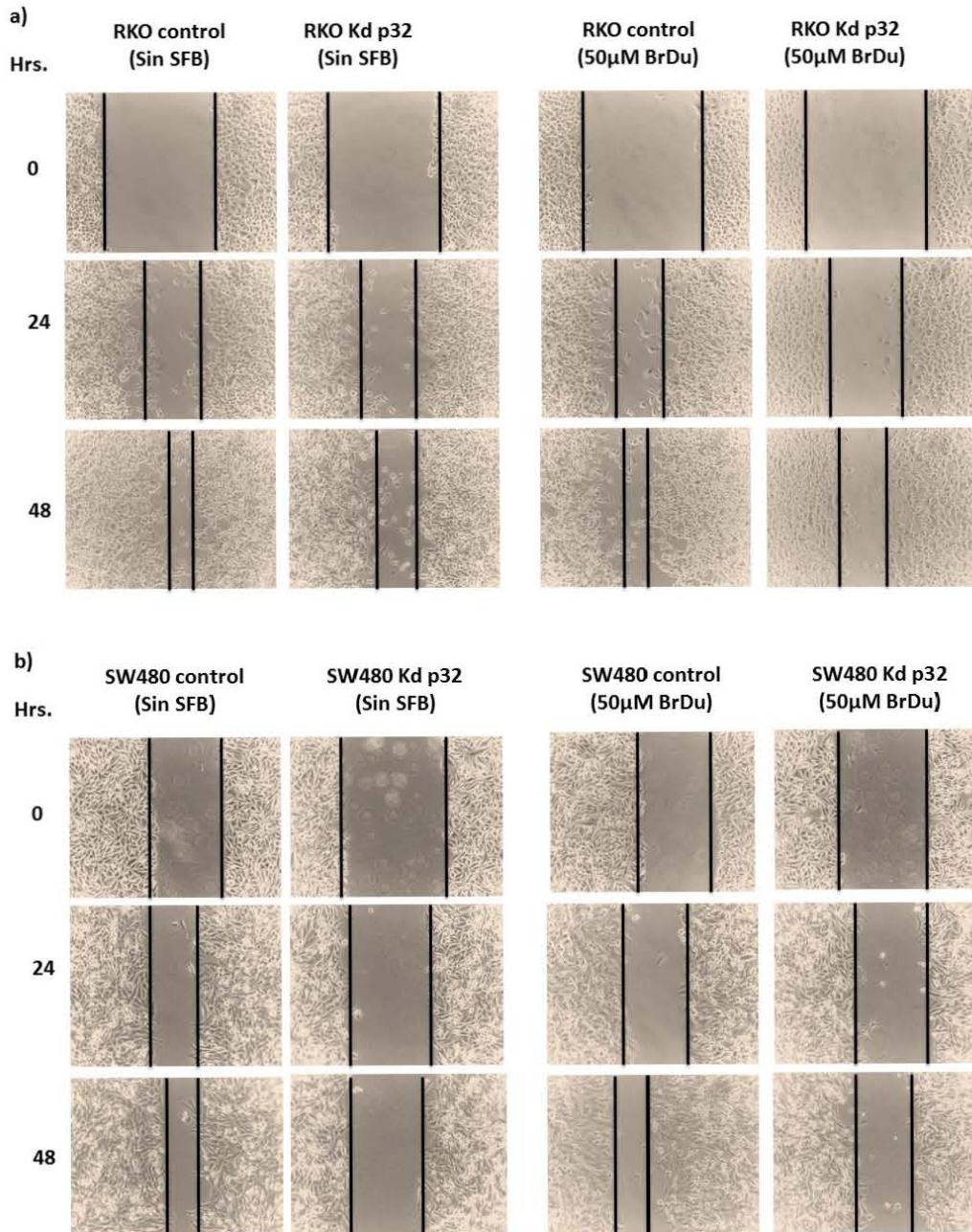
Figura 10. Medición de la producción de lactato. En el panel a) se muestran las células RKO, y en el panel b) las células SW480, a tiempos cortos (1 y 2 días) o a tiempos largos (5 o 6 días). Se graficaron 3 experimentos independientes (cada uno con dos replicas). Se realizó una prueba t para dos muestras ($\alpha=0.05$) comparando control vs Kd p32 en cada uno de los días. No se observó diferencias significativas: RKO día 1 ($p=0.462$), RKO día 2 ($p=0.130$), RKO día 5 ($p=0.052$), RKO día 6 ($p=0.378$), SW480 día 1 ($p=0.063$), SW480 día 2 ($p=0.153$), SW480 día 5 ($p=0.308$), SW480 día 6 ($p=0.969$)

7.3. Efecto de p32 en la migración celular

Dada la evidencia reportada de que p32 pudiera jugar un papel importante en el proceso de migración de las células cancerosas [15,20], se realizaron experimentos de *wound healing*, para determinar el efecto de la disminución de la expresión de p32 en la migración celular. Los experimentos se realizaron sin SFB para reducir la tasa de proliferación. Los resultados (Fig. 11), demostraron que las células malignas control, que sobreexpresan p32, migran significativamente más rápido que las células a las que se les bloqueó de manera estable la expresión de p32.

Debido a que el cierre de la herida pudiera deberse a eventos de proliferación y no necesariamente a migración, se adicionó BrDU, ya que se ha reportado que inhibe

proliferación en células cancerosas [45]. Como se muestra en la figura 11, al adicionar el compuesto hace más lento el cierre de la herida en ambos casos (control y *knockdown*). Sin embargo, al igual que en los experimentos sin SFB, el bloqueo de la expresión de p32 disminuye significativamente la migración de las células en comparación con las células control.



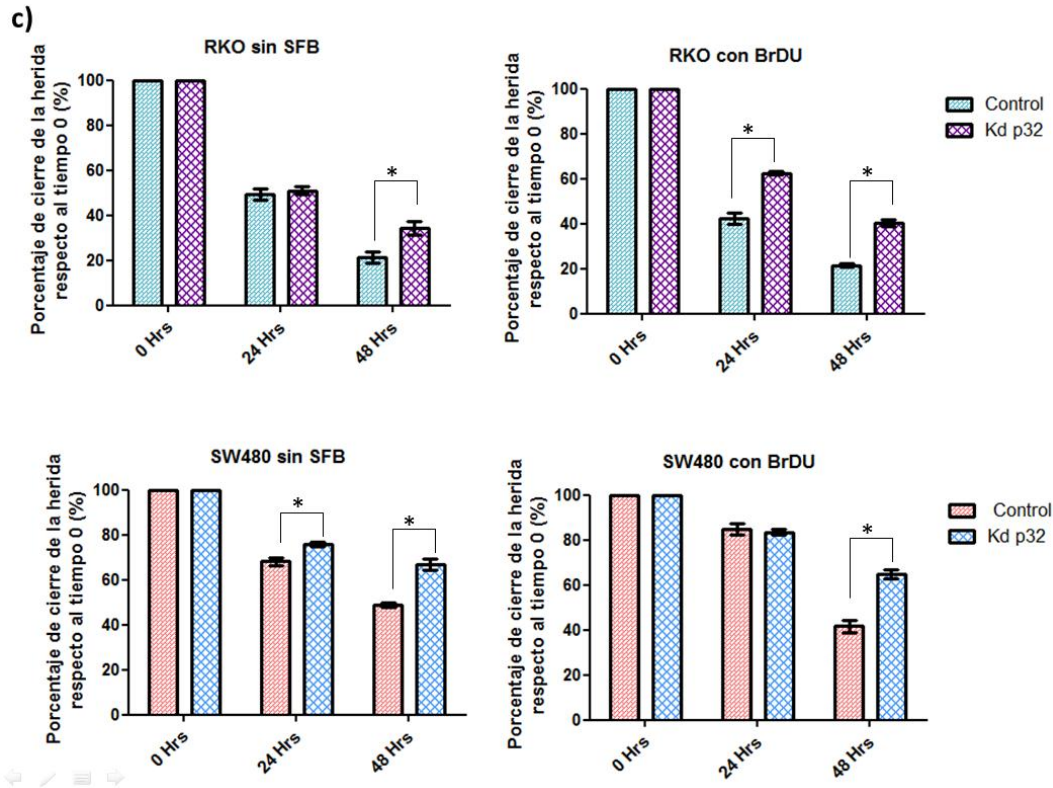


Figura 11. Ensayo de *wound healing*. En a) se muestran las células RKO y en b) en células SW480 (con sus respectivos *knockdown*). Los ensayos se realizaron sin SFB (lado izquierdo) y sin SFB adicionando BrDU. Las fotografías muestran un experimento representativo de tres que se realizaron. En c) se muestra la cuantificación del ensayo de *Wound Healing*. Utilizando el programa *ImagJ* se cuantificó el área de la herida a diferentes tiempos (0, 24 y 48 hrs). Se graficó el porcentaje de cierre de la herida respecto al tiempo 0, de 3 experimentos independientes. En células RKO y en células SW480 respectivamente. Se realizó una prueba t comparando control vs Kd p32 en cada uno de los tiempos, graficando el error estándar. Los asteriscos representan el nivel de significancia ($p < 0.05$).

7.4. Relación de p32 en la viabilidad y proliferación de las células

Ya que algunos autores han implicado a p32 en la regulación de la apoptosis [26,27,31,46] se realizaron experimentos con MTT, para comparar la viabilidad de las células control vs el *knockdown*. Los experimentos se realizaron con duración de 1 y 3 días (tiempos cortos) y con duración de 7 y 10 días (tiempos largos). Como lo muestra la figura 12, no se encontraron diferencias significativas en cuanto a viabilidad, entre las células que expresan p32 y las células *knockdown*, ya sean células RKO (Fig. 12a) o células SW480 (Fig. 12b).

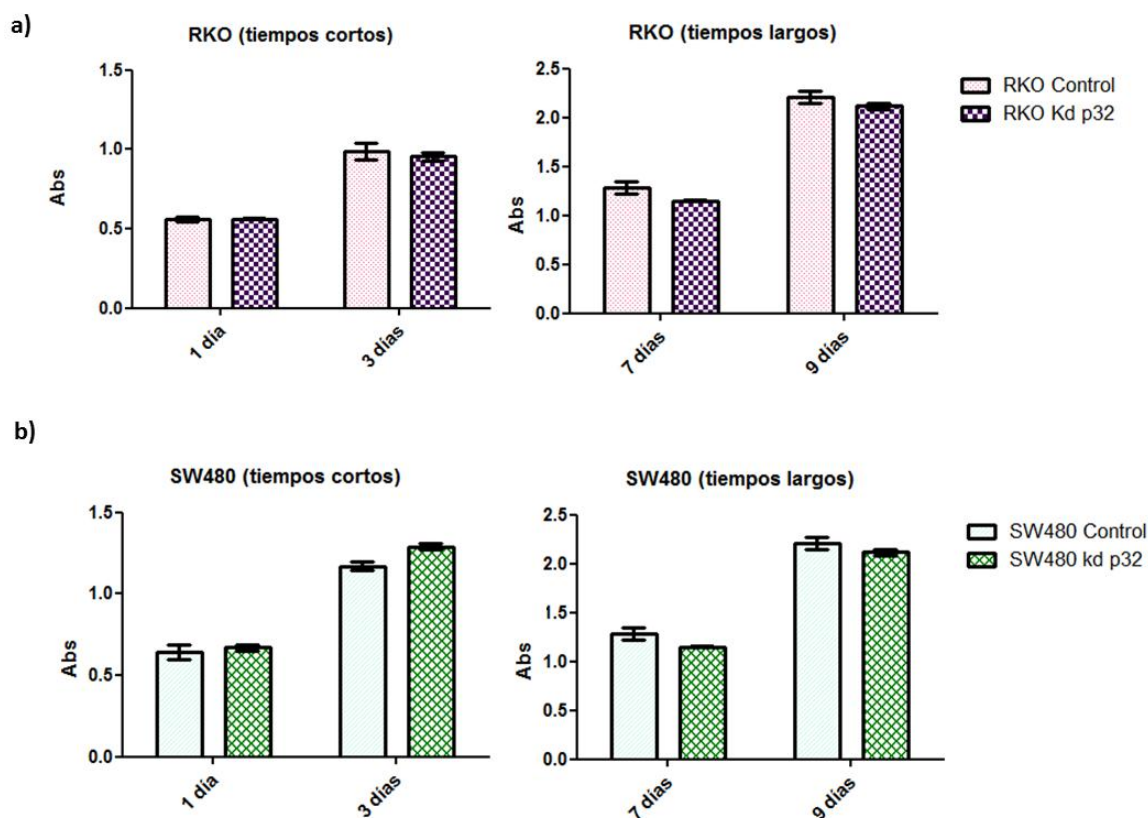


Figura 12. Resultados de los ensayos de MTT, para medir viabilidad. En a) se muestran las células RKO y en b) las células SW480 con su respectivo *knockdown*. Se graficaron 2 experimentos independientes (cada uno con dos replicas). Se realizó una prueba t para dos muestras ($\alpha=0.05$) comparando control vs Kd p32 en cada uno de los días. No se observó diferencias significativas: RKO día 1 ($p=0.974$), RKO día 3 ($p=0.613$), RKO día 7 ($p=0.166$), RKO día 9 ($p=0.304$), SW480 día 1 ($p=0.430$), SW480 día 3 ($p=0.051$), SW480 día 5 ($p=0.166$), SW480 día 6 ($p=0.304$)

P32 también se ha asociado a procesos proliferativos. En este sentido se ha reportado que la expresión constitutiva de p32 en fibroblastos inhibe la proliferación [27]. Sin embargo en células cancerosas de hígado HepG2, cuando sobre-expresan p32, la proliferación de las células aumenta a tiempos largos (6 días), no siendo evidente en periodos cortos (2 días) [47]. Otros también han reportado que el *knockdown* de p32 en líneas celulares de cáncer de mama MDA-MB-435 y MDA-MB-231, disminuye la proliferación de las células, y el efecto solo es evidente pasados 4 días [33].

Por ello, para determinar el efecto del *knockdown* de p32 en la proliferación celular, en nuestro modelo de estudio de colon, se realizaron ensayos con el compuesto CSFE. Los resultados demostraron que no existe diferencia en cuanto a proliferación, si se comparan las

células control contra las células que tienen bloqueada la expresión de p32, ni en células RKO (Fig. 13) ni en células SW480 (Fig. 14).

Por lo que se concluye, que la disminución de la expresión de p32 no afecta el estado de viabilidad o proliferación de estas células malignas de colon.

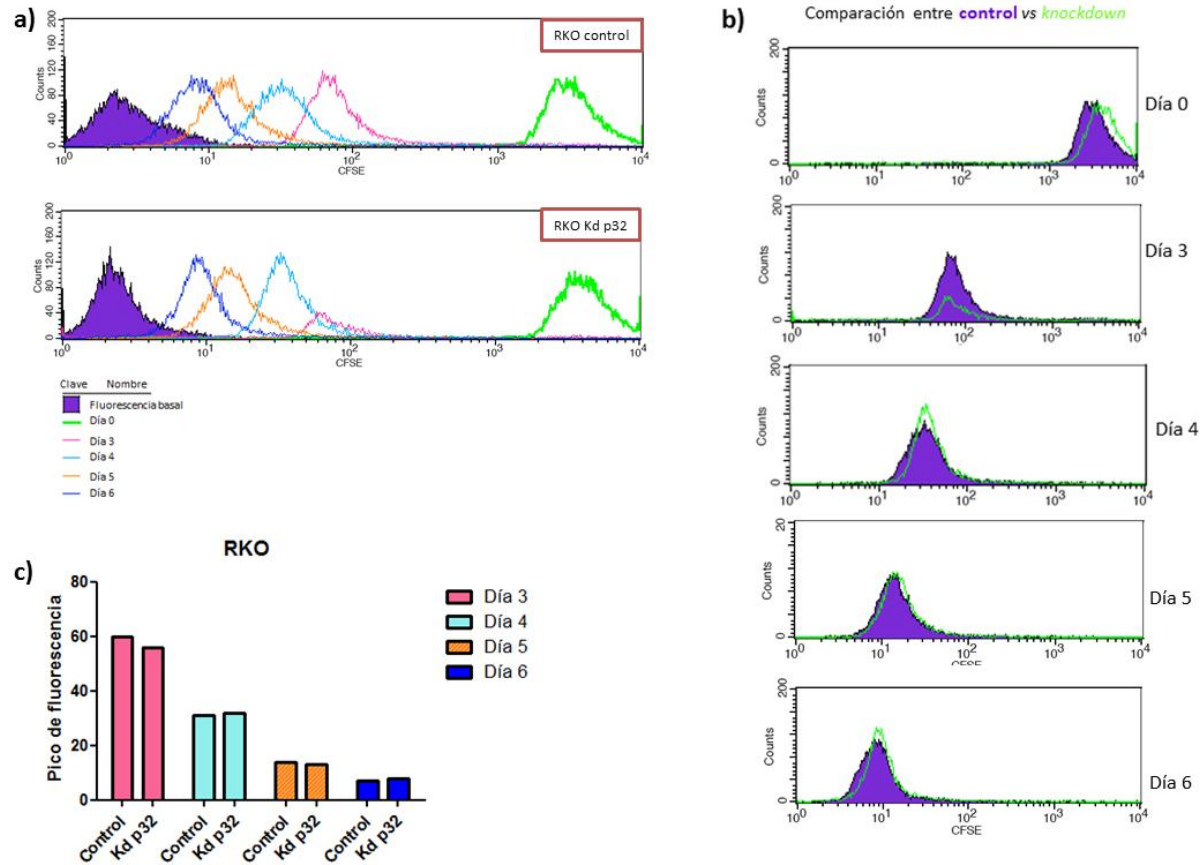


Figura 13. Ensayo de proliferación en las células RKO. En a), se muestra el histograma de las células control (arriba) y de las células con el *knockdown* de p32, a diferentes tiempos (día 0, 3, 4, 5 y 6); en b) se muestra la comparación de las células control vs el *knockdown* en los diferentes tiempos. En c), se graficaron los picos de fluorescencia para comparar los diferentes tiempos. Se muestra un experimento de dos realizados.

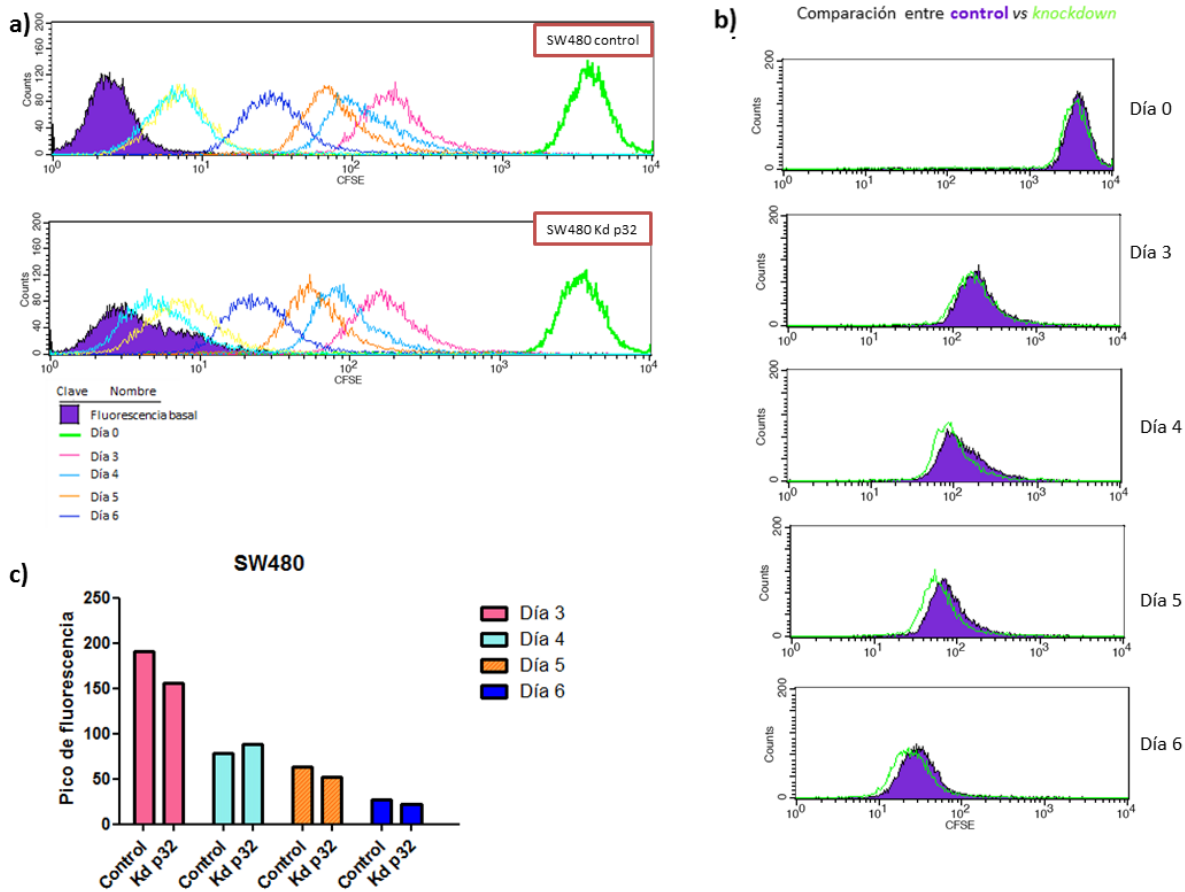


Figura 14. Ensayo de proliferación en las células SW480. En a), se muestra el histograma de las células control (arriba) y de las células con el *knockdown* de p32, a diferentes tiempos (día 0, 3, 4, 5 y 6); en b) se muestra la comparación de las células control vs el *knockdown* en los diferentes tiempos. En c), se graficaron los picos de fluorescencia para comparar los diferentes tiempos. Se muestra un experimento de dos realizados.

7.5. Efecto de p32 en la expresión génica

Para conocer si el bloqueo de la expresión de p32 afectaba la expresión de otros genes, se realizó un análisis por microarreglos. En este análisis, se comparó la expresión de las células de cáncer de colon RKO *versus* células de cáncer de colon RKO con el *knockdown* de p32. Los resultados determinaron que 96 secuencias cambiaron su expresión en las células con el *knockdown* de p32: 54 aumentaron los niveles y 42 disminuyeron sus niveles; de los cuales la mayoría de los genes que cambiaron su expresión están asociados al metabolismo de lípidos, bioquímica de moléculas pequeñas y expresión de genes (véase en anexos los datos completos, tabla 1).

Para validar los microarreglos, se realizaron ensayos de RT-PCR en las células RKO control y con el *knockdown* de p32. Se analizaron 2 genes que según los datos de los microarreglos disminuyeron su expresión (HAS2 y p32) y 2 genes que aumentaron su expresión (TNSF15 y HOOK1). Los resultados del RT-PCR (Fig. 16) concuerdan con los datos obtenidos en los microarreglos, donde la expresión de HAS2 y p32 es menor y la expresión de TNSF15 y HOOK1 aumenta en las células con el *knockdown* de p32, en comparación con las células RKO control; confirmando de ésta manera los resultados obtenidos de los microarreglos

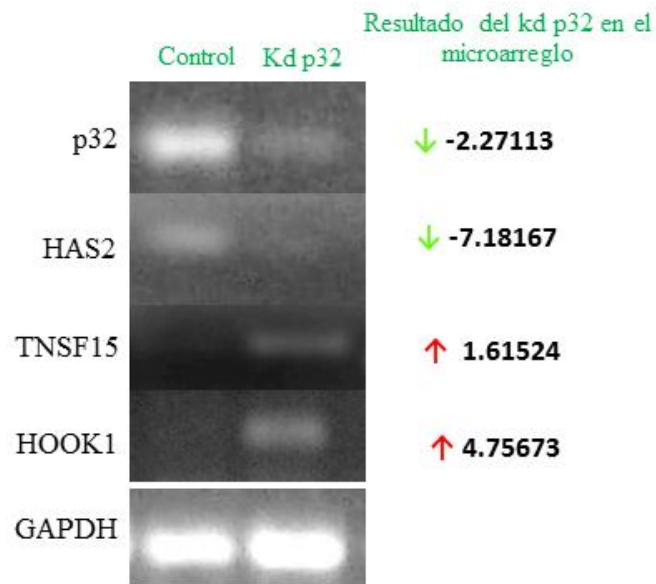


Figura 15. Resultados de RT-PCR en células RKO. Se muestran los resultados obtenidos del RT-PCR para distintos genes; del lado derecho se muestran los datos numéricos para cada gen, obtenidos del análisis por microarreglos.

Una vez confirmados los datos de los microarreglos, se decidió analizar sólo los genes que cambiaron su expresión asociados al fenotipo maligno. Haciendo uso del programa bioinformático IPA, encontramos 8 genes desregulados asociados a funciones específicas del fenotipo maligno: C1QBP (P32), GLDC, HAS2, IL18, MSR1, PDCD4, PLAU y TNC (Tabla 1 y 2).

Símbolo	Nombre completo	RefSeq	Cambio en el <i>knockdown</i>	Localización	Tipo
HAS2	Sintasa 2 de ácido hialurónico	NM_005328	↓ -7.18167	Membrana plasmática	Enzima
C1QBP (P32)	Componente 1 del complemento, proteína de unión al subcomponente q	NM_001212	↓ -2.27113	Citoplasma	Regulador transcripcional
MSR1	Receptor 1 de macrófagos <i>scavenger</i>	NM_002445	↓ -1.60717	Membrana plasmática	Receptor transmembranal
IL18	Interleucina 18	NM_001562	↓ -1.53097	Espacio extracelular	Citosina
PDCD4	Muerte celular programada 4 (Inhibidor de la transformación neoplásica)	NM_145341	↑ 1.59161	Núcleo	Otro
GLDC	Deshidrogenasa de glicina (descarboxilasa)	NM_000170	↑ 1.66926	Citoplasma	Enzima
PLAU	Activador del plasminógeno, uroquinasa	NM_002658	↑ 1.71189	Espacio extracelular	Peptidasa
TNC	Tenascina C	NM_002160	↑ 1.81644	Espacio extracelular	Otro

Tabla 1. Genes asociados al fenotipo maligno que cambiaron su expresión cuando se bloquea la expresión de p32, en las células RKO. La tabla muestra el símbolo oficial, el nombre completo del gen y la secuencia referencial utilizada en los microarreglos. También se muestra el número de veces que cambio su expresión el gen, en comparación con las células control. Finalmente se proporciona la localización y el tipo de proteína.

Símbolo	Función
C1QBP (P32)	Es una proteína multifuncional y multicompartimental envuelta en procesos como inflamación e infección, biogénesis de ribosomas, regulación de la apoptosis, regulación transcripcional y splicing del pre-mRNA. En la superficie celular, se piensa que actúa como un receptor de proteínas plasmáticas..
HAS2	Es miembro de la familia de las sintetizas de ácido hialurónico,(HA) el cual es un constituyente de matriz extracelular. El HA, es una polisacárido de alto peso molecular. El HA es sintetizado por las proteínas HAS unidas a la membrana plasmática, y las cadenas son extruidas a través de estructuras tipo poro. El HA tiene varias funciones incluyendo, llenar espacio, proveer una matriz para la migración, y es activamente producido por las células durante el <i>wound healing</i> y reparación del tejido.
PLAU	Codifica una serina proteasa la cual esta asociada a la degradación de la matriz extracelular y posiblemente a migración tumoral y proliferación. Esta proteína corta específicamente el plasminógeno para formar la enzima activa plasminina.
TNC	Codifica para una proteína de matriz extracelular implicada en guiar a las neuronas que migran así como a los axones durante el desarrollo, plasticidad sináptica y regeneración neuronal. Promueve el crecimiento de neuritas y es ligando de algunas integrinas.
GLDC	La proteína codificada por este gen es una proteína P (descarboxilasa de glicina dependiente de fosfato), la cual es parte del sistema que cataliza la degradación de la glicina.
IL18	La proteína codificada por este gen es una citosina pro-inflamatoria que aumenta la actividad de células NK y estimula la producción de interferón gamma en las células TH1.
MSR1	Este gen codifica la clase A de receptores en macrófagos <i>scavenger</i> , que incluye 3 diferentes isoformas generadas por <i>splicing</i> alternativo. Estos receptores o isoformas, son glicoproteínas integrales de membrana, y han sido implicadas en diversos procesos patológicos asociados a disfunción de macrófagos. Estos receptores median la endocitosis de un grupo diverso de macromoléculas, incluyendo lipoproteínas de baja densidad (LDL), excepto la isoforma III.
PDCD4	La proteína inhibe la iniciación de la traducción y la traducción cap-dependiente. Puede ejercer su función dificultando la interacción entre EIF4A y EIF4G. Inhibe la actividad helicasa de EIF4A. Modula la activación de la cinasa JUN. Regula negativamente la expresión de MAP4K1, inhibiendo así eventos importantes para llevar a cabo la invasión. Pudiera jugar un rol importante en apoptosis, como supresor tumoral.

Tabla 2. Funciones de los genes asociados al fenotipo maligno, que cambiaron su expresión cuando se bloquea la expresión de p32 en las células RKO. La información fue obtenida de la base de datos GenCards (<http://www.genecards.org/>).

La red también muestra que la transformación de células troncales tiene una posible activación, ya que GLDC que induce ésta activación, está regulado positivamente cuando se bloquea la expresión de p32. Asimismo, el potencial metastásico está regulado positivamente, ya que a pesar de que los inductores de metástasis IL18 y C1QBP están regulados negativamente, PLAU (otro inductor) está regulado positivamente,

La red también muestra que procesos como: la tumorigénesis de las células, formación de carcinoma, e invasión tisular, tienen señales de activación e inhibición cuando se bloquea la expresión de p32, por lo que no se puede predecir el efecto del bloqueo de p32.

7.6. Efecto de p32 en la capacidad tumorigénica

Finalmente, para investigar el papel que juega el bloqueo de la expresión de p32 *in vivo* y con base en los datos obtenidos de que el bloqueo de la expresión de p32 tiene efectos negativos en la capacidad de migración de las células y en la expresión de genes implicados en el fenotipo tumoral, se realizaron xenotransplantes de células a ratones inmunocomprometidos (nu/nu). Se utilizaron ambas líneas celulares RKO y SW480 con sus respectivos *knockdowns*.

Las células con el *knockdown* de p32 se inyectaron subcutáneamente en los flancos derechos de cada ratón. En los mismos animales se inyectaron en los flancos izquierdos, células control (expresando p32). Después de cuatro semanas, se sacrificaron los ratones, se removieron los tumores y se pesaron.

Los resultados con las células RKO (Fig. 17) demostraron que el bloqueo de la expresión de p32, inhibe severamente *in vivo* la capacidad tumorigénica de las células cancerígenas, pues en todos los casos el tumor fue mayor del lado izquierdo donde se inyectaron células control, con un peso promedio de 0.331 gr. En contraste, el lado derecho donde se inyectaron las células con *knockdown* de p32, sólo los ratones 4 y 6 formaron un pequeño tumor con un peso promedio de 0.030 gr. Se realizó un análisis estadístico *t-student* ($\alpha=0.05$) comparando los pesos entre los tumores derivados de las células control vs las células con el *knockdown* de p32, los resultados demostraron una diferencia estadística significativa.

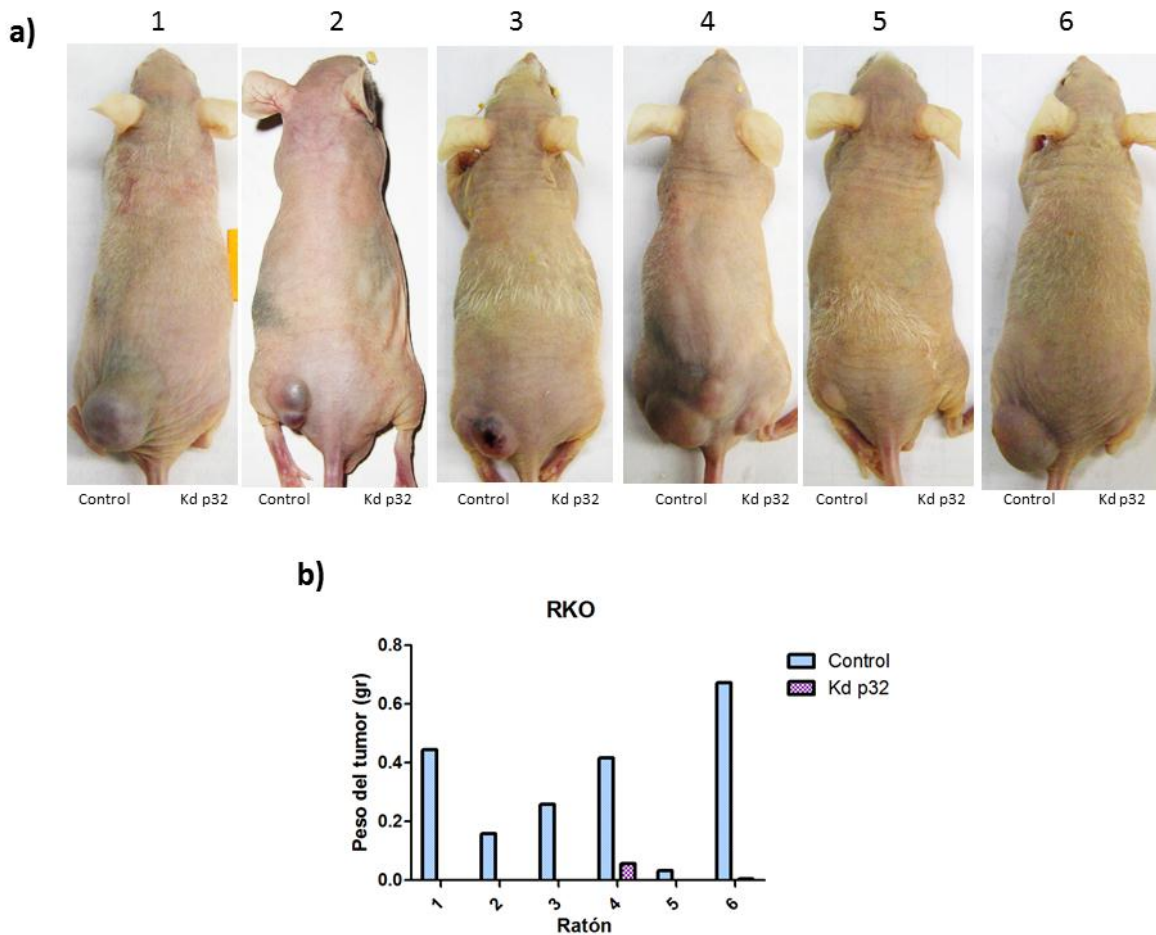


Figura 17. Ensayo de capacidad tumorigénica en ratones inmunocomprometidos utilizando las células RKO. En a) se muestran los 6 ratones inoculados con las células RKO control (lado izquierdo) y RKO con el *knockdown* de p32 (lado derecho). En b) se muestra la grafica de los pesos de los tumores por cada ratón.

Utilizando las células SW480, los resultados mostraron como se aprecia en la figura 18, que cuatro ratones (3, 4, 6, y 8) mostraron un tumor mayor del lado izquierdo, es decir donde se inyectaron células control. En contraste sólo dos ratones (1 y 9) mostraron un tumor mayor del lado derecho (células inyectadas con el *knockdown*).

En la figura 18a también se aprecia que los ratones 2, 5, 7 y 10 no formaron tumores de gran tamaño, ni con células control, ni con células *knockdown*. Incluso estos ratones se mantuvieron hasta por 6 semanas, sin cambio alguno.

En los ratones inyectados con células SW480, el peso promedio de los tumores del lado izquierdo donde se inyectaron células control, fue de 0.287 gr., en contraste, el peso promedio del lado derecho donde se inyectaron las células con *knockdown* de p32 fue de 0.199 gr. Se

realizó un análisis estadístico *t-student* ($\alpha=0.05$) comparando los pesos entre los tumores derivados de las células control vs las células con el *knockdown* de p32, los resultados no fueron significativos ($p=0.475$).

Cabe mencionar que dos ratones fueron excluidos del análisis. Uno de ellos presentó un absceso en el ojo (figura 18c) y otro ratón presentó nódulos en el aparato digestivo (figura 18d), lo cual pudiera ser signo de metástasis.

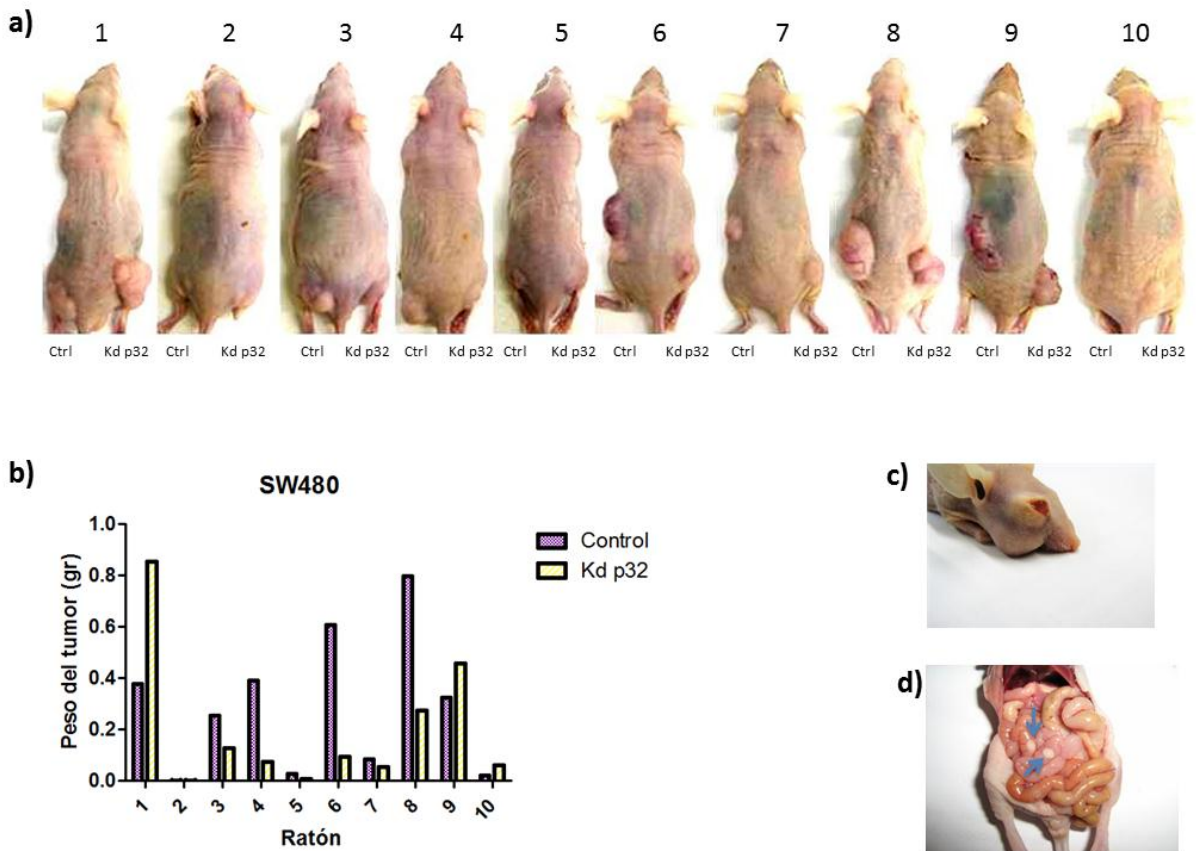


Figura 18. Ensayo de capacidad tumorigénica en ratones inmunocomprometidos utilizando células SW480. En a) se muestran 10 de los 12 ratones inoculados con las células RKO control (lado izquierdo) y RKO con el *knockdown* de p32 (lado derecho). En b) se muestra la gráfica de los pesos de los tumores por cada ratón. Las fotografías de c) y d), muestran 2 ratones que fueron excluidos del análisis por aparición de absceso en el ojo (c) y signos de metástasis (d), los nódulos se muestran con las flechas azules.

8. DISCUSIÓN

La proteína p32 se localiza en múltiples compartimentos celulares, interactúa con gran cantidad de proteínas, y es altamente conservada en la escala evolutiva; lo que sugiere sus probables implicaciones en diversos procesos biológicos. En el caso específico de cáncer, los datos acumulados hasta el momento, indican que p32 se sobreexpresa en células cancerígenas y contribuye al fenotipo maligno; sin embargo estos estudios proponen diferentes papeles para esta proteína durante la tumorigénesis.

En este estudio reportamos que, en dos líneas celulares malignas de colon, RKO y SW480, la proteína p32 se encuentra sobreexpresada en comparación con las células no cancerígenas de colon 112CoN (Fig. 6). También se comprobó mediante citometría de flujo, western blot y RT-PCR, la disminución de la expresión de p32 en ambas líneas celulares que contenían el shRNA que expresan un shRNA con actividad contra el mRNA para p32 (Fig. 9). Posteriormente se estudió del papel de la proteína p32 (gC1qR) en el mantenimiento del fenotipo maligno de estas líneas celulares de cáncer de colon, mediante ensayos para medir lactato, proliferación, viabilidad, cambios en la expresión génica y capacidad tumorigénica.

Como primer análisis, se estudió el papel de p32 en el metabolismo canceroso. Se sabe que en la mayoría de las células cancerosas ocurre una reprogramación de su metabolismo, para convertirlo a un metabolismo reductor, que favorece la biosíntesis de macromoléculas, en vez de que se lleve a cabo la oxidación completa de las moléculas combustibles en el clásico metabolismo oxidativo. Esto hace que en las células cancerosas la glucosa sea degradada preferencialmente a lactato, incluso en presencia de oxígeno, lo que se conoce como efecto Warburg o glucólisis aeróbica. Este tipo de metabolismo ofrece muchas ventajas de supervivencia a las células malignas, y además porque frecuentemente los tumores, al crecer tan rápido y no desarrollar vasos sanguíneos de manera adecuada, están sometidos a condiciones de hipoxia [40]. En el año 2010 se reportó que el *knockdown* de p32, en líneas celulares de cáncer de mama, aumenta éste tipo de metabolismo [33]. Sin embargo nuestros resultados mostraron que en las líneas células de cáncer de colon RKO y SW480, cuando se bloquea la expresión de p32, los niveles de lactato no cambian en comparación con las células control que sobre-expresan p32 (Fig. 10). Por lo tanto, el papel de p32 en ésta característica del fenotipo maligno pudiera ser tejido-dependiente.

Posteriormente se analizó la capacidad de migración de las células cuando se bloquea la expresión de p32. Estudios previos habían reportado que p32 pudiera estar involucrado en la capacidad de migración de las células cancerígenas, a través de la interacción ligando-receptor con la integrina $\alpha_v\beta_v$ activando así la vía NF-kappa B [15] o siendo esencial para la formación de lamelipodios, ya que se ha visto que es capaz de unirse a *lipid rafts* asociados a proteínas como CD44 o ezrin, las cuales están ampliamente descritas en procesos de migración [20]. Nuestros resultados con ensayos de *wound healing* (Fig. 11) mostraron que las células malignas control que sobreexpresan p32, migran más rápido que las células a las que se les bloqueó de manera estable la expresión de p32; lo cual concuerda con los reportes previos y deja claro que p32 es importante para la migración celular.

Por otro lado, algunos autores han reportado en fibroblastos normales, o en cáncer de hígado, que p32 pudiera estar implicado en la activación de algunas vías como AKT [47] o MAP cinasas [27], que regulan proliferación y viabilidad de las células. Incluso, otros reportes mencionan que cuando se bloquea la expresión de p32 en células de cáncer de pulmón [20] o mama [33], la proliferación disminuye. Debido a ello, se realizaron ensayos para medir proliferación y viabilidad. Sin embargo, nuestros datos, mostraron que no existen diferencias en cuanto a proliferación (Fig. 13 y 14) o en cuanto a la viabilidad de las células (Fig. 12), cuando se comparan las células control vs células con *knockdown* de p32. Por lo tanto, concluimos de estos resultados, que en las células cáncer de colon, p32 puede no tener un papel preponderante en proliferación y viabilidad celular, pero sí en la promoción de características más agresivas del tumor, como es el caso de la capacidad de migrar para promover metástasis. Cabe recordar que el epitelio del colon posee una altísima tasa de proliferación, en comparación con otros tipos celulares, el cual ya contiene activas varias señales que regulan positivamente la proliferación, por lo que si p32 induce de alguna manera señales para proliferación, estas serían irrelevantes en un epitelio proliferante.

En cuanto al análisis de microarreglos en las células RKO, encontramos que 96 secuencias cambiaron su expresión de mRNA en las células con el *knockdown* de p32: 54 aumentaron los niveles y 42 disminuyeron sus niveles; de los cuales la mayoría de los genes que cambiaron su expresión están asociados al metabolismo de lípidos, bioquímica de moléculas pequeñas y expresión de genes.

Previamente se había asociado a p32 como regulador de la expresión génica. Por ejemplo, se ha reportado que interacciona e inhibe al factor de *splicing* ASF/SF2 [35], el cual se ha

reportado importante para el mantenimiento de la estabilidad genómica y expresión de isoformas de oncogenes y genes supresores tumorales [36,48]; también se ha reportado inhibe el factor de transcripción CBF/NF-Y [37], el cual tiene entre sus funciones, regular genes implicados en ciclo celular [49].

Gracias al análisis de los microarreglos, pudimos confirmar que p32 regula la expresión génica. Sin embargo, la asociación de p32 con la regulación de la expresión de genes asociados al metabolismo de lípidos y bioquímica de moléculas pequeñas es nueva.

El análisis de microarreglos mediante el programa IPA también permitió encontrar 8 genes asociados directamente al fenotipo canceroso; de los cuales 4 aumentaron su expresión (PDCD4, GLDC, PLAU y TNC) y 4 disminuyeron su expresión (P32, HAS2, IL18, MSR1) en las células RKO con el *knockdown* de p32.

Los datos obtenidos de la red creada *in silico* (Fig. 16), sugieren que cuando se bloquea la expresión de p32 en las células RKO, procesos importantes de la carcinogénesis como la transformación del mesénquima, hiperplasia, transformación celular, vascularización del tumor, crecimiento tumoral y reacción citotóxica hacia las células tumorales, son procesos que probablemente son inactivados o su efecto es disminuido cuando se bloquea la expresión de p32; resultado de que algunas proteínas que inhiben estos procesos aumentan su expresión (como TNC, PLAU o PDCD4) o porque la expresión de proteínas que inducen estos procesos está disminuida en el *knockdown* de p32 (como MSR1, CIQBP, o IL18).

Por ejemplo, una de los genes que aumentó su expresión es PDCD4, que codifica para una proteína que inhibe la iniciación de la traducción y la traducción cap-dependiente. Esta proteína regula negativamente la expresión de MAP4K1, inhibiendo así eventos importantes para llevar a cabo el proceso de invasión [50]. También se ha reportado que inhibe la progresión maligna y se ha propuesto como supresor tumoral [51]. Por lo tanto, su aumento de expresión en el *knockdown* de p32, estaría inhibiendo el proceso de invasión y la progresión maligna, lo cual correlaciona con nuestros datos sobre disminución de invasividad (Fig. 11) y tumorigénesis de las células con el *knockdown* de p32 (Fig. 17-18).

Otra proteína que aumentó su expresión es GLDC, la cual codifica para una descarboxilasa de glicina, que degrada éste aminoácido. Se ha reportado que GLDC es esencial para células iniciadoras de tumores o células troncales cancerosas, ya que induce cambios en la glicolisis y el metabolismo de glicina/serina [52]. Por lo tanto, su aumento de expresión en el

knockdown de p32, estaría promoviendo un cambio en el metabolismo energético; sin embargo esta reprogramación energética no fue evidente en nuestros ensayos (Fig. 10).

PLAU es otro gen que aumentó su expresión en las células RKO con el *knockdown* de p32. PLAU codifica para una serina proteasa uPA, la cual esta asociada a la degradación de la matriz extracelular. Existe evidencia de que ésta proteasa, induce procesos como migración y metástasis [53]. Sin embargo, otros reportes también mencionan que uPA es capaz de inhibir la vascularización del tumor y el crecimiento tumoral [54]. Por lo tanto, su aumento de expresión en el *knockdown* de p32, estaría induciendo migración y metástasis, pero inhibiendo procesos como vascularización y crecimiento tumoral.

TNC también es un gen que aumentó su expresión en las células que tienen bloqueada la expresión de p32. TNC codifica para la tenascina C, una proteína de matriz extracelular la cual ha sido implicada en el proceso carcinogénico y se le ha clasificado como un oncogen. Los reportes, también indican que la tenascina C pudiera ser capaz de inhibir el crecimiento tumoral [55]. Por lo tanto, su aumento de expresión en el *knockdown* de p32, pudiera estar inhibiendo el crecimiento tumoral.

Por otro lado, uno de los genes que disminuyó su expresión fue IL18. Este gen codifica para una citosina pro-inflamatoria que en general, aumenta la actividad de células NK y estimula la producción de interferón gamma en las células TH1. Estas células eliminan células cancerosas eficientemente. Sin embargo, también se ha reportado que IL18 promueve la progresión tumoral induciendo angiogénesis, migración, metástasis y proliferación cuando se encuentra sobre-expresado [56]. Su disminución en el *knockdown* de p32, pudiera por lo tanto estar evitando el potencial maligno que ejerce IL18 cuando está sobre-expresado.

MSR1 también es un gen que disminuyó su expresión en las células RKO con el *knockdown* de p32. Este gen codifica la clase A de receptores en macrófagos *scavenger*, que incluye 3 diferentes isoformas generadas por *splicing* alternativo. Estos receptores o isoformas, son glicoproteínas integrales de membrana, y han sido implicadas en diversos procesos patológicos asociados a disfunción de macrófagos e inducción de hiperplasias en próstata [57].

Un dato destacable es el cambio en la expresión de HAS2, el cual disminuye aproximadamente 7 veces su expresión cuando se bloquea la expresión de p32 en las células RKO. HAS2 codifica para una sintasa de ácido hialurónico (HA), el cual es un componente esencial de la matriz

extracelular. El HA es importante para el ensamblaje de la matriz, proliferación y migración celular. Sin embargo, también juega un papel importante en la progresión tumoral. Se ha demostrado que el HA se encuentra sobre-expresado en varios tipos de tumores, incluyendo cáncer de colon; y se ha correlacionado una alta producción de HA con mayor actividad invasiva y metastásica. También se ha implicado en la angiogénesis tumoral, y se ha sugerido que altos niveles de HA podrían promover crecimiento anclaje-dependiente y tumorigénesis [58]. Nuestros resultados de los microarreglos (Tabla 1), así como los resultados por RT-PCR (Fig. 15), demostraron que la enzima HAS2 encargada de sintetizar HA, disminuye en gran manera su expresión cuando se bloquea la expresión de p32. Por lo tanto, se esperaría que las células *knockdown* de p32 expresaran menos HA, en comparación con las células control; resultando así en efectos negativos en cuanto a la migración, progresión tumoral, capacidad invasiva, crecimiento anclaje-dependiente, etc., lo cual correlaciona con nuestros datos sobre disminución de invasividad (Fig. 11) y tumorigénesis de las células con el *knockdown* de p32 (Figs. 17-18), ya que tienen menor capacidad tumorigénica aquellas células que tienen bloqueada la expresión de p32 y disminuida la expresión de HAS2.

Finalmente los datos obtenidos de los xenotransplantes en ratones inmunocomprometidos con células RKO, demostraron que p32 es una proteína implicada en la formación de los tumores, es decir, en la carcinogénesis, ya que en los resultados se obtuvo un tumor más pequeño donde las células inyectadas tenían bloqueada la expresión de p32 (Fig. 17).

Estos resultados son congruentes con los resultados en los que se observó que aunque no existe diferencia en cuanto a proliferación (Figs. 13-14) de las células control vs las células con el *knockdown* de p32, sí hay diferencias en la capacidad de promover la migración (característica importante para la generación de un tumor) (Fig. 11), y hay cambios en la expresión de genes asociados al fenotipo maligno (tabla 1) que pudieran favorecer la formación del tumor, como por ejemplo el aumento de HAS2 (sintasa de matriz extracelular).

Cabe señalar que los resultados entre capacidad tumorigénica de las células *knockdown* vs las células control, fue contundente en las células RKO (Fig.17); sin embargo el resultado no fue claro en las células SW480 (Fig.18). Los resultados mostraron que 3 de los 10 ratones inyectados con células SW480, no formaron tumores tan evidentes, ni con células control, ni con células *knockdown*. En estos ratones la diferencia pudo deberse a que la inyección subcutánea de las células no fue correcta, aunque no se puede descartar que las diferencias en los resultados entre las células RKO y las SW480, pudiera deberse a que se trata de dos líneas

con un fondo genético distinto que respondan diferente ante el bloqueo de la expresión de p32.

Los resultados en conjunto muestran que p32 tiene implicaciones directas en migración de las células cancerosas, expresión de genes asociados a cáncer y capacidad tumorigénica; y por tanto es importante en la promoción de un fenotipo maligno agresivo metastásico, lo que lo convierte en un posible blanco terapéutico contra el cáncer.

9. CONCLUSIONES

Con base en los resultados obtenidos concluimos que la proteína p32 se sobreexpresa en las líneas celulares cancerígenas de colon RKO y SW480, y que las células con el *knockdown* de p32 presentan baja expresión, a nivel tanto de mensajero como de la proteína.

También demostramos que el bloqueo de la expresión de p32 en nuestro modelo de estudio no tiene efecto en la producción de lactato de las células analizadas. Tampoco se encontraron diferencias en cuanto a viabilidad y proliferación, cuando se comparan las células con el *knockdown* de p32 y las células control.

Sin embargo, además de las diferencias encontradas previamente en el laboratorio en cuanto a la resistencia a apoptosis, se encontraron diferencias en la capacidad de migración celular, siendo evidente que p32 juega un papel importante en este proceso ya que el bloqueo de su expresión, disminuye ésta capacidad en las células.

Demostramos también que el bloqueo de la expresión de p32 en las células RKO, induce cambios en la expresión génica. En este mismo sentido, los resultados también indicaron que el bloqueo de p32 modifica la expresión de 8 genes asociados a cáncer, los cuales pudieran explicar el fenotipo maligno asociado a p32.

Finalmente concluimos que p32 juega un papel importante en la capacidad tumorigénica de las células de cáncer de colon in vivo, ya que en los experimentos de xenotransplantes en ratones, disminuyo significativamente la formación de tumores cuando las células inyectadas tenían bloqueada la expresión de p32.

En conjunto, nuestros datos sugieren que p32 está implicada en la progresión maligna e invasividad en nuestro modelo de estudio de cáncer de colon, más que en el mantenimiento del metabolismo y proliferación celular de las células cancerosas.

10. PERSPECTIVAS

Poco se sabe sobre la proteína p32 e incluso su función principal aun no ha sido determinada. Aun queda mucho por conocer sobre las funciones de p32, entre las incógnitas aun presentes están por ejemplo, determinar su función específica en la mitocondria o núcleo, determinar si es capaz de generar un poro, y si es así, que tipo de moléculas atraviesan este poro.

En el caso específico de la tumorigénesis, queda aun inconcluso, por ejemplo, si pudiera ser esencial durante el proceso de metástasis, o si su simple mutación en una célula no tumoral es capaz de transformar a éstas. Además sería importante analizar en otro modelo (diferente de colon) los mismos parámetros analizados en ésta tesis que ayuden a esclarecer incongruencias entre reportes.

Sólo nuevas investigaciones darán respuesta a las incógnitas de p32, que nos permitirán en algún momento, utilizar esta proteína como marcador tumoral o incluso ser utilizada como blanco terapéutico contra el cáncer.

11. REFERENCIAS

- [1] A. Gregorieff, D. Pinto, H. Begthel, O. Destree, M. Kielman, H. Clevers, Expression pattern of Wnt signaling components in the adult intestine, *Gastroenterology* 129 (2005) 626-638.
- [2] B. Vogelstein, K.W. Kinzler, Cancer genes and the pathways they control, *Nat Med* 10 (2004) 789-799.
- [3] E. Sancho, E. Batlle, H. Clevers, Signaling pathways in intestinal development and cancer, *Annu Rev Cell Dev Biol* 20 (2004) 695-723.
- [4] D.B. Rubinstein, A. Stortchevoi, M. Boosalis, R. Ashfaq, B. Ghebrehiwet, E.I. Peerschke, F. Calvo, T. Guillaume, Receptor for the globular heads of C1q (gC1q-R, p33, hyaluronan-binding protein) is preferentially expressed by adenocarcinoma cells, *Int J Cancer* 110 (2004) 741-750.
- [5] J. Jiang, Y. Zhang, A.R. Krainer, R.M. Xu, Crystal structure of human p32, a doughnut-shaped acidic mitochondrial matrix protein, *Proc Natl Acad Sci U S A* 96 (1999) 3572-3577.
- [6] B. Ghebrehiwet, J. Jesty, R. Vinayagasundaram, U. Vinayagasundaram, Y. Ji, A. Valentino, N. Tumma, K.H. Hosszu, E.I. Peerschke, Targeting gC1qR Domains for Therapy Against Infection and Inflammation, *Adv Exp Med Biol* 734 (2013) 97-110.
- [7] A.R. Krainer, A. Mayeda, D. Kozak, G. Binns, Functional expression of cloned human splicing factor SF2: homology to RNA-binding proteins, U1 70K, and *Drosophila* splicing regulators, *Cell* 66 (1991) 383-394.
- [8] S. Gupta, R.B. Batchu, K. Datta, Purification, partial characterization of rat kidney hyaluronic acid binding protein and its localization on the cell surface, *Eur J Cell Biol* 56 (1991) 58-67.
- [9] B. Ghebrehiwet, B.L. Lim, E.I. Peerschke, A.C. Willis, K.B. Reid, Isolation, cDNA cloning, and overexpression of a 33-kD cell surface glycoprotein that binds to the globular "heads" of C1q, *J Exp Med* 179 (1994) 1809-1821.
- [10] M. Majumdar, A. Bharadwaj, I. Ghosh, S. Ramachandran, K. Datta, Evidence for the presence of HABP1 pseudogene in multiple locations of mammalian genome, *DNA Cell Biol* 21 (2002) 727-735.
- [11] S. Das, T.B. Deb, R. Kumar, K. Datta, Multifunctional activities of human fibroblast 34-kDa hyaluronic acid-binding protein, *Gene* 190 (1997) 223-225.
- [12] T. Muta, D. Kang, S. Kitajima, T. Fujiwara, N. Hamasaki, p32 protein, a splicing factor 2-associated protein, is localized in mitochondrial matrix and is functionally important in maintaining oxidative phosphorylation, *J Biol Chem* 272 (1997) 24363-24370.
- [13] J. Dedio, W. Jahnen-Dechent, M. Bachmann, W. Muller-Esterl, The multiligand-binding protein gC1qR, putative C1q receptor, is a mitochondrial protein, *J Immunol* 160 (1998) 3534-3542.
- [14] B.J. Soltys, D. Kang, R.S. Gupta, Localization of P32 protein (gC1q-R) in mitochondria and at specific extramitochondrial locations in normal tissues, *Histochem Cell Biol* 114 (2000) 245-255.
- [15] M. Prakash, S. Kale, I. Ghosh, G.C. Kundu, K. Datta, Hyaluronan-binding protein 1 (HABP1/p32/gC1qR) induces melanoma cell migration and tumor growth by NF-kappa B dependent MMP-2 activation through integrin alpha(v)beta(3) interaction, *Cell Signal* 23 (2011) 1563-1577.
- [16] C. Claus, S. Chey, S. Heinrich, M. Reins, B. Richardt, S. Pinkert, H. Fechner, F. Gaunitz, I. Schafer, P. Seibel, U.G. Liebert, Involvement of p32 and microtubules in alteration of mitochondrial functions by rubella virus, *J Virol* 85 (2011) 3881-3892.

- [17] P. Storz, A. Hausser, G. Link, J. Dedio, B. Ghebrehiwet, K. Pfizenmaier, F.J. Johannes, Protein kinase C [micro] is regulated by the multifunctional chaperon protein p32, *J Biol Chem* 275 (2000) 24601-24607.
- [18] M. Majumdar, J. Meenakshi, S.K. Goswami, K. Datta, Hyaluronan binding protein 1 (HABP1)/C1QBP/p32 is an endogenous substrate for MAP kinase and is translocated to the nucleus upon mitogenic stimulation, *Biochem Biophys Res Commun* 291 (2002) 829-837.
- [19] H. Wu, H. Sun, X. Liang, W.F. Lima, S.T. Croke, Human RNase H1 Is Associated with Protein P32 and Is Involved in Mitochondrial Pre-rRNA Processing, *PLoS One* 8 (2013) e71006.
- [20] K.B. Kim, J.S. Yi, N. Nguyen, J.H. Lee, Y.C. Kwon, B.Y. Ahn, H. Cho, Y.K. Kim, H.J. Yoo, J.S. Lee, Y.G. Ko, Cell-surface receptor for complement component C1q (gC1qR) is a key regulator for lamellipodia formation and cancer metastasis, *J Biol Chem* 286 (2011) 23093-23101.
- [21] K.B. Kim, B.W. Kim, H.J. Choo, Y.C. Kwon, B.Y. Ahn, J.S. Choi, J.S. Lee, Y.G. Ko, Proteome analysis of adipocyte lipid rafts reveals that gC1qR plays essential roles in adipogenesis and insulin signal transduction, *Proteomics* 9 (2009) 2373-2382.
- [22] R. Amamoto, M. Yagi, Y. Song, Y. Oda, M. Tsuneyoshi, S. Naito, A. Yokomizo, K. Kuroiwa, S. Tokunaga, S. Kato, H. Hiura, T. Samori, D. Kang, T. Uchiumi, Mitochondrial p32/C1QBP is highly expressed in prostate cancer and is associated with shorter prostate-specific antigen relapse time after radical prostatectomy, *Cancer Sci* 102 (2011) 639-647.
- [23] G. Yu, J. Wang, Significance of hyaluronan binding protein (HABP1/P32/gC1qR) expression in advanced serous ovarian cancer patients, *Exp Mol Pathol* 94 210-215.
- [24] X. Zhang, F. Zhang, L. Guo, Y. Wang, P. Zhang, R. Wang, N. Zhang, R. Chen, Interactome Analysis Reveals that C1QBP is Associated with Cancer Cell Chemotaxis and Metastasis, *Mol Cell Proteomics* (2013).
- [25] W.X. Guo, B. Ghebrehiwet, B. Weksler, K. Schweitzer, E.I. Peerschke, Up-regulation of endothelial cell binding proteins/receptors for complement component C1q by inflammatory cytokines, *J Lab Clin Med* 133 (1999) 541-550.
- [26] A. Kamal, K. Datta, Upregulation of hyaluronan binding protein 1 (HABP1/p32/gC1qR) is associated with Cisplatin induced apoptosis, *Apoptosis* 11 (2006) 861-874.
- [27] J. Meenakshi, Anupama, S.K. Goswami, K. Datta, Constitutive expression of hyaluronan binding protein 1 (HABP1/p32/gC1qR) in normal fibroblast cells perturbs its growth characteristics and induces apoptosis, *Biochem Biophys Res Commun* 300 (2003) 686-693.
- [28] A. Watthanasurorot, P. Jiravanichpaisal, K. Soderhall, I. Soderhall, A calreticulin/gC1qR complex prevents cells from dying: a conserved mechanism from arthropods to humans, *J Mol Cell Biol* 5 (2013) 120-131.
- [29] K. Itahana, H.V. Clegg, Y. Zhang, ARF in the mitochondria: the last frontier?, *Cell Cycle* 7 (2008) 3641-3646.
- [30] Y. Li, O.W. Wan, W. Xie, K.K. Chung, p32 regulates mitochondrial morphology and dynamics through parkin, *Neuroscience* 199 (2011) 346-358.
- [31] Z.L. Chen, P.Q. Gu, K. Liu, Y.J. Su, L.J. Gao, The globular heads of the C1q receptor regulate apoptosis in human cervical squamous carcinoma cells via a p53-dependent pathway, *J Transl Med* 10 (2012) 255.
- [32] A.R. Chowdhury, I. Ghosh, K. Datta, Excessive reactive oxygen species induces apoptosis in fibroblasts: role of mitochondrially accumulated hyaluronic acid binding protein 1 (HABP1/p32/gC1qR), *Exp Cell Res* 314 (2008) 651-667.
- [33] V. Fogal, A.D. Richardson, P.P. Karmali, I.E. Scheffler, J.W. Smith, E. Ruoslahti, Mitochondrial p32 protein is a critical regulator of tumor metabolism via maintenance of oxidative phosphorylation, *Mol Cell Biol* 30 (2010) 1303-1318.

- [34] R. Kaul, P. Saha, M. Saradhi, R.L. Prasad, S. Chatterjee, I. Ghosh, R.K. Tyagi, K. Datta, Overexpression of hyaluronan-binding protein 1 (HABP1/p32/gC1qR) in HepG2 cells leads to increased hyaluronan synthesis and cell proliferation by up-regulation of cyclin D1 in AKT-dependent pathway, *J Biol Chem* 287 (2012) 19750-19764.
- [35] S.K. Petersen-Mahrt, C. Estmer, C. Ohrmalm, D.A. Matthews, W.C. Russell, G. Akusjarvi, The splicing factor-associated protein, p32, regulates RNA splicing by inhibiting ASF/SF2 RNA binding and phosphorylation, *EMBO J* 18 (1999) 1014-1024.
- [36] R. Karni, E. de Stanchina, S.W. Lowe, R. Sinha, D. Mu, A.R. Krainer, The gene encoding the splicing factor SF2/ASF is a proto-oncogene, *Nat Struct Mol Biol* 14 (2007) 185-193.
- [37] C. Chattopadhyay, D. Hawke, R. Kobayashi, S.N. Maity, Human p32, interacts with B subunit of the CCAAT-binding factor, CBF/NF-Y, and inhibits CBF-mediated transcription activation in vitro, *Nucleic Acids Res* 32 (2004) 3632-3641.
- [38] M. Yagi, T. Uchiumi, S. Takazaki, B. Okuno, M. Nomura, S. Yoshida, T. Kanki, D. Kang, p32/gC1qR is indispensable for fetal development and mitochondrial translation: importance of its RNA-binding ability, *Nucleic Acids Res* 40 (2012) 9717-9737.
- [39] Z.Q. Yao, S.N. Waggoner, M.W. Cruise, C. Hall, X. Xie, D.W. Oldach, Y.S. Hahn, SOCS1 and SOCS3 are targeted by hepatitis C virus core/gC1qR ligation to inhibit T-cell function, *J Virol* 79 (2005) 15417-15429.
- [40] C.V. Dang, p32 (C1QBP) and cancer cell metabolism: is the Warburg effect a lot of hot air?, *Mol Cell Biol* 30 (2010) 1300-1302.
- [41] M.G. Vander Heiden, L.C. Cantley, C.B. Thompson, Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation, *Science* 324 (2009) 1029-1033.
- [42] R.A. Cairns, I.S. Harris, T.W. Mak, Regulation of cancer cell metabolism, *Nat Rev Cancer* 11 (2011) 85-95.
- [43] C.V. Dang, A. Le, P. Gao, MYC-induced cancer cell energy metabolism and therapeutic opportunities, *Clin Cancer Res* 15 (2009) 6479-6483.
- [44] L. Tirado-Gómez, A. Mohar Betancourt, *Epidemiología del cáncer de colon y recto*, SFGFD (2008).
- [45] L.H. Levkoff, G.P. Marshall, 2nd, H.H. Ross, M. Caldeira, B.A. Reynolds, M. Cakiroglu, C.L. Mariani, W.J. Streit, E.D. Laywell, Bromodeoxyuridine inhibits cancer cell proliferation in vitro and in vivo, *Neoplasia* 10 (2008) 804-816.
- [46] K. Itahana, Y. Zhang, Mitochondrial p32 is a critical mediator of ARF-induced apoptosis, *Cancer Cell* 13 (2008) 542-553.
- [47] R. Kaul, P. Saha, M. Saradhi, R.L. Prasad, S. Chatterjee, I. Ghosh, R.K. Tyagi, K. Datta, Overexpression of hyaluronan-binding protein 1 (HABP1/p32/gC1qR) in HepG2 cells leads to increased hyaluronan synthesis and cell proliferation by up-regulation of cyclin D1 in AKT-dependent pathway, *J Biol Chem* 287 (2011) 19750-19764.
- [48] X. Li, J.L. Manley, Inactivation of the SR protein splicing factor ASF/SF2 results in genomic instability, *Cell* 122 (2005) 365-378.
- [49] K. Matuoka, K. Yu Chen, Nuclear factor Y (NF-Y) and cellular senescence, *Exp Cell Res* 253 (1999) 365-371.
- [50] H.S. Yang, C.P. Matthews, T. Clair, Q. Wang, A.R. Baker, C.C. Li, T.H. Tan, N.H. Colburn, Tumorigenesis suppressor Pcd4 down-regulates mitogen-activated protein kinase kinase kinase 1 expression to suppress colon carcinoma cell invasion, *Mol Cell Biol* 26 (2006) 1297-1306.
- [51] A.P. Jansen, C.E. Camalier, N.H. Colburn, Epidermal expression of the translation inhibitor programmed cell death 4 suppresses tumorigenesis, *Cancer Res* 65 (2005) 6034-6041.

- [52] W.C. Zhang, N. Shyh-Chang, H. Yang, A. Rai, S. Umashankar, S. Ma, B.S. Soh, L.L. Sun, B.C. Tai, M.E. Nga, K.K. Bhakoo, S.R. Jayapal, M. Nichane, Q. Yu, D.A. Ahmed, C. Tan, W.P. Sing, J. Tam, A. Thirugananam, M.S. Noghabi, Y.H. Pang, H.S. Ang, W. Mitchell, P. Robson, P. Kaldis, R.A. Soo, S. Swarup, E.H. Lim, B. Lim, Glycine decarboxylase activity drives non-small cell lung cancer tumor-initiating cells and tumorigenesis, *Cell* 148 (2012) 259-272.
- [53] M.J. Duffy, Urokinase plasminogen activator and its inhibitor, PAI-1, as prognostic markers in breast cancer: from pilot to level 1 evidence studies, *Clin Chem* 48 (2002) 1194-1197.
- [54] K.K. Joshi, J.S. Nanda, P. Kumar, G. Sahni, Substrate kringle-mediated catalysis by the streptokinase-plasmin activator complex: critical contribution of kringle-4 revealed by the mutagenesis approaches, *Biochim Biophys Acta* 1824 (2012) 326-333.
- [55] G. Orend, W. Huang, M.A. Olayioye, N.E. Hynes, R. Chiquet-Ehrismann, Tenascin-C blocks cell-cycle progression of anchorage-dependent fibroblasts on fibronectin through inhibition of syndecan-4, *Oncogene* 22 (2003) 3917-3926.
- [56] S. Park, S. Cheon, D. Cho, The dual effects of interleukin-18 in tumor progression, *Cell Mol Immunol* 4 (2007) 329-335.
- [57] A.W. Hsing, L.C. Sakoda, J. Chen, A.P. Chokkalingam, I. Sesterhenn, Y.T. Gao, J. Xu, S.L. Zheng, MSR1 variants and the risks of prostate cancer and benign prostatic hyperplasia: a population-based study in China, *Carcinogenesis* 28 (2007) 2530-2536.
- [58] R. Kosaki, K. Watanabe, Y. Yamaguchi, Overproduction of hyaluronan by expression of the hyaluronan synthase Has2 enhances anchorage-independent growth and tumorigenicity, *Cancer Res* 59 (1999) 1141-1145.

12. ANEXOS

Figura 1. Efecto de la ciclosporina A, en la actividad de caspasa en líneas celulares con la expresión de p32 silenciada. Células no transfectadas (NT), células con el vector vacío (Sc) y células con el knockdown de p32 (p32).

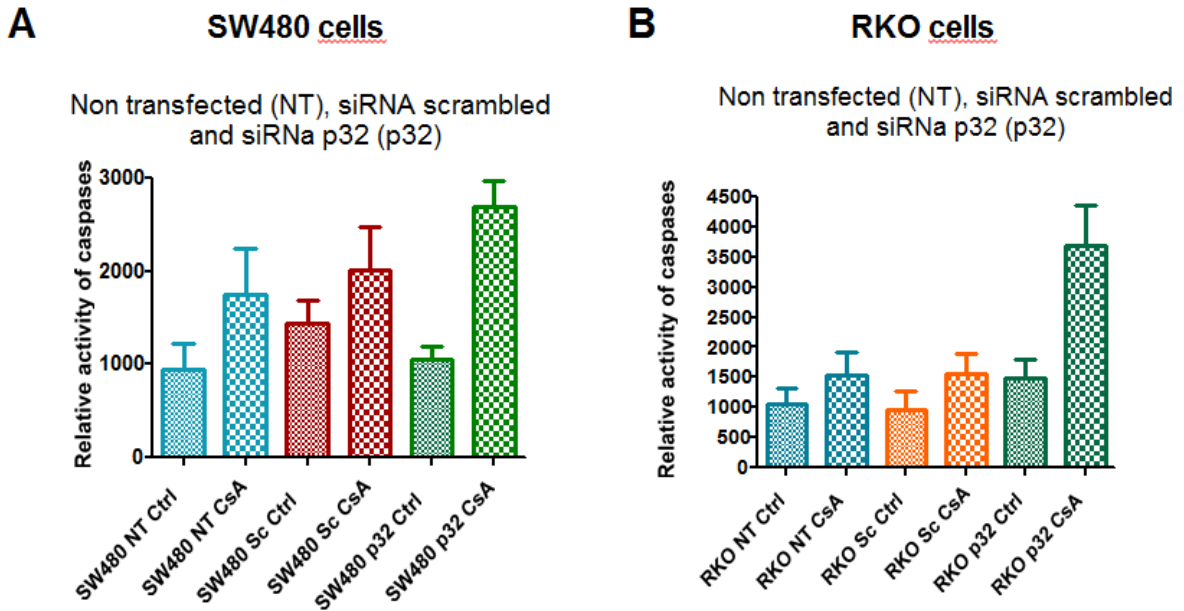


Figura 2. Se muestra la disminución en cuanto a la expresión de p32 analizada por citometría de flujo. Se graficó la fluorescencia media de cada uno de los análisis de las clonas tomando la fluorescencia de células RKO o SW480 respectivamente (control) como el 100% de fluorescencia.

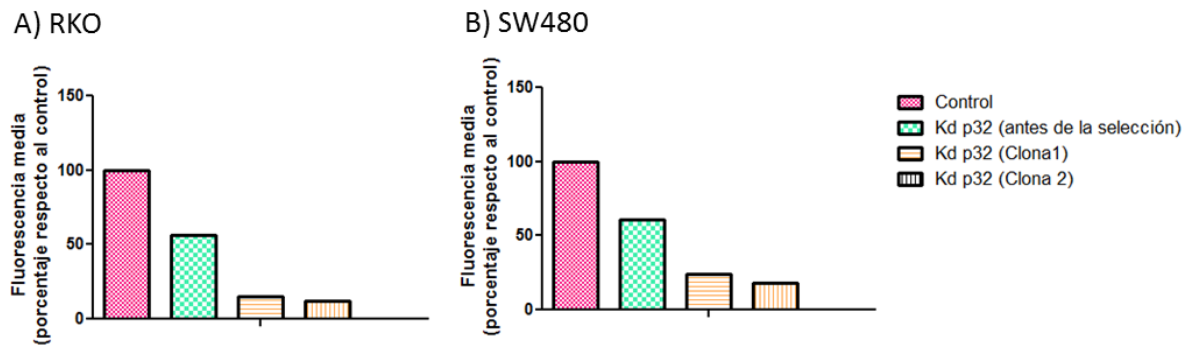


Tabla 1. Resultados completos del análisis por microarreglos de los genes que modificaron su expresión cuando se bloqueo la expresión de p32 en células RKO.

Asignación del Gen	Gen	Número de veces de cambio
NM_130808 // CPNE4 // copine IV // 3q22.1 // 131034 /// ENST00000357965 // CPNE4	CPNE4	-1.50045
NM_000121 // EPOR // erythropoietin receptor // 19p13.3-p13.2 // 2057 /// ENST00	EPOR	-1.50145
NM_033409 // C20orf54 // chromosome 20 open reading frame 54 // 20p13 // 113278	C20orf54	-1.50248
NM_003860 // BANF1 // barrier to autointegration factor 1 // 11q13.1 // 8815 ///	BANF1	-1.50661
NM_001080411 // ZNF433 // zinc finger protein 433 // 19p13.2 // 163059 /// BC047	ZNF433	-1.509
NM_001466 // FZD2 // frizzled homolog 2 (Drosophila) // 17q21.1 // 2535 /// ENST	FZD2	-1.51803
NM_024693 // ECHDC3 // enoyl Coenzyme A hydratase domain containing 3 // 10p14 /	ECHDC3	-1.52276
NM_021205 // RHOU // ras homolog gene family, member U // 1q42.11-q42.3 // 58480	RHOU	-1.52567
NM_004753 // DHRS3 // dehydrogenase/reductase (SDR family) member 3 // 1p36.1 //	HRS3	-1.52604
NM_007156 // ZXDA // zinc finger, X-linked, duplicated A // Xp11.1 // 7789 /// E	ZXDA	-1.52738
NM_001562 // IL18 // interleukin 18 (interferon-gamma-inducing factor) // 11q22.	IL18	-1.53097
NM_005913 // MC5R // melanocortin 5 receptor // 18p11.2 // 4161 /// ENST00000324	MC5R	-1.54703
Homo sapiens isolate cORF1 endogenous retrovirus HERV-K(HML-2) central open reading frame mRNA		-1.54963
Hypothetical gene supported by BC001801		-1.56195
NM_004472 // FOXD1 // forkhead box D1 // 5q12-q13 // 2297 /// U59832 // FOXD1 //	FOXD1	-1.57465
NM_001104554 // PAQR5 // progesterin and adipoQ receptor family member V // 15q23	PAQR5	-1.57758
snRNA Chr 6:18307204:18307306		-1.59633
NM_000497 // CYP11B1 // cytochrome P450, family 11, subfamily B, polypeptide 1 /	CYP11B1	-1.60299
NM_000015 // NAT2 // N-acetyltransferase 2 (arylamine N-acetyltransferase) // 8p	NAT2	-1.603
NM_001042706 // IQCJ // IQ motif containing J // 3q25.32 // 654502 /// NM_001042	IQCJ	-1.60365
NM_002445 // MSR1 // macrophage scavenger receptor 1 // 8p22 // 4481 /// NM_1387	MSR1	-1.60717
cdna:Genscan chromosome:GRCh37:X:40693738:40695195:1		-1.60882
No assignment	Chr 2	-1.61695
No assignment	Chr 2	-1.61804
No assignment	Chr 6	-1.66135
NM_181788 // H1FNT // H1 histone family, member N, testis-specific // 12q13.11 /	H1FNT	-1.67685
NM_001010908 // C1QL3 // complement component 1, q subcomponent-like 3 // 10p13	C1QL3	-1.73686
NM_000871 // HTR6 // 5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 6 // 1p36-p35 // 3	HTR6	-1.74146
NM_001005186 // OR6Q1 // olfactory receptor, family 6, subfamily Q, member 1 //	OR6Q1	-1.76242
NM_139056 // ADAMTS16 // ADAM metalloproteinase with thrombospondin type 1 motif,	ADAMTS16	-1.76268
cdna:pseudogene chromosome:GRCh37:7:23514415:23520578:1 gene:ENSG00000236654		-1.81279
NM_005335 // HCLS1 // hematopoietic cell-specific Lyn substrate 1 // 3q13 // 305	HCLS1	-1.83517
NM_203377 // MB // myoglobin // 22q13.1 // 4151 /// NM_005368 // MB // myoglobin	MB	-1.87999
No assignment	Chr 2	-1.92864
No assignment	Chr 17	-2.1216
NM_001212 // C1QBP // complement component 1, q subcomponent binding protein //	C1QBP	-2.27113
NM_007160 // OR2H2 // olfactory receptor, family 2, subfamily H, member 2 // 6p2	OR2H2	-2.39755

NM_001159 // AOX1 // aldehyde oxidase 1 // 2q33 // 316 /// ENST00000374700 // AO	AOX1	-2.47447
NM_001012393 // OPCML // opioid binding protein/cell adhesion molecule-like // 1	OPCML	-2.60062
NM_012180 // FBXO8 // F-box protein 8 // 4q34.1 // 26269 /// NM_001040157 // KIA	FBXO8	-2.90734
NM_005328 // HAS2 // hyaluronan synthase 2 // 8q24.12 // 3037 /// ENST0000030392	HAS2	-7.18167
NM_133378 // TTN // titin // 2q31 // 7273 /// NM_133437 // TTN // titin // 2q31	TTN	6.4641
Unmapped full length transcript		5.54002
NM_006642 // SDCCAG8 // serologically defined colon cancer antigen 8 // 1q43-q44	SDCCAG8	4.75942
NM_015888 // HOOK1 // hook homolog 1 (Drosophila) // 1p32.1 // 51361 /// ENST000	HOOK1	4.75673
NM_001025616 // ARHGAP24 // Rho GTPase activating protein 24 // 4q21.23-q21.3 //	ARHGAP24	3.85675
Unmapped full length transcript	Chr 6	3.75257
NM_007211 // RASSF8 // Ras association (RalGDS/AF-6) domain family (N-terminal)	RASSF8	3.40144
No assignment	Chr 1	2.80639
NM_016281 // TAOK3 // TAO kinase 3 // 12q // 51347 /// ENST00000392533 // TAOK3	TAOK3	2.51455
snRNA Chr5:137458697:137458800		2.31159
NM_002285 // AFF3 // AF4/FMR2 family, member 3 // 2q11.2-q12 // 3899 /// NM_0010	AFF3	2.12996
NM_019844 // SLC01B3 // solute carrier organic anion transporter family, member	SLCO1B3	2.12236
snRNA Crh20:34475581:34475723		2.09645
NM_001145728 // IFLTD1 // intermediate filament tail domain containing 1 // 12p1	IFLTD1	1.99136
NM_182526 // C14orf83 // chromosome 14 open reading frame 83 // 14q24.1 // 16114	C14orf83	1.90631
NM_020716 // GRAMD1B // GRAM domain containing 1B // 11q24.1 // 57476 /// ENST00	GRAMD1B	1.90237
No assignment	Chr 8	1.89772
miR-24-2	Chr 19	1.8945
NM_002288 // LAIR2 // leukocyte-associated immunoglobulin-like receptor 2 // 19q	LAIR2	1.84823
NM_021800 // DNAJC12 // DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 12 // 10q22.1	DNAJC12	1.83833
NR_003366 // ANKRD20B // ankyrin repeat domain 20B // 2q11.1 // 729171 /// ENST0	ANKRD20B	1.83765
NM_002160 // TNC // tenascin C // 9q33 // 3371 /// ENST00000350763 // TNC // ten	TNC	1.81644
NR_003366 // ANKRD20B // ankyrin repeat domain 20B // 2q11.1 // 729171 /// NR_00	ANKRD20B	1.80636
NM_153444 // OR5P2 // olfactory receptor, family 5, subfamily P, member 2 // 11p	OR5P2	1.73434
BC032634 // FCGR1A // Fc fragment of IgG, high affinity Ia, receptor (CD64) // 1	FCGR1A	1.72923
NM_001142749 // KIAA1324L // KIAA1324-like // 7q21.12 // 222223 /// NM_152748 //	KIAA1324L	1.72243
predicted cDNA		1.72003
No assignment	Chr 2	1.71513
NM_002658 // PLAU // plasminogen activator, urokinase // 10q24 // 5328 /// NM_00	PLAU	1.71189
NM_006794 // GPR75 // G protein-coupled receptor 75 // 2p16 // 10936 /// ENST000	GPR75	1.69204
NM_207015 // NAALADL2 // N-acetylated alpha-linked acidic dipeptidase-like 2 //	NAALADL2	1.68125
NM_033048 // CPXCR1 // CPX chromosome region, candidate 1 // Xq21.3 // 53336 ///	CPXCR1	1.67883
NM_000170 // GLDC // glycine dehydrogenase (decarboxylating) // 9p22 // 2731 ///	GLDC	1.66926
NM_001105078 // EVI1 // ecotropic viral integration site 1 // 3q24-q28 // 2122 /	EVI1	1.66377
NM_152735 // ZBTB9 // zinc finger and BTB domain containing 9 // 6p21.32 // 2215	ZBTB9	1.64943
Homo sapiens cDNA fis, A-BNGH41000020, highly similar to Homo sapiens isolate E1JbIII-4-94 NADH dehydrogenase subunit 1 gene	TRNM	1.62943
NM_005118 // TNFSF15 // tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 15 //	TNFSF15	1.61524

NM_198524 // TEX9 // testis expressed 9 // 15q21.3 // 374618 /// ENST00000352903	TEX9	1.59507
NM_145341 // PDCD4 // programmed cell death 4 (neoplastic transformation inhibit	PDCD4	1.59161
snRNA Chr 17:27715578:27715701		1.58374
NM_000569 // FCGR3A // Fc fragment of IgG, low affinity IIIa, receptor (CD16a) /	FCGR3A	1.56988
AK092544 // LOC100131581 // hypothetical LOC100131581 // 8p23.1 // 100131581	LOC100131581	1.56658
NM_001015001 // CKMT1A // creatine kinase, mitochondrial 1A // 15q15 // 548596 /	CKMT1A	1.56231
NM_001015001 // CKMT1A // creatine kinase, mitochondrial 1A // 15q15 // 548596 /	CKMT1A	1.56174
NM_001136002 // tcag7.977 // hypothetical protein LOC730130 // 7q31.32 // 730130	tcag7.977	1.56151
NR_002308 // RP11-278E11.2 // ubiquinol-cytochrome c reductase binding protein p	RP11-278E11.2	1.55274
NM_020169 // LXN // latexin // 3q25.32 // 56925 /// ENST00000264265 // LXN // la	LXN	1.55232
NR_003366 // ANKRD20B // ankyrin repeat domain 20B // 2q11.1 // 729171 /// NM_00	ANKRD20B	1.55127
No assignment	Chr 4	1.54983
NM_005274 // GNG5 // guanine nucleotide binding protein (G protein), gamma 5 //	GNG5	1.53319
snRNA Chr X:74422538:74422644		1.52815
No assignment	Chr 7	1.51276
NM_006681 // NMU // neuromedin U // 4q12 // 10874 /// ENST00000264218 // NMU //	NMU	1.51114