



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

La citocina TGF-beta regula positivamente la expresión del gen IQGAP1

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA:

Biol. Manuel de Jesús Tavares Cornejo

TUTOR PRINCIPAL

Dra. Marina Macías Silva
(Instituto de Fisiología Celular)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dra. Rosa Laura Camarena Mejía (Instituto de Investigaciones Biomédicas)
Dra. Alicia González Manjárez (Instituto de Fisiología Celular)

MÉXICO, D. F. Junio, 2015



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.

El presente trabajo se realizó bajo la dirección de la Dra. Marina Macías Silva en el laboratorio 225 Norte del Departamento de Biología Celular y del Desarrollo, en el Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México

El proyecto fue apoyado por los donativos de PAPIIT/DGAPA/UNAM No. IN206012 y IN208115 , CONACYT No. 101826 , y CONACYT-ANR No. 188565.

La citocina TGF-beta regula positivamente la expresión del gen IQGAP1

Reconocimientos

El presente trabajo se realizó bajo la dirección de la Dra. Marina Macías Silva, en el laboratorio 225N del Departamento de Biología Celular y del Desarrollo en el Instituto de Fisiología Celular de la UNAM.

El comité tutorial que evaluó el desarrollo de esta tesis estuvo formado por:

- Dra. Marina Macías Silva (Instituto de Fisiología Celular)
- Dra. Rosa Laura Camarena Mejía (Instituto de Investigaciones Biomédicas)
- Dra. Alicia González Manjarrez (Instituto de Fisiología Celular)

El jurado de examen para optar por el grado de Maestro en Ciencias Bioquímicas estuvo constituido por:

- PRESIDENTE Dr. Ignacio Camacho Arroyo
- SECRETARIO Dra. Martha Robles Flores
- VOCAL Dr. Fernando López Casillas
- VOCAL Dr. Rolando Efraín Hernández Muñoz
- VOCAL Dr. Carlos Rosales Ledezma

AGRADECIMIENTOS ACADÉMICOS

A mi tutora, la Dra. Marina Macías, por permitirme ser parte de su laboratorio y por todas las enseñanzas.

A la Biol. Marcela Sosa, Técnica Académica del laboratorio, por su asesoría en las técnicas para llevar a cabo este proyecto

A la Biol. Cassandre Caligaris y al LIBB. Genaro Vázquez, por siempre apoyarme en la parte técnica y teórica de este proyecto.

A los miembros de mi comité tutorial, Dra. Rosa Laura Camarena Mejía y Dra. Alicia Gonzalez Manjárez, quienes con sus comentarios sobre mi trabajo se pudo llevar a buen término

Al Dr. Álvaro Marín Hernández, por la donación de las células AS30D con las cuales se pudo llevar a cabo parte de este trabajo

A los miembros de la Unidad de Biología Molecular del IFC, UNAM, por su asesoría, apoyo técnico y servicios de generación de oligonucleótidos y secuenciación: Dra. Laura Ongay Larios, Biól. Ma. Guadalupe Códiz Huerta y M. en C. Minerva Mora Cabrera.

A los miembros del taller del IFC, UNAM: el Ing. Aurey Lobato Galván y el Ing. Manuel Ortíz Benavides, por su aportación en el mantenimiento del equipo del laboratorio.

A los miembros de la Unidad de Cómputo del IFC, UNAM, por su asesoría, apoyo técnico y servicios prestados: M. en C. Gerardo Coello Coutiño, M. en C. Ana María Escalante Gonzalbo, Ing. Juan Manuel Barbosa Castillo y Ing. Ivett Rosas Arciniega.

Al Dr. Fernando García Hernández, miembro de la Unidad de Imagenología del IFC, UNAM, por su asesoría y apoyo técnico.

A los miembros de Bioterio del IFC, UNAM, por su asesoría y apoyo técnico: Dra. Claudia V. Rivera Cerecedo y Dr. Héctor Malagón

Al Programa de Apoyo a los Estudios del Posgrado, por su financiamiento que me permitió asistir al IV Congreso Nacional de la Rama de Transducción de Señales de la Sociedad Mexicana de Bioquímica A.C. y al curso “Networks and Pathways” impartido en el EBI-EMBL en Reino Unido.

A CONACYT, por la beca otorgada para la realización del posgrado.

Agradecimientos Personales

A mis padres, que siempre han sido un ejemplo de esfuerzo, honestidad y bondad.

A Ana Paula, que siempre ha sido mi fortaleza y mi inspiración para superarme.

A mis compañeros del laboratorio: Aura, Cass, Dianita, Eugenio y Genarito, que hicieron muy ameno el posgrado.

Índice

1) Lista de abreviaturas	8
2) Glosario	9
3) Resumen	10
4) Introducción	11
4.1) La vía de señalización del TGF-β	11
4.1.1) Los ligandos de la familia del TGF- β	11
4.1.2) Los receptores para el TGF- β	12
4.2) Las proteínas Smad	14
4.2.1) Estructura y función de las proteínas Smad	14
4.2.3) "Código" de fosforilación en las Smads	16
4.2.2) Las Smads como factores de transcripción	17
4.2.3) La expresión génica mediada por Smads	18
4.4) La vía del TGF-β y su papel según el contexto celular	19
4.4.1) TGF- β y la transición epitelio-mesénquima	19
4.4.2) TGF- β y el hepatocarcinoma celular	21
4.4.3) El TGF- β y el sistema inmune	21
4.5) La proteína andamio IQGAP1	23
4.5.1) IQGAP1 es una proteína importante para la homeostasis celular	23
4.5.2) IQGAP1 y su papel en patologías	24
5) Planteamiento del problema	26
6) Hipótesis	27
7) Objetivos	27
7.1) General	27
7.2) Particulares	27
8) Estrategia experimental	28
9) Materiales y Métodos	29
9.1) Líneas Celulares y cultivos primarios	29
9.1.1) Línea celular C9 de rata (ATCC [®] CRL-1439)	29
9.1.2) Línea celular AS-30D	29
9.1.3) Cultivo primario de hepatocitos	29
9.1.4) Línea celular HepG2 (ATCC [®] HB-8065)	29
9.1.5) Línea celular RBL-2H3 (ATCC [®] CRL-2256)	30
9.2) Oligonucleótidos	30
9.3) Análisis bioinformático del promotor del gen <i>iqgap1</i>	31
9.3.1) Predicción de la región promotora del gen <i>iqgap1</i> en rata	31
9.3.2) Análisis funcional bioinformático sobre el promotor de <i>iqgap1</i>	31
9.4) Análisis experimental de la región promotora del gen <i>iqgap1</i> de rata	32
9.4.1) Diseño de oligonucleótidos para clonación de la región promotora del gen <i>iqgap1</i> de rata	32
9.4.2) Clonación del promotor del gen <i>iqgap1</i> de rata y su reverso	33
9.4.3) Ensayos de gen reportero con luciferasa sobre la región promotora del <i>iqgap1</i> en rata	34
9.5) RT-PCR en líneas celulares	35

9.5.1) Cursos temporales de estimulación con TGF- β de células hepáticas y cebadas	35
9.5.2) Extracción de RNA con TRIzol	35
9.5.3) Generación de cDNA	36
9.5.4) PCR usando como molde al cDNA	37
9.6) Ensayos de inmunoblots	37
9.6.1) Obtención de proteína de células estimuladas con TGF- β	37
9.6.2) Obtención de extractos de proteínas totales	38
9.6.3) <i>Western Blot</i>	38
9.7) Análisis bioinformático del interactoma de IQGAP1	39
9.7.1) Obtención del interactoma de IQGAP1	39
9.7.2) Análisis de agrupamiento	39
10) Resultados	41
10.1) Análisis bioinformático para establecer la región promotora del gen <i>iqgap1</i> en rata	41
10.2) Análisis funcional y localización de los factores transcripcionales descritos para el promotor de <i>iqgap1</i>	41
10.3) Clonación del promotor <i>iqgap1</i> de rata y ensayos de gen reportero	43
10.4) Regulación transcripcional de <i>iqgap1</i> por TGF- β en células hepáticas de rata	45
10.5) Regulación de la proteína IQGAP1 por TGF- β en líneas celulares hepáticas de rata	46
10.6) Regulación de la proteína IQGAP1 en RBL-2H3	48
10.7) IQGAP1 como <i>hub</i> en células cebadas	48
11) Discusión	52
12) Conclusiones	55
13) Perspectivas	56
14) Anexos	57
14.1) Anexo 1: Protocolos	57
14.1.1) Purificación de DNA	57
14.1.2) PCR	57
14.2) Anexo 2: Islas CpG's en el gen <i>iqgap1</i> en rata y ratón según <i>USCS Genome Browser</i>	58
14.3) Anexo 3: Anotación de Factores Transcripcionales en el promotor de <i>iqgap1</i> en rata y ratón según <i>Reactome FI</i>	59
14.3.1) Resultados utilizando <i>Gene Ontology Biological Processes (FDR <= 0.05)</i>	59
14.3.2) Resultados utilizando <i>Reactome Pathways (FDR < 0.05)</i>	61
14.4) Anexo 4: Colocalización de Factores transcripcionales de interés con SBE's de los promotores del gen <i>iqgap1</i> en rata y ratón.	67
14.5) Anexo 5: Esquema de la generación de redes de términos y anotaciones sobre el interactoma de la proteína IQGAP1	69
14.6) Anexo 6: Tabla completa de términos ontológicos recuperados de las redes de términos sobre el interactoma de la proteína IQGAP1, que contuvieran "tráfico vesicular"/"citoesqueleto"/"migración"	70
15) Recursos Electrónicos	73
16) Bibliografía	74

1) Lista de abreviaturas

ActR: *activin receptor*
ALK: *activin receptor like kinase*
AMHR: *anti-Mullerian hormone receptor*
BMP: *bone morphogenetic protein*
BMPR: *bone morphogenetic protein receptor*
CBP: *CREB binding protein*
CCl₄: *carbon tetrachloride*
Co-Smad: *common Smad*
CREB: *cAMP response element binding protein*
DAPI: *4'6-diamino-phenylindol*
DENA: *di-ethyl.nitrosamine*
DHD: *Dachshund homology domain*
DTT: *dithiothreitol*
ECM: *extracellular matrix*
EGF: *epidermal growth factor*
EGFR: *epidermal growth factor receptor*
EMT: *epithelial-mesenchymal transition*
FBS: *fetal bovine serum*
FDR: *false discovery rate*
HB-EGF: *heparin binding-EGF*
HGF: *hepatocyte growth factor*
HSC: *hepatic stellate cells*
I-Smads: *inhibitor Smads*
IL-6: *interleukin 6*
kDa: *kilo-Daltons*
LAP: *latency associated peptide*
LLC: *large latent complex*
LTFG- β : *latent TGF- β*
M-MLV: *Murine Leukemia Virus*
MH1/2: *mad homology*
PWM: *position weighted matrix*
R-Smads: *receptor activated Smads*
RT-PCR: *Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction*
SIM: *smad interaction motif*
siRNA: *small interfering RNA*
shRNA: *short hairpin RNA*
bp: *base pairs*
T β R: *transforming growth factor β receptor*
TGF- β : *transforming growth factor β*
TGIF: *transforming growth interacting factor*
TNF- α : *tumor necrosis factor α*
TRE: *TGF- β responsive element*
TSS: *transcription start site*

2) Glosario

False Discovery Rate (FDR): se define como la proporción esperada de falsos positivos dentro de un resultado estadísticamente significativo. Este índice se utiliza hoy en día como un criterio para analizar y comprobar varias hipótesis simultáneamente, como sucede en un ensayo de microarreglo o de RNA-seq. Por ejemplo, si hipotéticamente hablando se declara una colección de 100 genes con un FDR máximo de 0.10 para establecerse como diferencialmente expresados, entonces se podrían esperar un máximo de 10 genes que sean falsos positivos (Pawitan, Michiels, Koscielny, Gusnanto, & Ploner, 2005).

Hub: se refiere a un nodo en una red dada, que se encuentra áltamente interconectado (Barabási & Oltvai, 2004).

Position Weigthed Matrix (PWM): representación de una secuencia consenso para sitios de unión de proteínas al DNA, que se basa en una matriz con valores para todas las bases posibles en cada una de las posiciones del sitio. El puntaje por un sitio en particular es la suma de los valores de la matriz. Cualquier secuencia que difiera del consenso tendrá un puntaje menor, pero la magnitud de este cambio dependerá del tipo de diferencias (Stormo, 2000).

3) Resumen

Se reconoce a la vía del TGF- β como un elemento importante para un sinnúmero de procesos biológicos normales y patológicos, como el cáncer. Una de las formas en las que logra regular tantos y tan diversos procesos es a través de la activación de programas específicos de expresión génica mediante la activación de las proteínas Smads, quienes funcionan como factores transcripcionales. Por lo tanto, es de vital importancia la identificación de los genes regulados por la citocina TGF- β en diferentes patologías y procesos fisiológicos normales, ya que con esto se podría llegar a entender los mecanismos que los causan. El gen que codifica para la proteína *scaffold* IQGAP1, se presenta como un candidato interesante que podría ser regulado a nivel transcripcional por la vía canónica del TGF- β . En particular, ya que se ha reportado que IQGAP1 participa en diversos procesos biológicos paradójicos entre sí, muy parecidas a las regulados por el TGF- β . Por lo tanto, en el presente trabajo se delimitó el promotor del gen *iqgap1* de rata mediante análisis bioinformático, en donde se identificaron probables sitios de unión de las Smads y otros factores transcripcionales, que podrían explicar los procesos celulares en los que IQGAP1 juega un papel importante. Además, se clonó el promotor del gen *iqgap1* de rata y se hicieron ensayos de genes reportero, con los cuales se comprobó que se trataba de una región promotora pero que no respondía al TGF- β . También se observó que el mRNA del gen *iqgap1* se regula de forma transitoria por el TGF- β en la línea celular hepática normal C9, pero no así en la línea celular de hepatocarcinoma, AS-30D. Además, se observó que en la línea celular C9 no se regulaba la proteína IQGAP1 bajo el estímulo de TGF- β , pero si en la línea celular RBL-2H3 y en cultivos primarios de hepatocitos de rata. En este último modelo también se observó un aumento de la expresión de la proteína IQGAP1 cuando se perdía del fenotipo epitelial. Finalmente, se estableció el *interactoma* proteínico de IQGAP1 y se predijo que probablemente la migración de las células cebadas promovida por TGF- β se deba a la interacción de IQGAP1 con CD44. Todos los resultados anteriores apuntan a que el TGF- β regula la expresión de la proteína IQGAP1 y su transcrito dependiendo del contexto, y que esto podría explicar fenómenos biológicos regulados por el TGF- β .

4) Introducción

4.1) La vía de señalización del TGF- β

4.1.1) Los ligandos de la familia del TGF- β

La vía de señalización del TGF- β juega un papel importante en fenómenos de desarrollo embrionario, proliferación celular, migración, apoptosis y homeostasis celular. Esta puede ser activada por citocinas de la familia del TGF- β , las cuales están codificadas por 33 genes que producen polipéptidos estructuralmente relacionados, entre los que se encuentran: TGF- β , BMP's, activinas, inhibinas y nodal. La estructura de todas éstas citocinas se compone de un péptido señal, un pro-dominio y un polipéptido C-terminal, que cuando es procesado se le conoce como polipéptido maduro y se caracteriza por contener nueve cisteínas espaciadas. Cuando el polipéptido precursor se sintetiza, éste se encuentra unido con otros polipéptidos por puentes di-sulfuro para formar heterodímeros u homodímeros (P. Xu, Liu, & Derynck, 2012).

Entre las citocinas que le dan el nombre a esta familia, el TGF- β 1 es la isoforma prototipo en los estudios de los mecanismos de activación y señalización a partir de la inducción de la vía por ligando (Heldin & Moustakas, 2012). Las isoformas de TGF- β 1, 2 y 3 están codificadas por 3 genes distintos y son estructuralmente idénticas (con un 76-80% de homología en la secuencia de aminoácidos). Los ligandos se secretan como moléculas precursoras latentes, conocidas como LTGF- β , *Latent TGF- β* por sus siglas en inglés, que están compuestas por dos péptidos asociados a la latencia, denominados LAP, y un dímero maduro de TGF- β 1. El LTGF- β se asocia con una proteína de unión al TGF- β latente, llamada LTBP, que le confiere la capacidad para unirse a la matriz extracelular (ECM), formando así el complejo latente grande (LLC, *large latent complex*) (**Imagen 1**) (Javelaud & Mauviel, 2004). Finalmente, para generar un dímero de TGF- β activo, primero se tiene que separar al LLC de la ECM, gracias a la actividad de enzimas como por ejemplo la plasmina, entre otras. Después de esto, se escinde el dominio LAP gracias a la actividad de diferentes proteasas, para dejar libre y activo al dímero del TGF- β , el cual entonces es capaz de unirse a sus receptores (Biernacka, Dobaczewski, & Frangogiannis, 2011).

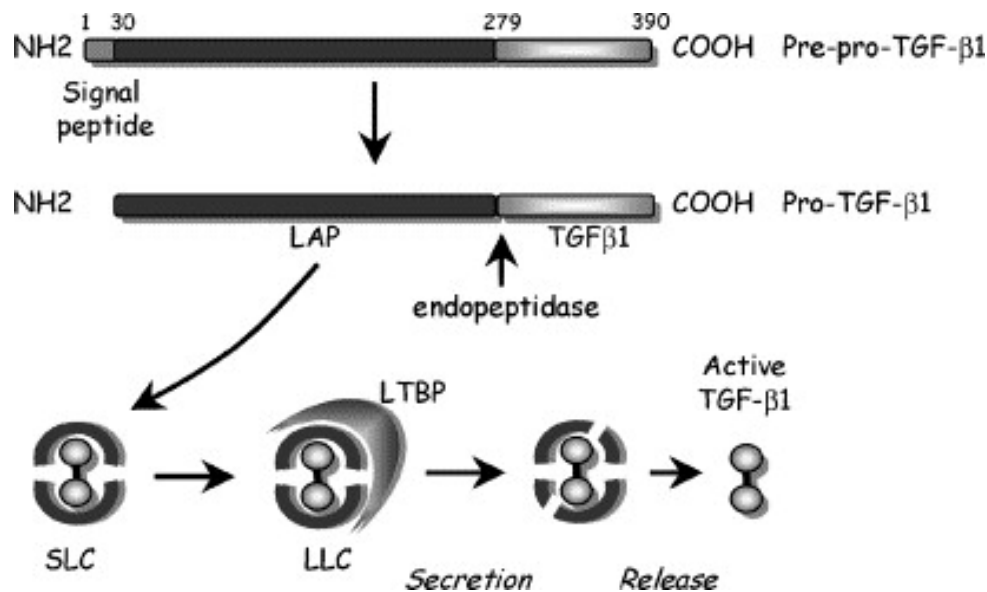


Imagen 1. Esquema de la maduración del TGF- β 1. El TGF- β es sintetizado como un pre-proTGF- β que se corta en el aparato de Golgi para formar complejos latentes pequeños (SLC) que contiene un homodímero maduro de 24 kDa, que está asociado no covalentemente a dos péptidos asociados a latencia (LAP) de aproximadamente 80 kDa. El TGF- β generalmente se secreta como un complejo grande de latencia (LLC) que se une covalentemente a la proteína LTBP. La activación del dímero de TGF- β se lleva a cabo una vez que éste se libera del LLC. Tomada de Javelaud & Mauviel, 2004.

4.1.2) Los receptores para el TGF- β

La señalización intracelular producida por las proteínas que pertenecen a la familia del TGF- β inicia cuando éstas se unen a receptores específicos que se encuentran en la superficie celular, para formar complejos tetraméricos entre los receptores del tipo I y II (Xu, Liu, & Dernyck, 2012). Estos dos tipos de receptores cuentan con una estructura muy parecida: están compuestos por aproximadamente 500 aminoácidos, organizados secuencialmente en un dominio N-terminal extracelular que se une al ligando, una región transmembranal y un dominio C-terminal con actividad de cinasa de residuos de serinas/treoninas (Y. Shi & Massagué, 2003).

Se sabe que en mamíferos hay 5 receptores tipo II ($T\beta RII$, ActR-II, ActR-IIB, BMPR-I, AMHR-II) y 7 tipo I denominados ALK 1-7 (*activin receptor-like kinases*) (Wrighton, Lin, & Feng, 2009). De éstos últimos, se ha demostrado que el receptor ALK5 es específico para los ligandos TGF- β 1, 2 y 3 (Wrighton et al., 2009).

En la vía canónica del TGF- β (**Imagen 2**), que se activa en todas las líneas celulares bajo el estímulo de TGF- β 1, la señalización se propaga cuando

la unión del ligando al receptor tipo II ($T\beta RII$) promueve el reclutamiento de receptores tipo I (ALK5). El receptor tipo II transfosforila a los receptores tipo I en el dominio corto GS en residuos de serinas y treoninas, lo que permite que éste se active y pueda modificar proteínas citoplásmicas, en particular, en la vía canónica del TGF- β se activan a las proteínas Smads (Lönn, Morén, Raja, Dahl, & Moustakas, 2009), las cuales forman complejos que están directamente relacionadas con la regulación de genes blanco del TGF- β , ya sea negativa o positivamente (Wrana et al., 1994; Souchelnytskyi, ten Dijke, Miyazono, & Heldin, 1996). Estas proteínas Smads necesitan de una proteína llamada SARA con un dominio FYVE que reconoce lípidos de membrana, quien presenta a las proteínas Smad al receptor para facilitar la interacción receptor-sustrato (Schmierer & Hill, 2007).

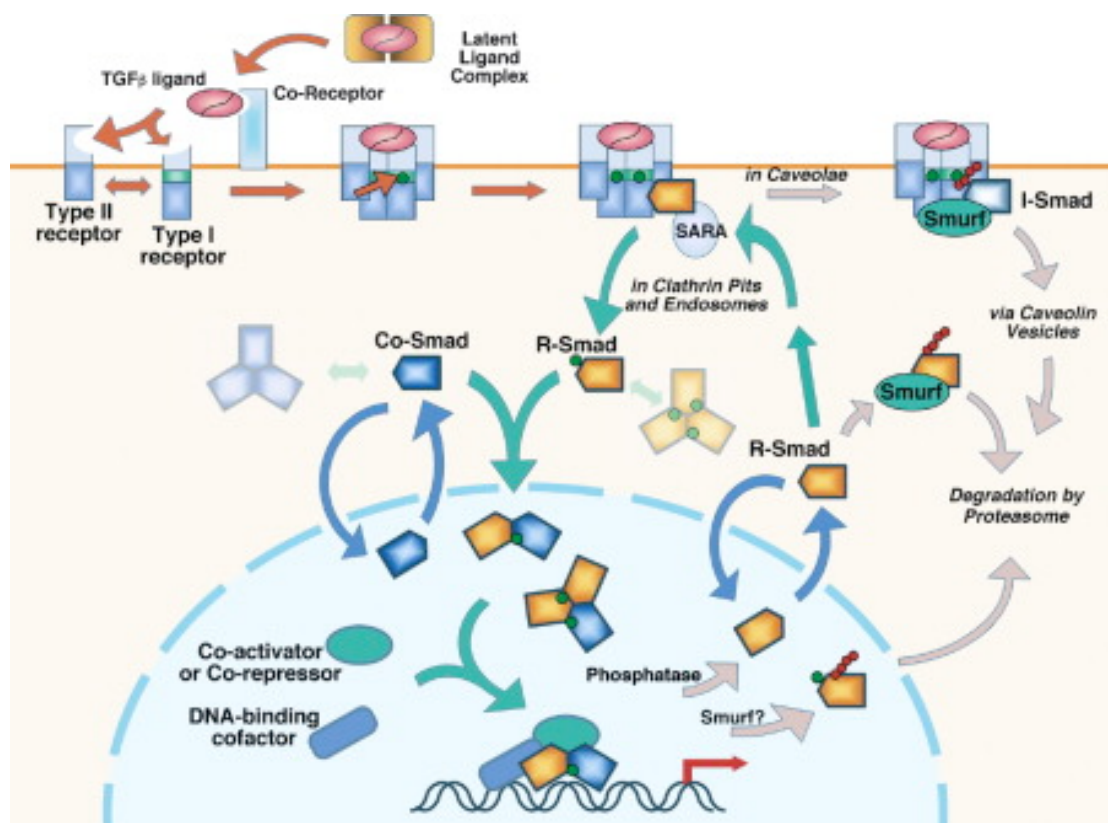


Imagen 2. Esquema de la señalización de la vía canónica del TGF- β . Las flechas naranjas representan la activación por ligando, las de color gris la inactivación de las Smads y el receptor, las verdes representan la activación y formación del complejo transcripcional y las azules el transporte hacia el núcleo de las Smads. Los grupos fosfato y las ubiquitinas están representadas por círculos verdes y rojos, respectivamente. Tomado de Shi & Massagué, 2003.

4.2) Las proteínas Smad

4.2.1) Estructura y función de las proteínas Smad

La primera proteína relacionada con las Smads fue descrita cuando se encontró, en *D. melanogaster*, que sin la presencia del gen *mad* (*mother against decapentaplegic*) era imposible que se transmitiera la señal del producto del gen *dpp*, que se sabía era parte de la superfamilia del TGF- β (Sekelsky, Newfeld, & Raftery, 1995).

Posteriormente, en 1996, se encontraron homólogos de estas proteínas en vertebrados. En los genomas del humano y del ratón, por ejemplo, hay 8 proteínas Smads codificadas. De éstas, 5 son denominadas R-Smads, o Smads reguladas por receptor, ya que son sustrato de fosforilación para los receptores de la familia de receptores de la familia del TGF- β . Dentro de las proteínas R-Smads se incluyen a Smad1, Smad2, Smad3, Smad5 y Smad8 (Massagué, Seoane, & Wotton, 2005). Las Smad2 y Smad3 son activadas por los receptores de TGF- β y activinas, mientras que Smad1, Smad5 y Smad8 son activadas por receptores de BMP's (Heldin & Moustakas, 2012). Las Smads restantes se clasifican en otros 2 subgrupos: I-Smads o Smads inhibitorias (Smad6 y Smad7), y la llamada Smad común (Co-Smad) o Smad4 (Wrighton et al., 2009), que funciona como un compañero compartido por todas las R-Smads (Massagué et al., 2005).

Las R-Smad y la Co-Smad tienen dos dominios conservados, llamados MH1 (*Mad-Homology*) y MH2, los cuales están conectados por una región *linker* (**Imagen 3**). Por el contrario, en las I-Smads hay un dominio MH1 muy corto (Heldin & Moustakas, 2012). En el dominio MH2 de las R-Smads hay motivos SSXS en donde se da la fosforilación por parte de los receptores tipo I, lo que genera cambios conformacionales en las R-Smads que permiten la disociación del receptor y la posterior formación de complejos que consisten en proteínas R-Smads y Smad4, ya sean trímeros o dímeros (X.-H. Feng & Derynck, 2005). Una vez que se forman estos complejos activos, se sabe que se translocan al núcleo a través de la interacción directa con nucleoporinas, para el caso de las Smads 2, 3 y 4, proceso en el que tal vez ayude la importina- β en el caso de Smads 3 y 4 (Massagué et al., 2005).

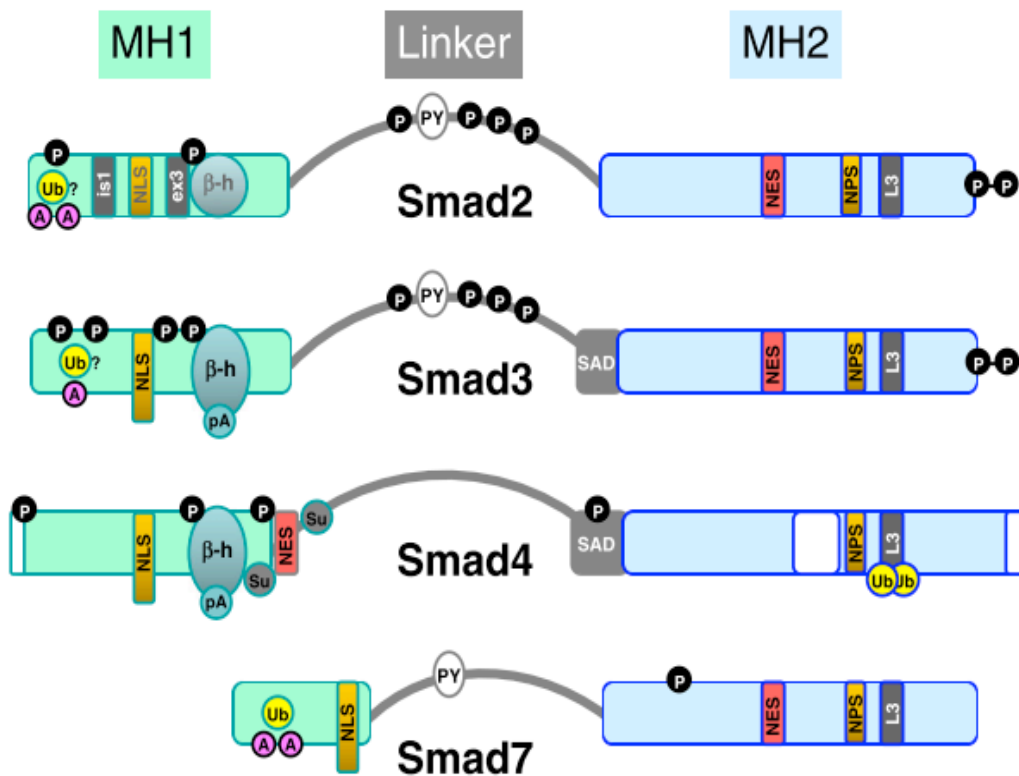


Imagen 3. Esquema de los dominios, motivos y sitios de modificaciones postraduccionales de Smad 2, 3, 4 y 7. Se muestran los sitios de fosforilación (P), de ubiquitinación (Ub), de acetilación (A) y de poli-ADP-ribosilación (pA). De igual forma se muestran los motivos de la señal localización nuclear (NLS), de exportación nuclear (NES), de la señal del nucleoporo (NPS), el motivo I-loop 3 (L3), el dominio de activación de Smads (SAD) y el motivo PY. En Smad2 en el dominio MH1, el motivo *Is1* impide la señal de localización al núcleo (NLS), mientras que el motivo *ex3* altera la funcionalidad del β -hairpin, imposibilitando la unión de Smad2 al DNA. Tanto Smad3 como Smad 4 no tienen estos motivos, por lo que sus motivos NLS y β -hairpin son funcionales. Tomada de Heldin & Moustakas, 2012.

Finalmente, el último grupo de las proteínas Smads, compuesto por Smad6 y Smad7, son las encargadas de regular negativamente la señalización en respuesta a BMP's y al TGF- β , respectivamente, por lo que se les denomina I-Smads. Se sabe que la expresión de Smad7 es inducida por el propio TGF- β en células HaCaT (Akiyoshi et al., 2001), lo cual genera una asa de retroalimentación negativa que inhibe la señal del TGF- β , fenómeno que hoy en día se sabe que sucede a través de varios mecanismos.

Smad7 es capaz de regular la actividad del receptor T β RI activado, ya que impide la activación de los complejos R-Smads, al competir con ellos por los sitios de unión del receptor, además de que pueden reclutar fosfatasa que desactivan al receptor cuando lo desfosforilan (W. Shi et al., 2004), o incluso puede reclutar ligasas E3 de ubiquitina (Smurf-1, Smurf-2 y NEDD4-2), lo que

resulta en la poliubiquitinación y posterior degradación del receptor vía el proteosoma (Runyan, Poncelet, & Schnaper, 2006).

4.2.3) “Código” de fosforilación en las Smads

Además de ser blanco de fosforilación en el carboxilo-terminal, a través del receptor tipo 1 del TGF- β , las Smads también pueden ser fosforiladas en su región *linker* por la actividad de cinasas activadas por otras vías de transducción o incluso por el mismo TGF- β . En este último caso, se le denominan como vías no canónicas del TGF- β , ya que los blancos de fosforilación por el receptor de TGF- β son proteínas distintas a las proteínas Smad. Además, estas señales generalmente tienen efectos contrarios a los efectuados por la vía canónica del TGF- β , como son la síntesis de matriz extracelular, la progresión del ciclo celular, la migración, el crecimiento y la proliferación celular. También se ha descrito que la activación, duración y implicaciones funcionales de la fosforilación del linker dependen del tipo celular (Matsuzaki et al., 2009).

Entre las vías alternas al TGF- β que fosforilan a las Smads en la región *linker*, se encuentra la vía activada por el EGF, el cual activa a la proteína Ras mediante fosforilación, la cual a su vez lleva a la posterior activación de Erk2, miembro de las cinasas de proteínas activadas por mitógenos (MAPK), quien fosforila a Smad2 y Smad3 en sitios Ser/Thr-Pro (Kretschmar & Doody, 1999). De igual forma, se observó en células de la mucosa del estómago de ratón que tanto Smad2 como Smad3 son fosforiladas en residuos de serinas encontrados en su región *linker* a través de la actividad de la cinasa del N-terminal de c-Jun (JNK), ya sea por un estímulo del TGF- β o también de HGF (Mori et al., 2004). También se ha descrito que la cinasa GSK3 puede fosforilar a la región linker de Smad2/3 (Abushahba et al., 2012; Millet et al., 2009).

4.2.2) Las Smads como factores de transcripción

Una vez que los complejos activados R-Smads/Co-Smad se translocan al núcleo, éstos se unen a secuencias específicas en el DNA, que se encuentran en los promotores o en regiones *enhancers* de sus genes blanco, conocidas como elementos de unión a Smad's (*SBE*, por sus siglas en inglés) y que

corresponden a la secuencia 5'-AGAC-3' o su reverso complementario (Attisano & Wrana, 2002; Ikushima & Miyazono, 2010; Macı et al., 1996; Massagué et al., 2005; Y. Shi & Massagué, 2003; Ikushima & Miyazono, 2010) (**Imagen 4**). Esta unión se da gracias a que en los dominios MH1 existe una región de unión al DNA, estabilizado por un átomo de zinc, que comprende una estructura β -hairpin y que se conserva en casi todas las R-Smads y en Smad4. Curiosamente, la proteína Smad2 contiene una secuencia insertada en el exón 3, en la estructura β -hairpin, que es suficiente para evitar la capacidad de unión al DNA (Massagué et al., 2005).

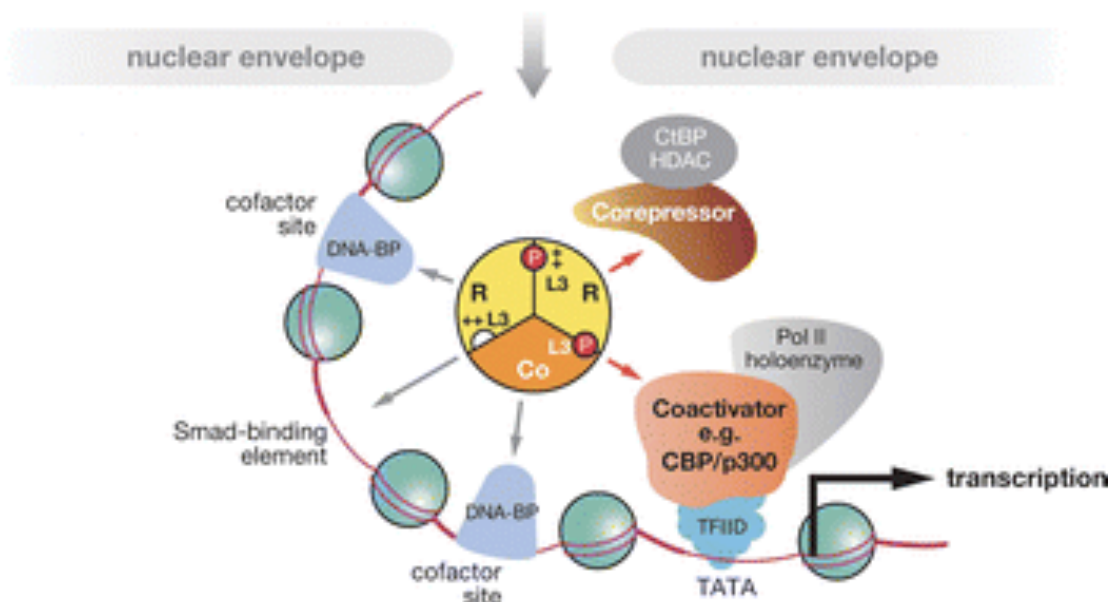


Imagen 4. Modo de acción de los complejos Smads como factores de transcripción. Una vez que las Smads se encuentran fosforiladas y se unen para formar el complejo, se translocan al núcleo en donde éste interactúa con el DNA, con otros factores de transcripción y con corepresores o con coactivadores, dependiendo del gen blanco. Modificada de Feng & Derynck, 2005.

Aunque los SBE's son necesarios para que se de el reclutamiento de las Smads en promotores o *enhancers* de los genes blanco, estos no son suficientes para que el complejo R-Smads/Smad4 inducido por TGF- β tenga la suficiente especificidad y afinidad por una región dada (Koinuma et al., 2009), por lo que uno de los mecanismos implicados considera que las proteínas Smads son capaces de cooperar a través de interacciones físicas, con una gran diversidad de factores de transcripción que se unen a las proteínas Smads a través de motivos SIM (*Smad interaction motif*), ya sea en el dominio

MH1 o MH2 de la Smad, y así, dependiendo del factor de transcripción con el que se asocien es que se puede aumentar la afinidad del complejo por el DNA, ya que también se unen a éste (X.-H. Feng & Derynck, 2005). Un ejemplo de factores transcripcionales que forman complejos con las proteínas Smad son los factores FoxH1a/FoxH1b (Inman & Hill, 2002), Sp1 (X. Feng, Lin, & Derynck, 2000), FoxO3 (Seoane, Le, Shen, Anderson, & Massagué, 2004), y el coactivador p300 (Long, Wang, Matsuura, He, & Liu, 2004), entre muchos otros.

Además de la gran variedad de factores de transcripción a los que se pueden unir los complejos Smads, estos también pueden reclutar cofactores transcripcionales, ya sean coactivadores o correpresores, cuya expresión y actividad es específica de la célula o tejido (Dyck & Hill, 2004). Entre los cofactores más conocidos y estudiados se encuentran el coactivador CBP, el cual es reclutado por la interacción de Smad3 con CREB y cuenta con actividad de acetil transferasa de histonas, y los correpresores TGIF, Ski y SnoN, que reclutan desacetilasas de histonas. Estos cofactores transcripcionales son críticos para aumentar o disminuir de manera importante la capacidad transcripcional del complejo (Feng & Derynck, 2005).

4.2.3) La expresión génica mediada por las proteínas Smads

Como se ha mencionado anteriormente, es gracias a la capacidad de regular la expresión génica con la cual la vía del TGF- β lleva a cabo sus funciones, y es relevante particularmente en el caso de sus funciones anti-tumorigénicas.

Conforme a lo anterior, se ha descrito que el TGF- β genera una respuesta pro-apoptótica, ya que induce la expresión del receptor Fas, el cual lleva a cabo la activación de la caspasa 8, lo que promueve la apoptosis de células de carcinoma gástrico (Kim, Jong, & Kim, 2004). Por otra parte, también se ha descrito que la expresión del gen de DAP-cinasa, la cual esta relacionada con la activación de p19/p53, un producto de la activación de las proteínas Smad, es vital para generar la respuesta pro-apoptótica de la vía del TGF- β en células de hepatoma con fenotipo epitelial, Hep3B (Jang et al., 2002). Finalmente, en células hematopoyéticas también se ha relacionado la expresión de SHIP, regulada tanto por Smad2 como por Smad3 fosforiladas

bajo el estímulo de TGF- β , relacionada con la inhibición de la actividad de Akt, proteína que tiene un rol central en el crecimiento y la supervivencia celular (Valderrama-Carvajal et al., 2002).

En relación al control del ciclo celular, se ha demostrado que tanto p15 como p21, proteínas que promueven el arresto celular, son inducidas por la vía canónica del TGF- β , particularmente en líneas celulares epiteliales, como son HaCaT, Mv1-Lu, COS-7, y HepG2, entre otras (X. Feng et al., 2000; Pardali et al., 2000).

Es importante mencionar que la fosforilación del dominio *linker* de las Smads también tiene una relevancia a nivel de la regulación transcripcional, dependiendo del contexto celular. En particular, se ha descrito que en células mesenquimales de ratón, como las líneas celulares fibroblásticas AKR-2 y NIH-3T3, la fosforilación de algunas serinas en la región linker de Smad2, por la cinasa Erk2 activada por TGF- β , aumentan la transcripción de los genes *pai-1* y *smad7*. Interesantemente, esto no se observó en las líneas epiteliales NMuMG y Mv1Lu (Hough, Radu, & Doré, 2012). Además, se describió que en fibroblastos se bloqueaba la transcripción de COL1 y COL3 regulada por el TGF- β /Smads, cuando se mutaba a Smad2 en sus sitios de fosforilación en el *linker* Ser245/Ser250/Ser255, los cuales son blanco de la cinasa Erk2 (Li et al., 2009). Finalmente, también se ha descrito que la fosforilación de Smad2 en el linker (Smad2L), junto con su fosforilación en el carboxilo (Smad2L/C), permite la expresión del gen que codifica para la metaloproteínasa 9 (MMP-9), el cual se vió relacionado con la invasividad de fibroblastos embrionarios de ratón (Matsuzaki et al., 2009).

4.4) La vía del TGF- β y su papel según el contexto celular

4.4.1) TGF- β y la transición epitelio-mesénquima

La transición epitelio-mesénquima (EMT) se refiere al proceso durante el cual células epiteliales gradualmente pierden sus características típicas como el ser células adherentes que se unen entre sí y que forman monocapas con una polaridad ápico-basal, para adquirir características de células mesenquimales (células no polarizadas capaces de moverse como células individuales, ya que les faltan conexiones intercelulares) (Choi & Diehl, 2009) (**Imagen 5**). Este

fenómeno se da tanto en procesos fisiológicos normales como es el desarrollo embrionario, al igual que en procesos patológicos como el cáncer.

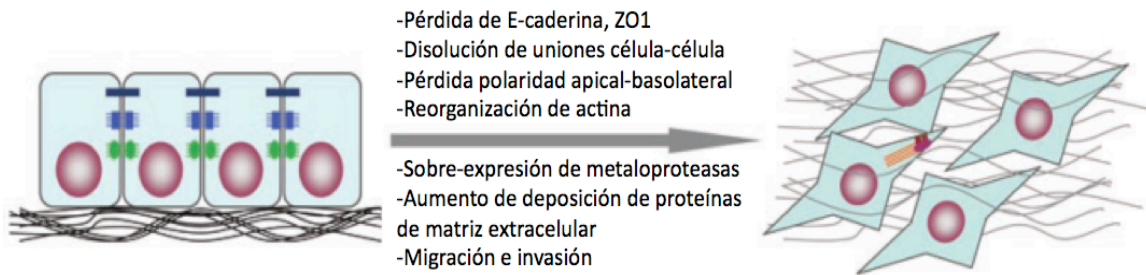


Imagen 5. Esquema de la transición epitelio-mesénquima. Se muestran algunos de los cambios observados en las células mesenquimatosas una vez que pierden el fenotipo epitelial. Modificado de Xu et al., 2009.

En el desarrollo, se ha observado que el TGF- β juega un papel fundamental en la EMT que ocurre en el canal atrioventricular y en la migración de células de la cresta neural para formar varios tejidos, incluyendo huesos y músculo liso (J. Xu, Lamouille, & Derynck, 2009). También, se ha descrito que el TGF- β promueve la EMT en células epiteliales de mama de ratón NMuMG, lo cual se estableció ya que se notó que había una disminución en la expresión de E-caderina, ZO1, desmoplaquinas 1/2 y vinculina (Miettinen & Ebner, 1994).

Por otra parte, se ha visto que una señalización aberrante de la vía del TGF- β puede generar varias patologías relacionadas con la EMT como lo son los trastornos del desarrollo, la fibrosis y el cáncer, entre muchas otras (Biernacka et al., 2011; Heldin, Vanlandewijck, & Moustakas, 2012; Massague, Blain, & Lo, 2000). Específicamente, se ha observado que la citocina TGF- β juega un papel preponderante en el establecimiento de la fibrosis en varios tejidos. Se ha descrito que bajo un estímulo de TGF- β , los fibroblastos sufren una transición hacia un fenotipo miofibroblástico, un estado celular que se considera como un efector clave para establecer la fibrosis (Biernacka et al., 2011). En el caso del hígado, se ha identificado a las células estrelladas como los principales actores de la fibrosis hepática (Dooley & ten Dijke, 2012), ya que éstas producen matriz extracelular bajo el estímulo del TGF- β . En particular, se ha observado que Smad3 es indispensable para la proliferación de las células estrelladas activadas, así como en la deposición de matriz extracelular propiciada por el TGF- β (Uemura & Swenson, 2005).

Por otra parte, se considera a las células mesenquimatosas como la fuente principal de miofibroblastos en procesos fibróticos de varios órganos. Los miofibroblastos también pueden surgir de células epiteliales gracias a la EMT, en el cual también TGF- β juega un papel importante (J. Xu et al., 2009). Aunque sigue siendo un punto de debate, se ha propuesto que las células epiteliales hepáticas, los hepatocitos, también pueden generar miofibroblastos. Se observó que bajo un estímulo de TGF- β , hepatocitos cultivados *in vitro* aumentaban su producción de colagena I, que cambiaba la localización de E-caderina en la membrana celular, y que aumentaba la cantidad de vimentina (Kaimori et al., 2007), todos marcadores de una célula mesenquimatosas.

4.4.2) TGF- β y el hepatocarcinoma celular

Además de la fibrosis y la transición epitelio-mesénquima, se relaciona al TGF- β con una protección contra la progresión de tumores en estadios tempranos, cuando hay un contexto normal celular (Massagué et al., 2000). Por ejemplo, se ha observado en hígados de ratones mutantes nulos heterocigotos del TGF- β que presentan un aumento en la proliferación de los hepatocitos y una reducción de los procesos apoptóticos en el hígado (Tang et al., 1998). Además, se ha encontrado una gran cantidad de mutaciones, tanto en los receptores del TGF- β , como en las proteínas Smads, que llevan a diferentes tipos de cánceres. Por ejemplo, se describió que había mutaciones A:T -> G:C tanto en Smad2 como en Smad4 en algunas muestras de pacientes con hepatocarcinomas celulares (HCC), estableciendo que la vía del TGF- β esta alterada en estos tipos de cáncer al menos en el 10% de los casos (Yakicier, Irmak, Romano, Kew, & Ozturk, 1999).

4.4.3) El TGF- β y el sistema inmune

Dentro del sistema inmune, el TGF- β tiene un papel preponderante en mantener la tolerancia mediante la regulación de la proliferación de linfocitos, su diferenciación y su supervivencia. Además, el TGF- β controla la iniciación y resolución de respuestas inflamatorias a través de la regulación de quimiotaxis y activación de linfocitos, células dendríticas, células NK, granulocitos y las células cebadas (Halova, Draberova, & Draber, 2012) (**Imagen 6**).

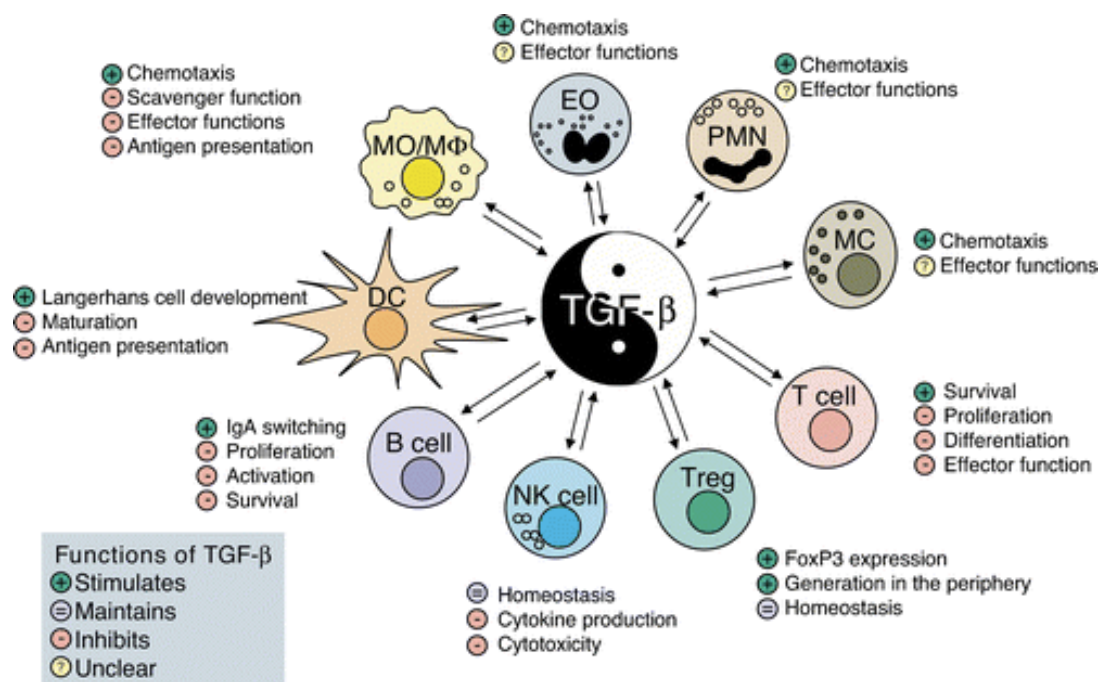


Imagen 6. Efectos pleiotrópicos del TGF- β en leucocitos. Se muestran las funciones reguladas por el TGF-beta en células cebadas (MC), eosinófilos (EO), y monocitos/macrófagos (MO/MP), entre otras. Tomada de Li et al., 2006.

En el caso de las células cebadas, cuyo origen son leucocitos derivados de la médula ósea, es importante mencionar que se describió que el TGF- β era un quimioatrayente, lo cual se comprobó con ensayos de quimiotaxis con células murinas PMC, donde también se vio una disminución en su proliferación celular (Gruber, Marchese, & Kew, 1994). Además, se ha descrito que el TGF- β promueve la expresión y secreción de IL-6 en cultivos primarios de células cebadas provenientes de ratones C57BL/6 y BALB/C (Ganeshan & Bryce, 2012). De igual forma, se sabe que el TGF- β facilita la migración intraepitelial de las células cebadas mediante la expresión de la integrina $\alpha 7$, la cual se une a laminina-1 (Rosbottom, 2002).

A pesar de que se considera de que el TGF- β es un importante componente en los mecanismos para guiar a las células cebadas, también se ha reportado que puede funcionar como un inhibidor de la maduración de las células cebadas en sus últimos estadios de desarrollo, ya que inhibe la expresión c-kit, T1/ST2, Fc ϵ RI y Fc γ R, y la formación de gránulos (Kashyap et al., 2005).

4.5) La proteína andamio IQGAP1

4.5.1) IQGAP1 es una proteína importante para la homeostasis celular

A la proteína IQGAP1 se le ha reconocido como un componente importante en muchas de las funciones celulares, ya que puede funcionar como una proteína de integración de muchos tipos de señales extracelulares (Brown & Sacks, 2006) (**Imagen 7**). Esta proteína cuenta con un dominio de homología a calponina (CHD), una región de unión a poliprolinas (WW), un dominio IQ que cuenta con 4 motivos de isoleucina/glutamina (el cual le da su nombre), y un dominio de activación de GTPasa (GAP). El gran número de funciones celulares en las que toma parte, se debe a que hasta ahora se han reportado más de 100 proteínas con las cuales interactúa (Hedman, Smith, & Sacks, 2015; White, Erdemir, & Sacks, 2012). Entre éstas está B-Raf, integrante de la vía MEK/ERK, con la cual IQGAP1 funciona como un andamio (*scaffold*), lo que permite la transducción de señales mitogénicas, de diferenciación y de supervivencia inducidas por el EGF (Ren, Li, & Sacks, 2007).

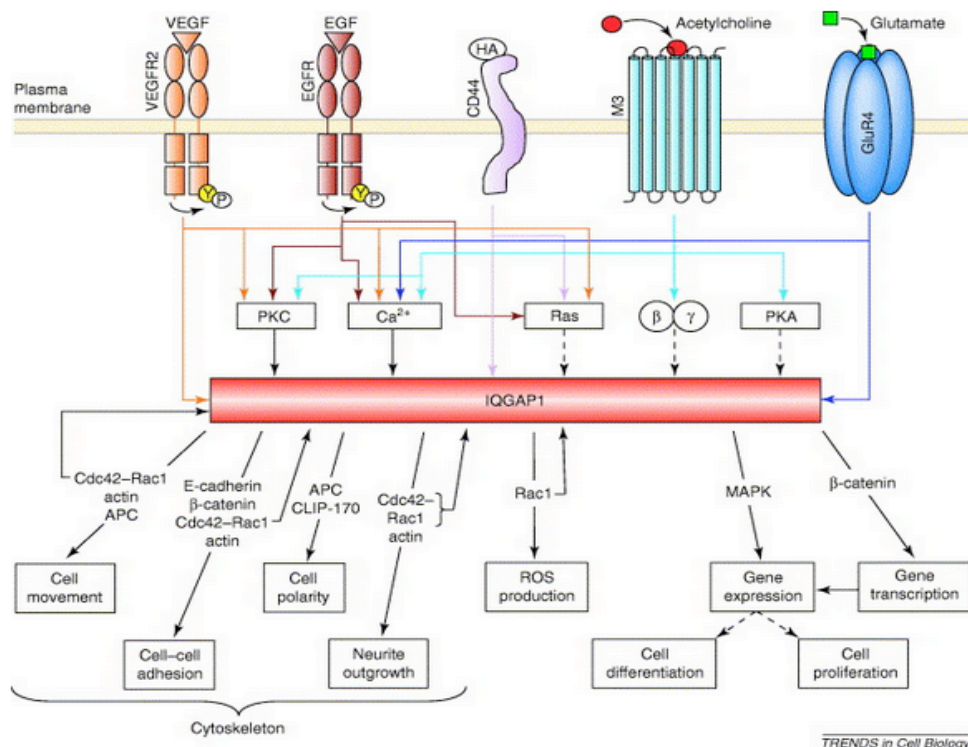


Imagen 7. IQGAP1 es una proteína de andamiaje que sirve para integrar y transducir varias señales extracelulares. IQGAP1 participa en muchos procesos celulares como lo son la adhesión celular, la polaridad de la célula, la diferenciación y la proliferación celular, entre otros. Tomada de Brown & Sacks, 2006.

Con relación a los procesos celulares en los que participa IQGAP1, se ha reportado que mantiene la estructura polar de la célula, secuestrando los filamentos de actina en el crecimiento, a través de interacciones con un complejo compuesto por CLIP-170, Rac y Cdc42 (Fukata et al., 2002). Posteriormente, se describió que IQGAP1 también era vital para la migración en células fibroblásticas Vero, ya que esta proteína genera un complejo que permite la interacción entre APC y el complejo Rac1, Cdc42 y filamentos de actina, lo que permite la formación de los bordes líder (Watanabe et al., 2004). Paradójicamente, además de fomentar la motilidad celular, también se ha descrito que IQGAP1 es importante para mantener sitios de adhesión célula-célula mediados por E-caderina, como resultado de la activación de Rac1, en células epiteliales de riñón canino MDCKII (Noritake, Fukata, & Sato, 2004).

4.5.2) IQGAP1 y su papel en patologías

A últimas fechas, el estudio sobre IQGAP1 se ha centrado en describir su papel en cáncer, debido a que se ha visto que en algunos tumores esta proteína se encuentra en niveles muy altos (Schmidt, 2012). En particular, se ha visto que en tejidos de pacientes que sufren de carcinomas hepatocelulares, el aumento de IQGAP1 correlaciona con estadios más graves en la progresión del cáncer, habiendo menos en adenomas que en carcinomas. En este mismo estudio, también se reportó que aquellas células hepáticas que mantenían un fenotipo epitelial contaban con una menor concentración de la proteína (HepG2, Hep3B, etc.), que aquellas que tenían un fenotipo que asemejaba más a una célula mesenquimal (Sk-Hep-1, SNU475, etc.) (White et al., 2010). Conforme a lo anterior, uno de los efectos de la sobre-expresión de la proteína IQGAP1 en carcinomas hepatocelulares es la promoción de la proliferación celular a través de la activación de la vía PI3K/Akt, la cual a su vez activa la vía mTORC1 (Chen et al., 2010).

Todo lo anterior ha llevado a que se le considere a IQGAP1 como un oncogen y un probable blanco para terapias contra algunos tipos de cánceres. En especial ya que se observó que cuando se hacían ratones dobles mutantes *iqgap1^{-/-}* y *iqgap2^{-/-}*, éstos revertían el fenotipo hepatocarcinogénico generado en ratones mutantes en el gen *iqgap2* (Schmidt, Chiariello, Capilla, Miller, & Bahou, 2008). Incluso, ya se ha logrado evitar eventos tumorigénicos en

carcinomas celulares escamosos, generados a partir de la desregulación química de la vía RAS-MAPK, utilizando solamente péptidos que contienen la región WW de IQGAP1 para “secuestrar” a las proteínas ERK1/2. Esto evita su interacción con IQGAP1, lo que disminuye la capacidad proliferativa y la malignidad (Jameson et al., 2013).

4.5.3) La proteína IQGAP1 y la vía del TGF- β

Además de todas las vías de transducción que, se reportó que IQGAP1 jugaba un papel importante en la regulación de la vía del TGF- β , ya que en células estrelladas hepáticas humanas, la proteína IQGAP1 es responsable de promover la degradación del receptor T β RII, lo que impide la transducción de la vía del TGF- β y evita la activación de éstas células. También se constató que en estas mismas células, el TGF- β disminuye la concentración de la proteína IQGAP1 a 24 h de que las células estrelladas son estimuladas (Liu, Billadeau, & Abdelhakim, 2013).

Contradictoriamente, se reportó en ensayos de microarreglos de DNA en células epiteliales de mama de ratón, NMuMG, el mRNA del gen *iqgap1* era inducido de forma temprana (1 hora después del estímulo con TGF- β). Es importante denotar que estas células en particular son reconocidas como el modelo por excelencia para estudiar el proceso de la transición epitelio-mesénquima regulado por el TGF- β (Xie et al., 2003) .

5) Planteamiento del problema

La citocina TGF- β regula una gran cantidad de procesos fisiológicos, que en gran parte se entienden gracias a los programas de expresión génica que activa, y esto varía según el tipo celular que se estimula. IQGAP1 por su parte también se ha visto relacionada con varios procesos fisiológicos importantes y paradójicos, como lo son promover la migración celular, y por lo tanto el movimiento, mientras que también promueve las interacciones célula-célula. Nosotros proponemos que la expresión de IQGAP1 es regulada transcripcionalmente por el TGF- β , a través de la actividad de las proteínas Smads como factores transcripcionales, y que esto podría explicar la función del TGF- β en algunos tipos celulares.

6) Hipótesis

La expresión del gen *iqgap1* es regulada positivamente a nivel transcripcional por la vía canónica del TGF- β /Smads.

7) Objetivos

7.1) General

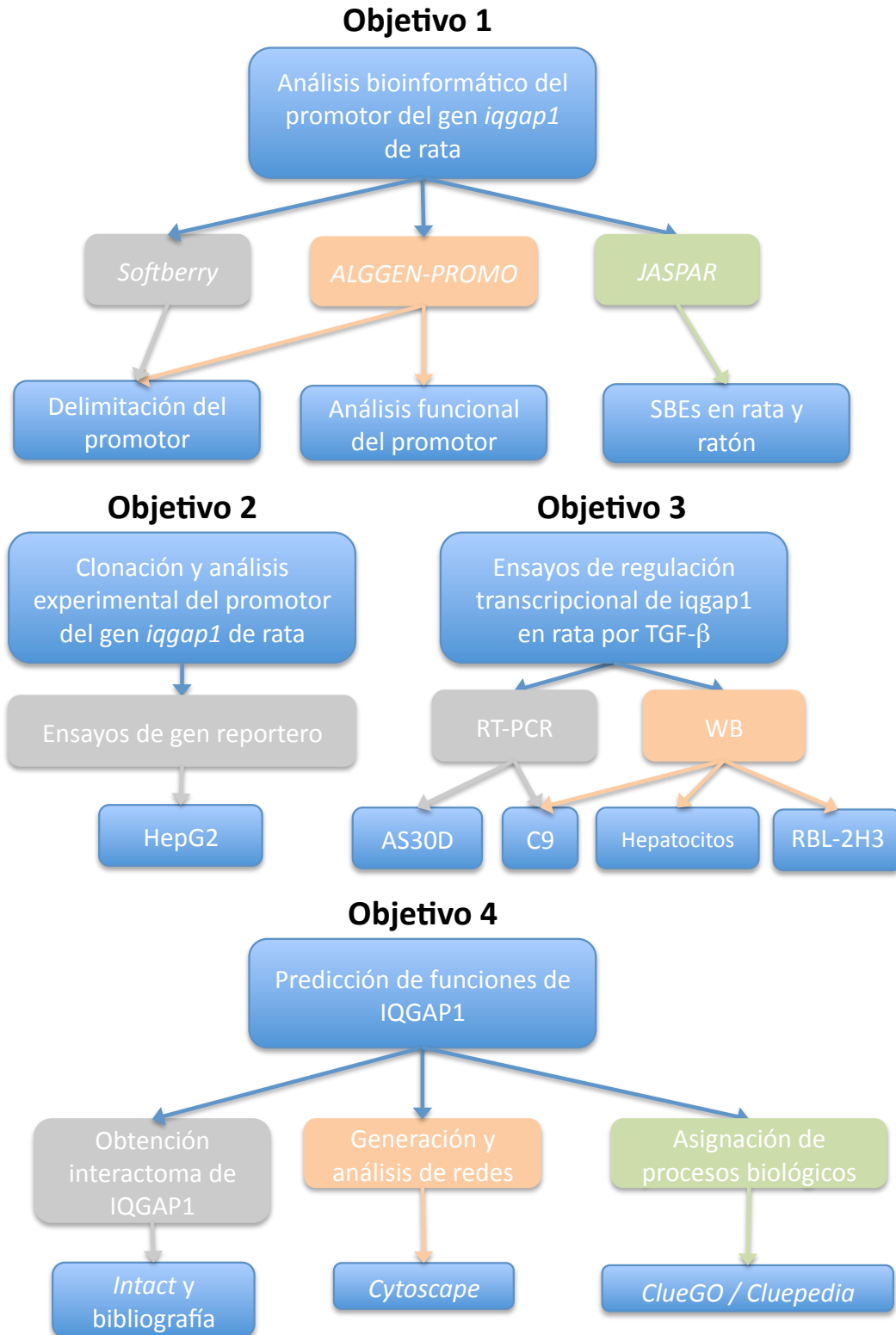
Establecer si el gen *iqgap1* es un gen blanco de la vía canónica del TGF- β .

7.2) Particulares

1. Analizar bioinformáticamente la región *core* del promotor del gen *iqgap1* de rata, para identificar sitios potenciales de unión de las Smads.
2. Clonar la región *core* del promotor del gen *iqgap1* de rata, para investigar y caracterizar el papel de los factores transcripcionales Smads en la regulación de su expresión.
3. Estudiar la regulación de la expresión del gen *iqgap1* por el TGF- β en líneas celulares de rata a nivel del mRNA y de la proteína.
4. Proponer probables funciones de IQGAP1 en líneas celulares en donde se regule por el TGF- β

8) Estrategia experimental

A continuación se muestra un diagrama de flujo que describe la estrategia experimental que se seguirá en este trabajo para resolver cada uno de nuestros objetivos particulares:



9) Materiales y Métodos

9.1) Líneas Celulares y cultivos primarios

9.1.1) Línea celular C9 de rata (ATCC® CRL-1439)

La línea celular C9 fue aislada a partir de un hígado normal de una rata macho Sprague-Dawley (*Rattus norvegicus*) con 4 semanas de edad. Son células epiteliales hepáticas inmortalizadas (hepatocitos) que se utilizan generalmente para hacer estudios de toxicidad y carcinogenicidad.

9.1.2) Línea celular AS-30D

Estas células se establecieron a partir de líquido de ascitis proveniente de un hepatoma de rata hembra Sprague Dawley, de 16 meses de edad. Se utilizan principalmente como modelo para hacer estudios bioquímicos en cáncer. Para mantener la línea celular, éstas células se inyectan en el peritoneo de las ratas. De 3 a 5 días después, una vez que se ha establecido el hepatoma, se extraen y se mantienen en solución **Krebs-Ringer**. Para someterlos a los experimentos pertinentes, las células se incuban en suspensión en medio de cultivo Williams E.

9.1.3) Cultivo primario de hepatocitos

Hepatocitos de rata fueron aislados a partir de hígados de ratas Wistar de 250-300g. El hígado fue perfundido con solución Krebs-Ringer con colagenasa, como se ha descrito previamente (Macias-Silva, Li, Leu, Crissey, & Taub, 2002), después los hepatocitos fueron separados por centrifugación a 400 rpm por 2 min en centrífuga *Allegra 21R*. Posteriormente, se estableció la viabilidad de los hepatocitos mediante purificación isodensa en gradiente de Percoll (Amersham), y su posterior exclusión del azul de tripano. Finalmente, los hepatocitos (~ 3 millones) se cultivaron en medio de adherencia toda la noche en cajas de Petri previamente cubiertas con 1% de colágena tipo 1 de rata (Becton Dickinson).

9.1.4) Línea celular HepG2 (ATCC® HB-8065)

Línea celular obtenida de un carcinoma hepatocelular humano, proveniente de un hombre caucásico de 15 años. Es una línea celular considerada como no invasiva, con fenotipo epitelial.

9.1.5) Línea celular RBL-2H3 (ATCC® CRL-2256)

Línea celular aislada a partir de basófilos leucémicos provenientes de una rata Wistar. Esta línea celular se ha utilizado para estudiar la activación de fosfolipasas, proteínas-cinasas y proteínas G pequeñas.

9.2) Oligonucleótidos

En este trabajo se utilizaron oligonucleótidos para experimentos de RT-PCR, cuyo blanco son los mRNA de *iqgap1*, β -actina y *smad7*. El primer par de oligonucleótidos (Zhang, Li, Wang, Zhang, & Ye, 2012) se utilizó para observar si es que *iqgap1* es un gen blanco temprano de TGF- β , mientras que β -actina sirvió para normalizar los experimentos de RT-PCR. Además, *smad7* se utilizó como control positivo de regulación por TGF- β (Briones-Orta, et al., 2006). Finalmente, también se utilizaron oligonucleótidos para clonar el promotor de *iqgap1* en rata. Su diseño y especificaciones se muestran en la sección 5.7.1. Las secuencias de cada uno de los oligonucleótidos se pueden ver en la **Tabla 1**.

Tabla 1. Información sobre los oligonucleótidos utilizados para evaluar los niveles de diferentes RNA mensajeros por RT-PCR.

RNAm Blanco	Oligos: Secuencia 5'-3'	Amplicón (Tamaño esperado)
<i>mRNA de iqgap1</i>		
Sentido	caa agg tgg atc aga ttc aag	636 pb
Antisentido	ggt gag cat tat cac cca gaa	
<i>mRNA de β-actina</i>		
Sentido	ggg tca gaa gga ttc cta tg	237 pb
Antisentido	ggt ctc aaa cat gat ctg gg	
<i>mRNA de smad7</i>		
Sentido	gcc ctc tct gga tat ctt ct	319 pb
Antisentido	gct gca taa act cgt ggt ca	
<i>Promotor iqgap1</i>		
Sentido	taa gca ggt acc ttt aaa gag ccg cgg tac a	416 pb
Antisentido	taa gca gag ctc ccg gtg agg aag agc aga ga	

9.3) Análisis bioinformático del promotor del gen *iqgap1*

9.3.1) Predicción de la región promotora del gen *iqgap1* en rata

Para establecer cual era la región promotora del gen *iqgap1* en rata, la cual todavía no se había descrito, se hizo un análisis bioinformático de la región -499 a +100 pb desde el sitio de inicio de la transcripción + 1 (TSS). La secuencia del gen se obtuvo a partir de la base de datos *RefSeq*, la cual pertenece al *National Center for Biotechnological Information* (NCBI). Se buscó en *USCS Genome Browser*, que es un compendio de diferentes marcas genéticas y epigenéticas a lo largo de los genomas de varios organismos, islas CpG's que se encontraran en esta región. Posteriormente, dentro de la región -499 a +100 pb, se predijeron sitios de unión de factores de iniciación de la transcripción (TFIID, TFIIB, TBP, Sp1, Nrf-1, etc.) utilizando el programa *Algen-PROMO*. Finalmente, para establecer que verdaderamente se trataba de una región promotora, se hizo un análisis con el programa de *Softberry*, el cual cuenta con tres algoritmos para predecir promotores (dependientes o independientes de una caja TATA) en eucariontes: *FPROM*, *TSSG* y *TSSW*. Como comparativo, se utilizó la misma región pero en el gen de ratón, y se hicieron los mismos análisis antes descritos.

Para establecer que el gen *iqgap1* es regulado por la vía del TGF- β , se buscaron sitios de unión de Smad2 y 3 (SBE's) dentro de la región promotora, utilizando la base de datos de factores transcripcionales *Jaspar*, la cual contiene algoritmos para encontrar sitios de unión de la mayoría de los Factores Transcripcionales reportados. Para tener aún más seguridad de que se trataba de un gen regulado por TGF- β , una vez más, se compararon las regiones promotoras de dos especies (ratón y rata), para establecer si los SBE's se mantenían. Para lo anterior, se hicieron alineamientos y anotaciones en las secuencias utilizando el programa *Geneious*®.

9.3.2) Análisis funcional bioinformático sobre el promotor de *iqgap1*

Para identificar a otras probables vías de señalización que pudieran afectar la regulación del gen *iqgap1*, ya sea de manera antagonista o que sinergizen con el TGF- β a través de las Smads, se tomó la región -499 a +100 pb's partiendo del TSS del gen *iqgap1* en rata y ratón, y se hizo una predicción de Factores

Transcripcionales de humano, rata y ratón, que compartieran ambas secuencias y que mantuvieran un 85% de similitud a las matrices reportadas en la base de datos *TRANSFAC*, utilizando el programa *Alggen-Promo*.

Teniendo la lista de factores transcripcionales compartidos de las tres especies, se removieron factores transcripcionales homólogos, dándole prioridad a las proteínas humanas, después a las murinas y al final a las de rata. Además, solamente se utilizaron aquellas proteínas que contaban con un registro en *Uniprot*. Una vez que se contó con esta lista, se hizo un análisis funcional de ésta utilizando el programa *Cytoscape*, un software libre que sirve para visualizar y analizar redes moleculares y de interacción génica (Cline et al., 2007), con el *plugin Reactome FI* (Croft et al., 2014), el cual utiliza su misma base de datos *Reactome* y a *Gene Ontology* para asignar funciones y procesos biológicos en los cuales han sido reportadas cada una de las proteínas a analizar. Con este programa se le asignaron vías de señalización, procesos biológicos y/o patologías en las cuales se ha reportado a cada una de las proteínas que se encontraban en la lista. En este trabajo únicamente nos basamos en las bases de datos *Gene Ontology Biological Processes* y *Reactome Pathways*, con un $FDR \leq 0.05$ para ambos análisis.

Del resultado de los dos análisis anteriores, se escogieron aquellos factores transcripcionales de interés para este trabajo, particularmente aquellos a los cuales se les asignaron procesos que contaran con los términos: *TGF- β* , *Smad*, *transición epitelio-mesénquima* y *cancer*. Una vez seleccionados dichos factores transcripcionales, se estableció su colocalización con las SBE's, es decir, que los sitios de unión de los factores transcripcionales se solapaban o se encontraban a 10 nucleótidos de distancia.

9.4) Análisis experimental de la región promotora del gen *iqgap1* de rata

9.4.1) Diseño de oligonucleótidos para clonación de la región promotora del gen *iqgap1* de rata

Como nos interesaba estudiar la regulación transcripcional del gen *iqgap1*, en particular en respuesta al *TGF- β* , se diseñaron oligonucleótidos que

flanquearan las SBE's predichas que se conservaban en los promotores de los genes de rata y de ratón.

Para lo anterior, se utilizó el programa *Primer Blast*, mantenido por el NCBI, el cual da una serie de posibles pares de oligonucleótidos. Se escogieron aquellos en los cuales el producto contenía a los 4 SBE's y que tenían una longitud de 20-21 nucleótidos (*nt's*) de homología con las secuencias adyacentes a la región a clonar. A estos se les añadieron sitios de corte por enzimas de restricción para clonarlos en el plásmido *pGL3-Basic Vector (Promega)*, al igual que una secuencia extra de por lo menos 6 nucleótidos.

Finalmente, los oligonucleótidos modificados se analizaron con *Oligo-Analyzer 3.1* para establecer si formaban homodímeros, heterodímeros u horquillas. Esto con el fin de corroborar que se trataban de oligonucleótidos funcionales. Finalmente, para confirmar que las modificaciones no habían alterado el reconocimiento de la secuencia blanco, ambos se revisaron mediante un BLAST en NCBI contra la secuencia genómica de *Rattus norvegicus*.

9.4.2) Clonación del promotor del gen *iqgap1* de rata y su reverso

Para clonar el promotor se utilizó DNA genómico obtenido de hígado de rata, como se establece en el **Anexo 14.1.1**. La muestra de DNA purificado se cuantificó a una longitud de onda de 260 nm y se utilizaron 100 ng por reacción.

Se utilizó el siguiente programa en el termociclador: 30 ciclos de 20 s de desnaturalización, 15 s a 65 °C de alineamiento y 15 s de elongación, utilizando la enzima *Pfu II Ultra HS DNA Polymerase* (Agilent). El producto se resolvió mediante un gel de agarosa al 1% en buffer TBE. La banda de interés se purificó mediante el kit "Axyprep DNA Gel Extraction". Una vez purificada, esta banda fue sometida a reacciones con enzimas de restricción *KpnI* y *SacI* para ser ligado al plásmido *pGL3-Basic* cortado con las mismas enzimas (plásmido *iqgap1SBE's*).

Una vez clonado el promotor en el plásmido, se secuenció para comprobar que era la región promotora del gen *iqgap1*. Cuando se corroboró que la secuencia clonada era la correcta, se recuperó la región promotora

mediante una reacción con enzimas de restricción *XhoI* y *SacI* sobre el plásmido que ya contaba con el promotor clonado. El producto de esta reacción se subclonó en un plásmido *pGL3-Basic*, pero digerido con las enzimas *XhoI* y *SacI*, obteniendo así el promotor del gen *iqgap1* de rata invertido (plásmido *iqgap1SBE's 3'-5'*).

9.4.3) Ensayos de gen reportero con luciferasa sobre la región promotora del *iqgap1* en rata

Se transfectaron células HepG2 fueron transfectadas transitoriamente con un gen reportero conteniendo el promotor del gen *iqgap1* de rata (orientado 5'-3') o su reverso (orientado 3'-5'), por medio del método de fosfato de calcio, como se ha descrito previamente (Macias et al., 1996). Brevemente, se tomó una caja a 80-100% de confluencia con células HepG2 y se sembró en una placa con 12 pozos a una confluencia del 40%, en 0.5 mL de medio MEM Gibco® (complementado con 10% FBS, penicilina/streptomycin, 1% piruvato de sodio) en cada uno de los pozos.

Al día siguiente, se cambió el medio por nuevo (0.5 mL) 2 horas antes de transfectar las células con fosfato de calcio. Para transfectar las células, se preparó una "Master Mix" (buffer HEBS 1X, CaCl₂ 1.2 M), que contenía la mezcla del plásmido con la secuencia del promotor a analizar y el plásmido que codifica para β-gal, como control de transfección. Se agregaron de 0.5 a 1.4 μg de DNA total por pozo. Se incubaron las células toda la noche a 37 °C y posteriormente las células se ayunaron con medio sin suero fetal bovino, de 6-8 horas. Después, se renovó el medio con 0.5 mL por pozo y se estimuló con TGF-β (100 pM) y se incubó toda la noche. Al día siguiente a cada uno de los pozos se les hizo un lavado con 1 mL de PBS 1X, y después se agregaron 50 μL de Buffer de Lisis Reportero 1X (*Promega*) por pozo. Se recuperó el volumen y se utilizaron 5 μL del lisado más 25 μL de sustrato para luciferasa (*Promega*) para establecer la producción de ésta. Se midió la luminiscencia con "20/20 Luminometer" (*Turner Biosystems*), y se establecieron los datos obtenidos como unidades relativas.

9.5) RT-PCR en líneas celulares

9.5.1) Cursos temporales de estimulación con TGF- β de células hepáticas

Para inducir la expresión de genes blanco del TGF- β , se incubaron a las células de las líneas C9 y AS-30D con una concentración de 0.3 nM de TGF- β , y a las células cebadas con 0.1 nM, por los tiempos indicados. Durante el estímulo, las células se mantienen a 37 °C con 5% de CO₂.

Las células C9 se mantienen en cultivo con medio DMEM bajo en glucosa (Gibco), complementado con L-glutamina 5% y 10% de suero fetal bovino (FBS). Para hacer el estímulo, se les ayunó 12-16 h con 2 mL de medio DMEM sin FBS (medio de ayuno), cuando éstas se encontraban en una confluencia cercana al 100%. El día en que se realiza el curso temporal, se les cambian los 2 mL de medio de ayuno por 1.5 mL del mismo medio, y en este es en donde se aplican los diferentes estímulos, en los tiempos que se indiquen.

Por otra parte, en las células AS-30D antes de ser estimuladas, se mantienen en agitación a 4 °C. Se centrifugan a 800 rpm en centrífuga *Allegra 21R* por 2 min a 4 °C para eliminar la solución Krebs-Ringer por medio de aspiración. Se resuspenden en 35-40 mL de medio Williams E y se dejan en agitación. Se hace una mezcla de 100 μ L de células AS-30D resuspendidas y 100 μ L de azul de tripano, y de esta mezcla se toman 10 μ L, los cuales se cuentan en la cámara de Neubauer, mediante la fórmula: (el promedio del número de células de los 4 cuadrantes) x 2 x 10,000 = número total de células / mL. Se ponen alrededor de 3×10^6 células por pozo, en una placa para cultivo de 6 pozos, complementando lo faltante de volumen con el mismo medio Williams E hasta tener 2 mL.

9.5.2) Extracción de RNA con TRIzol

**Para obtener RNA se utilizaron materiales estériles y, de ser posible, sin RNAsas. Las soluciones utilizadas eran de grado biología molecular.*

Se procesaron las células añadiendo 1 mL de TRIzol (Invitrogen) por cada pozo. Se mezcló por pipeteo hasta que se obtuvo un líquido poco viscoso, que se transfirió a microtubos Eppendorf, y se incubó por 5 min a temperatura ambiente. Al terminar el tiempo de incubación, se le agregaron a cada una de

las muestras 0.2 mL de cloroformo y se agitó vigorosamente por 15 seg. Se centrifugaron las muestras por 45 min a 3,500 rpm en microcentrífuga a 4 °C. Se obtuvieron 2 fases, de las cuales se recuperaron la fase acuosa en tubos nuevos. A esta se le agregaron 0.5 mL de isopropanol por muestra, se mezcló por inversión y se volvieron a centrifugar las muestras por 45 min a 4 °C a 3,500 rpm en microcentrífuga (para las células C9 se utilizan 11,000 rpm). Se descartó el sobrenadante y se le dio un lavado con 1 mL de etanol al 75%, centrifugando por 30 min a 4 °C y 3,500 rpm en microcentrífuga. Finalmente, se eliminó el sobrenadante, y se secaron los pellets. Se resuspendieron en un volumen adecuado de H₂O tratada con DEPC (dietilpirocarbonato) libre de RNAsas y se congelan a -70 °C.

9.5.3) Generación de cDNA

**Se siguen las mismas condiciones de esterilidad para obtener cDNA que para extraer el RNA.*

A partir del RNA extraído, se cuantificó la concentración de RNA de cada una de las muestras, utilizando 2 µL de las mismas. Una vez cuantificados, se tomó el volumen adecuado para tener 2 µg de RNA por muestra, se llevaron al mismo volumen todas las muestras con H₂O (8-10 µL) y a cada una de las muestras de 2 µg de RNA se les agregaron 1 µL de hexámeros aleatorios (Invitrogen), 1 µL de coctel de dNTP's (Invitrogen) y se llevaron todas las muestras a un volumen final de 12-16 µL con dH₂O.

Se incubaron las muestras a 65 °C por 5 min en termociclador, e inmediatamente después se incubaron en hielo. A cada una de las muestras se le agregaron 4 µL de Buffer 5X para M-MLV RT (Invitrogen) y 2 µL de ditiotreitil 0.5 mM (DTT, Invitrogen). Posteriormente, las muestras se incubaron por 2 min a 37 °C en el termociclador, y finalmente a cada una de las muestra se le agregó 1 µL de retro-transcriptasa M-MLV (Invitrogen). Estas muestras se sometieron al siguiente programa en el termociclador: 10 min a 25 °C, seguidos por 50 min a 37°C y finalmente 15 min a 72°C. Terminado el programa, se obtuvo el cDNA de cada una de las muestras, el cual se puede guardar a -20°C.

9.5.4) PCR usando como molde al cDNA

Para observar los cambios de expresión de mRNA de los genes blanco de TGF- β , se realizaron **PCR's** sobre los cDNA's obtenidos. Para lograr esto, se tomó 1 μ L del cDNA de la muestra a analizar, y se le agregaron 0.5 μ L de cada uno de los oligonucleótidos que conforman el par para analizar el mRNA deseado. También, a cada una de las muestras, se les agregaron 4 μ L de H₂O y 6 μ L de *Taq PCR master mix kit* (Invitrogen), para tener un volumen final de 12 μ L. Una vez que se tiene la mezcla, dependiendo de qué células y qué mRNA se quiera observar, se sometieron a los programas de PCR establecidos en la **Tabla 2**. Finalmente, los productos de la PCR se analizaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 1.5 %.

Tabla 2. Programas utilizados para la amplificación de diferentes RNA mensajeros por RT-PCR.

RNAm	C9	AS-30D	Fase de Desnaturalización		Fase de Alineamiento		Fase de elongación	
	Núm.	Ciclos	Tiempo	Temperatura	Tiempo	Temperatura	Tiempo	Temperatura
<i>Iqgap1</i>	28	27	1 min	95 °C	45 seg	60 °C	1 min	72 °C
<i>β-actina</i>		23	45 seg		30 seg	55 °C		
<i>Smad7</i>		26						

9.6) Ensayos de inmunoblots

9.6.1) Obtención de extractos de proteínas de células estimuladas con TGF- β

Para la obtención de muestras de proteínas en concentraciones basales y de cursos temporales en respuesta al TGF- β , se utilizó una mayor cantidad de células por experimento que en los realizados para obtener RNA.

Para las muestras de cultivo primario de hepatocitos se utilizaron 3 millones de células por caja. Después de ser aislados, se incuban por 4 h a 37 °C en cajas de 10 cm de diámetro cubiertas con colágena tipo I de cola de rata. Posteriormente se les cambia el medio de cultivo por un medio de adherencia libre de FBS y se incuban por 24 h (Delgado-Coello et al., 2010), antes de ser sometidas a los estímulos establecidos. Se utilizó una caja por punto del curso temporal. Para cultivos de hepatocitos prolongados, el medio se cambiaba cada segundo día con medio de adherencia sin FBS.

Para las células C9 se utilizó un cultivo confluyente, en una caja Petri de 10 cm de diámetro, mientras que las células RBL-2H3 se mantienen en medio

de cultivo DMEM bajo en glucosa (Gibco) complementado con 100 μ M de aminoácidos no esenciales (NEAA 100X, Gibco), piruvato de sodio 1 mM, y 10% FBS inactivado, y se realiza el mismo procedimiento de ayuno que en la línea celular C9 para hacer los estímulos de TGF- β .

9.6.2) Obtención de extractos de proteínas totales

Las células se lisaron en 1 mL de buffer RIPA o TNTE al 0.5% de tritón X-100, según se indique, en agitación a 4 °C por 1 h. Una vez que terminó este tiempo de incubación, se centrifugaron a 11,000 rpm en una microcentrífuga por 5 min a 4 °C y se recuperó el sobrenadante en microtubos nuevos. Para guardarse, los extractos de proteína se congelaron rápidamente en etanol al 96% a -70°C durante 15 min, y posteriormente se almacenaron a -70°C, para usarse en futuros experimentos.

Para realizar el análisis de las muestras, los extractos de proteína se dejaron descongelar totalmente en hielo, y se cuantificaron 2 μ L por muestra mediante el método de Bradford. Una vez cuantificados, se tomó el volumen necesario para tener la concentración requerida de proteínas, y se les agregó suficiente Buffer Laemli 2X (65.8 mM Tris-HCl, pH 6.8, 2.1% SDS, 26.3% glicerol, β -mercaptoetanol), para que el volumen final quede en una concentración 1X. Posteriormente se incubaron a 95 °C por 5 min, después se dejaron reposar a temperatura ambiente, y se guardaron a -20 °C o se analizaron inmediatamente por electroforesis en geles desnaturalizantes de poliacrilamida.

9.6.3) Western Blot

Una vez que las muestras de proteínas se resolvieron en geles de poliacrilamida, estas se transfirieron a membranas de PVDF. Esta membrana con las proteínas se bloqueó con buffer TBS-T (NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, Tris base 19mM, Tween-20 0.1 %) con leche descremada (*Svelty*) al 5% por 1 h a temperatura ambiente. Se enjuagó con agua desionizada y se lavó con TBS-T, y posteriormente se incubó con el anticuerpo primario deseado a la dilución adecuada (generalmente 1:1000-1:2000) en el menor volumen posible de TBS-T dentro de una bolsa de plástico, toda la noche a 4 °C y con agitación. En este

trabajo se utilizaron los anticuerpos contra β -tubulina de *Sigma*, anti-IQGAP1 (H-109) de *Santa Cruz*, anti-p-Smad2 carboxilo terminal (Ser465/467) o anti-p-Smad2 en la región linker (Ser245/250/255) de *Cell Signaling*.

Terminado el período de incubación, la membrana se enjuagó con agua desionizada y se lavó con TBS-T, y luego se incubó con anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa de rábano *HRP* (en una dilución 1:10,000-1:20,000, según convenga) en TBS-T con leche descremada al 5% por 1 h, a temperatura ambiente con agitación.

Después de la incubación, se lavó con abundante agua desionizada y TBS-T, y se detecta con reactivo *Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate* (Milipore) a la dilución conveniente, y con placas radiográficas *Medical X-ray Film General Purpose Blue Kodak*[®].

9.7) Análisis bioinformático del interactoma de IQGAP1

9.7.1) Obtención del interactoma de IQGAP1

Como la función primordial de IQGAP1 es la de ser un andamio (*scaffold*) para favorecer las interacciones entre diversas proteínas, es importante saber cuáles son las proteínas con las que se ha reportado que IQGAP1 interacciona para establecer sus funciones en un contexto dado. Para saber lo anterior, se hizo una búsqueda en la base de datos *IntAct*, del EMBL-EBI, la cual contiene interacciones proteína-proteína curadas por bioinformáticos. Se utilizaron los identificadores *Uniprot* P46940 (humano), Q9JKF1 (ratón) y G3V7Q7 (rata) para obtener todas las interacciones reportadas para IQGAP1 en estas tres especies. De igual forma, también se hizo una búsqueda bibliográfica para obtener interacciones que todavía no fueran reportadas en la base de datos. Posteriormente, se utilizó el programa *Cytoscape* para graficar el número de interacciones entre las proteínas del interactoma de IQGAP1 y ésta.

9.7.2) Análisis de agrupamiento

Para hacer un análisis funcional del interactoma de IQGAP1 se utilizó el *plugin* de *Cytoscape* llamado *ClueGO* (Bindea et al., 2009), el cual se utiliza para visualizar términos biológicos de *clusters* largos de genes o proteínas para ser agrupados funcionalmente en una red. Este *plugin* utiliza índice de *kappa* para hacer agrupamientos y muestra las relaciones entre términos basados en la

similitud de sus genes asociados. Para este trabajo se utilizó un valor de $\kappa= 0.4$, una significancia de términos ontológicos con un valor $p < 0.05$ y las bases de datos del *Gene Ontology Biological Processes*, *Reactome Pathways* y *KEGG*.

Nuestro modelo de estudio en este momento fueron células cebadas de rata, debido a su naturaleza mesenquimatosa, así que nos concentramos en estudiar aquellos fenómenos que estuvieran relacionados con la función de este tipo celular bajo el estímulo del TGF- β . Por lo anterior, se tomaron aquellos términos que contuvieran las palabras “citoesqueleto”, “movilidad” y “tráfico vesicular” de cada una de las tres redes, junto con sus proteínas asociadas, y se hizo una nueva red. Sobre esta red se buscaron genes que reportaron con microarreglo de DNA como regulados por TGF- β en células cebadas de humano a tiempos tardíos (5 días) (Wiener et al., 2007).

10) Resultados

10.1) Análisis bioinformático para establecer la región promotora del gen *iqgap1* en rata

Como no se encontraron estudios publicados, ya sean bioinformáticos o experimentales, en los cuales se hubiera analizado al promotor de *iqgap1* en rata, en este trabajo se delimitó la región promotora de este gen en rata. Conforme a lo anterior, en la base de datos UCCS Genome Browser se encontró que el TSS+1 del gen *iqgap1* en ratón como en el de rata se encontraba dentro de una isla CpG (**Anexo 14.2**). Conforme a lo anterior, se identificaron dentro de esta región a los sitios de unión para los factores de transcripción Nrf-1, Sp1, TFIID y TFIIB (**Figura 1A**). Además, en el probable promotor del gen *iqgap1* de rata se encontró una caja TATA a -125 pb de distancia del TSS+1, que era reconocida tanto por dos diferentes algoritmos de *Softberry*, TSSW y FPRM, como por el programa *Alggen-PROMO* (**Figura 1A,B**).

Con relación a la regulación transcripcional mediada por la vía del TGF- β , se encontraron 6 SBE's en la secuencia del gen de ratón y 5 en el de rata, que contaban con una similitud mayor o igual al 79 %. De igual forma, se observó que había 4 que se conservaban perfectamente entre las dos secuencias, lo cual se asemeja a un patrón antes observado y que se denomina elemento de respuesta al TGF- β (TRE, por sus siglas en inglés), que consiste de varios sitios de SBE's que se encuentran cercanos entre sí (**Figura 1B**).

10.2) Análisis funcional y localización de los factores transcripcionales descritos para el promotor de *iqgap1*

Una vez que se estableció que el gen *iqgap1* contaba con SBE's en regiones proximales del TSS que se conservaban en rata y ratón, se decidió hacer un análisis extra del probable promotor del gen, el cual ahora definiremos como la secuencia que abarca del -499 bp al +100 bp desde el TSS (+1), para establecer qué otros factores transcripcionales se unían a las secuencias de rata y ratón.

Se obtuvieron 187 matrices que se encontraban en los promotores de ambas especies, las cuales representan secuencias consenso de factores transcripcionales descritos en humano, rata y ratón. Sin embargo, mediante un curado manual, se obtuvo que 29 matrices no tenían referencia externa alguna, es decir que no tenían un registro en *Uniprot* o *EMBL*, y que 14 matrices no contaban con acceso gratuito. Esto último se debió a que utilizamos los registros públicos de la base de datos *TRANSFAC* y no aquellos que requieran de una licencia. Siguiendo los dos criterios de exclusión anteriores, se obtuvieron 143 matrices finales, las cuales generaban, quitando las proteínas homólogas entre especies, un total de 106 factores transcripcionales de rata, ratón y humano. Teniendo esto, se analizaron con el *plug-in Reactome FI*, en el cual solamente se encontraron 59 en la base de datos de *Reactome*.

Cuando se anotaron los procesos y vías en los cuales se habían reportado a estos factores transcripcionales, se obtuvieron 177 procesos para el grupo de *Reactome Pathways* y 83 para *Gene Ontology Biological Processes*, como se puede observar en el **Anexo 14.2**. Dentro de los procesos, se escogieron aquellos que contenían los siguientes términos: *la vía del TGF- β* , *proteínas SMAD*, *regulación de proliferación celular*, *transición epitelio-mesénquima* y *ciclo celular*. Esto nos dio un total de 4 términos para el análisis con *Reactome Pathways* y 6 para el análisis de *Gene Ontology Biological Processes* (**Tabla 2**), que en conjunto contenían 35 factores transcripcionales: ARNT, CEBPA, CEBPB, E2F1, E2F5, EP300, ESR1, ETS1, FPS, FPCA2, FOXO3, GATA1, GATA3, HNF1A, IRF1, JUN, MYOD1, NKX2-1, PAX2, PAX5, RARB, RXRA, SP1, SP3, STAT1, STAT5A, TCF3, TFAP2A, TFAP4, TFDP1, TGIF1, TP53, VDR, WT1 y ZEB1 (se puede ver la tabla con el análisis completo en el **Anexo 14.3**).

Luego, se vio que los sitios de unión de algunos factores transcripcionales se sobrelapaban con los SBE's predichos por *JASPAR*, o que se encontraban muy cercanos a éstos, y que se conservaba su posición tanto en el promotor de rata como en el de ratón. Se muestran los sitios de factores transcripcionales que se encontraban tanto en rata y ratón en el **Anexo 14.4**. Se puede observar que en el SBE2, en donde se encuentra la caja TATA del promotor del gen de rata, hay varios factores de la lista anterior (**Figura 1C**).

Tabla 2. Listas de los procesos biológicos asignados a los factores transcripcionales analizados con las bases de datos *Gene Ontology Biological Processes* y *Reactome Pathways*.

Gene Ontology Biological Processes	Ratio of protein in gene Set	Number of protein in Gene Set	Protein From Network	P-value	FDR	Proteins
Signaling by TGF-beta Receptor Complex(R)	0,0071	70	4	0,0005	3.09E-03	E2F5,TGIF1,TFDP1,SP1
Cell cycle(K)	0,0125	124	5	0,0005	3.02E-03	E2F1,E2F5,TP53,EP300,TFDP1
Pathways in cancer(K)	0,0330	327	12	0,0000	<5.882e-05	E2F1,STAT5A,FOS,RARB,RXRA,TP53,EP300,JUN,ARNT,CEBPA,STAT1,ETS1
Transcriptional misregulation in cancer(K)	0,0180	179	9	0,0000	<4.545e-05	PAX5,ZEB1,RXRA,TP53,WT1,TCF3,CEBPA,CEBPB,SP1
Reactome pathways	Ratio of protein in gene Set	Number of protein in Gene Set	Protein From Network	P-value	FDR	Proteins
Regulation of nuclear SMAD2/3 signaling(N)	0,0078	77	13	0,0000	<1.000e-03	MYOD1,FOXO3,FOS,GATA3,ESR1,EP300,JUN,TGIF1,VDR,TCF3,CEBPB,SP1,SP3
regulation of cell cycle SMAD protein signal transduction	0,0057	60	3	0,0048	4.99E-02	E2F5,JUN,IRF1
negative regulation of epithelial to mesenchymal transition	0,0015	16	3	0,0001	4.29E-03	HNF1A,FOS,JUN
mesenchymal to epithelial transition	0,0013	14	2	0,0029	3.36E-02	FOXA2,NKX2-1
negative regulation of cell proliferation	0,0007	7	3	0,0000	3.33E-04	PAX2,GATA3,WT1
	0,0305	321	13	0,0000	<1.250e-04	ZEB1,GATA1,GATA3,RARB,JUN,TGIF1,TFAP2A,TFAP4,WT1,VDR,CEBPA,ETS1,IRF1

10.3) Clonación del promotor *iqgap1* de rata y ensayos de gen reportero

Una vez que se hizo el análisis funcional de los factores transcripcionales se buscó clonar para el promotor del gen *iqgap1* en rata. El par de oligonucleótidos diseñados en este trabajo para clonar la región -315 a +80 pb tomando como referencia el TSS+1 del gen *iqgap1* en rata que se muestra en la **Figura 2A**. Haciendo la reacción de PCR con estos oligonucleótidos sobre DNA genómico de rata, se obtuvo un producto de aproximadamente 400 pb (**Figura 2B**). A estos oligonucleótidos se les añadieron sitios de corte para enzimas de restricción que se encuentran dentro del *Multiple Cloning Site (MCS)*, de tal forma que de ser digerido con el par de enzimas *KpnI-SacI* quedaría orientado en dirección 5'-3' río arriba del gen de luciferasa, mientras que si se digería con el par *XhoI-SacI* quedaría clonado como su reverso (**Figura 2C**). Para corroborar las dos construcciones, se hicieron reacciones enzimáticas con *XhoI* en el plásmido *iqgap1SBEs* y con *XhoI* y *XhoI/SacI* en el plásmido *iqgap1SBEs(3'->5')* (**Figura 2D**).

Teniendo ambos plásmidos, se hicieron ensayos de reportero en las células HepG2, en las cuales se transfectaron 0.2 µg de plásmido por pozo. En el caso de la células transfectadas con el plásmido *iqgap1SBE's*, se pudo observar que había actividad de luciferasa de forma basal. De igual forma, se

observó que a pesar de que las células eran estimuladas con TGF- β , no había diferencia alguna con el control. Por otra parte, las células transfectadas con el plásmido *iqgap1SBE's* (3'->5') no presentaban actividad alguna (**Figura 2E**).

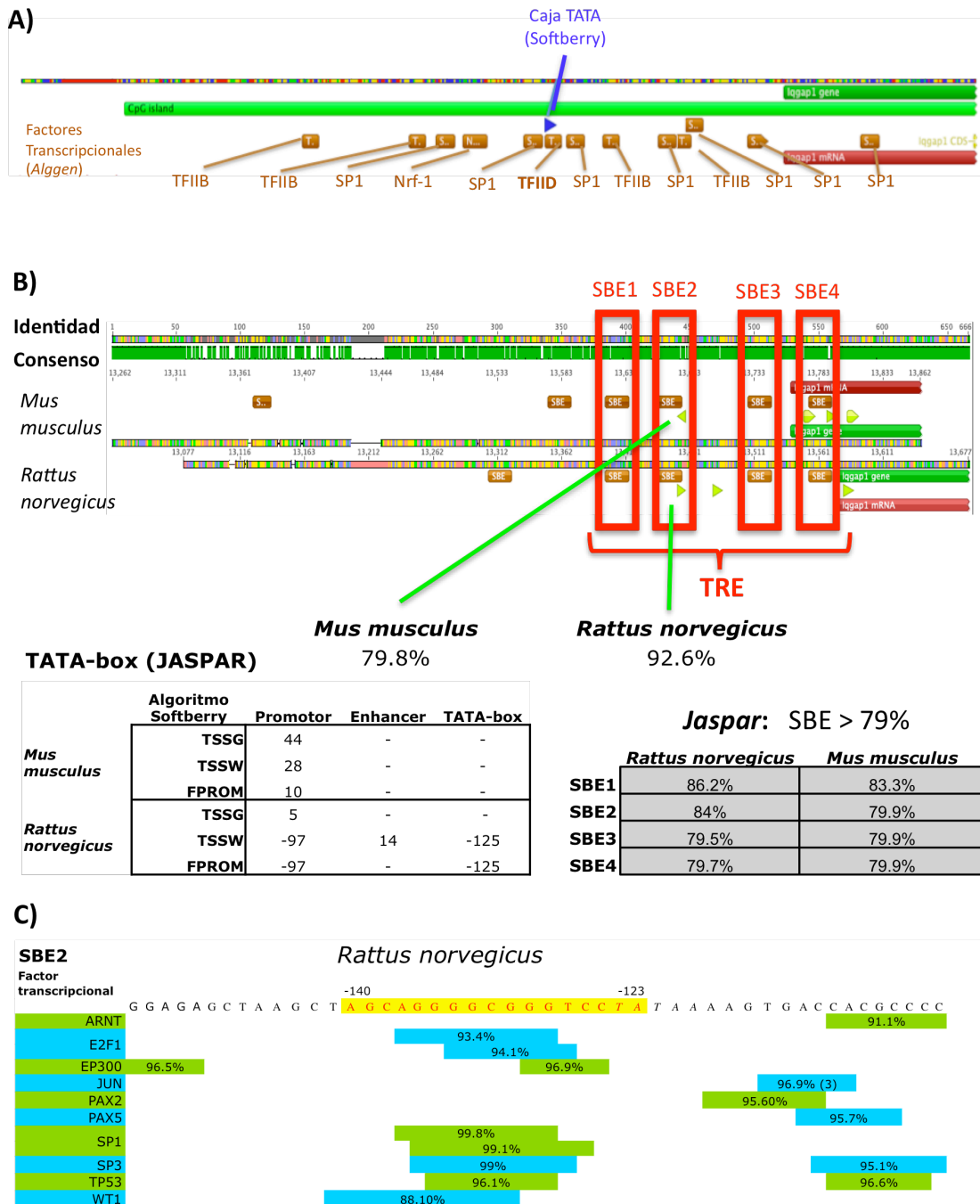


Figura 1. Análisis bioinformático del promotor de *iqgap1* en rata. A) Delimitación de la posible región promotora de *iqgap1* en rata. Con cuadrados café se denotan los factores de transcripción TFIIB, SP1, TFIID y NRF-1, predichos por *Algen-PROMO*. En azul se denota la posible caja TATA según al algoritmo *Softberry*. B) Análisis bioinformático comparativo entre las regiones del probable promotor de *iqgap1* en rata y ratón. En café se denotan las SBE's en rata y ratón, y en recuadros rojos se muestran aquellas secuencias que se conservaron en las dos especies. Se denota el análisis de la predicción de promotores en rata y ratón, la localización y el algoritmo que lo predijo. C) Colocalización de Factores Transcripcionales con las SBE's en rata. Se muestran aquellos factores transcripcionales de interés que colocalizaron con las SBE's predichas por JASPAR en el probable promotor del gen *iqgap1* en rata y ratón, es decir, los que se sobrelapaban o que se encontraban a un máximo de 10 pb's de distancia.

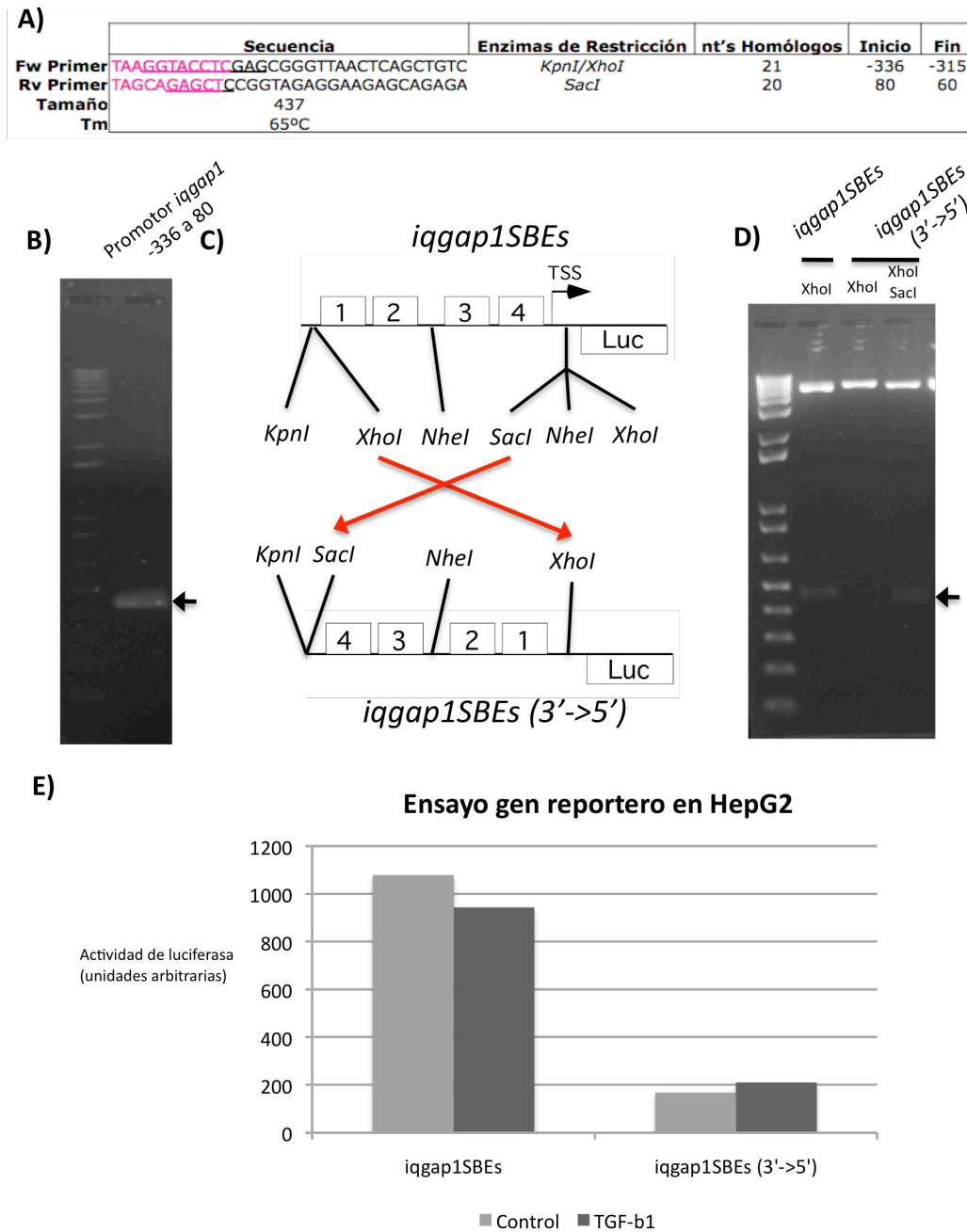


Figura 2. Ensayos con gen reportero sobre el promotor del *iqgap1* en rata. Se muestran los oligonucleótidos diseñados para la clonación del promotor *iqgap1* en rata A), el producto del PCR utilizando los oligonucleótidos sobre DNA genómico de rata, el esquema de la clonación de los dos plásmidos reporteros C) y la corroboración de las construcciones mediante restricciones enzimáticas. Se hizo un ensayo de gen reportero utilizando D) con el promotor del gen *iqgap1* clonado en dirección 5'-3' (*iqgap1SBEs*) y 3'-5' (*iqgap1SBEs 3'->5'*). Cada una de las cajas ennumeradas representa una SBE. B) Ensayo de gen reportero en HepG2 con el plásmido *iqgap1SBEs* e *iqgap1SBEs(3'->5')*, Se utilizaron 0.2 μ g de cada uno de los plásmidos por pozo.

10.4) Regulación transcripcional de *iqgap1* por TGF- β en células hepáticas de rata

En las líneas celulares, C9 y AS-30D, se hizo un curso temporal de tratamiento con 0.3 nM de TGF- β , como se ha descrito previamente, con estímulos por 0.5,

1, 2 y 4 h, y se midieron los niveles de mRNA como resultado de la inducción de los genes de *iqgap1* y *smad7*.

En las células C9 se pudo observar un aumento de los niveles del mRNA de *iqgap1* en respuesta al TGF- β , desde las 0.5 h, y esta inducción disminuye con el tiempo, al igual que el mRNA de *smad7*. Por otra parte, en las células AS-30D, se observó que la inducción del gen *smad7* se daba desde la 0.5 h y se sostenía lo largo de todo el curso temporal, pero no se observó aumento alguno del transcrito de *iqgap1* (**Figura 3A**).

10.5) Regulación de la proteína IQGAP1 por TGF- β en líneas celulares hepáticas de rata

Viendo que el TGF- β regulaba positivamente el gen de *iqgap1*, por lo menos en las células C9, se revisó si la concentración de la proteína IQGAP1 producto de este gen reflejaba el aumento en la transcripción del mRNA del gen *iqgap1*.

Para lo anterior, se realizó un curso temporal de 0.5, 1, 2 y 4 h en respuesta al TGF- β en la línea celular C9. Para establecer que se estaba activando la vía canónica del TGF- β , se observó la fosforilación de la región carboxilo terminal de la proteína Smad2. Conforme a lo anterior, se vio que la fosforilación aumentó desde las 0.5 h de estímulo con TGF- β , y que esta se mantenía hasta las 4 h. Por otra parte, para establecer si es que se activaban las vías no canónicas del TGF- β en la línea celular, se observó que la proteína Smad2 era fosforilaba en su región *linker*, con un pico a las 0.5 h, que disminuía a las 2 h y que se volvía a observar, pero en menor magnitud, a las 4 h. Pero, no se observó que hubiera un cambio perceptible en la concentración de la proteína IQGAP1. Como control de carga se utilizó a la proteína β -tubulina (**Figura 3B**).

Como no se observaba cambio alguno en la concentración de la proteína IQGAP1 en la línea celular C9, se planteó hacer una comparación de los niveles de la proteína en hepatocitos de rata con diferentes contextos celulares. Por lo anterior, se hizo un análisis comparativo entre un cultivo primario de hepatocitos, la línea C9 y la línea celular AS-30D. En este caso se observó que había una cantidad mucho mayor de la proteína en líneas celulares que en un cultivo primario de hepatocitos (**Figura 3C**).

Viendo que en la línea celular hepáticas de rata (C9) la concentración de la proteína IQGAP1 no se regulaba por la vía del TGF- β , se planteó hacer un experimento con un tratamiento con TGF- β por 1h en cultivo primario de hepatocitos. En este caso, se observó que sí había un aumento de alrededor de 2 veces la concentración basal (**Figura 3D**, panel izquierdo). Además, se vio después de mantener el cultivo de hepatocitos por 5 días también aumentaba la concentración de la proteína IQGAP1 (**Figura 3D**, panel derecho).

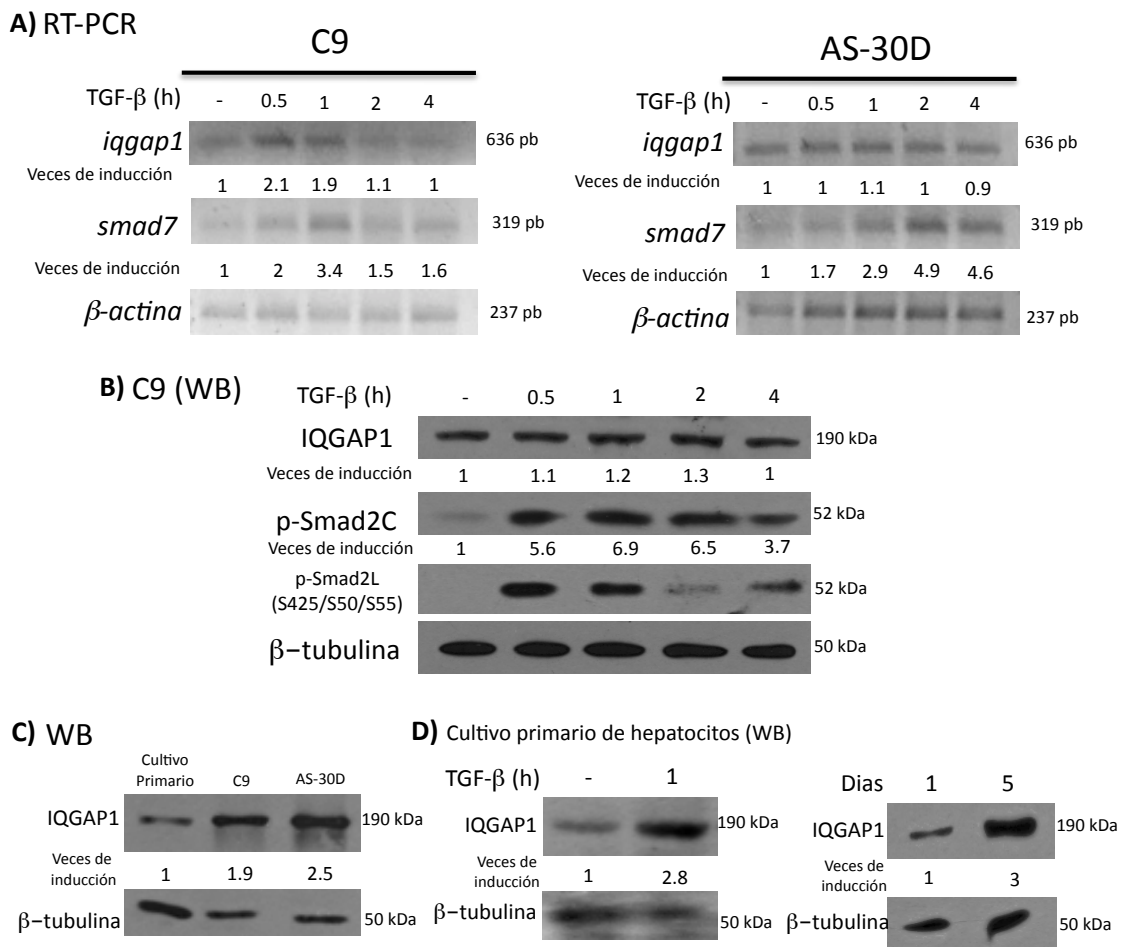


Figura 3. Regulación transcripcional del gen *iqgap1* y de su proteína en hepatocitos de rata. A) RT-PCR para observar la respuesta al TGF- β de los genes *iqgap1* y *smad7* en las líneas celulares C9 y AS-30D. β -actina se utilizó como control de carga. B) Western Blot para observar la respuesta de la proteína *iqgap1* al TGF- β . Anti p-Smad2C se utilizó como control de inducción de TGF- β y β -tubulina como control de carga. C) Western Blot comparativo de la concentración basal de la proteína IQGAP1 en cultivo primario de hepatocitos de rata y las líneas celulares C9 y AS-30D. D) Western Blot para establecer la presencia de IQGAP1 en cultivo de hepatocitos primarios. Se observa la concentración de IQGAP1 en cultivos primarios de hepatocitos en respuesta al TGF- β (panel izquierdo) y a cultivo prolongado (panel derecho). β -tubulina se utilizó como control de carga y se normalizaron con el control. Datos representativos de un solo experimento, con una n=2.

10.6) Regulación de la proteína IQGAP1 en RBL-2H3

Como se observó que las líneas celulares de hígado de rata no representaban un buen modelo para estudiar la regulación de la proteína IQGAP1 en respuesta al TGF- β , se hizo un curso temporal de estimulación con TGF- β en las células cebadas de rata RBL-2H3.

Como este tipo celular está considerado como altamente sensible al TGF- β , se hicieron cursos temporales de 5, 15, 30 y 60 min con estímulos de 100 pM de TGF- β . Se observó que la concentración de IQGAP1 subía aproximadamente 15 min después del estímulo, teniendo un pico a los 30 min y después regresaba a un nivel basal a los 60 min. Al igual que en el curso temporal en la línea C9, se verificó que tanto la vía canónica de la señalización del TGF- β como las vías no canónicas estuvieran activadas. Se observó que la fosforilación en el carboxilo de Smad2 era evidente desde los 5 min y se mantenía hasta los 60 min del estímulo. Por otra parte, la fosforilación en la región *linker* comienza a hacerse aparente a los 5 min de estímulo, y presenta su mayor aumento a los 30 min con una ligera disminución a los 60 min (**Figura 4**).

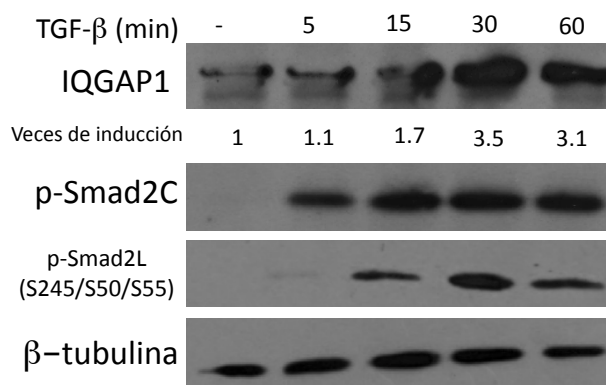


Figura 4. Regulación de la proteína IQGAP1 en la línea celular RBL-2H3. Experimento de Western Blot para observar la respuesta de la proteína IQGAP1 al TGF- β . Anti p-Smad2C se utilizó como control de inducción de la vía canónica del TGF- β , y p-SmadL para las vías no canónicas. β -tubulina se utilizó como control de carga y se normalizó con el control para ver la inducción. Datos representativos de un solo experimento, con una n=2.

10.7) IQGAP1 como *hub* en células cebadas

En la base de datos de *IntAct* solamente se encontraron 78 proteínas que interaccionaban con la proteína *iqgap1* en humano, rata y ratón. De estas, se observó que la mayoría tenían más de una interacción reportada, por lo que era más seguro que sean interacciones proteína-proteína comunes (**Figura**

5A). Además, se descubrió que hay más interacciones reportadas para IQGAP1, por lo que además se analizó la información de artículos que reportaban proteínas que todavía no se encontraban en la base de datos *Intact* (Hedman et al., 2015; Smith, Hedman, & Sacks, 2015; White et al., 2012)

Removiendo las proteínas homólogas entre las 3 especies, se obtuvo un total de 133 proteínas que interaccionaban con IQGAP1. Tomando éstas, se encontraron 285 términos ontológicos para la red generada con la base *Gene Ontology Biological Processes*, 81 con *KEGG* y 133 con *Reactome Pathways*. Una vez que se hizo el filtro de las palabras tráfico vesicular/citoesqueleto/migración y que se juntaron las redes, quedaron solamente 43 términos de *Gene Ontology Biological Processes* (**Figura 5B**), 5 de *KEGG* (**Figura 5C**) y 7 términos de *Reactome Pathways* (**Figura 5D**), con un total de 91 proteínas que participaban en alguno de los procesos (**Figura 5E, Anexo 14.6**).

Una vez que se buscaron los genes sobre-expresados y sub-expresados en ensayos de microarreglo en células cebadas de humano en respuesta al TGF- β (Wiener et al., 2007), se encontró que el mRNA de la proteína CD44, la cual pertenece al interactoma de IQGAP1, aumentaba con el estímulo del TGF- β . Asociada a esta, se encontraron en la red generada 9 términos que pertenecían solamente a *Gene Ontology Biological Processes* (**Figura 5F**). Ente estos, se encontraron los procesos de *migración leucocítica* y *migración celular* (**Tabla 4**).

Tabla 4. Lista de términos de procesos biológicos de la red generada del interactoma de IQGAP1 que contenían a la proteína CD44. También se muestran todas las demás proteínas que interactúan con IQGAP1 que se encontraron en esos procesos.

Gene Ontology Biological Processes	Term PValue	% Associated Genes	Associated Genes Found
cell migration	1.82E-21	4.98	[AKT1, APC, ARRB2, CD2AP, CD44 , CDH2, CDK1, CLASP2, CSF1, CTNNB1, CXCR2, DGKZ, DIAPH1, DVL2, EGFR, ESR2, FGFR1, FN1, GNB2L1, GRB2, ILK, ITGB1, KDR, KRAS, LPAR1, LRRK2, MAP2K1, MAPK1, MAPK14, MEN1, NFATC2, NRD1, PAFAH1B1, PDGFRB, PIP5K1C, PODXL, PRKCE, PTEN, PTK2, PTPRM, RAC1, RHOA, RIPK3, S100P, SHC1, SRC, TGFB2, TIAM1, VCAM1, WASF2, YWHAE]
leukocyte migration	4.58E-06	4.61	[CD44 , CXCR2, FN1, GRB2, ITGB1, KRAS, MEN1, PIP5K1C, PODXL, RAC1, RIPK3, SHC1, SRC, VCAM1]
positive regulation of phosphorylation	9.46E-20	5.55	[AKT1, ARRB2, BRAF, CD44 , CDC42, CDH2, CDK1, CSF1, CTNNB1, DVL2, EGFR, ERBB2, FGFR1, GNB2L1, ILK, IQGAP1, ITGB1, KDR, KISS1R, KRAS, LAMTOR2, LPAR1, LRRK2, MAP2K1, MAP2K2, MAP3K3, MAPK1, MAPK14, MAPK3, MTOR, PDGFRB, PPP2CA, PRKAA1, PRKACA, PRKCE, PTK2, RAC1, RAF1, RIPK3, SHC1, SRC, STK4, TGFB2]
positive regulation of protein metabolic process	2.02E-18	4.52	[AKT1, APC, ARRB2, BRAF, CALM1, CD44 , CDC42, CDK1, CSF1, CTNNB1, DVL2, EGFR, ERBB2, FGFR1, GNB2L1, ILK, IQGAP1, ITGB1, KDR, KISS1R, KRAS, LAMTOR2, LPAR1, LRRK2, MAP2K1, MAP2K2, MAP3K3, MAPK1, MAPK14, MAPK3, MEN1, MTOR, NRD1, PDGFRB, PPARGC1A, PPP2CA, PRKAA1, PRKACA, PTEN, PTK2, RAC1, RAF1, RIPK3, SHC1, SNW1, SREBF1, STK4, TGFB2]
positive regulation of protein phosphorylation	1.53E-18	5.79	[AKT1, ARRB2, BRAF, CD44 , CDC42, CDK1, CSF1, DVL2, EGFR, ERBB2, FGFR1, GNB2L1, ILK, IQGAP1, ITGB1, KDR, KISS1R, KRAS, LAMTOR2, LPAR1, LRRK2, MAP2K1, MAP2K2, MAP3K3, MAPK1, MAPK14, MAPK3, MTOR, PDGFRB, PPP2CA, PRKAA1, PRKACA, PTK2, RAC1, RAF1, RIPK3, SHC1, STK4, TGFB2]
protein phosphorylation	6.48E-18	4.04	[AKT1, APC, ARRB2, AURKA, BRAF, CAMK2G, CD44 , CDC42, CDK1, CSF1, DVL2, EGFR, ERBB2, FGFR1, GNB2L1, ILK, IQGAP1, ITGB1, KDR, KISS1R, KRAS, LAMTOR2, LPAR1, LRRK2, MAP2K1, MAP2K2, MAP3K3, MAPK1, MAPK13, MAPK14, MAPK3, MEN1, MTOR, PDGFRB, PPP2CA, PPP2R1A, PRKAA1, PRKAB1, PRKACA, PRKCE, PTEN, PTK2, RAC1, RAF1, RIPK3, RNASEL, SHC1, SPTBN1, SRC, STK4, TGFB2]
regulation of phosphorylation	1.46E-18	4.36	[AKT1, APC, ARRB2, BRAF, CD44 , CDC42, CDH2, CDK1, CSF1, CTNNB1, DVL2, EGFR, ERBB2, FGFR1, GNB2L1, GRB2, ILK, IQGAP1, ITGB1, KDR, KISS1R, KRAS, LAMTOR2, LPAR1, LRRK2, MAP2K1, MAP2K2, MAP3K3, MAPK1, MAPK14, MAPK3, MEN1, MTOR, MYC, PAFAH1B1, PDGFRB, PPP2CA, PPP2R1A, PRKAA1, PRKACA, PRKCE, PTEN, PTK2, RAC1, RAF1, RIPK3, SHC1, SRC, STK4, TGFB2]
regulation of protein modification process	2.06E-17	4.09	[AKT1, APC, ARRB2, BRAF, CALM1, CD44 , CDC42, CDK1, CSF1, CTNNB1, DVL2, EGFR, ERBB2, FGFR1, GNB2L1, ILK, IQGAP1, ITGB1, KDR, KISS1R, KRAS, LAMTOR2, LPAR1, LRRK2, MAP2K1, MAP2K2, MAP3K3, MAPK1, MAPK14, MAPK3, MEN1, MTOR, PDGFRB, PPARGC1A, PPP2CA, PPP2R1A, PRKAA1, PRKACA, PRKCE, PTEN, PTK2, RAC1, RAF1, RIPK3, SHC1, SNW1, SREBF1, STK4, TGFB2, YWHAE]
regulation of protein phosphorylation	3.80E-17	4.61	[AKT1, APC, ARRB2, BRAF, CD44 , CDC42, CDK1, CSF1, DVL2, EGFR, ERBB2, FGFR1, GNB2L1, ILK, IQGAP1, ITGB1, KDR, KISS1R, KRAS, LAMTOR2, LPAR1, LRRK2, MAP2K1, MAP2K2, MAP3K3, MAPK1, MAPK14, MAPK3, MEN1, MTOR, PDGFRB, PPP2CA, PPP2R1A, PRKAA1, PRKACA, PRKCE, PTEN, PTK2, RAC1, RAF1, RIPK3, SHC1, STK4, TGFB2]

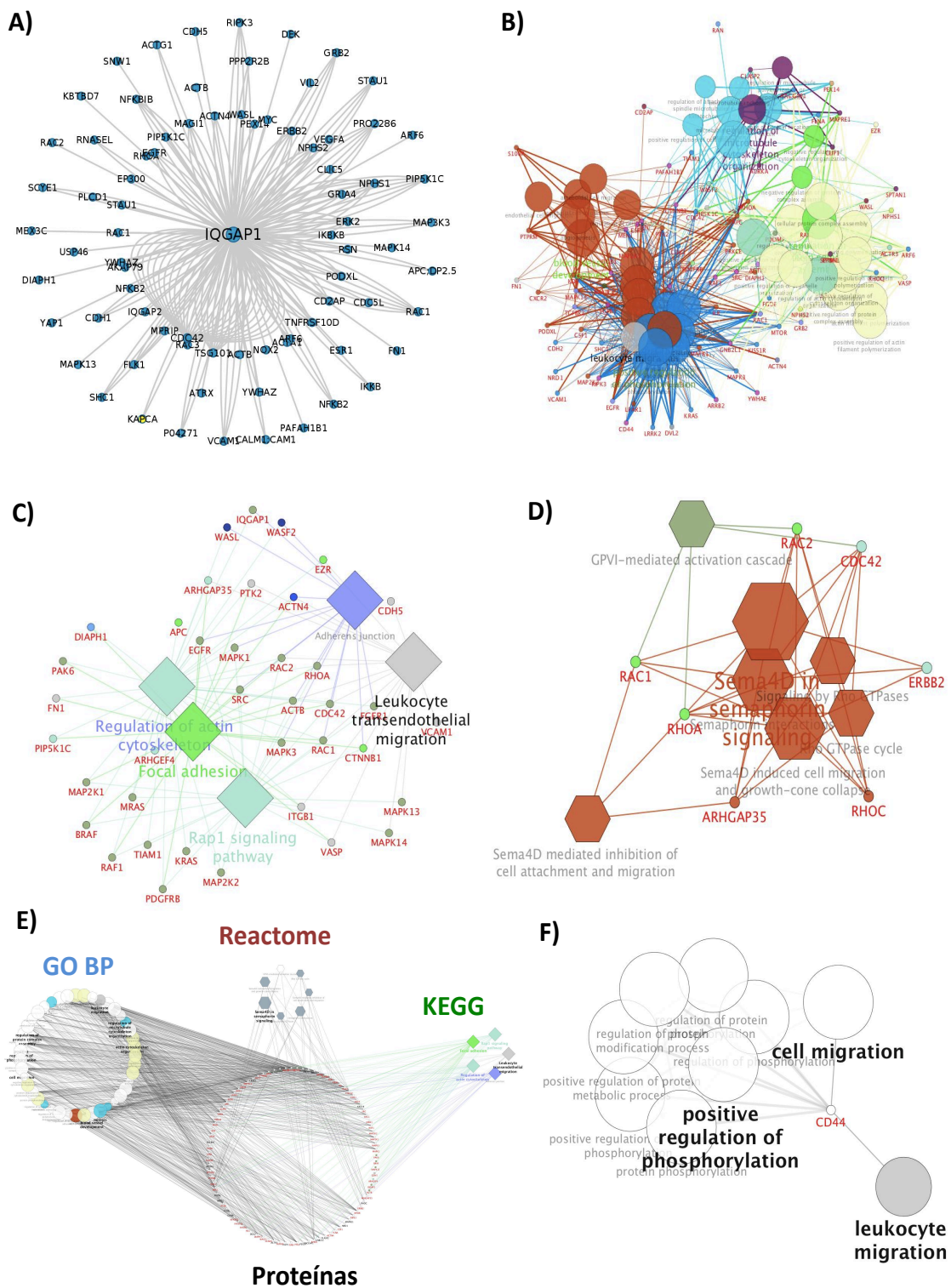


Figura 5. Interacciones proteína-proteína de IQGAP1 y su probable función en células cebadas. Se muestran en forma de red el interactoma de IQGAP1 recuperado de *Intact* **A)** y los términos ontológicos recuperados con el filtrado tráfico vesicular/citosqueleto/migración para *Gene Ontology Biological Processes* **B)**, *KEGG* **C)** y *Reactome Pathways* **D)**. También se muestra un esquema de la fusión de las tres redes, y todas las proteínas que participan en los procesos biológicos denotados por los términos ontológicos **E)**, además de los procesos asociados a CD44 recuperada de la red fusionada **F)**.

11) Discusión

En el presente trabajo describimos como el gen de *iqgap1* de rata se regula transcripcionalmente gracias al estímulo del TGF- β . De igual forma, se determinó y se delimitó el promotor del gen *iqgap1* en rata, por medio de un análisis bioinformático sobre una isla CpG en la que se encontraba el TSS del gen *iqgap1* en rata, gracias a que también se encontraron una caja *TATA* y sitios de unión de factores de transcripción: TFIID, TFIIB, Nrf-1 y Sp1. Todos los anteriores son considerados como marcadores de promotores de genes (Deaton & Bird, 2011).

Una vez delimitado el promotor del gen, también se encontraron 4 SBE's que se conservan en ratón y rata en regiones cercanas a su TSS, lo que sugiere que probablemente se trate de un TRE (TGF- β response element) y que los componentes de la vía canónica del TGF- β , las Smads, son importantes para su regulación. Adyacentes al los sitios SBEs del promotor del gen *iqgap1* antes descritos, se encontraron una gran cantidad de factores transcripcionales predichos que se conservan en las secuencias de rata y ratón, que podrían explicar la regulación de IQGAP1 en respuesta a estímulos que fomenten la proliferación celular o incluso probables eventos de carcinogénesis (TP53, ZEB1, etc.) o de transición epitelio mesénquima (PAX, WT1, etc.), fenómenos en los cuales ya se ha reportado que IQGAP1 y la vía del TGF- β juegan un papel importante. Además, se encontraron sitios para factores transcripcionales que se ha descrito que pueden tener una interacción con las Smads para fomentar la expresión génica, como son TP300, CEBP y SP1. Esto refuerza la idea de que las proteínas Smads podrían ser las responsables de la regulación transcripcional del gen *iqgap1*. Teniendo en cuenta estos factores transcripcionales obtenidos gracias al análisis realizado con el *plug-in Reactome FI* del programa *Cytoscape*, y teniendo en cuenta las diferentes funciones que cumple la proteína IQGAP1 en distintas patologías, se podrían proponer complejos de factores transcripcionales en los cuales participen las proteínas Smads para regular la expresión de *iqgap1* en diferentes patologías.

En lo que respecta al análisis experimental del promotor del gen *iqgap1* de rata, se logró clonar al promotor tanto en sentido (dirección 5'-3') del gen de

la luciferasa como su reverso (dirección 3'-5'). Los datos obtenidos mostraron que el gen *iqgap1* parece estar constitutivamente activo en células hepáticas HepG2, las cuales, aunque son cancerosas, mantienen un fenotipo propiamente epitelial. En este caso, ya se ha reportado que IQGAP1 es una proteína ubicua, por lo que probablemente el que se registre que se esta transcribiendo la luciferasa se debe a que en la mayoría de los tejidos hay una concentración basal de IQGAP1. De igual forma, es importante denotar que en estas células no se registró una regulación del reportero en respuesta al TGF- β , por lo que probablemente en este contexto no se cuenta con los elementos necesarios, es decir, un conjunto de factores transcripcionales específicos que generen complejos con las Smads para regular transcripcionalmente al gen *iqgap1*.

Un dato interesante que encontramos fue que hay una regulación transcripcional diferencial del gen *iqgap1* entre los tipos celulares estudiados. En primera instancia, observamos que en las líneas celulares hepáticas C9 y AS-30D, la transcripción del gen *iqgap1* solo se veía incrementada en respuesta al TGF- β en las células C9 y no en la AS30D, ya que tal vez el mRNA del gen *iqgap1* se encontraba en niveles demasiado altos en la línea celular AS-30D como para ser regulados por el TGF- β .

Por otra parte, se observó que no había correlación entre la regulación transcripcional y la concentración de la proteína IQGAP1 en respuesta al TGF- β en la línea C9. Esto se esperaba que ocurriera solamente en la línea celular AS-30D, ya que se ha reportado anteriormente que una sobre-expresión de la proteína IQGAP1 correlaciona con estadios más malignos de diferentes tipos de cánceres, especialmente en el caso de los hepatocarcinomas (Schmidt et al., 2008), por lo que una línea celular no cancerosa debería de tener niveles bajos de la proteína. Además, para establecer si la regulación transcripcional del gen *iqgap1* era llevada a cabo gracias a la actividad de vías no canónicas, se estableció la fosforilación de las Smads en su región *linker*. Los resultados muestran que si estaban activadas.

Para establecer el porqué de la falta de regulación de los niveles de la proteína IQGAP1 en células C9 por el TGF- β , se realizó un ensayo comparando lo niveles basales de IQGAP1 entre las dos líneas celulares y

células de cultivo primario de hepatocitos, estos últimos considerados como una representación más fiel de lo que estaría sucediendo *in vivo*. En este ensayo se observó que las dos líneas celulares tenían una mayor cantidad de la proteína IQGAP1 que los hepatocitos en cultivo primario. Esto podría explicarse, ya que las células C9 son reconocidas por su alta capacidad proliferativa, un proceso en el cual IQGAP1 se ha reportado que puede jugar un papel esencial en los hepatocitos que sufren una transformación durante la carcinogénesis (Chen et al., 2010).

Una vez que se hicieron ensayos sobre la regulación de la proteína IQGAP1 por el TGF- β en cultivos primarios de hepatocitos, descubrimos que aumenta su concentración ya sea con un estímulo de TGF- β o incluso solamente manteniendo el cultivo primario por 5 días. Esto nos sugiere entonces que probablemente el hecho de que IQGAP1 se encuentre en tan altas concentraciones en la línea celular C9 implica que los niveles de IQGAP1 cambian dependiendo del contexto celular del hepatocito. De igual forma, al mantener un cultivo primario de hepatocitos primario por un tiempo prolongado, genera que estos pierdan su fenotipo epitelial y se asemejen a una célula con fenotipo mesenquimatoso. Esto resulta de particular importancia, ya que se ha observado que un aumento de la concentración de la proteína IQGAP1 se relaciona con líneas celulares de cáncer hepático que han sufrido una transición epitelio-mesénquima (White et al., 2010). En este caso, valdría la pena establecer en un futuro si el aumento de IQGAP1 en hepatocitos de rata es la causa o simplemente correlaciona con la pérdida del fenotipo epitelial.

Por otra parte, en las células RBL-2H3 los niveles de la proteína IQGAP1 si son regulados por el TGF- β . Al igual que en el caso de las células C9, tanto la vía canónica como las no canónica se encontraban activadas en la línea celular RBL-2H3 a los 15 min del estímulo con TGF- β , aunque en menor medida la fosforilación de la región *linker* de Smad2. Concordante con esto, se vio un aumento en la concentración de IQGAP1 después de que se observa la activación de ambas vías, y sería ideal poder en el futuro establecer cual de las dos vías es la responsable de regular la expresión de IQGAP1. Lo anterior se podría resolver bloqueando farmacológicamente ya sea la vía canónica, con SB431542 (inhibidor del receptor tipo I del TGF-beta), y las no canónicas, con

inhibidores específicos de GSK3- β , Erk2 o incluso JNK. El aumento de la concentración de la proteína IQGAP1 podría significar que TGF- β esta orquestando procesos fisiológicos relacionados con las funciones de las células cebadas, en las cuales ya se ha descrito que el TGF- β promueve la quimiotaxis.

Finalmente, cuando se hizo el análisis de probables procesos en los que el interactoma de IQGAP1 podría tener un papel relevante en la fisiología de las células cebadas, se observó que solamente el gen que codifica para CD44 sobre-expresado en células cebadas en humano, HMC-1 (Wiener et al., 2007). Esto resulta de particular importancia, ya que CD44 es una proteína que se ha reportado como importante para la migración celular y que es dependiente de hialuronano (Peck & Isacke, 1998). Es importante mencionar que en el microarreglo (Wiener et al., 2007) se tomaron en cuenta tiempos muy largos de estímulo, por lo que valdría la pena hacer un estudio transcripcional a tiempos cortos para ver la respuesta inmediata del interactoma de IQGAP1 en las células cebadas.

12) Conclusiones

- El promotor del gen *iqgap1* contiene 4 probables SBE's que podrían estar reclutando a complejos transcripcionales formados por las Smads.
- El promotor del gen *iqgap1* contiene sitios para factores transcripcionales que ya se han reportado como interactores de las Smads, y que podrían explicar fenómenos en los que IQGAP1 juega un papel importante.
- El TGF- β puede inducir la expresión del gen *iqgap1*, dependiendo del tipo celular estimulado.
- Los niveles de expresión de la proteína IQGAP1 son regulados en hepatocitos en cultivo primario tanto por el TGF- β como por la pérdida del fenotipo epitelial.
- El estudio de la relevancia de la interacción de la proteína CD44 con IQGAP1 podría ayudar a explicar fenómenos observados en células cebadas, como por ejemplo la migración.

13) Perspectivas

- Comprobar la unión de Smads a la región promotora del gen *iqgap1* de rata mediante ensayos de inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP), ya sea en plásmido o endógenamente.
- Comprobar si algunos de factores transcripcionales propuestos en este trabajo participan en la regulación de la expresión del gen *iqgap1* por TGF- β , mediante ensayos de inmunoprecipitación secuencial de cromatina (Re-ChIP)
- Identificar cuáles cinasas son activadas por el TGF- β y establecer si son las responsables de la fosforilación en la región *linker* de Smad2 en las líneas celulares C9 y RBL-2H3.
- Investigar si la regulación de los niveles de la proteína IQGAP1 en las células RBL-2H3 se debe al aumento del transcrito del gen mediante RT-PCR.
- Estudiar si la interacción de IQGAP1 con CD44 juega un papel en la migración regulada por el TGF- β en las células cebadas.

14) Anexos

14.1) Anexo 1: Protocolos

14.1.1) Purificación de DNA

- Se añade a la muestra que quiera recuperar DNA, 1 volumen de fenol cloroformo-isoamílico y se mezcla por 10 seg en vórtex.
- Se centrifuga a máxima velocidad a TA por 5 min, se recupera la fase acuosa y se le agrega 1 volumen de cloroformo (se puede repetir si la interfase se ve muy turbia).
- La fase acuosa se precipita con 1/10 de volumen de acetato de sodio 3 M, pH 5.2 (se le agrega también 2 μ L a una concentración de 5 mg/mL) y 2.5 volúmenes de etanol absoluto. Se deja incubar a 70 °C por 30 min.
- Se centrifuga a máxima velocidad por 2 min y se elimina el sobrenadante. Posteriormente, se le hacen lavados a la pastilla (2-3 veces) con 200 μ L de etanol 70 %, y se centrifuga de la misma forma.
- Al final, el Pellet de DNA se resuspende en 10-20 μ L de agua estéril (inyectable) y se guarda a -20°C (se puede cuantificar tomando 1 μ L de la muestra).

14.1.2) PCR

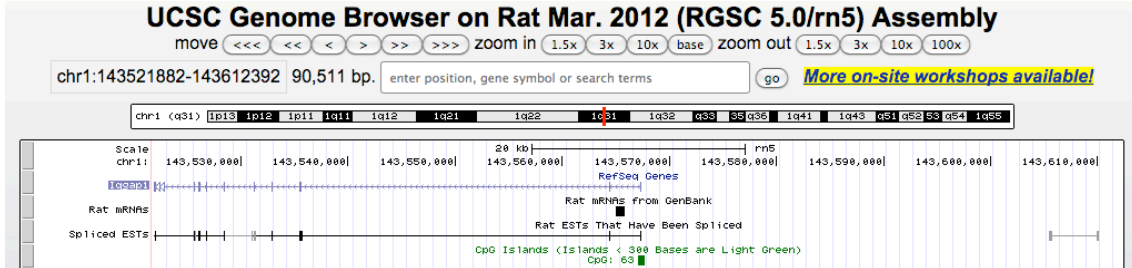
- Se usan oligonucleótidos que flanqueen la región promotoras de interés, al igual que sirvan como cebadores para la PCR.
- El programa de amplificación es:
 - 1) 5 min 95 °C
 - 2) X ciclos de:
 - I) X min a 95°C (fase de *desnaturalización*)
 - II) X min a la temperatura a la cual se alinean los oligonucleótidos
 - III) X min a 72°C (fase de *elongación*)
 - 3) 5 min a 72°C

* *Los valores X se especifican en cada experimento, y dependen del tamaño del amplificado.*

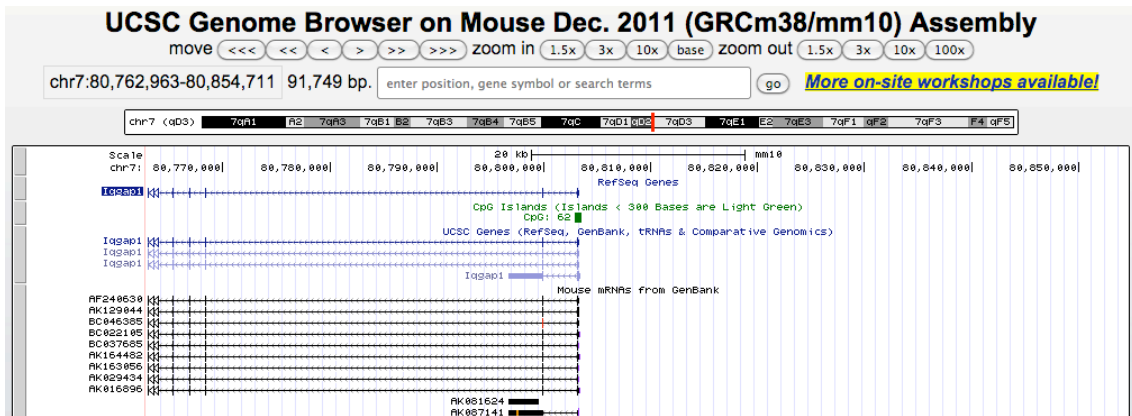
- Las muestras se corren en un gel de agarosa a la concentración conveniente, dependiendo del tamaño del producto amplificado, con bromuro de etidio y se revela con luz ultravioleta.

14.2) Anexo 2: Islas CpG's en el gen *iqgap1* en rata y ratón según *USCS Genome Browser*

Rata



Ratón



14.3) Anexo 3: Anotación de Factores Transcripcionales en el promotor de *iqgap1* en rata y ratón según *Reactome FI*.

14.3.1) Resultados utilizando *Gene Ontology Biological Processes (FDR <= 0.05)*

Gene Ontology Biological Processes	Ratio of protein in gene Set	Number of protein in Gene Set	Protein From Network	P-value	FDR	Proteins
cell differentiation in hindbrain	0,0004	4	2	0,0002	9.77E-03	FOXA2,GATA2
metanephric epithelium development	0,0004	4	2	0,0002	9.77E-03	PAX2,WT1
ureter maturation	0,0004	4	2	0,0002	9.77E-03	PAX2,GATA3
positive regulation of transcription from RNA polymerase III promoter	0,0004	4	2	0,0002	9.77E-03	FOXA2,CEBPA
cell fate determination	0,0010	10	3	0,0000	8.13E-04	PAX2,GATA2,GATA3
definitive hemopoiesis	0,0014	15	4	0,0000	7.69E-05	GATA2,TAL1,SP1,SP3
positive regulation of erythrocyte differentiation	0,0014	15	4	0,0000	7.69E-05	GATA1,GATA2,TAL1,ETS1
forebrain development	0,0048	50	4	0,0002	7.31E-03	E2F1,ZEB1,NR2F2,NKX2-1
embryonic hemopoiesis	0,0018	19	3	0,0002	7.29E-03	GATA1,GATA3,TAL1
lung development	0,0063	66	6	0,0000	7.14E-05	EP300,CUX1,NKX2-1,CEBPA,SP1,SP3
positive regulation of transcription from RNA polymerase II promoter by glucose	0,0003	3	2	0,0001	7.00E-03	FOXA2,USF2
inner ear morphogenesis	0,0043	45	4	0,0001	6.58E-03	PAX2,GATA2,GATA3,TFAP2A
skeletal muscle cell differentiation	0,0043	45	4	0,0001	6.58E-03	MYOD1,PAX5,FOS,FOXN2
regulation of cell cycle	0,0057	60	3	0,0048	4.99E-02	E2F5,JUN,IRF1
SMAD protein signal transduction	0,0015	16	3	0,0001	4.29E-03	HNF1A,FOS,JUN
positive regulation of gene expression	0,0108	114	4	0,0039	3.95E-02	E2F1,TFAP2A,VDR,NKX2-1
sympathetic nervous system development	0,0015	16	2	0,0037	3.88E-02	GATA3,TFAP2A
negative regulation of cyclin-dependent protein kinase activity	0,0015	16	2	0,0037	3.88E-02	NR2F2,TFAP4
toll-like receptor 10 signaling pathway	0,0053	56	3	0,0039	3.86E-02	FOS,JUN,ELK1
toll-like receptor 5 signaling pathway	0,0053	56	3	0,0039	3.86E-02	FOS,JUN,ELK1
embryonic camera-type eye morphogenesis	0,0014	15	3	0,0001	3.74E-03	ZEB1,SP1,SP3
positive regulation of type I interferon production	0,0050	53	3	0,0034	3.68E-02	EP300,IRF1,IRF3
eosinophil fate commitment	0,0002	2	2	0,0001	3.36E-03	GATA1,GATA2
basophil differentiation	0,0002	2	2	0,0001	3.36E-03	GATA1,TAL1
nephric duct formation	0,0002	2	2	0,0001	3.36E-03	PAX2,GATA3
embryonic digestive tract development	0,0013	14	2	0,0029	3.36E-02	RARB,MYB
monocyte differentiation	0,0013	14	2	0,0029	3.36E-02	JUN,SP3
trophectodermal cell differentiation	0,0013	14	2	0,0029	3.36E-02	SP1,SP3
negative regulation of epithelial to mesenchymal transition	0,0013	14	2	0,0029	3.36E-02	FOXA2,NKX2-1
mesenchymal to epithelial transition	0,0007	7	3	0,0000	3.33E-04	PAX2,GATA3,WT1
response to lipopolysaccharide	0,0096	101	4	0,0025	3.24E-02	FOS,JUN,TCF3,CEBPB
toll-like receptor signaling pathway	0,0094	99	4	0,0024	3.14E-02	FOS,JUN,ELK1,IRF3
stress-activated MAPK cascade	0,0044	46	3	0,0023	3.06E-02	FOS,JUN,ELK1
urogenital system development	0,0011	12	2	0,0021	2.95E-02	PAX2,GATA2
cell development	0,0011	12	2	0,0021	2.95E-02	FOXA2,TCF3
epithelial tube branching involved in lung morphogenesis	0,0011	12	2	0,0021	2.95E-02	FOXA2,NKX2-1
skeletal muscle tissue development	0,0041	43	3	0,0019	2.87E-02	MYOD1,NR2F2,EP300
mesonephros development	0,0010	11	2	0,0018	2.84E-02	PAX2,GATA3
response to nutrient levels	0,0010	11	2	0,0018	2.84E-02	ZEB1,PAX2
negative regulation by host of viral transcription	0,0010	11	2	0,0018	2.84E-02	JUN,TFAP4

response to drug	0,0221	232	6	0,0019	2.83E-02	FOS,GATA3,JUN,TGIF1,NFATC2,TCF3
response to mechanical stimulus	0,0038	40	3	0,0015	2.59E-02	FOS,JUN,ETS1
cell maturation	0,0034	36	4	0,0001	2.53E-03	GATA2,GATA3,POU2F2,CEBPA
humoral immune response	0,0037	39	3	0,0014	2.52E-02	PAX5,GATA3,POU2F2
B cell differentiation	0,0036	38	3	0,0013	2.41E-02	MYB,TCF3,SP3
regulation of G1/S transition of mitotic cell cycle	0,0009	9	2	0,0012	2.36E-02	E2F1,TCF3
natural killer cell differentiation	0,0009	9	2	0,0012	2.36E-02	TCF3,SP3
toll-like receptor 4 signaling pathway	0,0079	83	4	0,0013	2.35E-02	FOS,JUN,ELK1,IRF3
positive regulation of fibroblast proliferation	0,0033	35	3	0,0010	2.11E-02	E2F1,JUN,TGIF1
camera-type eye development	0,0031	33	3	0,0009	2.04E-02	PAX2,WT1,PKNOX1
maternal placenta development	0,0008	8	2	0,0010	2.01E-02	NR2F2,RXRA
ovulation from ovarian follicle	0,0008	8	2	0,0010	2.01E-02	FOXO3,PGR
metanephric mesenchyme development	0,0008	8	2	0,0010	2.01E-02	PAX2,WT1
platelet formation	0,0008	8	2	0,0010	2.01E-02	GATA1,TAL1
organ morphogenesis	0,0070	74	4	0,0008	1.94E-02	E2F5,PAX5,EP300,VDR
toll-like receptor 3 signaling pathway	0,0068	71	4	0,0007	1.90E-02	FOS,JUN,ELK1,IRF3
embryonic process involved in female pregnancy	0,0007	7	2	0,0007	1.83E-02	SP1,SP3
ventricular cardiac muscle cell differentiation	0,0007	7	2	0,0007	1.83E-02	RARB,RXRA
anatomical structure formation involved in morphogenesis	0,0007	7	2	0,0007	1.83E-02	GATA3,NKX2-1
MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway	0,0065	68	4	0,0006	1.62E-02	FOS,JUN,ELK1,IRF3
kidney development	0,0063	66	4	0,0005	1.58E-02	GATA3,TFAP2A,CUX1,WT1
TRIF-dependent toll-like receptor signaling pathway	0,0064	67	4	0,0006	1.58E-02	FOS,JUN,ELK1,IRF3
in utero embryonic development	0,0167	176	6	0,0005	1.40E-02	FOXA2,GATA1,GATA3,MYB,RXRA,GABPA
pituitary gland development	0,0023	24	3	0,0004	1.29E-02	GATA2,NKX2-1,ETS1
enucleate erythrocyte differentiation	0,0005	5	2	0,0004	1.27E-02	SP1,SP3
negative regulation of reactive oxygen species metabolic process	0,0005	5	2	0,0004	1.27E-02	PAX2,TFAP2A
transforming growth factor beta receptor signaling pathway	0,0105	110	5	0,0004	1.26E-02	E2F5,FOS,JUN,TGIF1,SP1
positive regulation of neuron differentiation	0,0058	61	4	0,0004	1.23E-02	FOXA2,ZEB1,TGIF1,TCF3
erythrocyte differentiation	0,0032	34	4	0,0000	1.11E-03	GATA1,GATA3,TAL1,PKNOX1
histone H4 acetylation	0,0020	21	3	0,0002	1.10E-02	MYOD1,EP300,TCF3
transcription initiation from RNA polymerase II promoter	0,0155	163	6	0,0003	1.09E-02	E2F5,PGR,RARB,TGIF1,VDR,SP1
liver development	0,0062	65	5	0,0000	1.06E-03	HNF1A,JUN,CEBPA,SP1,SP3
positive regulation by host of viral transcription	0,0009	9	4	0,0000	<9.091e-05	EP300,JUN,TFAP4,SP1
positive regulation of transcription from RNA polymerase II promoter	0,0605	636	36	0,0000	<3.333e-04	E2F1,MYOD1,HNF1A,E2F5,FOXA2,PAX5,ZEB1,PAX2,GATA1,GATA2,GABPB1,FOS,GATA3,RARB,MYB,RXRA,GABPA,EP300,JUN,TFAP2A,ELK1,VDR,TAL1,STAT4,NKX2-1,NFATC2,TCF3,NFATC1,CEBPA,USF2,PKNOX1,SP1,ETS1,ETS2,IRF1,NFIC

positive regulation of transcription, DNA-dependent	0,0415	436	25	0,0000	<3.333e-04	E2F1,HNF1A,FOXA2,FOXO3,PAX2,FOS,GATA3,MYB,NR2F2,JUN,TFAP2A,TFAP4,ELK1,WT1,TAL1,POU2F2,NKX2-1,NFATC2,TCF3,NFATC1,SP1,ETS1,SP3,ETS2,IRF1
negative regulation of transcription from RNA polymerase II promoter	0,0466	490	25	0,0000	<3.333e-04	E2F1,HNF1A,FOXA2,PAX5,ZEB1,PAX2,GATA1,GATA2,RGB,MYB,NR2F2,YY1,GABPA,AHR,EP300,TGIF1,TFAP2A,CUX1,WT1,VDR,TAL1,NKX2-1,CEBPA,IRF3,NFIC
transcription from RNA polymerase II promoter	0,0275	289	17	0,0000	<2.500e-04	PAX5,PAX2,GATA1,FOS,GATA3,GABPA,AHR,TFAP2A,POU2F2,NFATC1,CEBPA,CEBPB,PKNOX1,ETS1,IRF1,IRF3,NFIC
regulation of transcription from RNA polymerase II promoter	0,0197	207	12	0,0000	<2.000e-04	MYOD1,HNF1A,FOXA2,ZEB1,GABPB1,FOS,NR2F2,YY1,AHR,CUX1,WT1,TAL1
transcription, DNA-dependent	0,1453	1528	27	0,0000	<1.667e-04	E2F1,E2F5,STAT5A,ZEB1,PAX2,GATA2,GABPB1,MYB,TP53,ESR1,FOXN2,ESR2,EP300,TGIF1,CUX1,ELK1,ARNT,STAT4,NFATC2,TCF3,TFDP1,CEBPA,STAT1,USF2,SP1,ETS1,ETS2
negative regulation of transcription, DNA-dependent	0,0353	371	14	0,0000	<1.429e-04	E2F1,ZEB1,PAX2,GATA3,MYB,NR2F2,JUN,TFAP2A,TFAP4,WT1,VDR,CEBPB,SP3,IRF1
negative regulation of cell proliferation	0,0305	321	13	0,0000	<1.250e-04	ZEB1,GATA1,GATA3,RARB,JUN,TGIF1,TFAP2A,TFAP4,WT1,VDR,CEBPA,ETS1,IRF1
embryonic placenta development	0,0020	21	5	0,0000	<1.111e-04	GATA2,CEBPA,CEBPB,SP1,SP3
megakaryocyte differentiation	0,0008	8	4	0,0000	<1.000e-04	GATA1,TAL1,SP1,SP3

14.3.2) Resultados utilizando *Reactome Pathways* ($FDR \leq 0.05$)

Reactome pathways	Ratio of protein in gene Set	Number of protein in Gene Set	Protein From Network	P-value	FDR	Proteins
Oxidative Stress Induced Senescence(R)	0,0090	89	5	0,0001	9.77E-04	E2F1,FOS,TP53,JUN,TFDP1
Role of Calcineurin-dependent NFAT signaling in lymphocytes(N)	0,0051	51	3	0,0025	9.34E-03	EP300,NFATC2,NFATC1
Signaling events mediated by Stem cell factor receptor (c-Kit)(N)	0,0052	52	3	0,0026	9.33E-03	STAT5A,FOXO3,STAT1
Endometrial cancer(K)	0,0052	52	3	0,0026	9.33E-03	FOXO3,TP53,ELK1
Notch signaling pathway(N)	0,0052	52	3	0,0026	9.33E-03	GATA3,YY1,EP300
oxidative stress induced gene expression via nrf2(B)	0,0014	14	2	0,0025	9.16E-03	FOS,JUN
Ras signaling in the CD4+ TCR pathway(N)	0,0014	14	2	0,0025	9.16E-03	FOS,ELK1
nuclear receptors coordinate the activities of chromatin remodeling complexes and coactivators to facilitate initiation of transcription in carcinoma cells(B)	0,0014	14	2	0,0025	9.16E-03	RXRA,GTF2B
Toll-like receptor signaling pathway(K)	0,0107	106	4	0,0023	8.85E-03	FOS,JUN,STAT1,IRF3
Angiopoietin receptor Tie2-mediated signaling(N)	0,0050	50	3	0,0024	8.85E-03	STAT5A,ELK1,ETS1

calcium signaling by hbv of hepatitis b virus(B)	0,0013	13	2	0,0022	8.52E-03	FOS,JUN
repression of pain sensation by the transcriptional regulator dream(B)	0,0013	13	2	0,0022	8.52E-03	FOS,JUN
il 3 signaling pathway(B)	0,0013	13	2	0,0022	8.52E-03	STAT5A,FOS
T cell receptor signaling pathway(K)	0,0105	104	4	0,0022	8.44E-03	FOS,JUN,NFATC2,NFATC1
Validated transcriptional targets of TAp63 isoforms(N)	0,0049	49	3	0,0022	8.44E-03	EP300,VDR,SP1
t cell receptor signaling pathway(B)	0,0049	49	3	0,0022	8.44E-03	FOS,JUN,NFATC1
ErbB1 downstream signaling(N)	0,0101	100	4	0,0019	7.88E-03	FOS,JUN,ELK1,STAT1
FGF signaling pathway(N)	0,0046	46	3	0,0019	7.79E-03	FOS,JUN,STAT1
il-2 receptor beta chain in t cell activation(B)	0,0046	46	3	0,0019	7.79E-03	E2F1,STAT5A,FOS
Presenilin action in Notch and Wnt signaling(N)	0,0045	45	3	0,0017	7.58E-03	HNF1A,FOS,JUN
effects of calcineurin in keratinocyte differentiation(B)	0,0011	11	2	0,0016	6.90E-03	NFATC1,SP3
p53 signaling pathway(B)	0,0011	11	2	0,0016	6.90E-03	E2F1,TP53
FOXM1 transcription factor network(N)	0,0041	41	4	0,0001	6.05E-04	FOS,ESR1,EP300,SP1
rb tumor suppressor/checkpoint signaling in response to dna damage(B)	0,0010	10	2	0,0013	5.96E-03	E2F1,TP53
il22 soluble receptor signaling pathway(B)	0,0010	10	2	0,0013	5.96E-03	STAT5A,STAT1
overview of telomerase protein component gene htert transcriptional regulation(B)	0,0010	10	2	0,0013	5.96E-03	TP53,WT1
Oxidative stress response(P)	0,0040	40	3	0,0013	5.77E-03	JUN,ELK1,STAT1
IFN-gamma pathway(N)	0,0040	40	4	0,0001	5.71E-04	EP300,CEBPB,STAT1,IRF1
Transcriptional Regulation of White Adipocyte Differentiation(R)	0,0079	78	5	0,0001	5.61E-04	NR2F2,RXRA,EP300,CEBPA,CEBPB
Intrinsic Pathway for Apoptosis(R)	0,0038	38	3	0,0011	5.14E-03	E2F1,TP53,TFDP1
Signaling events mediated by HDAC Class II(N)	0,0038	38	3	0,0011	5.14E-03	GATA1,GATA2,ESR1
Small cell lung cancer(K)	0,0087	86	4	0,0011	5.11E-03	E2F1,RARB,RXRA,TP53
pertussis toxin-insensitive ccr5 signaling in macrophage(B)	0,0009	9	2	0,0011	5.05E-03	FOS,JUN
Validated transcriptional targets of deltaNp63 isoforms(N)	0,0044	44	2	0,0225	4.88E-02	VDR,POU2F2
p53 pathway(P)	0,0044	44	2	0,0225	4.88E-02	TP53,EP300
GMCSF-mediated signaling events(N)	0,0037	37	3	0,0010	4.78E-03	STAT5A,FOS,STAT1
LKB1 signaling events(N)	0,0043	43	2	0,0216	4.74E-02	TP53,ESR1
Plasma membrane estrogen receptor signaling(N)	0,0042	42	2	0,0207	4.64E-02	ESR1,ESR2
ifn gamma signaling pathway(B)	0,0004	4	1	0,0208	4.56E-02	STAT1
Axon guidance mediated by netrin(P)	0,0004	4	1	0,0208	4.56E-02	NFATC2
ahr signal transduction pathway(B)	0,0004	4	1	0,0208	4.56E-02	AHR
TNF signaling pathway(K)	0,0111	110	3	0,0201	4.54E-02	FOS,JUN,CEBPB
Wnt signaling pathway(K)	0,0140	139	5	0,0008	4.38E-03	TP53,EP300,JUN,NFATC2,NFATC1
tsp-1 induced apoptosis in microvascular endothelial cell(B)	0,0008	8	2	0,0008	4.37E-03	FOS,JUN
chaperones modulate interferon signaling pathway(B)	0,0008	8	2	0,0008	4.37E-03	TP53,WT1
T cell activation(P)	0,0082	81	4	0,0009	4.34E-03	FOS,JUN,NFATC2,NFATC1
TGF-beta signaling pathway(K)	0,0081	80	4	0,0008	4.31E-03	E2F5,EP300,TFDP1,SP1
IL23-mediated signaling events(N)	0,0035	35	3	0,0009	4.24E-03	STAT5A,STAT4,STAT1
IL2 signaling events mediated by PI3K(N)	0,0035	35	3	0,0009	4.24E-03	E2F1,FOXO3,MYB
Viral carcinogenesis(K)	0,0208	206	6	0,0007	4.04E-03	STAT5A,TP53,GTF2B,EP300,JUN,IRF3
Pre-NOTCH Expression and Processing(R)	0,0045	45	5	0,0000	3.85E-05	E2F1,TP53,EP300,JUN,TFDP1

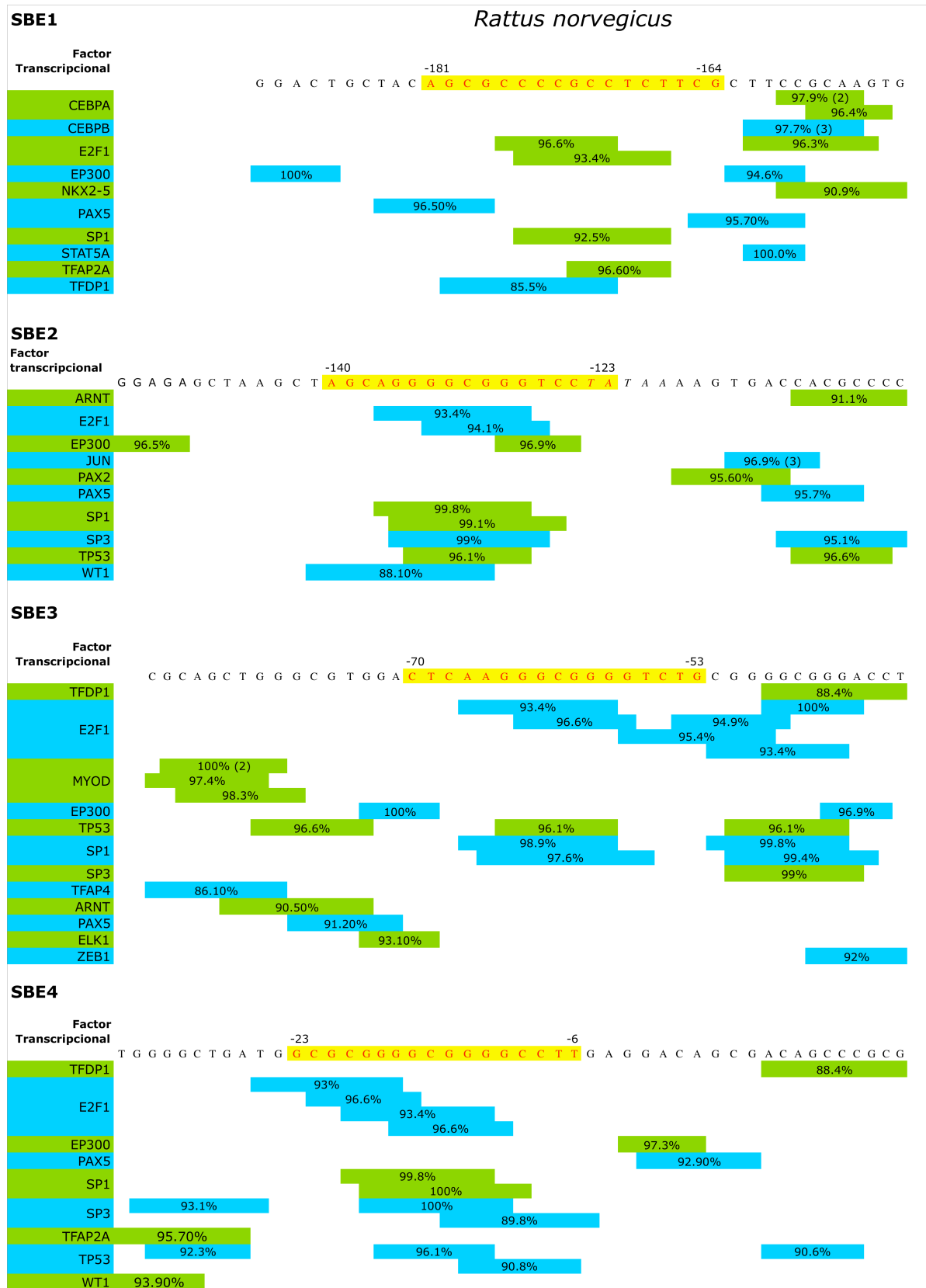
Signaling mediated by p38-alpha and p38-beta(N)	0,0035	35	4	0,0000	3.85E-04	TP53,ESR1,JUN,CEBPB
Pertussis(K)	0,0076	75	4	0,0007	3.83E-03	FOS,JUN,IRF1,IRF3
Bladder cancer(K)	0,0038	38	2	0,0171	3.83E-02	E2F1,TP53
mechanism of gene regulation by peroxisome proliferators via ppara(B)	0,0038	38	2	0,0171	3.83E-02	RXRA,JUN
Epstein-Barr virus infection(K)	0,0204	202	6	0,0007	3.81E-03	TP53,GTF2B,EP300,JUN,ITGAL,IRF3
Osteoclast differentiation(K)	0,0133	132	5	0,0006	3.81E-03	FOS,JUN,NFATC2,NFATC1,STAT1
Hepatitis C(K)	0,0134	133	5	0,0007	3.78E-03	RXRA,TP53,STAT1,IRF1,IRF3
p73 transcription factor network(N)	0,0074	73	5	0,0000	3.75E-04	FOXO3,GATA1,EP300,WT1,SP1
IL6-mediated signaling events(N)	0,0047	47	5	0,0000	3.70E-05	FOS,JUN,CEBPB,STAT1,IRF1
ErbB2/ErbB3 signaling events(N)	0,0037	37	2	0,0163	3.66E-02	FOS,JUN
Leishmaniasis(K)	0,0074	73	4	0,0006	3.59E-03	FOS,JUN,ELK1,STAT1
Direct p53 effectors(N)	0,0134	133	7	0,0000	3.57E-05	E2F1,TP53,EP300,JUN,VDR,TFDP1,SP1
Trk receptor signaling mediated by PI3K and PLC-gamma(N)	0,0036	36	2	0,0155	3.54E-02	STAT5A,FOXO3
inhibition of cellular proliferation by gleevec(B)	0,0024	24	4	0,0000	3.45E-05	STAT5A,FOS,JUN,STAT1
signal transduction through il1r(B)	0,0035	35	2	0,0147	3.41E-02	FOS,JUN
Signaling events mediated by TCPTP(N)	0,0035	35	2	0,0147	3.41E-02	STAT5A,STAT1
B cell receptor signaling pathway(K)	0,0073	72	4	0,0006	3.40E-03	FOS,JUN,NFATC2,NFATC1
Tuberculosis(K)	0,0179	178	4	0,0142	3.35E-02	EP300,VDR,CEBPB,STAT1
tpo signaling pathway(B)	0,0025	25	4	0,0000	3.33E-05	STAT5A,FOS,JUN,STAT1
angiotensin ii mediated activation of jnk pathway via pyk2 dependent signaling(B)	0,0034	34	2	0,0139	3.31E-02	FOS,JUN
Influenza A(K)	0,0177	176	4	0,0137	3.26E-02	EP300,JUN,STAT1,IRF3
Trk receptor signaling mediated by the MAPK pathway(N)	0,0033	33	2	0,0131	3.18E-02	FOS,ELK1
toll-like receptor pathway(B)	0,0033	33	2	0,0131	3.18E-02	FOS,JUN
EPO signaling pathway(N)	0,0033	33	2	0,0131	3.18E-02	STAT5A,STAT1
Signaling by TGF-beta Receptor Complex(R)	0,0071	70	4	0,0005	3.09E-03	E2F5,TGIF1,TFDP1,SP1
Regulation of beta-cell development(R)	0,0032	32	2	0,0124	3.06E-02	HNF1A,FOXA2
IL27-mediated signaling events(N)	0,0026	26	4	0,0000	3.03E-05	STAT5A,GATA3,STAT4,STAT1
Calcium signaling in the CD4+ TCR pathway(N)	0,0026	26	4	0,0000	3.03E-05	FOS,JUN,NFATC2,NFATC1
Signaling events mediated by HDAC Class III(N)	0,0026	26	4	0,0000	3.03E-05	MYOD1,FOXO3,TP53,EP300
Cell cycle(K)	0,0125	124	5	0,0005	3.02E-03	E2F1,E2F5,TP53,EP300,TFDP1
Non-small cell lung cancer(K)	0,0056	56	5	0,0000	2.94E-05	E2F1,FOXO3,RARB,RXRA,TP53
Rheumatoid arthritis(K)	0,0091	90	3	0,0119	2.94E-02	FOS,JUN,ITGAL
Prostate cancer(K)	0,0090	89	3	0,0115	2.90E-02	E2F1,TP53,EP300
Inflammatory bowel disease (IBD)(K)	0,0067	66	5	0,0000	2.90E-04	GATA3,JUN,STAT4,NFATC1,STAT1
MAPK signaling pathway(K)	0,0261	259	5	0,0114	2.89E-02	FOS,TP53,JUN,ELK1,NFATC1
ErbB signaling pathway(K)	0,0089	88	3	0,0112	2.85E-02	STAT5A,JUN,ELK1
the information processing pathway at the ifn beta enhancer(B)	0,0030	30	2	0,0110	2.82E-02	GTF2B,JUN
role of egf receptor transactivation by gpcrs in cardiac hypertrophy(B)	0,0030	30	2	0,0110	2.82E-02	FOS,JUN
pdgf signaling pathway(B)	0,0027	27	3	0,0004	2.68E-03	FOS,JUN,STAT1
bcr signaling pathway(B)	0,0027	27	3	0,0004	2.68E-03	FOS,JUN,NFATC1
Osteopontin-mediated events(N)	0,0029	29	2	0,0103	2.68E-02	FOS,JUN

Thyroid cancer(K)	0,0029	29	2	0,0103	2.68E-02	RXRA,TP53
CD40/CD40L signaling(N)	0,0029	29	2	0,0103	2.68E-02	STAT5A,JUN
Myogenesis(R)	0,0029	29	2	0,0103	2.68E-02	MYOD1,TCF3
Herpes simplex infection(K)	0,0187	185	6	0,0004	2.67E-03	FOS,TP53,EP300,JUN,STAT1,IRF3
PDGFR-beta signaling pathway(N)	0,0121	120	5	0,0004	2.66E-03	STAT5A,FOS,JUN,ELK1,STAT1
RXR and RAR heterodimerization with other nuclear receptor(N)	0,0026	26	3	0,0004	2.62E-03	RARB,RXRA,VDR
S1P2 pathway(N)	0,0026	26	3	0,0004	2.62E-03	FOS,JUN,ELK1
Angiogenesis(P)	0,0067	66	4	0,0004	2.60E-03	FOS,JUN,STAT1,ETS1
Renal cell carcinoma(K)	0,0067	66	4	0,0004	2.60E-03	EP300,JUN,ARNT,ETS1
bioactive peptide induced signaling pathway(B)	0,0028	28	2	0,0096	2.60E-02	STAT5A,STAT1
fc epsilon receptor i signaling in mast cells(B)	0,0028	28	2	0,0096	2.60E-02	FOS,JUN
Ras Pathway(P)	0,0064	63	4	0,0003	2.59E-03	JUN,ELK1,STAT1,ETS1
EGF receptor signaling pathway(P)	0,0083	82	3	0,0092	2.53E-02	STAT5A,STAT4,STAT1
Jak-STAT signaling pathway(K)	0,0157	156	4	0,0091	2.52E-02	STAT5A,EP300,STAT4,STAT1
IL3-mediated signaling events(N)	0,0027	27	2	0,0090	2.49E-02	STAT5A,CEBPB
RIG-I/MDA5 mediated induction of IFN-alpha/beta pathways(R)	0,0080	79	3	0,0084	2.33E-02	EP300,IRF1,IRF3
IL12-mediated signaling events(N)	0,0061	60	4	0,0003	2.29E-03	STAT5A,FOS,STAT4,STAT1
Validated targets of C-MYC transcriptional repression(N)	0,0061	60	4	0,0003	2.29E-03	FOXO3,EP300,CEBPA,SP1
Maturity onset diabetes of the young(K)	0,0025	25	2	0,0078	2.19E-02	HNF1A,FOXA2
Regulation of Hypoxia-inducible Factor (HIF) by Oxygen(R)	0,0025	25	2	0,0078	2.19E-02	EP300,ARNT
B cell activation(P)	0,0059	59	4	0,0003	2.17E-03	FOS,JUN,NFATC2,NFATC1
Signaling by ERBB4(R)	0,0148	147	4	0,0074	2.11E-02	STAT5A,FOXO3,PGR,ESR1
ATF-2 transcription factor network(N)	0,0058	58	4	0,0003	2.08E-03	FOS,ESR1,EP300,JUN
Growth hormone receptor signaling(R)	0,0024	24	2	0,0072	2.08E-02	STAT5A,STAT1
Dorso-ventral axis formation(K)	0,0024	24	2	0,0072	2.08E-02	ETS1,ETS2
p53 pathway feedback loops 2(P)	0,0024	24	2	0,0072	2.08E-02	TP53,STAT1
Senescence-Associated Secretory Phenotype (SASP)(R)	0,0076	75	3	0,0073	2.07E-02	FOS,JUN,CEBPB
Chronic myeloid leukemia(K)	0,0074	73	3	0,0067	1.99E-02	E2F1,STAT5A,TP53
Signaling events mediated by HDAC Class I(N)	0,0056	56	4	0,0002	1.86E-03	GATA1,GATA2,YY1,EP300
igf-1 signaling pathway(B)	0,0022	22	2	0,0061	1.82E-02	FOS,JUN
growth hormone signaling pathway(B)	0,0022	22	2	0,0061	1.82E-02	HNF1A,STAT5A
cell cycle: g1/s check point(B)	0,0022	22	2	0,0061	1.82E-02	E2F1,TP53
IL2-mediated signaling events(N)	0,0054	54	4	0,0002	1.65E-03	STAT5A,FOS,JUN,STAT1
Toll-Like Receptors Cascades(R)	0,0135	134	4	0,0054	1.65E-02	FOS,JUN,ELK1,IRF3
Measles(K)	0,0135	134	4	0,0054	1.65E-02	STAT5A,TP53,STAT1,IRF3
IL4-mediated signaling events(N)	0,0064	63	5	0,0000	1.62E-04	STAT5A,MYB,CEBPB,SP1,ETS1
PDGFR-alpha signaling pathway(N)	0,0021	21	3	0,0002	1.62E-03	FOS,JUN,ELK1
Pancreatic cancer(K)	0,0067	66	3	0,0051	1.59E-02	E2F1,TP53,STAT1
Estrogen signaling pathway(K)	0,0101	100	5	0,0002	1.54E-03	FOS,ESR1,ESR2,JUN,SP1
Generic Transcription Pathway(R)	0,0484	480	10	0,0002	1.47E-03	E2F5,PGR,RARB,RXRA,ESR1,ESR2,TGIF1,VDR,TFDP1,SP1
tumor suppressor arf inhibits ribosomal biogenesis(B)	0,0019	19	2	0,0046	1.44E-02	E2F1,TP53
Hypoxic and oxygen homeostasis regulation of HIF-1-alpha(N)	0,0019	19	2	0,0046	1.44E-02	TP53,ARNT
Interferon gamma signaling(R)	0,0064	63	3	0,0045	1.43E-02	STAT1,IRF1,IRF3
Interferon alpha/beta signaling(R)	0,0064	63	3	0,0045	1.43E-02	STAT1,IRF1,IRF3
Colorectal cancer(K)	0,0063	62	3	0,0043	1.39E-02	FOS,TP53,JUN
Fc-epsilon receptor I signaling in mast cells(N)	0,0063	62	3	0,0043	1.39E-02	FOS,JUN,NFATC2

Retinoic acid receptors-mediated signaling(N)	0,0030	30	4	0,0000	1.39E-04	RARB,RXRA,EP300,VDR
IL12 signaling mediated by STAT4(N)	0,0030	30	4	0,0000	1.39E-04	FOS,JUN,STAT4,IRF1
gata3 participate in activating the th2 cytokine genes expression(B)	0,0018	18	2	0,0041	1.36E-02	GATA3,NFATC1
Huntington disease(P)	0,0122	121	4	0,0038	1.25E-02	FOS,TP53,EP300,JUN
control of skeletal myogenesis by hdac and calcium/calmodulin-dependent kinase (camk)(B)	0,0017	17	2	0,0037	1.23E-02	MYOD1,NFATC1
nerve growth factor pathway (ngf)(B)	0,0017	17	2	0,0037	1.23E-02	FOS,JUN
Regulation of Androgen receptor activity(N)	0,0049	49	4	0,0001	1.20E-03	RXRA,EP300,JUN,CEBPA
keratinocyte differentiation(B)	0,0049	49	4	0,0001	1.20E-03	FOS,JUN,ETS1,ETS2
p53 pathway(N)	0,0057	57	3	0,0034	1.17E-02	YY1,TP53,EP300
Interleukin signaling pathway(P)	0,0055	55	3	0,0031	1.04E-02	STAT5A,FOXO3,FOS
atm signaling pathway(B)	0,0015	15	2	0,0029	1.00E-02	TP53,JUN
cadmium induces dna synthesis and proliferation in macrophages(B)	0,0015	15	2	0,0029	1.00E-02	FOS,JUN
mapkinase signaling pathway(B)	0,0054	54	3	0,0029	1.00E-02	FOS,JUN,STAT1
Validated nuclear estrogen receptor alpha network(N)	0,0062	61	7	0,0000	<9.091e-05	STAT5A,PGR,ESR1,ESR2,EP300,JUN,CEBPB
Regulation of retinoblastoma protein(N)	0,0063	62	7	0,0000	<8.333e-05	E2F1,MYOD1,EP300,JUN,TFDP1,CEBPA,CEBPB
Validated transcriptional targets of AP1 family members Fra1 and Fra2(N)	0,0036	36	6	0,0000	<7.692e-05	EP300,JUN,NFATC2,NFATC1,USF2,SP1
mets affect on macrophage differentiation(B)	0,0018	18	5	0,0000	<7.143e-05	E2F1,FOS,JUN,ETS1,ETS2
HIF-1-alpha transcription factor network(N)	0,0067	66	7	0,0000	<6.667e-05	GATA2,FOS,EP300,JUN,ARNT,SP1,ETS1
E2F transcription factor network(N)	0,0069	68	7	0,0000	<6.250e-05	E2F1,E2F5,YY1,EP300,TFDP1,CEBPA,SP1
Pathways in cancer(K)	0,0330	327	12	0,0000	<5.882e-05	E2F1,STAT5A,FOS,RARB,RXRA,TP53,EP300,JUN,ARNT,CEBPA,STAT1,ETS1
Prolactin signaling pathway(K)	0,0073	72	7	0,0000	<5.556e-05	STAT5A,FOXO3,FOS,ESR1,ESR2,STAT1,IRF1
FOXA2 and FOXA3 transcription factor networks(N)	0,0044	44	6	0,0000	<5.263e-05	HNF1A,FOXA2,NKX2-1,CEBPA,CEBPB,SP1
Calcineurin-regulated NFAT-dependent transcription in lymphocytes(N)	0,0046	46	6	0,0000	<5.000e-05	E2F1,FOS,GATA3,JUN,NFATC2,NFATC1
AP-1 transcription factor network(N)	0,0071	70	11	0,0000	<5.000e-04	GATA2,FOS,MYB,TP53,ESR1,EP300,JUN,NFATC2,NFATC1,SP1,ETS1
Factors involved in megakaryocyte development and platelet production(R)	0,0123	122	8	0,0000	<4.762e-05	GATA1,GATA2,GATA3,MYB,TP53,EP300,IRF1,IRF3
Transcriptional misregulation in cancer(K)	0,0180	179	9	0,0000	<4.545e-05	PAX5,ZEB1,RXRA,TP53,WT1,TCF3,CEBPA,CEBPB,SP1
HIF-2-alpha transcription factor network(N)	0,0033	33	5	0,0000	<4.348e-05	EP300,ELK1,ARNT,SP1,ETS1
Downstream signaling in naïve CD8+ T cells(N)	0,0064	63	6	0,0000	<4.167e-05	FOS,JUN,ELK1,STAT4,NFATC2,NFATC1
BCR signaling pathway(N)	0,0066	65	6	0,0000	<4.000e-05	FOS,JUN,ELK1,POU2F2,NFATC1,ETS1
C-MYB transcription factor network(N)	0,0083	82	11	0,0000	<3.333e-04	MYOD1,PAX5,GATA1,GATA3,MYB,EP300,CEBPA,CEBPB,SP1,ETS1,ETS2
FOXA1 transcription factor network(N)	0,0043	43	9	0,0000	<2.500e-04	FOXA2,FOS,NR2F2,ESR1,EP300,JUN,CEBPB,SP1,NFIC
Hepatitis B(K)	0,0147	146	12	0,0000	<2.000e-04	E2F1,STAT5A,FOS,TP53,EP300,JUN,ELK1,STAT4,NFATC2,NFATC1,STAT1,IRF3

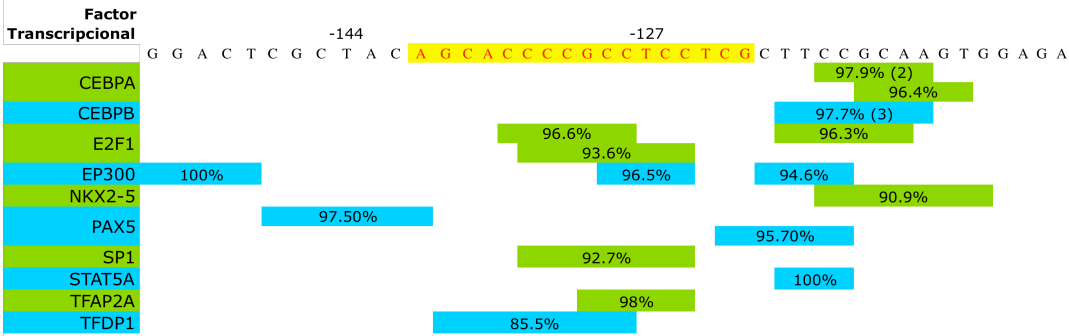
HTLV-I infection(K)	0,0262	260	14	0,0000	<1.667e-04	E2F1,STAT5A,FOS,MYB,TP53,EP300,JUN,ITGAL,ELK1,NFATC2,TCF3,NFATC1,ETS1,ETS2
Regulation of Telomerase(N)	0,0069	68	9	0,0000	<1.429e-04	E2F1,FOS,NR2F2,ESR1,JUN,WT1,SP1,SP3,IRF1
Notch-mediated HES/HEY network(N)	0,0046	46	8	0,0000	<1.250e-04	E2F1,MYOD1,GATA1,MYB,YY1,EP300,ARNT,TCF3
Glucocorticoid receptor regulatory network(N)	0,0078	77	8	0,0000	<1.111e-04	FOS,GATA3,TP53,EP300,JUN,NFATC1,STAT1,IRF1
Oncogene Induced Senescence(R)	0,0030	30	6	0,0000	<1.000e-04	E2F1,TP53,TFDP1,SP1,ETS1,ETS2
Regulation of nuclear SMAD2/3 signaling(N)	0,0078	77	13	0,0000	<1.000e-03	MYOD1,FOXO3,FOS,GATA3,ESR1,EP300,JUN,TGIF1,VDNR,TCF3,CEBPB,SP1,SP3

14.4) Anexo 4: Colocalización de Factores transcripcionales de interés con los SBE's de los promotores de los genes de *iqgap1* de rata y de ratón.

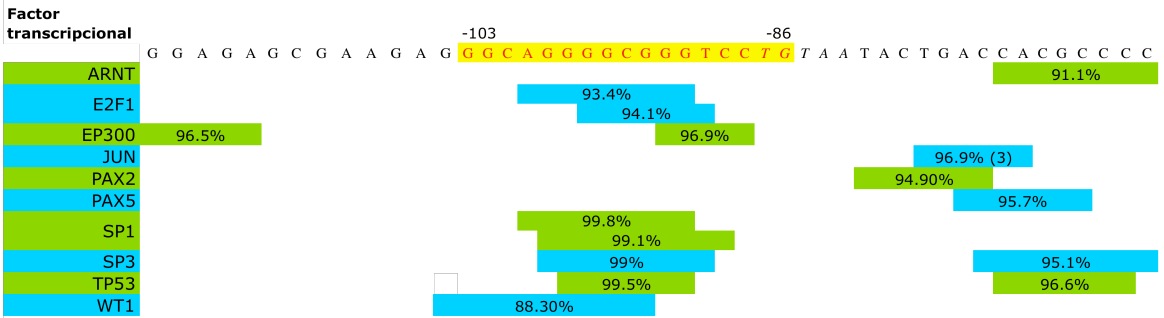


SBE1

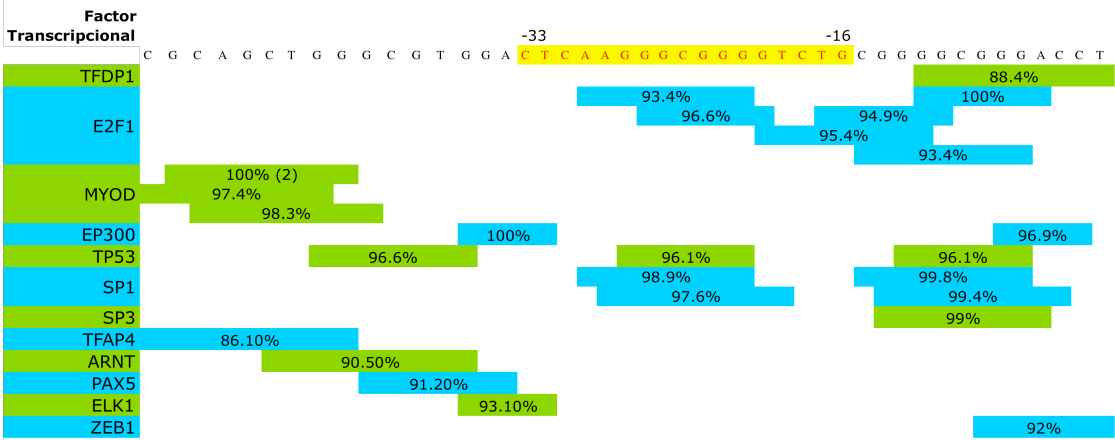
Mus musculus



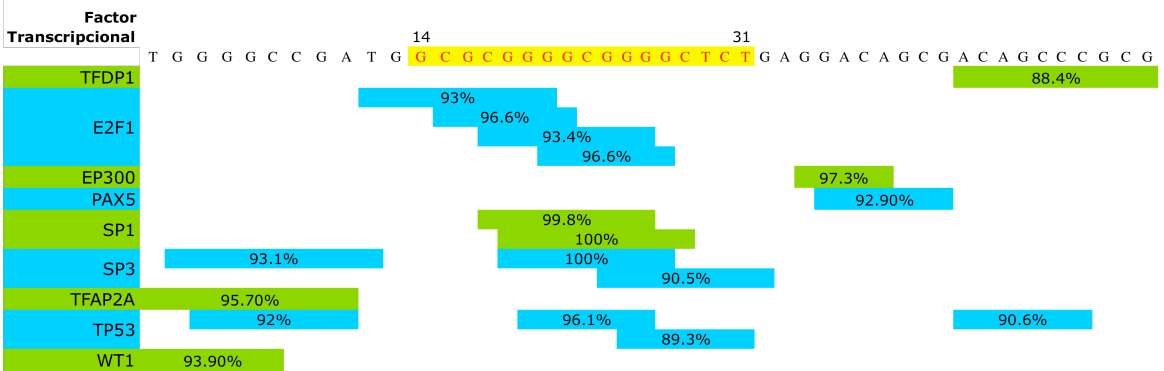
SBE2



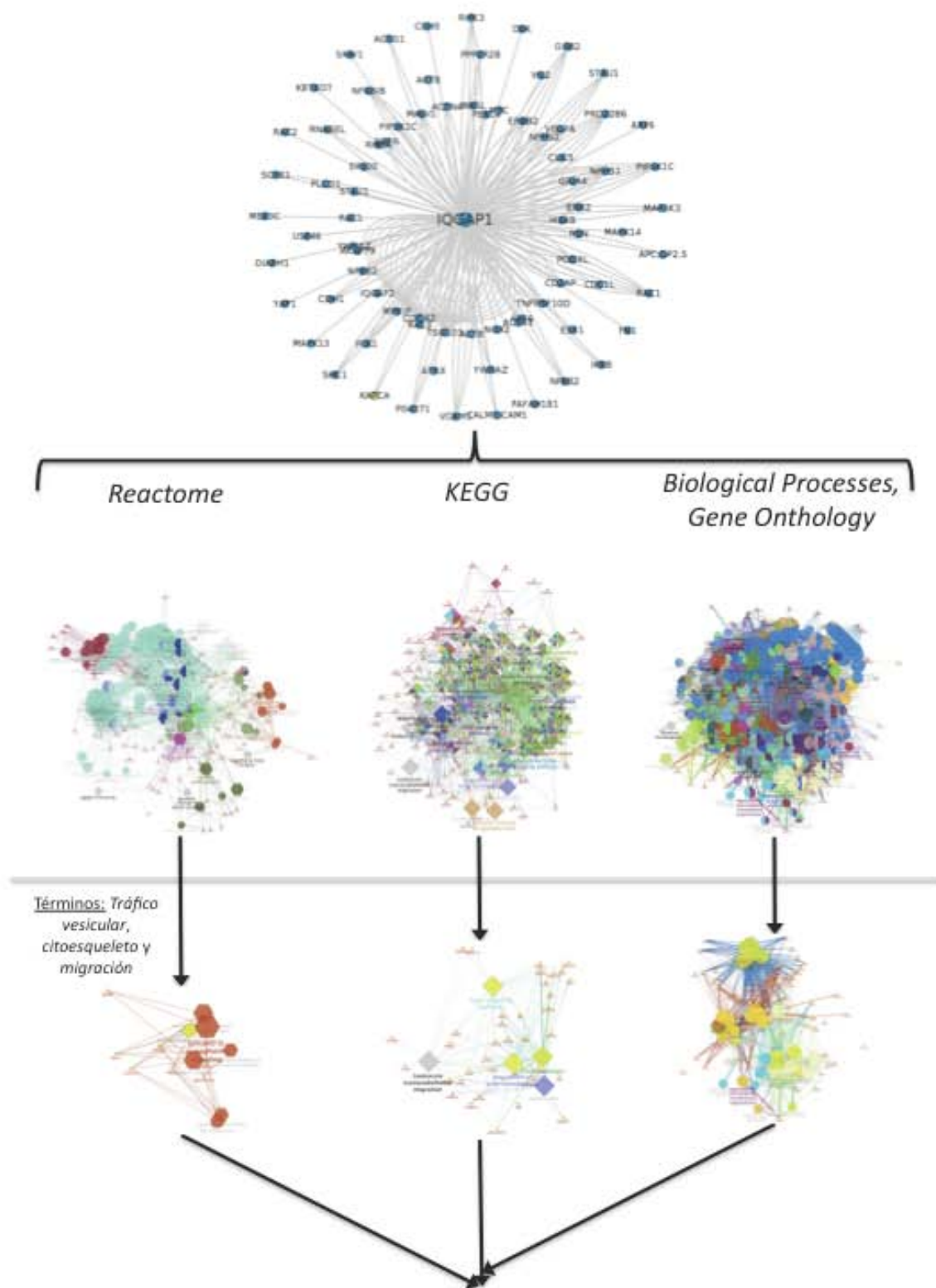
SBE3



SBE4



14.5) Anexo 5: Esquema de la generación de redes de términos y anotaciones sobre el *interactoma* de la proteína IQGAP1



14.6) Anexo 6: Tabla completa de términos ontológicos recuperados de las redes de términos sobre el *interactoma* de la proteína IQGAP1, que contuvieran tráfico vesicular/citoesqueleto/migración

Gene Ontology Biological Processes	Term PValue	% Associated Genes	Associated Genes Found
positive regulation of protein complex assembly	1.34E-09	9.9	[ACTR3, APC, ARF6, CLIP1, GNB2L1, GRB2, MTOR, NPHS1, PRKCE, RAC1, SRC, VASP, WASL]
cellular protein complex assembly	5.94E-08	4.7	[ACTR3, APC, ARF6, CLIP1, DIAPH1, GRB2, MAPRE1, MTOR, NPHS1, PEX14, PRKCE, PTK2, RAC1, RACGAP1, SPTAN1, SPTBN1, SRC, VASP, WASL]
positive regulation of protein polymerization	6.74E-10	13.9	[ACTR3, APC, ARF6, CLIP1, GRB2, MTOR, NPHS1, PRKCE, RAC1, VASP, WASL]
positive regulation of cell division	2.36E-04	7.3	[APC, CDC42, MEN1, PRKCE, RACGAP1, RHOA]
positive regulation of protein phosphorylation	1.53E-18	5.8	[AKT1, ARRB2, BRAF, CD44 , CDC42, CDK1, CSF1, DVL2, EGFR, ERBB2, FGFR1, GNB2L1, ILK, IQGAP1, ITGB1, KDR, KISS1R, KRAS, LAMTOR2, LPAR1, LRRK2, MAP2K1, MAP2K2, MAP3K3, MAPK1, MAPK14, MAPK3, MTOR, PDGFRB, PPP2CA, PRKAA1, PRKACA, PTK2, RAC1, RAF1, RIPK3, SHC1, STK4, TGFBR2]
positive regulation of protein metabolic process	2.02E-18	4.5	[AKT1, APC, ARRB2, BRAF, CALM1, CD44, CDC42, CDK1, CSF1, CTNNB1, DVL2, EGFR, ERBB2, FGFR1, GNB2L1, ILK, IQGAP1, ITGB1, KDR, KISS1R, KRAS, LAMTOR2, LPAR1, LRRK2, MAP2K1, MAP2K2, MAP3K3, MAPK1, MAPK14, MAPK3, MEN1, MTOR, NRD1, PDGFRB, PPARGC1A, PPP2CA, PRKAA1, PRKACA, PTEN, PTK2, RAC1, RAF1, RIPK3, SHC1, SNW1, SREBF1, STK4, TGFBR2]
negative regulation of protein complex assembly	3.57E-05	8.1	[CDC42, MAPRE1, PEX14, RAF1, SPTAN1, SPTBN1, SRC]
regulation of attachment of spindle microtubules to kinetochore	1.82E-04	27.3	[APC, CDC42, RACGAP1]
mitosis	1.17E-07	4.7	[APC, AURKA, CD2AP, CDC42, CDK1, CLASP2, CLIP1, FLNA, MAP2K1, MAPRE1, PAFAH1B1, PDGFRB, PTEN, RACGAP1, RAN, RHOA, SEPT2, WASL]
blood vessel development	8.06E-12	5.0	[AKT1, ANPEP, CDC42, CDH2, CDH5, CTNNB1, CXCR2, ERBB2, FGFR1, FN1, ITGB1, KDR, MAP2K1, MAPK1, MAPK14, MCAM, MED1, MEN1, PDGFRB, PLCD1, PTEN, PTK2, PTPRM, SHC1, STK4, TGFBR2, WASF2, YAP1]
actin filament polymerization	1.90E-08	9.0	[ACTR3, ARF6, DIAPH1, GRB2, MTOR, NPHS1, PRKCE, RAC1, SPTAN1, SPTBN1, VASP, WASL]
angiogenesis	3.50E-10	5.4	[ANPEP, CDC42, CTNNB1, CXCR2, ERBB2, FGFR1, FN1, ITGB1, KDR, MAPK14, MCAM, MED1, MEN1, PDGFRB, PLCD1, PTEN, PTK2, PTPRM, SHC1, STK4, TGFBR2, WASF2]
regulation of cell-substrate adhesion	1.75E-05	6.5	[CDC42, CSF1, ILK, ITGB1, KDR, PRKCE, PTEN, PTK2, SRC]
regulation of cell motility	8.16E-11	4.9	[AKT1, APC, CSF1, CXCR2, DIAPH1, EGFR, GNB2L1, ILK, ITGB1, KDR, LPAR1, MAP2K1, MAP2K2, MAPK1, MAPK14, PDGFRB, PODXL, PRKCE, PTEN, PTK2, PTPRM, RAC1, RAF1, RHOA, RIPK3, TGFBR2]
regulation of microtubule polymerization or depolymerization	1.51E-04	10.4	[APC, AURKA, CLASP2, CLIP1, MAPRE1]
microtubule anchoring	5.48E-05	12.8	[APC, CDC42, CLASP2, PEX14, RACGAP1]
regulation of cytoskeleton organization	4.17E-17	8.1	[ACTR3, APC, ARF6, AURKA, CDC42, CLASP2, CLIP1, CTNNB1, GRB2, ILK, KISS1R, MAPK1, MAPK3, MAPRE1, MTOR, NPHS1, PDGFRB, PRKCE, PTK2, RAC1, RACGAP1, RHOA, RHOQ, SPTAN1, SPTBN1, VASP, WASF2, WASL]
protein phosphorylation	6.48E-18	4.0	[AKT1, APC, ARRB2, AURKA, BRAF, CAMK2G, CD44 , CDC42, CDK1, CSF1, DVL2, EGFR, ERBB2, FGFR1, GNB2L1, IKBKB, ILK, IQGAP1, ITGB1, KDR, KISS1R, KRAS, LAMTOR2, LPAR1, LRRK2, MAP2K1, MAP2K2, MAP3K3, MAPK1, MAPK13, MAPK14, MAPK3, MEN1, MTOR, PDGFRB, PPP2CA, PPP2R1A, PRKAA1, PRKAB1, PRKACA, PRKCE, PTEN, PTK2, RAC1, RAF1, RIPK3, RNASEL, SHC1, SPTBN1, SRC, STK4, TGFBR2]

positive regulation of cytoskeleton organization	3.33E-09	9.2	[ACTR3, APC, ARF6, CLIP1, GRB2, KISS1R, MTOR, NPHS1, PRKCE, RAC1, RHOA, VASP, WASL]
negative regulation of cytoskeleton organization	9.40E-05	7.0	[APC, AURKA, CLASP2, MAPRE1, SPTAN1, SPTBN1, WASF2]
cell migration	1.82E-21	5.0	[AKT1, APC, ARRB2, CD2AP, CD44 , CDH2, CDK1, CLASP2, CSF1, CTNNB1, CXCR2, DGKZ, DIAPH1, DVL2, EGFR, ESR2, FGFR1, FN1, GNB2L1, GRB2, ILK, ITGB1, KDR, KRAS, LPAR1, LRRK2, MAP2K1, MAPK1, MAPK14, MEN1, NFATC2, NRD1, PAFAH1B1, PDGFRB, PIP5K1C, PODXL, PRKCE, PTEN, PTK2, PTPRM, RAC1, RHOA, RIPK3, S100P, SHC1, SRC, TGFB2, TIAM1, VCAM1, WASF2, YWHAE]
positive regulation of cellular component movement	1.08E-11	6.9	[ACTN4, AKT1, APC, CSF1, CXCR2, DIAPH1, EGFR, GNB2L1, ILK, ITGB1, KDR, LPAR1, MAP2K1, MAP2K2, MAPK1, MAPK14, PDGFRB, PODXL, PRKCE, PTK2, TGFB2]
regulation of actin cytoskeleton organization	7.74E-10	7.1	[ACTR3, ARF6, GRB2, ILK, KISS1R, MTOR, NPHS1, PDGFRB, PRKCE, RAC1, RHOA, RHOQ, SPTAN1, SPTBN1, VASP, WASF2, WASL]
positive regulation of phosphorylation	9.46E-20	5.5	[AKT1, ARRB2, BRAF, CD44 , CDC42, CDH2, CDK1, CSF1, CTNNB1, DVL2, EGFR, ERBB2, FGFR1, GNB2L1, ILK, IQGAP1, ITGB1, KDR, KISS1R, KRAS, LAMTOR2, LPAR1, LRRK2, MAP2K1, MAP2K2, MAP3K3, MAPK1, MAPK14, MAPK3, MTOR, PDGFRB, PPP2CA, PRKAA1, PRKACA, PRKCE, PTK2, RAC1, RAF1, RIPK3, SHC1, SRC, STK4, TGFB2]
regulation of phosphorylation	1.46E-18	4.4	[AKT1, APC, ARRB2, BRAF, CD44 , CDC42, CDH2, CDK1, CSF1, CTNNB1, DVL2, EGFR, ERBB2, FGFR1, GNB2L1, GRB2, ILK, IQGAP1, ITGB1, KDR, KISS1R, KRAS, LAMTOR2, LPAR1, LRRK2, MAP2K1, MAP2K2, MAP3K3, MAPK1, MAPK14, MAPK3, MEN1, MTOR, MYC, PAFAH1B1, PDGFRB, PPP2CA, PPP2R1A, PRKAA1, PRKACA, PRKCE, PTEN, PTK2, RAC1, RAF1, RIPK3, SHC1, SRC, STK4, TGFB2]
regulation of protein complex assembly	2.47E-11	7.5	[ACTR3, APC, ARF6, CDC42, CLIP1, GNB2L1, GRB2, MAPRE1, MTOR, NPHS1, PEX14, PRKCE, RAC1, RAF1, SPTAN1, SPTBN1, SRC, VASP, WASL]
ameboidal cell migration	5.35E-06	4.9	[AKT1, ITGB1, KDR, MAPK14, MEN1, PAFAH1B1, PRKCE, PTEN, PTK2, PTPRM, S100P, TGFB2, WASF2]
regulation of cell migration	8.31E-10	4.7	[AKT1, APC, CSF1, CXCR2, DIAPH1, EGFR, GNB2L1, ILK, ITGB1, KDR, LPAR1, MAP2K1, MAPK1, MAPK14, PDGFRB, PODXL, PRKCE, PTEN, PTK2, PTPRM, RAC1, RHOA, RIPK3, TGFB2]
endothelial cell migration	1.38E-05	6.7	[AKT1, ITGB1, KDR, MAPK14, MEN1, PTEN, PTK2, PTPRM, S100P]
maintenance of protein location in cell	2.38E-06	8.3	[APC, CDC42, CLASP2, CTNNB1, EZR, FLNA, PEX14, PIP5K1C, RACGAP1]
regulation of protein modification process	2.06E-17	4.1	[AKT1, APC, ARRB2, BRAF, CALM1, CD44 , CDC42, CDK1, CSF1, CTNNB1, DVL2, EGFR, ERBB2, FGFR1, GNB2L1, ILK, IQGAP1, ITGB1, KDR, KISS1R, KRAS, LAMTOR2, LPAR1, LRRK2, MAP2K1, MAP2K2, MAP3K3, MAPK1, MAPK14, MAPK3, MEN1, MTOR, PDGFRB, PPARGC1A, PPP2CA, PPP2R1A, PRKAA1, PRKACA, PRKCE, PTEN, PTK2, RAC1, RAF1, RIPK3, SHC1, SNW1, SREBF1, STK4, TGFB2, YWHAE]
regulation of kinase activity	2.49E-17	5.3	[AKT1, APC, BRAF, CDC42, CDK1, CSF1, DVL2, EGFR, ERBB2, FGFR1, GNB2L1, ILK, IQGAP1, KISS1R, KRAS, LAMTOR2, LPAR1, LRRK2, MAP2K1, MAP2K2, MAP3K3, MAPK1, MAPK14, MAPK3, MEN1, MTOR, PDGFRB, PPP2CA, PPP2R1A, PRKAA1, PRKACA, PTEN, PTK2, RAC1, RAF1, RIPK3, SHC1, STK4, TGFB2]
positive regulation of organelle organization	1.89E-15	8.2	[ACTR3, AKT1, APC, ARF6, ARRB2, AURKA, CLIP1, GRB2, KISS1R, MAPK3, MEN1, MTOR, NPHS1, PDGFRB, PPARGC1A, PRKCE, PTEN, RAC1, RHOA, SNW1, SREBF1, VASP, WASL, YWHAE, YWHAZ]
actin filament organization	8.65E-11	7.0	[ACTN4, ACTR3, ARF6, CDC42, DIAPH1, EZR, FLNA, GRB2, KISS1R, MTOR, NPHS1, PRKCE, RAC1, RHOA, SPTAN1, SPTBN1, VASP, WASF2, WASL]
epithelial cell migration	3.69E-06	6.1	[AKT1, ITGB1, KDR, MAPK14, MEN1, PRKCE, PTEN, PTK2, PTPRM, S100P, TGFB2]
leukocyte migration	4.58E-06	4.6	[CD44 , CXCR2, FN1, GRB2, ITGB1, KRAS, MEN1, PIP5K1C, PODXL, RAC1, RIPK3, SHC1, SRC, VCAM1]
regulation of protein phosphorylation	3.80E-17	4.6	[AKT1, APC, ARRB2, BRAF, CD44 , CDC42, CDK1, CSF1, DVL2, EGFR, ERBB2, FGFR1, GNB2L1, ILK, IQGAP1, ITGB1, KDR, KISS1R, KRAS, LAMTOR2, LPAR1, LRRK2, MAP2K1, MAP2K2, MAP3K3, MAPK1, MAPK14, MAPK3, MEN1, MTOR, PDGFRB, PPP2CA, PPP2R1A, PRKAA1, PRKACA, PRKCE, PTEN, PTK2, RAC1, RAF1, RIPK3, SHC1, STK4, TGFB2]
positive regulation of actin filament polymerization	3.05E-08	13.6	[ACTR3, ARF6, GRB2, MTOR, NPHS1, PRKCE, RAC1, VASP, WASL]

regulation of microtubule cytoskeleton organization	7.60E-06	8.4	[APC, AURKA, CDC42, CLASP2, CLIP1, CTNNB1, MAPRE1, RACGAP1]
microtubule cytoskeleton organization	3.62E-06	4.4	[APC, AURKA, CDC42, CDK1, CLASP2, CLIP1, CTNNB1, FLNA, MAPRE1, PAFAH1B1, PEX14, PTK2, RACGAP1, RAN, RHOA]
positive regulation of cell projection organization	2.47E-09	7.7	[ACTR3, APC, CDC42, FGFR1, ILK, ITGB1, MTOR, NGFR, PAFAH1B1, RAC1, RHOA, RHOQ, TIAM1, WASF2, WASL]
actin cytoskeleton organization	3.54E-19	7.0	[ACTN4, ACTR2, ACTR3, ARF6, CDC42, DIAPH1, EPB41, EZR, FGD6, FLNA, GRB2, ILK, ITGB1, KISS1R, KRAS, MRAS, MTOR, NPHS1, NPHS2, PAFAH1B1, PDGFRB, PDLIM7, PIP5K1C, PRKCE, RAC1, RAC2, RACGAP1, RHOA, RHOQ, SHC1, SPTAN1, SPTBN1, VASP, WASF2, WASL]
protein polymerization	3.05E-09	7.6	[ACTR3, APC, ARF6, CLIP1, DIAPH1, GRB2, MAPRE1, MTOR, NPHS1, PRKCE, RAC1, SPTAN1, SPTBN1, VASP, WASL]

KEGG Terms	Term PValue	% Associated Genes	Associated Genes Found
Leukocyte transendothelial migration	5.15E-10	13.6	[ACTB, ACTN4, ARHGAP35, CDC42, CDH5, CTNNB1, EZR, ITGB1, MAPK13, MAPK14, PTK2, RAC1, RAC2, RHOA, VASP, VCAM1]
Adherens junction	1.55E-18	27.4	[ACTB, ACTN4, CDC42, CDH1, CTNNB1, EGFR, ERBB2, FGFR1, IQGAP1, MAPK1, MAPK3, PTPRM, PVRL1, RAC1, RAC2, RHOA, SRC, TGFB2, WASF2, WASL]
Regulation of actin cytoskeleton	1.44E-20	14.9	[ACTB, ACTN4, APC, ARHGAP35, ARHGEF4, BRAF, CDC42, DIAPH1, EGFR, EZR, FGFR1, FN1, IQGAP1, ITGB1, KRAS, MAP2K1, MAP2K2, MAPK1, MAPK3, MRAS, PAK6, PDGFRB, PIP5K1C, PTK2, RAC1, RAC2, RAF1, RHOA, SRC, TIAM1, WASF2, WASL]
Focal adhesion	4.54E-20	15.0	[ACTB, ACTN4, AKT1, ARHGAP35, BRAF, CDC42, CTNNB1, DIAPH1, EGFR, ERBB2, FLNA, FN1, GRB2, ILK, ITGB1, KDR, MAP2K1, MAPK1, MAPK3, PAK6, PDGFRB, PIP5K1C, PTEN, PTK2, RAC1, RAC2, RAF1, RHOA, SHC1, SRC, VASP]
Rap1 signaling pathway	8.77E-22	15.5	[ACTB, AKT1, BRAF, CALM1, CDC42, CDH1, CSF1, CTNNB1, EGFR, FGFR1, GRIN2A, GRIN2B, ITGB1, KDR, KRAS, LPAR1, MAGI1, MAP2K1, MAP2K2, MAPK1, MAPK13, MAPK14, MAPK3, MRAS, NGFR, PDGFRB, RAC1, RAC2, RAF1, RHOA, SRC, TIAM1, VASP]

Reactome Terms	Term PValue	% Associated Genes	Associated Genes Found
Sema4D mediated inhibition of cell attachment and migration	2.87E-04	37.5	[ARHGAP35, RAC1, RHOA]
Semaphorin interactions	4.38E-06	12.5	[ARHGAP35, CDC42, ERBB2, ITGB1, PIP5K1C, RAC1, RAC2, RHOA, RHOC]
Signaling by Rho GTPases	5.60E-05	8.2	[ARHGAP1, ARHGAP35, ARHGEF4, CDC42, RAC2, RACGAP1, RHOA, RHOC, RHOQ, TIAM1]
Sema4D in semaphorin signaling	1.10E-06	21.9	[ARHGAP35, CDC42, ERBB2, RAC1, RAC2, RHOA, RHOC]
Sema4D induced cell migration and growth-cone collapse	9.46E-06	20.7	[CDC42, ERBB2, RAC1, RAC2, RHOA, RHOC]
GPVI-mediated activation cascade	1.91E-04	16.1	[AKT1, CDC42, RAC1, RAC2, RHOA]
Rho GTPase cycle	5.60E-05	8.2	[ARHGAP1, ARHGAP35, ARHGEF4, CDC42, RAC2, RACGAP1, RHOA, RHOC, RHOQ, TIAM1]

15) Recursos Electrónicos

<<http://alggen.lsi.upc.es/cgi-bin/promo_v3/promo/promoinit.cgi?dirDB=TF_8.3>> “*Alggen-Promo*”

<<http://jaspar.binf.ku.dk/cgi-bin/jaspar_db.pl>> “*The Jaspar Database*”

<<<http://linux1.softberry.com/berry.phtml?topic=tssg&group=programs&subgroup=promoter>>> “*Softberry: Recognition of human PolII promoter region and start of transcription*”

<<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/refseq/>>> “*Refseq: NCBI Reference Sequence Database*”

<<<http://genome.ucsc.edu/>>> “*UCSC genome browser*”

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>> *NCBI Primer Blast*

<<<http://www.ebi.ac.uk/intact/>>> *IntAct Molecular Interaction Database*

<<<http://www.reactome.org/>>> *Reactome, a curated pathway Database*

16) Bibliografía

- Abushahba, W., Olabisi, O. O., Jeong, B.-S., Boregowda, R. K., Wen, Y., Liu, F., ... Cohen-Solal, K. a. (2012). Non-canonical Smads phosphorylation induced by the glutamate release inhibitor, riluzole, through GSK3 activation in melanoma. *PloS One*, 7(10), e47312. doi:10.1371/journal.pone.0047312
- Akiyoshi, S., Ishii, M., Nemoto, N., Kawabata, M., Aburatani, H., & Miyazono, K. (2001). Targets of transcriptional regulation by transforming growth factor-beta: expression profile analysis using oligonucleotide arrays. *Japanese Journal of Cancer Research Gann*, 92(3), 257–268. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11267935
- Attisano, L., & Wrana, J. L. (2002). Signal transduction by the TGF-beta superfamily. *Science (New York, N.Y.)*, 296(5573), 1646–7. doi:10.1126/science.1071809
- Barabási, A.-L., & Oltvai, Z. N. (2004). Network biology: understanding the cell's functional organization. *Nature Reviews. Genetics*, 5(2), 101–13. doi:10.1038/nrg1272
- Biernacka, A., Dobaczewski, M., & Frangogiannis, N. G. (2011). TGF-β signaling in fibrosis. *Growth Factors (Chur, Switzerland)*, 29(5), 196–202. doi:10.3109/08977194.2011.595714
- Bindea, G., Mlecnik, B., Hackl, H., Charoentong, P., Tosolini, M., Kirilovsky, A., ... Galon, J. (2009). ClueGO: a Cytoscape plug-in to decipher functionally grouped gene ontology and pathway annotation networks. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 25(8), 1091–3. doi:10.1093/bioinformatics/btp101
- Brown, M. D., & Sacks, D. B. (2006). IQGAP1 in cellular signaling: bridging the GAP. *Trends in Cell Biology*, 16(5), 242–9. doi:10.1016/j.tcb.2006.03.002
- Chen, F., Zhu, H. H., Zhou, L. F., Wu, S. S., Wang, J., & Chen, Z. (2010). IQGAP1 is overexpressed in hepatocellular carcinoma and promotes cell proliferation by Akt activation. *Experimental & Molecular Medicine*, 42(7), 477–83. doi:10.3858/emm.2010.42.7.049
- Choi, S., & Diehl, A. (2009). Epithelial-to-mesenchymal transitions in the liver. *Hepatology*, 50(6), 2007–2013. doi:10.1002/hep.23196.Epithelial-to-Mesenchymal
- Cline, M. S., Smoot, M., Cerami, E., Kuchinsky, A., Landys, N., Workman, C., ... Bader, G. D. (2007). Integration of biological networks and gene expression data using Cytoscape. *Nature Protocols*, 2(10), 2366–82. doi:10.1038/nprot.2007.324
- Croft, D., Mundo, A. F., Haw, R., Milacic, M., Weiser, J., Wu, G., ... D'Eustachio, P. (2014). The Reactome pathway knowledgebase. *Nucleic Acids Research*, 42(Database issue), D472–7. doi:10.1093/nar/gkt1102
- Deaton, A. M., & Bird, A. (2011). CpG islands and the regulation of transcription. *Genes & Development*, 25(10), 1010–22. doi:10.1101/gad.2037511

- Delgado-Coello, B., Bravo-Martínez, J., Sosa-Garrocho, M., Briones-Orta, M. a, Macías-Silva, M., & Mas-Oliva, J. (2010). Plasma membrane calcium ATPase isoform 3 expression in single cells isolated from rat liver. *Molecular and Cellular Biochemistry*, *344*(1-2), 117–24. doi:10.1007/s11010-010-0535-1
- Dooley, S., & ten Dijke, P. (2012). TGF- β in progression of liver disease. *Cell and Tissue Research*, *347*(1), 245–56. doi:10.1007/s00441-011-1246-y
- Feng, X., Lin, X., & Derynck, R. (2000). Smad2, Smad3 and Smad4 cooperate with Sp1 to induce p15Ink4B transcription in response to TGF- β . *The EMBO Journal*, *19*(19). Retrieved from <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1093/emboj/19.19.5178/full>
- Feng, X.-H., & Derynck, R. (2005). Specificity and versatility in tgf-beta signaling through Smads. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, *21*, 659–93. doi:10.1146/annurev.cellbio.21.022404.142018
- Fukata, M., Watanabe, T., Noritake, J., Nakagawa, M., Yamaga, M., Kuroda, S., ... Kaibuchi, K. (2002). Rac1 and Cdc42 capture microtubules through IQGAP1 and CLIP-170. *Cell*, *109*(7), 873–85. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12110184>
- Ganeshan, K., & Bryce, P. J. (2012). Regulatory T cells enhance mast cell production of IL-6 via surface-bound TGF- β . *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *188*(2), 594–603. doi:10.4049/jimmunol.1102389
- Gruber, B., Marchese, M., & Kew, R. (1994). Transforming growth factor-beta 1 mediates mast cell chemotaxis. *The Journal of Immunology*. Retrieved from <http://www.jimmunol.org/content/152/12/5860.short>
- Halova, I., Draberova, L., & Draber, P. (2012). Mast cell chemotaxis - chemoattractants and signaling pathways. *Frontiers in Immunology*, *3*(May), 119. doi:10.3389/fimmu.2012.00119
- Hedman, A. C., Smith, J. M., & Sacks, D. B. (2015). The biology of IQGAP proteins: beyond the cytoskeleton. *EMBO Reports*, *16*(4), 427–446. doi:10.15252/embr.201439834
- Heldin, C.-H., & Moustakas, A. (2012). Role of Smads in TGF β signaling. *Cell and Tissue Research*, *347*(1), 21–36. doi:10.1007/s00441-011-1190-x
- Heldin, C.-H., Vanlandewijck, M., & Moustakas, A. (2012). Regulation of EMT by TGF β in cancer. *FEBS Letters*, *586*(14), 1959–70. doi:10.1016/j.febslet.2012.02.037
- Hough, C., Radu, M., & Doré, J. J. E. (2012). Tgf-beta induced Erk phosphorylation of smad linker region regulates smad signaling. *PLoS One*, *7*(8), e42513. doi:10.1371/journal.pone.0042513
- Ikushima, H., & Miyazono, K. (2010). Cellular context-dependent “colors” of transforming growth factor-beta signaling. *Cancer Science*, *101*(2), 306–12. doi:10.1111/j.1349-7006.2009.01441.x
- Inman, G. J., & Hill, C. S. (2002). Stoichiometry of active smad-transcription factor complexes on DNA. *The Journal of Biological Chemistry*, *277*(52), 51008–16. doi:10.1074/jbc.M208532200
- Jameson, K. L., Mazur, P. K., Zehnder, A. M., Zhang, J., Zarnegar, B., Sage, J., & Khavari, P. a. (2013). IQGAP1 scaffold-kinase interaction blockade selectively targets RAS-MAP kinase-driven tumors. *Nature Medicine*, *19*(5), 626–30. doi:10.1038/nm.3165

- Jang, C.-W., Chen, C.-H., Chen, C.-C., Chen, J., Su, Y.-H., & Chen, R.-H. (2002). TGF-beta induces apoptosis through Smad-mediated expression of DAP-kinase. *Nature Cell Biology*, *4*(1), 51–8. doi:10.1038/ncb731
- Javelaud, D., & Mauviel, A. (2004). Mammalian transforming growth factor-betas: Smad signaling and physio-pathological roles. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, *36*(7), 1161–5. doi:10.1016/S1357-2725(03)00255-3
- Kaimori, A., Potter, J., Kaimori, J.-Y., Wang, C., Mezey, E., & Koteish, A. (2007). Transforming growth factor-beta1 induces an epithelial-to-mesenchymal transition state in mouse hepatocytes in vitro. *The Journal of Biological Chemistry*, *282*(30), 22089–101. doi:10.1074/jbc.M700998200
- Kashyap, M., Bailey, D. P., Gomez, G., Rivera, J., Huff, T. F., & Ryan, J. J. (2005). TGF-beta1 inhibits late-stage mast cell maturation. *Experimental Hematology*, *33*(11), 1281–91. doi:10.1016/j.exphem.2005.07.001
- Kim, S., Jong, H., & Kim, T. (2004). Transforming growth factor- β 1 induces apoptosis through Fas ligand-independent activation of the Fas death pathway in human gastric SNU-620 carcinoma cells. *Molecular Biology of the Cell*, *15*(February), 420–434. doi:10.1091/mbc.E03
- Koinuma, D., Tsutsumi, S., Kamimura, N., Taniguchi, H., Miyazawa, K., Sunamura, M., ... Aburatani, H. (2009). Chromatin immunoprecipitation on microarray analysis of Smad2/3 binding sites reveals roles of ETS1 and TFAP2A in transforming growth factor beta signaling. *Molecular and Cellular Biology*, *29*(1), 172–86. doi:10.1128/MCB.01038-08
- Kretzschmar, M., & Doody, J. (1999). A mechanism of repression of TGF β /Smad signaling by oncogenic Ras. *Genes & Development*, 804–816. Retrieved from <http://genesdev.cshlp.org/content/13/7/804.short>
- Li, F., Zeng, B., Chai, Y., Cai, P., Fan, C., & Cheng, T. (2009). The linker region of Smad2 mediates TGF-beta-dependent ERK2-induced collagen synthesis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *386*(2), 289–93. doi:10.1016/j.bbrc.2009.05.084
- Liu, C., Billadeau, D., & Abdelhakim, H. (2013). IQGAP1 suppresses T β RII-mediated myofibroblastic activation and metastatic growth in liver. *The Journal of Clinical Investigation*, *1*, 1–19. doi:10.1172/JCI63836.trols
- Long, J., Wang, G., Matsuura, I., He, D., & Liu, F. (2004). Activation of Smad transcriptional activity by protein inhibitor of activated STAT3 (PIAS3). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *101*(1), 99–104. doi:10.1073/pnas.0307598100
- Lönn, P., Morén, A., Raja, E., Dahl, M., & Moustakas, A. (2009). Regulating the stability of TGFbeta receptors and Smads. *Cell Research*, *19*(1), 21–35. doi:10.1038/cr.2008.308
- Macías-Silva, M., Abdollah, S., & Hoodless, P. (1996). MADR2 is a substrate of the TGF β receptor and its phosphorylation is required for nuclear accumulation and signaling. *Cell*, *87*, 1215–1224. Retrieved from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0092867400818176>
- Macias-Silva, M., Li, W., Leu, J. I., Crissey, M. A. S., & Taub, R. (2002). Up-regulated transcriptional repressors SnoN and Ski bind Smad proteins to antagonize transforming growth factor-beta signals during liver regeneration. *The Journal of Biological Chemistry*, *277*(32), 28483–90. doi:10.1074/jbc.M202403200

- Massague, J., Blain, S. W., & Lo, R. S. (2000). TGF β Signaling in Growth Control, Cancer, and Heritable Disorders. *Cell*, *103*, 295–309.
- Massagué, J., Seoane, J., & Wotton, D. (2005). Smad transcription factors. *Genes & Development*, *19*(23), 2783–810. doi:10.1101/gad.1350705
- Matsuzaki, K., Kitano, C., Murata, M., Sekimoto, G., Yoshida, K., Uemura, Y., ... Okazaki, K. (2009). Smad2 and Smad3 phosphorylated at both linker and COOH-terminal regions transmit malignant TGF-beta signal in later stages of human colorectal cancer. *Cancer Research*, *69*(13), 5321–30. doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-4203
- Miettinen, P., & Ebner, R. (1994). TGF-beta induced transdifferentiation of mammary epithelial cells to mesenchymal cells: involvement of type I receptors. *The Journal of Cell Biology*, *127*(6). Retrieved from <http://jcb.rupress.org/content/127/6/2021.abstract>
- Millet, C., Yamashita, M., Heller, M., Yu, L.-R., Veenstra, T. D., & Zhang, Y. E. (2009). A negative feedback control of transforming growth factor-beta signaling by glycogen synthase kinase 3-mediated Smad3 linker phosphorylation at Ser-204. *The Journal of Biological Chemistry*, *284*(30), 19808–16. doi:10.1074/jbc.M109.016667
- Mori, S., Matsuzaki, K., Yoshida, K., Furukawa, F., Tahashi, Y., Yamagata, H., ... Okazaki, K. (2004). TGF-beta and HGF transmit the signals through JNK-dependent Smad2/3 phosphorylation at the linker regions. *Oncogene*, *23*(44), 7416–29. doi:10.1038/sj.onc.1207981
- Noritake, J., Fukata, M., & Sato, K. (2004). Positive role of IQGAP1, an effector of Rac1, in actin-meshwork formation at sites of cell-cell contact. *Molecular Biology of the Cell*, *15*(March), 1065–1076. doi:10.1091/mbc.E03
- Pardali, K., Kurisaki, a., Moren, a., ten Dijke, P., Kardassis, D., & Moustakas, a. (2000). Role of Smad Proteins and Transcription Factor Sp1 in p21Waf1/Cip1 Regulation by Transforming Growth Factor-. *Journal of Biological Chemistry*, *275*(38), 29244–29256. doi:10.1074/jbc.M909467199
- Pawitan, Y., Michiels, S., Koscielny, S., Gusnanto, a., & Ploner, a. (2005). False discovery rate, sensitivity and sample size for microarray studies. *Bioinformatics*, *21*(13), 3017–3024. doi:10.1093/bioinformatics/bti448
- Peck, D., & Isacke, C. (1998). Hyaluronan-dependent cell migration can be blocked by a CD44 cytoplasmic domain peptide containing a phosphoserine at position 325. *Journal of Cell Science*, *160*(1), 1595–1601. Retrieved from <http://jcs.biologists.org/content/111/11/1595.short>
- Ren, J.-G., Li, Z., & Sacks, D. B. (2007). IQGAP1 modulates activation of B-Raf. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *104*(25), 10465–9. doi:10.1073/pnas.0611308104
- Rosbottom, A. (2002). TGF- β 1 regulates adhesion of mucosal mast cell homologues to laminin-1 through expression of integrin α 7. *The Journal of Immunology*, *169*(1), 2–8. Retrieved from <http://www.jimmunol.org/content/169/10/5689.short>

- Schmidt, V. a. (2012). Watch the GAP: Emerging Roles for IQ Motif-Containing GTPase-Activating Proteins IQGAPs in Hepatocellular Carcinoma. *International Journal of Hepatology*, 2012, 958673. doi:10.1155/2012/958673
- Schmidt, V. a, Chiariello, C. S., Capilla, E., Miller, F., & Bahou, W. F. (2008). Development of hepatocellular carcinoma in Iqgap2-deficient mice is IQGAP1 dependent. *Molecular and Cellular Biology*, 28(5), 1489–502. doi:10.1128/MCB.01090-07
- Schmierer, B., & Hill, C. S. (2007). TGFbeta-SMAD signal transduction: molecular specificity and functional flexibility. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 8(12), 970–82. doi:10.1038/nrm2297
- Sekelsky, J., Newfeld, S., & Raftery, L. (1995). Genetic Characterization and Cloning of Mothers against dpp, a Gene Required for decapentuplegic Function in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, 1358(139), 1347–1358. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1206461/>
- Seoane, J., Le, H., Shen, L., Anderson, S., & Massagué, J. (2004). Integration of Smad and forkhead pathways in the control of neuroepithelial and glioblastoma cell proliferation. *Cell*, 117, 211–223. Retrieved from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0092867404002983>
- Shi, W., Sun, C., He, B., Xiong, W., Shi, X., Yao, D., & Cao, X. (2004). GADD34-PP1c recruited by Smad7 dephosphorylates TGFbeta type I receptor. *The Journal of Cell Biology*, 164(2), 291–300. doi:10.1083/jcb.200307151
- Shi, Y., & Massagué, J. (2003). Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell*, 113(6), 685–700. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12809600>
- Smith, J. M., Hedman, A. C., & Sacks, D. B. (2015). IQGAPs choreograph cellular signaling from the membrane to the nucleus. *Trends in Cell Biology*, 25(3), 171–184. doi:10.1016/j.tcb.2014.12.005
- Souchelnytskyi, S., ten Dijke, P., Miyazono, K., & Heldin, C. H. (1996). Phosphorylation of Ser165 in TGF-beta type I receptor modulates TGF-beta1-induced cellular responses. *The EMBO Journal*, 15(22), 6231–40. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=452446&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Stormo, G. D. (2000). DNA binding sites: representation and discovery. *Bioinformatics*, 16(1), 16–23. doi:10.1093/bioinformatics/16.1.16
- Uemura, M., & Swenson, E. (2005). Smad2 and Smad3 play different roles in rat hepatic stellate cell function and α -smooth muscle actin organization. *Molecular Biology of the Cell*, 16(September), 4214–4224. doi:10.1091/mbc.E05
- Valderrama-Carvajal, H., Cocolakis, E., Lacerte, A., Lee, E.-H., Krystal, G., Ali, S., & Lebrun, J.-J. (2002). Activin/TGF-beta induce apoptosis through Smad-dependent expression of the lipid phosphatase SHIP. *Nature Cell Biology*, 4(12), 963–9. doi:10.1038/ncb885

- Watanabe, T., Wang, S., Noritake, J., Sato, K., Fukata, M., Takefuji, M., ... Kaibuchi, K. (2004, December). Interaction with IQGAP1 links APC to Rac1, Cdc42, and actin filaments during cell polarization and migration. *Developmental Cell*. doi:10.1016/j.devcel.2004.10.017
- White, C. D., Erdemir, H. H., & Sacks, D. B. (2012). IQGAP1 and its binding proteins control diverse biological functions. *Cellular Signalling*, 24(4), 826–34. doi:10.1016/j.cellsig.2011.12.005
- White, C. D., Khurana, H., Gnatenko, D. V, Li, Z., Odze, R. D., Sacks, D. B., & Schmidt, V. a. (2010). IQGAP1 and IQGAP2 are reciprocally altered in hepatocellular carcinoma. *BMC Gastroenterology*, 10(1), 125. doi:10.1186/1471-230X-10-125
- Wiener, Z., Kohalmi, B., Pocza, P., Jeager, J., Tolgyesi, G., Toth, S., ... Falus, A. (2007). TIM-3 is expressed in melanoma cells and is upregulated in TGF-beta stimulated mast cells. *The Journal of Investigative Dermatology*, 127(4), 906–14. doi:10.1038/sj.jid.5700616
- Wrighton, K. H., Lin, X., & Feng, X.-H. (2009). Phospho-control of TGF-beta superfamily signaling. *Cell Research*, 19(1), 8–20. doi:10.1038/cr.2008.327
- Xie, L., Law, B. K., Aakre, M. E., Edgerton, M., Shyr, Y., Bhowmick, N. a, & Moses, H. L. (2003). Transforming growth factor beta-regulated gene expression in a mouse mammary gland epithelial cell line. *Breast Cancer Research*, 5(6), R187–R198. doi:10.1186/bcr640
- Xu, J., Lamouille, S., & Derynck, R. (2009). TGF-beta-induced epithelial to mesenchymal transition. *Cell Research*, 19(2), 156–72. doi:10.1038/cr.2009.5
- Xu, P., Liu, J., & Derynck, R. (2012). Post-translational regulation of TGF- β receptor and Smad signaling. *FEBS Letters*, 586(14), 1871–84. doi:10.1016/j.febslet.2012.05.010
- Yakicier, M., Irmak, M., Romano, A., Kew, M., & Ozturk, M. (1999). Smad2 and Smad4 gene mutations in hepatocellular carcinoma. *Oncogene*, 4, 0–4. Retrieved from <http://europepmc.org/abstract/med/10490821>
- Zhang, L., Li, X., Wang, B., Zhang, T., & Ye, J. (2012). Chlamydia (Chlamydia) pneumoniae infection promotes vascular smooth muscle cell adhesion and migration through IQ domain GTPase-activating protein 1. *Microbial Pathogenesis*, 53(5-6), 207–13. doi:10.1016/j.micpath.2012.07.005