

Tesis de Maestría

Regulación de la expresión del promotor del gen P8 por las vías de stress de las RHOGTPasas y MAPKs : evaluación del rol de IP15

Cosen de Binker, Laura Iris

2005

Tesis presentada para obtener el grado de Magister de la Universidad de Buenos Aires en Biología Molecular Médica de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the Master's and Doctoral Theses Collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Cosen de Binker, Laura Iris. (2005). Regulación de la expresión del promotor del gen P8 por las vías de stress de las RHOGTPasas y MAPKs : evaluación del rol de IP15. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

http://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis_n4198_CosendeBinker

Cita tipo Chicago:

Cosen de Binker, Laura Iris. "Regulación de la expresión del promotor del gen P8 por las vías de stress de las RHOGTPasas y MAPKs : evaluación del rol de IP15". Tesis de Magister. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2005.

http://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis_n4198_CosendeBinker

EXACTAS

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

FCE y N BIBLIOTECA

MAESTRIA EN BIOLOGIA MOLECULAR MEDICA
UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

TESINA DE MAGÍSTER

REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DEL PROMOTOR
DEL GEN P8 POR LAS VÍAS DE STRESS DE LAS RHO-
GTPasas Y MAPKs. EVALUACIÓN DEL ROL DE IP15.

TESISTA: DOCTORA LAURA IRIS COSEN DE BINKER

DIRECTOR: DOCTOR JUAN LUCIO IOVANNA

CENTRE DE RECHERCHE INSERM, UNITE 624,
CELLULAR STRESS.
MARSELLA, FRANCIA.

2004

77805

DEDICATORIAS

AGRADECIMIENTOS

EVALUACION DEL DIRECTOR

AGRADECIMIENTOS :

- ❖ A mi Director de Tesina, Dr. Juan Lucio Iovanna, por su invaluable dirección en el desarrollo de este trabajo, su constante estímulo y su generosidad al transmitir sus conocimientos.
- ❖ A mi Supervisor Post-Doctoral, Dr. Andras Kapus, por sus valiosas enseñanzas y consejos expertos al igual que su constante apoyo y confianza.
- ❖ A los Doctores Sergio Grinstein y Amira Klip, por guiarme estando tan lejos de mi hogar.
- ❖ A Sophie, Cedric y Joel por su ayuda en el trabajo realizado.
- ❖ A mi querida compañera de mesada y andanzas en Marsella, Pía Valacco.
- ❖ A mis profesores de la Maestría en Biología Molecular Médica quienes alimentaron y guiaron vivamente mi interés en este área junto a mis compañeros con quienes transitamos los primeros pasos de esta disciplina.
- ❖ A Cecilia, Lucas y Laurita con quienes compartí cada viernes y sábado.
- ❖ A las autoridades, personal docente y no docente de la FFyB-UBA quienes posibilitaron mi formación profesional.
- ❖ A mi Director de Tesis de Doctorado, Dr. Osvaldo Tiscornia, quien me contagió su amor por el páncreas.
- ❖ Al Dr. Julio N. Cosen y la Dra. Rodica H. de Cosen por su constante ejemplo en mi formación científica y ética, y por haberme guiado con bondad y dedicación en mi carrera profesional despertando mi amor hacia la Investigación Científica.
- ❖ A mis hijos, Makena Joy y Andrés Ariel, por compartir su tiempo y sus risas.
- ❖ A mi marido, Marcelo Gustavo Binker, por su buen criterio, apoyo y ayuda incondicionales, infinita paciencia, amor, compañía y su aliento constantes.

⌘ *¡ A los que por siempre tienen de estudiantes,* ⌘
para toda la vida el corazón !



Centre de Recherche INSERM
EMI 0116
Physiopathologie du Stress Pancréatique

Institut national
de la santé et de la recherche médicale

11 de Febrero del 2003

Dejo constancia que la Doctora Laura Cosen-Binker realizó trabajos de investigación en nuestro laboratorio (Centre de recherche INSERM EMI0116, laboratoire de Physiopathologie du Stress Pancréatique, 163 avenue de Luminy, Campus de Luminy, 13009 Marseille, France) desde el 2 de enero al 12 de febrero del 2003 dentro del cuadro de su tesis de Maestría en Biología Molecular Médica bajo mi responsabilidad.

La Doctora Cosen-Binker tuvo bajo su responsabilidad el estudio de la regulación de la expresión del gen p8, un gen implicado en los mecanismos de defensa pancreática, por un nuevo gen identificado en nuestro laboratorio y denominado transitoriamente "clon 13". Los trabajos consistieron en transfectar una construcción plamídica conteniendo el promotor de gen p8 controlando la expresión del gen reporter CAT, junto a un plásmido de expresión del clon 13 solo o en combinación con otros plásmidos de expresión para las proteínas cdc42, rhoA o rac, o junto a inhibidores farmacológicos específicos para las diferentes vías MAP kinasa (ERK, JNK y p38). Los resultados obtenidos fueron de gran utilidad para nuestro laboratorio y pusieron algunas luces sobre la complejidad de la regulación de la expresión del gen p8.

La Doctora Cosen-Binker tuvo la oportunidad de trabajar en cultivo celular, preparar ADN plamídico, medir actividades de las enzimas CAT y beta-galactosidasa. En esta corta experiencia se ha podido apreciar algunas de las cualidades de la Doctora Cosen-Binker, en particular su seriedad profesional, su prolividad y su cuidado en el desarrollo de sus actividades.



Dr Juan L Iovanna
Director

A la memoria de mi querida hija SOL VICTORIA :

*Cuando ya no queda NADA
se está frente al TODO
que es la magnificencia eterna
de Tu Luz que en tu enero
en mi nació y hoy anida.
Le gambeteaste las horas al Tiempo
siendo el ejemplo de UN DESTINO
que vibra y palpita más allá
de toda forma, cuerpo y presencia.
Es tu ausencia
la huella más profunda
que a fuego graba
tu edificante existencia
porque luchaste por la VIDA
mientras VIDA hubo por la que luchar había.
Es el saberte AUSENTE
tal vez, lo que en mí,
te hace SER por SIEMPRE PRESENTE
porque son muchas las formas de VIVIR
y eso es lo que cuenta, VIVIR,
más allá de las circunstancias,
por siempre VIVIR.
Seas la VICTORIA de mi SOL
sobre las oscuras tinieblas
de todo el dolor
porque **INFINITO ES EL AMOR.***



Dedicado a:



Mis hijos Makena Joy y Andrés Ariel,



Mi marido Marcelo Gustavo



Mis padres Rodica y Julio



INDICE

Indice

-Introducción	1
.Pancreatitis Aguda.....	1
.Rho-GTPasas.....	3
.MAPK.....	8
.p8.....	11
.IP15.....	16
-Hipótesis y Objetivos.....	20
-Procedimientos.....	21
-Resultados.....	24
-Discusión.....	31
-Bibliografía.....	37
-Resúmenes.....	42
.Castellano.....	42
.Inglés.....	43

INTRODUCCIÓN

Regulación de la Expresión del Promotor del gen p8 por las vías de stress de las Rho-GTPasas y MAPKs. Evaluación del rol de IP15.

Introducción

Pancreatitis Aguda

La Pancreatitis Aguda (PA) es una patología que se caracteriza por un severo dolor abdominal acompañado del aumento de las enzimas pancreáticas tanto en sangre como en orina; se inicia como una inflamación local, la cual, a través de una señal, probablemente mediada por citokinas, produce una inflamación sistémica asociada al reclutamiento de leucocitos, los cuales liberan mediadores que a su vez también activan otras células inflamatorias dinamizando un fenómeno de amplificación en cascada ⁽¹⁻²⁻³⁾. Los Arcos Reflejos Autonómicos desencadenados en el duodeno peri-Vateriano son los responsables de gatillar la inflamación sistémica temprana en la PA ⁽⁴⁻⁵⁾ y el cuadro de stress asociado a la noxa lleva a una PA severa ⁽⁶⁾.

La PA severa es inicialmente un proceso necrótico-inflamatorio local-regional susceptible de transitar hacia una enfermedad multiorgánica. Esta evolución se debe fundamentalmente a la acción de las enzimas pancreáticas y a los mediadores pro-inflamatorios ⁽⁷⁻⁸⁾. El proceso de autodigestión de la glándula pancreática debido a la activación prematura de los zimógenos tiene como resultado la síntesis de enzimas proteolíticas activas en el interior del páncreas ⁽⁹⁾. Si la agresión es muy severa, los mecanismos de defensa por parte de las células que buscan restaurar la homeostasis a través de la apoptosis, eliminando las células dañadas sin un proceso inflamatorio ⁽¹⁰⁻¹¹⁾, fracasan y se instaura entonces la necrosis y la inflamación, probablemente acompañadas de hemorragia ⁽¹²⁻¹³⁻¹⁴⁾.

El sufrimiento de la célula acinar lleva a la activación del sistema inmunológico interviniendo las citokinas y los productos de la citolisis resultantes de la necrosis celular. La anoxia, derivada del stress oxidativo, y la isquemia, debida a la vasoconstricción e hipotensión, afectan directamente la actividad mitocondrial teniendo un rol protagónico en la inducción de la necrosis ⁽¹⁵⁻¹⁶⁾.

El bloqueo mitocondrial determina un estallido celular con la liberación de su contenido incluyendo enzimas potencialmente peligrosas; la pérdida de la integridad de las organelas es consecuencia de la degradación del citoesqueleto ante esta eclosión no programada que finaliza con la muerte por necrosis⁽¹⁷⁻¹⁸⁻¹⁹⁾.

Las alteraciones en la microcirculación, resultantes de la estimulación alternada de la vías adrenérgica y colinérgica⁽⁶⁾, exacerbán el cuadro de la PA ya que la glándula es muy susceptible a la hipoxia. La injuria por isquemia y la reperfusión secundaria a la hipoperfusión tienen como consecuencia final la necrosis. El Síndrome de Respuesta Inflamatoria Sistémica se manifiesta cuando la PA grave pasa a ser un síndrome multifocal conocido como Falla Multi-Orgánica⁽²⁰⁾, lo cual implica una disfunción orgánica con falla pluriparenquimatosa⁽²¹⁻²²⁻²³⁾; las citokinas, los radicales libres (anión superóxido, peróxido de hidrógeno, óxido nítrico) y el factor de agregación plaquetaria (PAF) entre otros, son los protagonistas mayores de este cuadro patológico⁽²⁴⁻²⁵⁾.

Familia de las Rho-GTPasas

Proteínas de la Familia Rho

Dentro de las proteínas de la familia Rho, pertenecientes a la superfamilia Ras, podemos identificar en mamíferos las siguientes subfamilias de Rho-GTPasas: Rho (isoformas A-B-C), Rac (isoformas 1-2-3), Cdc42 (isoformas Cdc42Hs, G25K), Rnd1/Rho6, Rnd2/Rho7, Rnd3/RhoE, RhoD, RhoG, TC10, TTF.

Rho – Rac – Cdc42 son las principales Rho-GTPasas en mamíferos. Estas proteínas monoméricas de 20 a 30 KDa que unen guanosina trifosfato (GTP) son GTPasas que se encuentran en dos formas interconvertibles: GDP (inactiva) y GTP (activa). Cada una de estas GTPasas actúa como una llave de encendido, mantenidas en un estado inactivo unido a GDP y siendo activadas al ser unidas a GTP. En el estado activo pueden interactuar con moléculas blanco o efectoras para iniciar una respuesta río-abajo, mientras una actividad de GTPasa intrínseca lleva a la proteína nuevamente al estado inactivo unido a GDP para así completar el ciclo y dar fin a la señal de transducción (figura 1).

El ciclo del estado de unión a GDP-GTP-GDP es regulado por varias proteínas celulares que facilitan el intercambio de GDP por GTP, y se trata de los factores de intercambio de nucleótidos de guanosina (GEFs). También existen proteínas que aumentan la actividad intrínseca de hidrólisis de GTP de las Rho-GTPasas conocidas como proteínas activadoras de las GTPasas (GAPs) y los inhibidores de la disociación del nucleótido de guanosina (GDIs). El principal mecanismo por el cual las Rho-GTPasas activan a las moléculas efectoras parece ser la inhibición de las interacciones intramoleculares de auto-inhibición, exponiendo los dominios funcionales dentro de la proteína efectora. Al unirse la GTPasa, la secuencia inhibitoria es desplazada dejando libre el dominio de la kinasa para que se una a los correspondientes sustratos ⁽²⁶⁾.

Las proteínas Rho regulan diversas actividades celulares como la estructura del citoesqueleto en respuesta a estímulos extracelulares, la adhesión celular, la polaridad celular, la endocitosis, el tráfico vesicular, la apoptosis, la progresión a través del ciclo celular y control de la proliferación, la diferenciación, la oncogénesis y metástasis, la transcripción génica y la inflamación.

Entre las ya estudiadas, la principal función de las Rho-GTPasas es regular la formación y organización del citoesqueleto de actina por lo que se considera que Rho, Rac y Cdc42 regulan tres vías de transducción relacionando varios receptores de membrana a la formación de filamentos de actina-miosina, lamellipodia y filopodia; por ende, las mismas juegan un rol importante en procesos celulares que dependen del citoesqueleto de actina tales como la citokinesis, la fagocitosis, la pinocitosis, la migración celular, la morfogénesis y la orientación axonal⁽²⁷⁻²⁸⁾.

La subfamilia Rho fundamentalmente está involucrada en la formación de fibras de stress (elongación de ovillos o “bundles” de actina que atraviesan la célula promoviendo el anclaje de la misma a la matriz extracelular a través de adhesiones focales). RhoA y RhoC estimulan la proliferación, opuesto a RhoB que en muchos casos la inhibe. RhoB funciona en vesículas de tráfico intracelular y está localizada tanto en la membrana plasmática como en la membrana externa de los cuerpos multivesiculares (compartimento endosomal tardío). La internalización del receptor de EGF activa a RhoB y a su vez RhoB activado inhibe el transporte del receptor de EGF al lisosoma. La expresión de RhoC promueve la metástasis y está aumentado en carcinomas invasivos.

Rac estimula la formación de lamellipodia (extensiones del borde celular) y “ruffles” de membrana.

Cdc42 estimula la formación de filopodia (finas extensiones de actina probablemente involucradas en el reconocimiento del medio extracelular) y une a WASP (Wiscott Aldrich Síndrome Protein), siendo importante para la polarización celular.

Estudios en células Swiss 3T3 mostraron que Cdc42, Rac y Rho están organizados en cascadas jerárquicas. El Cdc42 activado activa a Rac, el cual a su vez activa a Rho. También existe una cascada independiente de Cdc42 que vincula Ras a Rac y por ende a Rho⁽²⁷⁻²⁸⁾.

Las Rho-GTPasas también regulan otras vías bioquímicas independientes de la actina tales como los factores de transcripción, factor de respuesta sérica (SRF) y factor nuclear kappa B (NF- κ B), las vías de las MAPKs a partir de JNK y p38, el complejo de fagocitosis NADPH oxidasa, la progresión del ciclo celular en G₁, el ensamblado de los contactos celulares que contienen cadherina, la secreción en mastocitos, la polaridad celular y la transformación celular.

La sobre-expresión de las formas activadas de Rac y Cdc42 llevan a la activación de las MAPKs JNK y p38 en varios tipos celulares. La activación de JNK por ciertos factores de crecimiento y citokinas (ej. EGF, TNF α , TGF β) está inhibida ante la presencia de la forma dominante negativa de Rac y Cdc42, aunque esto no se puede generalizar ya que la inducción de JNK por TNF α no depende de Cdc42 en las células Swiss 3T3. Las tres Rho-GTPasas están implicadas en el ensamblaje y/o mantenimiento de los contactos celulares.

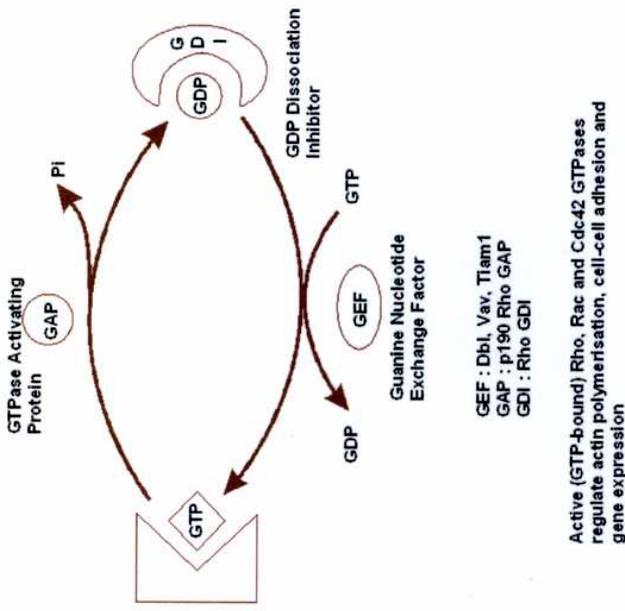
Las actividades celulares que involucran a Rho – Rac y Cdc42 están sintetizadas en la tabla 1.

Mientras que los roles de RhoA, Rac y Cdc42 relacionados a la motilidad celular son similares en la mayoría de los tipos celulares, su función en células epiteliales es más compleja. En este contexto, parecen ser necesarias tanto la adhesión célula-célula como la motilidad. Por ejemplo, la función de Rac y Rho es requerida para establecer nuevas juntas o “junctions” mediadas por cadherina-E, a la vez que mantienen las ya existentes. En células Madin-Darby renales caninas (MDCK), la hiperactivación de Rac1 lleva a la acumulación tanto de cadherina-E como de actina cortical en los bordes de membranas laterales, y previenen la migración celular inducida por Ras oncocéntrico o por el factor de crecimiento del hepatocito (HGF). Cdc42 puede también participar en el ensamblaje de las juntas de adhesión.

En forma opuesta, la inhibición de la función de Rac1 bloquea la migración celular en MDCK en los ensayos “wound-healing assay” en respuesta al HGF, sugiriendo que Rac también regula positivamente la migración epitelial como lo hace en fibroblastos y otras células no epiteliales.

Las células epiteliales adquieren mayor motilidad y un fenotipo fibroblástico en un proceso referido como transición epitelial-mesenquimal (EMT). Ejemplos de EMT se dan tanto en el desarrollo normal (ej. gastrulación, migración celular de cresta neural) y procesos patológicos tales como la metástasis. Un evento temprano en EMT tanto “in vivo” como “in vitro” es la pérdida de las “adherens junctions”, lo que se correlaciona con la internalización de complejos de cadherina-E de la membrana plasmática. La cadherina-E es la molécula de adhesión primaria del epitelio. La desregulación en la expresión o función de la cadherina es una característica común de los cánceres epiteliales, habiéndose identificado a la cadherina-E como un supresor tumoral⁽²⁹⁾.

Figura 1: Mecanismo de activación e inactivación de las GTPasas



Miembros de una familia de proteínas que actúan como llaves de encendido moleculares intracelulares, las pequeñas GTPasas, perciben modificaciones en el entorno extracelular y los traduce a señales homeostáticas. La función de llave se da en posición de encendido al unirse a GTP, y apagado al unir GDP. Al unir GTP estas proteínas unen y activan a proteínas efectoras que están río-abajo tales como kinasas, proteínas que unen actina y enzimas modificadoras de lípidos. Entre las pequeñas GTPasas, Ras y la familia Rho regulan vías que llevan a fenotipos vinculados a la proliferación, diferenciación y apoptosis. Ras y las Rho-GTPasas están organizadas en complejas redes de interacciones funcionales⁽²⁸⁾.

Tabla 1: Síntesis de las actividades celulares que involucran a Rho - Rac- Cdc42

	Actina	SRF	JNK p38	NF-kB	NADPH oxidasa	G1 Progresión del Ciclo Celular	Contacto Célula-Célula	Secreción	Polaridad Celular	Transformación
Rho	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+
Rac	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
Cdc42	+	+	+	+	-	+	+	?	+	+

Estas actividades se refieren a las vías biológicas que pueden ser inducidas por las Rho-GTPasas activas, y/o que pueden ser inhibidas por las construcciones dominante-negativas de las correspondientes Rho-GTPasa. SRF y NF-kB son factores de transcripción; JNK y p38 corresponden a la vía de las MAPKs; el complejo NADPH/oxidasa está presente solo en células fagocíticas; la secreción solo se ha visto que involucra a las Rho-GTPasas en mastocitos.

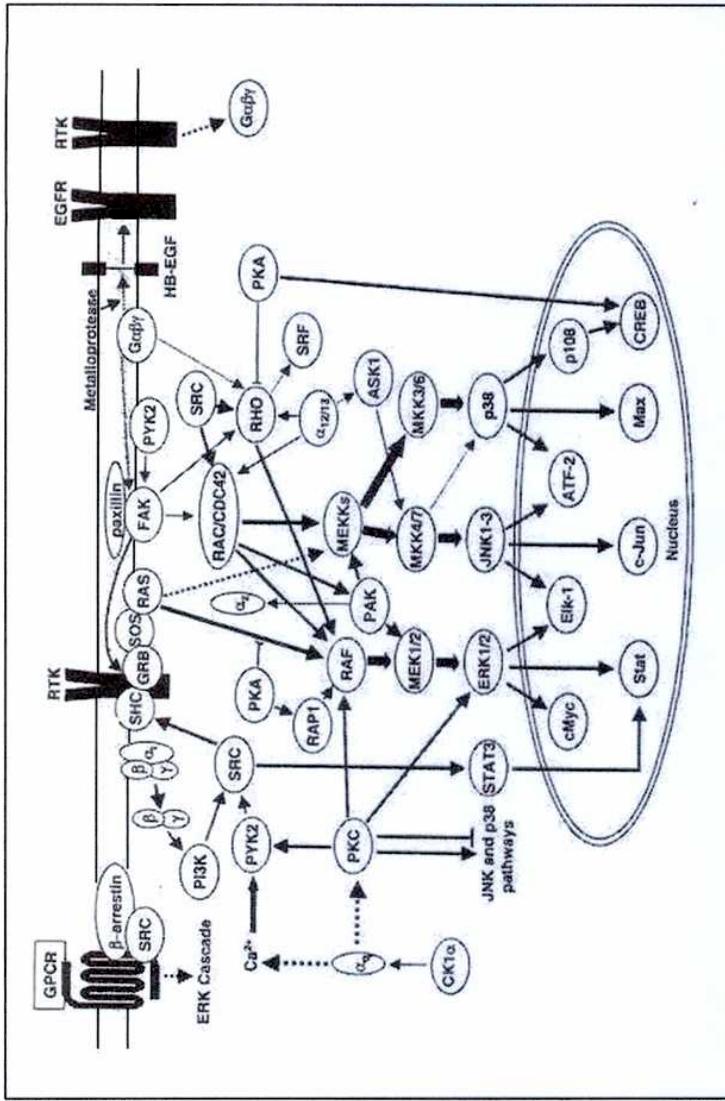
MAPK

La principal vía de señalización que vincula la activación de RTKs (Receptores de Tirosín Kininas) al núcleo corresponde a la vía del Ras que es una pequeña proteína monomérica de membrana que une GTP. Luego de ser activada, Ras estimula una cascada de kininas proteicas del tipo serina/treonina llamadas, Kininas Proteicas Asociadas a Mitógenos (MAPKs) las cuales transmiten el mensaje al núcleo. Las MAPKs al activarse fosforilan a varias proteínas reguladoras de genes alterando su habilidad para regular la transcripción génica y por ende influenciando la proliferación celular, la sobrevida, la migración y/o diferenciación. Esta cascada de MAPKs está altamente conservada entre las especies eucariotas⁽³⁰⁾.

Por lo menos hay tres MAPKs distintas. Estas incluyen las kininas reguladas por señales extracelulares (ERKs), las kininas amino terminales de c-Jun (JNKs) y las p38 MAPKs. La especificidad de las interacciones de MAPKs con la molécula efectora que estimula depende en gran medida del subtipo de MAPK estimulada (7 MAPKKs, 14 MAPKKKs, 12 MAPK). Por ejemplo, ERKs son estimulados principalmente por factores de crecimiento y modulan la proliferación celular y la diferenciación, mientras que JNKs y p38 MAPKs son activadas mas comúnmente por el stress (irradiación, shock térmico) y citokinas (TNF- α , IL-1 β) estando involucrados en la proliferación celular, diferenciación, sobrevida, apoptosis y producción de citokinas.

La activación de JNK mediada por la proteína G puede ser dependiente o independiente de Ras según el GPCR (receptor asociado a la proteína G) y tipo celular involucrados. Hay evidencias que indican que la vía independiente de Ras que lleva a la activación de JNK involucra a las pequeñas GTP-asas de la familia Rho, (Rho A, Rac-1 y Cdc 42). Ambas pueden regular la actividad de JNK independiente de la cascada Ras/MAPK⁽³¹⁾ (figuras 2 y 3).

Figura 2: Cross-talk entre las vías de señalización de GPCR y RTK



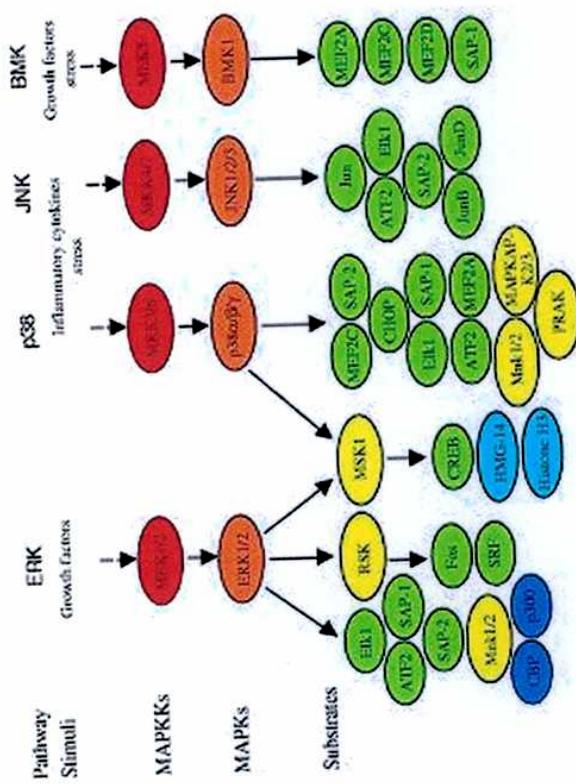
Esquema del complejo rol de las kinasas de tirosina que no actúan como receptores (Src, Pyk 2, FAK) asociadas a miembros de la familia de Ras y Rho (proteínas de bajo peso molecular que se unen a GTP)

con énfasis en la comunicación entre cascadas.

Las flechas gruesas indican una conexión directa, las flechas punteadas indican una conexión indirecta.

El grosor de la flecha señala la importancia relativa de la vía⁽³⁰⁾.

Figura 3 : Vía de las MAPK en mamíferos



Esquema de las vías de MAPKs y algunos de sus substratos. MAPKK/MKK (MAPK Kinasa), ERK (kinasa regulada por señales extracelulares), JNK (Kinasa Jun N-terminal), BMK (MAPK grande), MEK (kinasa MAPK/ERK). El código de colores correspondiente es: rojo, MAPKKs; naranja, MAPKs; amarillo, kinasas río-abajo; verde, factores de transcripción; celeste, proteínas nucleosomales; azul oscuro, co-reguladores⁽³¹⁾.

Proteína p8

En condiciones fisiológicas, la proteína p8 presenta un bajo nivel de expresión en el páncreas; dicha expresión se encuentra notablemente aumentada durante la fase aguda de la pancreatitis⁽³²⁻³³⁾, y elevada, pero en menor medida, en otras situaciones de injuria pancreática. A su vez también se comprobó un aumento de la transcripción del gen p8 en varios tejidos como respuesta a la administración sistémica de LPS y en el cerebro luego de una isquemia transitoria. La sobre-expresión de p8 en respuesta al sufrimiento celular estaría indicando que el mismo constituye parte de un programa general destinado a la defensa contra la injuria y el stress celular⁽³⁴⁻³⁵⁻³⁶⁻³⁷⁾.

La expresión del ARNm de la p8 de rata es rápida y fuertemente activada luego de inducir la pancreatitis aguda experimentalmente. El estudio del cDNA de p8 indica que la secuencia del ARNm presenta un solo marco de lectura abierto, dos metioninas ubicadas en las posiciones 52 y 55 son los posibles sitios de iniciación de la traducción. La característica más importante de la secuencia consenso es una A en la posición -3 y una G inmediatamente después del codón ATG la cual esta presente en la posición 55 aproximadamente, por lo que la síntesis de p8 probablemente comience en el nucleótido 55. La región 3' consiste de un codón de finalización TGA en la posición -295 seguido por 292 nucleótidos de un mensaje que no es traducido (excluyendo el tramo de poliA). Un sitio canónico de reconocimiento de la poliadenilación (AATAAA) se encontró 18 nucleótidos río-arriba de la cola de poliA⁽³⁸⁾ (figura 4).

La p8 es un polipéptido de 82 aminoácidos y peso molecular estimado de 8955 Da cuya localización es nuclear. Se trata de una fosfoproteína con un pI teórico de 9.45 en la cual se encuentra un motivo hélice-vuelta-hélice típico de las familias de proteínas que interactúan con el DNA si bien este motivo no tiene una homología significativa con otros motivos hélice-vuelta-hélice encontrados en otros genes (figura 5). Desde el punto de vista bioquímico y biofísico la proteína p8 puede ser clasificada dentro del grupo de proteínas de alta movilidad (HMG-I/Y) aunque muestre un bajo grado de homología en cuanto a la secuencia primaria⁽³⁸⁾.

A partir de un gráfico de hidrofobicidad se demostró una alta hidrofilicidad a lo largo de toda la longitud de la proteína salvo en el centro donde hay una región ligeramente hidrofóbica. Hay una alta probabilidad que p8 carezca de péptido señal (score - 6,82) sugiriendo esto que no se trata de una típica proteína de secreción. La proteína p8 no tiene regiones de transmembrana y es muy baja la probabilidad de que se trate de una proteína mitocondrial, lisosomal o de anclaje en el

retículo endoplasmático. La proteína p8 presenta una potencial señal bipartita de blanco nuclear en la posición 63 (RKLLTKFQNSERKKAWR) sugiriendo esto que la función de p8 reside en el núcleo (figura 6).

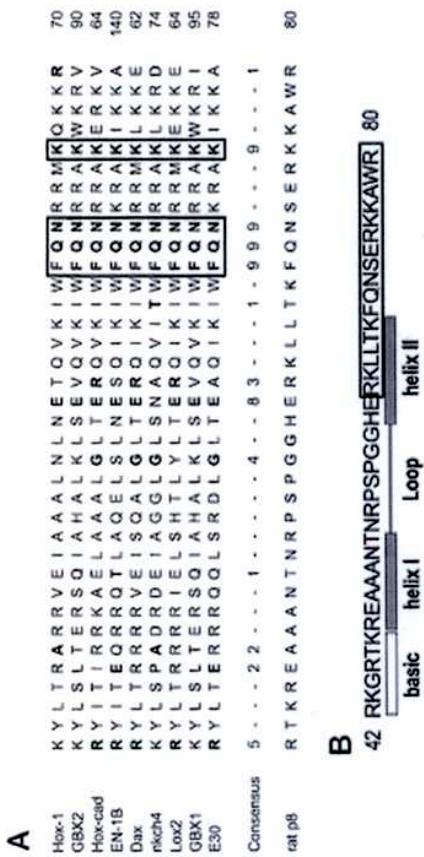
Basados en la estructura y en estudios funcionales se puede asumir que la proteína p8 funciona como un cofactor de transcripción dado que, por ejemplo, facilita la actividad transcripcional de las proteínas Smad en respuesta al TGF-β. Estímulos pro-apoptóticos inducen la expresión de p8, indicando que la misma tiene entonces una función anti-apoptótica, observándose a su vez que está aumentada en algunos tejidos tumorales, lo que remarca que sería esencial para la progresión tumoral y el establecimiento de metástasis como se observó en el estudio de ratones deficientes en p8⁽³⁹⁻⁴⁰⁾. En contraposición se observó que en líneas celulares de cáncer de páncreas Panc1, p8 inhibe la proliferación⁽⁴¹⁻⁴²⁾. Esto lleva a suponer que p8 actúa como un co-factor de transcripción que se une a la región promotora del gen modulando la transcripción de manera tal que según el tipo celular y el entorno puede actuar estimulando o inhibiendo la proliferación celular. Por último, los ratones deficientes en el gen p8 son incapaces de responder apropiadamente a insultos como la pancreatitis aguda o a la administración sistémica de LPS. La p8 participa en el cambio del patrón de expresión génica que ocurre en respuesta a esas agresiones y su falta provoca una respuesta celular incompleta⁽⁴³⁻⁴⁴⁻⁴⁵⁻⁴⁶⁾.

Figura 4- Secuencia del RNAm de p8 de rata y secuencia deducida de la proteína correspondiente

gagggcagacatttggaaaaacaggcaagacactttggagaaaggcagaccaggatg	ATG	GCC	60
Met	Ala	2	
ACC T ^r TG CCA CCA ACA GCG CAC ACT TCC CAG CAA CCT GTC AAC ATA GAG GAC GAA GAT GGG			120
Thr Leu Pro Pro Thr Ala His Thr Ser Gln Gln Pro Val Asn Ile Glu Asp Glu Asp Gly			22
ATC CTG GAT GAG TAT GAC CAG TAC AGC CTG GCC CAA TCT TAT GTC GTC GGT GGA GGT CGG			180
Ile Leu Asp Glu Tyr Asp Gln Tyr Ser Leu Ala Gln Ser Tyr Val Val Gly Gly Arg			42
AAA GGA CGT ACC AAG AGA GAA GCT GCT GCC AAC ACC AAC CGC CCC AGC CCT GGT GGG CAT			240
Lys Gly Arg Thr Lys Arg Glu Ala Ala Asn Thr Asn Arg Pro Ser Pro Gly His			62
GAG AGG AAG CTG ACC AAC TTC CAG AAC TCT GAA AGG AAA AAG GCC TGG CGC TGA Gac			300
Glu Arg Lys Leu Leu Thr Lys Phe Gln Asn Ser Glu Arg Lys Ala Trp Arg End			80
agagctggagatggcccgaccacccgacaccacccggatacgacccggatggcccgacc			379
caggacctaggcctgttattttccacctaagtggatggctctggagaggaaacacaaaaaaagccctccggacc			458
cagctaaggccaaagttagggcggcagaaggcagatggcggcagagcttaagaaggccaaacaaatgtacaacacgtgg			537
gaaaaactggatgcctttgggtggcagtaacaat <u>taactgtacaacacgtgg</u> aaaaaaa			602

El marco de lectura abierto que codifica para p8 es dado por las letras mayúsculas. Las secuencias no codificantes están en minúscula y el sitio de poladenilación está subrayado (44).

Figura 5- Alineamiento de la p8 murina y 9 genes homeóticos

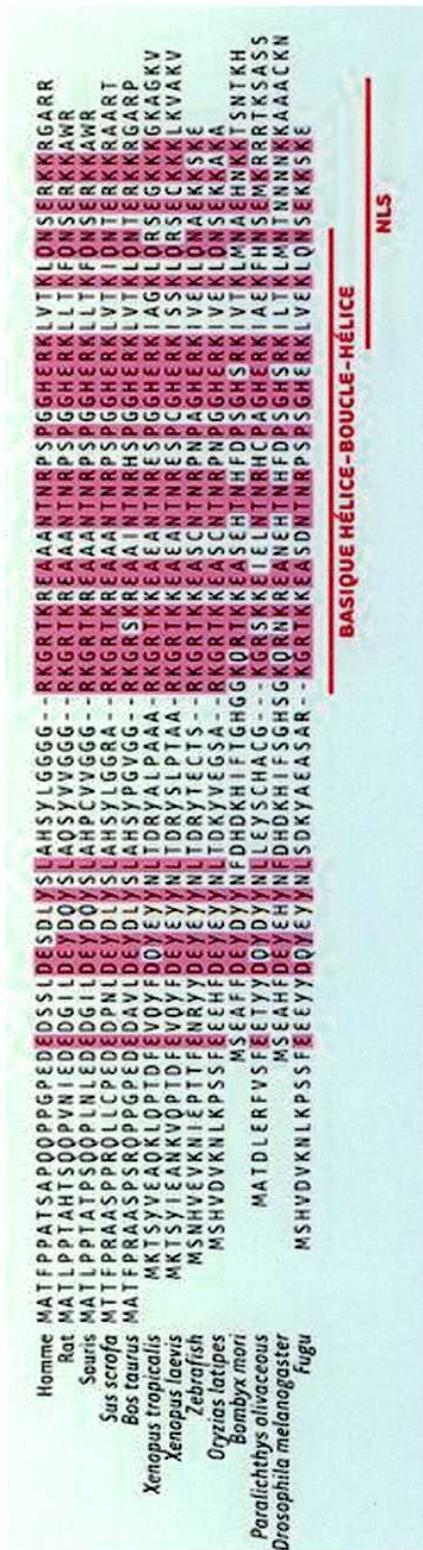


A-Las coincidencias están en negritas. Las secuencias enmarcadas representan residuos conservados entre p8 y los 9 genes homeóticos.

Los números indican la posición en la secuencia proteica primaria. Los números de acceso de las secuencias analizadas son: Florida lancelet homeotic protein Hox-1 (SA 7600); human homeobox protein GBX2 (P52951); chicken protein Hox-cad (S49003); xenopus laevés homeobox protein engrailed-1B (EN-1B) (P31538); desert locust homeotic protein class antennapedia (Dax) (S36647); Drosophila melanogaster homeotic protein nkch4 (PC1287); hirundo medicinalis homeobox protein Lox2 (P21523); human homeobox containing protein GBX1 (S32510); apis mellifera homeobox protein E30 (P09076) ⁽⁴⁴⁾.

B-Posibles secuencias bHLH y de blanco nuclear. El bHLH se calculó usando la base de datos PRO PSEARCH. La señal de blanco nuclear se calculó usando PSORT ⁽⁴⁴⁾.

Figura 6- Secuencias y homologías de la proteína p8 entre las distintas especies



NLS: señal de localización nuclear

La proteína p8 tiene características bioquímicas análogas a las de las proteínas de HMG, particularmente la familia HMG-I/4.

Si bien en el hombre el porcentaje de identidad entre p8 y las proteínas HMG-I/4 es solo del 35%; los pesos moleculares, los puntos isoelectricos; los porcentajes de Arg+Lys – Glu+Asp – Ser+Thr – Gly+Pro; los perfiles de hidrofильidad y la segregación de cargas son muy similares. Otra característica que les es común es que no se desnaturalizan a 100 °C ni precipitan con ácido tricloroacético al 2% y en ambos casos se acetilan a nivel de la secuencia NLS. Los experimentos de retraso sobre geles muestran una débil asociación entre p8 y el ADN sin especificidad por una secuencia en particular. Por otro lado la proteína p8 humana es sustrato de la proteinkinasa A “in vitro” y la forma fosforilada de p8 presenta mejor interacción con el ADN, según se observó en estudios de dicroísmo circular. Todo esto sugiere que p8 tiene un rol en la manutención de la maquinaria transcripcional similar a las proteínas HMG-I/4 con las cuales posee muchos puntos en común⁽⁴⁹⁾.

Proteína IP15

Con el objetivo de identificar nuevos genes pancreáticos activados por el stress celular que se generan durante la pancreatitis aguda ⁽⁴⁷⁾, se realizó un análisis utilizando el microarray de alta densidad de cDNA de ratón sobre aproximadamente 8.000 genes ⁽⁴⁸⁾. Se comparó el patrón de expresión génica de un páncreas sano versus uno con pancreatitis, identificándose así varios genes, entre ellos un nuevo gen de ratón que codifica para una proteína que es inducida por el interferón, a esta proteína se la denominó IP15 (proteína inducida por interferón) ⁽⁴⁹⁾.

Este gen inducido por el interferón genera una proteína que probablemente es de transmembrana. Este gen es activado en células acinares pancreáticas de ratón en un estadio temprano de pancreatitis aguda desencadenada por lipopolisacáridos (LPS) y en el intestino ante la infección por *Salmonella*. La sobre-expresión de IP15 inhibe fuertemente la proliferación celular ⁽⁴⁹⁾.

Por inmunohistoquímica se demostró, a través de la sobre-expresión de la proteína IP15 fusionada a un "tag", que se trata de una proteína de membrana. Esta proteína no es constitutiva, su síntesis es inducida por procesos inflamatorios y la interacción entre células.

IP15 es un blanco específico del IFN- α pero no de otros agentes como sucede con otros genes asociados a la pancreatitis. Dado que los interferones (IFNs) son una familia de citokinas relacionadas que median un rango de diversas funciones incluyendo la actividad antiproliferativa se corroboró que la sobre-expresión de IP15 afecta la proliferación. Esto fue corroborado a través de experimentos realizados en el laboratorio del Dr. Iovanna en los que se evidenció que la proteína IP15 participa en la respuesta generada por el contacto intercelular llevando también a la inhibición de la proliferación. Estos hallazgos indican que el gen IP15 genera una proteína de membrana en respuesta al INF- α la cual inhibe la proliferación celular ⁽⁴⁹⁾.

El ARNm de IP15 está ausente en el páncreas sano pero es activado por la pancreatitis "in vivo" y por una serie de agentes inductores de stress "in vitro"; en particular el gen correspondiente a IP15 es fuertemente inducido por el IFN- α/γ . Estudios "in vivo" demostraron que IP15 es una proteína de fase aguda activada en las células al ser agredidas. En la pancreatitis aguda inducida por ceruleína (análogo de la colecistokinina) el ARNm de IP15 es rápidamente inducido en las primeras 3 horas con un máximo a las 6 horas decreciendo luego a valores

basales. Por lo tanto la actividad de IP15 es requerida en la fase temprana de la pancreatitis aguda preferentemente en comparación a la fase tardía de regeneración post-traumática. IP15 parece estar involucrada en la respuesta de la célula acinar inducida por la injuria, situación en la que posiblemente exista una producción de IFN⁽⁴⁹⁾.

IP15 se expresa en las células acinares pero no se encuentra en los islotes de Langerhans, ductos, infiltrado inflamatorio y tejido estromal pancreático como se observó por hibridización "in situ". A su vez, también se hallo en células epiteliales intestinales una alta expresión del ARNm de IP15 luego de 6 horas de infección por Salomonella. La localización subcelular de IP15 se detecta como una distribución vesicular puntiforme agrupada densamente en el espacio perinuclear y ausente en el núcleo. Esta localización de IP15 sugiere una asociación a la membrana por parte de IP15⁽⁴⁹⁾.

Un solo marco abierto de lectura fue hallado en la correspondiente secuencia del ARNm. La metionina ubicada en la posición 116 es posiblemente el sitio de inicio para la traducción; a su vez, el codón de inicio está rodeado por una secuencia motivo altamente conservada. La característica más importante de la secuencia consenso es una A en la posición-3 que se encuentra aproximadamente alrededor de la posición 116. Por lo tanto la síntesis de IP15 probablemente comience en el nucleótido 116. La región 3' consiste de un codón stop TAA en la posición 527 seguido por 108 nucleótidos que no son traducidos (excluyendo la cola de poli A). Un sitio canónico de poli-adenilación (AATAAA) fue encontrado 18 nucleótidos río-arriba de la cola de poliA (figura 7). A partir del análisis de la estructura de IP15 usando computadoras, se dedujo la estructura primaria de la proteína codificada por el gen de la IP15 murina; esta proteína consta de 137 amino ácidos; el pI teórico es 7,5 y el peso molecular predicho es de 14950 Da. A pesar que el análisis de la estructura primaria de IP15 no manifiesta un péptido señal, la presencia de dos hélices de transmembrana indican que es una proteína de membrana con los extremos carboxi y amino terminales ubicados fuera de la célula. El estudio de la secuencia hidrofóbica muestra que IP15 es una proteína de membrana plasmática con una seguridad del 70% (PSORT) y tiene un fragmento intracelular de 25 amino ácidos con posibles sitios de fosforilación en las serinas ubicadas en las posiciones 81 y 84 y la tirosina ubicada en la posición 99⁽⁴⁹⁾.

IP15 está ubicada en la posición 131,3 Mb en el cromosoma 7 del ratón según http://www.ensembl.org/Mus_musculus. El extremo 5' del gen contiene un elemento de

respuesta inducido por interferón (ISRE). IP15 se encuentra próximo a 2 genes estructuralmente relacionados (los tres genes están ubicados en una región de 60 kb) ⁽⁴⁹⁾.

En la rata hay un conjunto similar de genes en el cromosoma 1. En la rata y el ratón estos genes codifican para proteínas de 137, 144 y 134 amino ácidos respectivamente. En el genoma humano los genes 1-8U, 1-8D y Leu13/9-27 fueron identificados en un fragmento de DNA geonómico de menos de 18 kb en el cromosoma 11, pero en este caso las proteínas son de 133, 132 y 125 amino ácidos respectivamente. Estas proteínas son similares en su estructura y la única región altamente conservada corresponde al dominio intracelular de 25 amino ácidos ⁽⁴⁹⁾.

La estructura predicha para IP15 se asemeja a la de un receptor cuyo dominio intracelular de 25 amino ácidos tiene 3 sitios posibles de fosforilación sugiriendo un posible dominio de fosforilación/defosforilación. El análisis de la secuencia de amino ácidos predice que IP15 posiblemente se encuentra en la membrana plasmática ⁽⁴⁹⁾.

Figura 7- Secuencia de IP15

		Organism
A		
IP15	MNHTSQAFITASGGOPPNYER-KEEVEVAEMGAPEHSSASVPTTVINMPEEVSPDITVW	Mouse
1-80	MNQIVQTFPSPPNSGPPNFTVTHKEEVEVAEMGAPEHSSASVPTTVINMPEEVSPDITVW	Human
1-8D	-NNHIIIVQEFPSPPNSGPPNFTVTHKEEVEVAEMGAPEHSSASVPTTVINMPEEVSPDITVW	Human
9-27	-MEKKEKEKEVAVVAGAPPSTLIPRSTVNIHSETSVSPDITVW	Human
IP15	SILNTLIPKNECCUCLGIPAYAVSVKSRSRDKMKGDTGAGAYASTAKCLNITSLVSLILMVTI	Mouse
1-80	SILNTLIPKNECCUCLGIPAYAVSVKSRSRDKMKGDTGAGAYASTAKCLNITSLVSLILMVTI	Human
1-8D	SILNTLIPKNECCUCLGIPAYAVSVKSRSRDKMKGDTGAGAYASTAKCLNITSLVSLILMVTI	Human
9-27	SILNTLIPKNECCUCLGIPAYAVSVKSRSRDKMKGDTGAGAYASTAKCLNITSLVSLILMVTI	Human
IP15	TIVSVLTVLNQNLNT-----	Mouse
1-80	LIVIPVLFQANG-----	Human
1-8D	LIVIPVLFQANG-----	Human
9-27	PILLVPLVYQAGR-----	Human
B		
IP15	MNHTSQAFITASGGOPPNYER-KEEVEVAEMGAPEHSSASVPTTVINMPEEVSPDITVW	Mouse
Q95M03	MNRTSQQLLINGAHSAVPPATEV-KEEVEVAEMGAPEHSSASVPTTVINMPEEVSPDITVW	Bovine
Q95M02	-----MKEKEKEVAVVAGAPPSTLIPRSTVNIHSETSVSPDITVW	Bovine
114K_TORFA	-----MKEKEKEVAVVAGAPPSTLIPRSTVNIHSETSVSPDITVW	Electric Ray
Q8QF13	-----MDS PSTOPRPPVPGKGRKMYRMLIEDPGAPFQHPPVQPPDITVW	Salmo gairdneri
Q8QF04	-----MDQD PWPQOBEPVPMKGKGRKMYRMLIEDPGAPFQHPPVQPPDITVW	Salmo gairdneri
Q8JH61	-----MEERNMAGITQ-----VSNAPTYL	Channel catfish
IP15	VWSLIPNTIPANPCCLOETVAYASVKSRSRDKMKGDTGAGAYASTAKCLNITSLVSLILMVTI	Mouse
Q95M03	VWSLIPNTIPANPCCLOETVAYASVKSRSRDKMKGDTGAGAYASTAKCLNITSLVSLILMVTI	Bovine
Q95M02	VWSLIPNTIPANPCCLOETVAYASVKSRSRDKMKGDTGAGAYASTAKCLNITSLVSLILMVTI	Bovine
114K_TORFA	VWSLIPNTIPANPCCLOETVAYASVKSRSRDKMKGDTGAGAYASTAKCLNITSLVSLILMVTI	Electric Ray
Q8QF13	VWSLIPNTIPANPCCLOETVAYASVKSRSRDKMKGDTGAGAYASTAKCLNITSLVSLILMVTI	Salmo gairdneri
Q8QF04	VWSLIPNTIPANPCCLOETVAYASVKSRSRDKMKGDTGAGAYASTAKCLNITSLVSLILMVTI	Salmo gairdneri
Q8JH61	VWSLIPNTIPANPCCLOETVAYASVKSRSRDKMKGDTGAGAYASTAKCLNITSLVSLILMVTI	Channel catfish
IP15	VITIVSVLTVLNQNLNT-----	Mouse
Q95M03	VVLLVPLVYQAGR-----	Bovine
Q95M02	IGSITMVLIGFGMAYAVTVEFALMNGKRGH	Bovine
114K_TORFA	ILIGLAAVETVQALKXG-----	Electric ray
Q8QF13	ILPLFTIYQEFITVNLISH-----	Salmo gairdneri
Q8QF04	LEPPFTIYQEFITVNLISH-----	Salmo gairdneri
Q8JH61	TISIVLCTVFLARQT-----	Channel catfish

A-Comparación en la secuencia de aminoácidos entre la IP15 murina y la familia de genes 1-8. Las secuencias compartidas representan residuos conservados del dominio intracelular.

B-Alineamiento de secuencias proteicas de IP15 y sus homólogos en otras especies. Las secuencias compartidas representan residuos conservados ⁽⁴⁹⁾.

HIPOTESIS

Y

OBJETIVOS

Hipótesis

Dado que la IP15 es una proteína de membrana que se expresa durante el desarrollo de procesos inflamatorios, suponemos un posible vínculo con el mecanismo de expresión génica de la p8, otra proteína que se expresa durante procesos inflamatorios, isquémicos y de injuria.

Objetivo

Evaluar la influencia de la proteína IP15 sobre el promotor del gen p8. Determinar si la expresión de IP15 modifica la actividad del promotor de p8 a fin de investigar si parte de la actividad del gen correspondiente a IP15 se vincula a p8. Finalmente, investigar cómo se manifiestan las modificaciones que puedan ser inducidas por IP15 en relación a las Rho-GTPasas y las MAPKs, vías usuales en los procesos de stress celular.

PROCEDIMIENTOS

Procedimientos

Aspectos Generales

Células de la línea celular Cos1 fueron transfectadas en forma transitoria con las distintas construcciones de plásmidos; de cada plásmido se utilizó 1 ug de DNA. Luego de 24 horas de haber sido transfectadas las células, las distintas vías de las MAP kinasas fueron inhibidas farmacológicamente durante 6 horas a través de los inhibidores específicos para p38 (SB 203580), ERK (U0126) y JNK (SP600125). La concentración de los inhibidores fue de 10 μ M según lo indicado por la bibliografía ⁽⁵⁰⁻⁵¹⁻⁵²⁾. En todos los casos se utilizó el plásmido pCMV/ β -galactosidasa como control de la eficiencia de transfección. La actividad de CAT se midió siguiendo el método de extracción de fase ⁽⁵³⁾ mientras que el dosaje de β -galactosidasa se efectuó según Dussetti et al. ⁽⁵⁴⁾. La actividad CAT se normalizó a través de la actividad de betagalactosidasa. Los experimentos se realizaron por triplicado en tres experimentos independientes.

Línea celular y condiciones de cultivos

Se utilizó la línea celular Cos1 derivada de células renales simias CV-1 transformadas por SV40 cuya morfología se corresponde a la del fibroblasto. Dichas células fueron cultivadas en incubadora a 37 °C y 5% de CO₂ en medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado con 10% de suero fetal bovino, L-glutamina 2mM, 100 UI/ml de Penicilina G y 100 ug/ml de Estreptomicina. Las células fueron sembradas en una concentración de 200.000 células / pocillo en placas de pocillos de 30 mm de diámetro 24 horas previo a ser transfectadas. Los inhibidores específicos de las MAP kinasas SB203580, U0126 y SP600125 (Calbiochem-USA) fueron utilizados 24 horas post-transfección en una concentración 10 μ M en DMEM durante 6 horas a 37°C / 5% CO₂.

Plásmidos de Expresión

Para medir la respuesta del gen p8 se utilizó un plásmido que contiene 1400 nucleótidos de la región promotora del gen subclonada en el extremo 5' del gen reportero CAT (pp8-CAT). La medida de la actividad CAT es indicativa de la actividad del promotor. Este plásmido pp8-CAT corresponde a la construcción del promotor p-1471/+37p8-CAT previamente descrito ⁽⁵³⁾.

El plásmido pCMV/β-galactosidasa se utilizó como control de la eficiencia de transfección y para normalizar la actividad de CAT a través de la actividad de la β-galactosidasa. El plásmido pEGFP-IP15 corresponde a la región codante del gen IP15 transformado en el vector pGEM/pEGFP que fue subclonada en el vector de expresión eucariote pcDNA4-C (Invitrogen). Como control se utilizó el vector pcDNA4-EGFP. La preparación de todos los plásmidos se efectuó según el protocolo de Qiagen (Qiafilter Maxi Protocol-Preparation of Plasmid DNA-Qiafilter Plasmid Kit). Los plásmidos de expresión correspondientes a la vía de las MAP kinasas fueron obtenidos del Dr. O Coso (UBA); los mismos son: WT Cdc 42, DN Cdc 42 (N17), CA Cdc 42 (QL), WT Rac1, DN Rac1(N17), CA Rac1 (QL), WT RhoA , DN RhoA (N19), CA RhoA (QL).

Transfección celular

Las células Cos1 fueron sembradas a una concentración de 200.000 células / pocillo en placas de pocillos de 30 mm de diámetro 24 horas previo a ser transfectadas en forma transitoria con 1 µg del plásmido reportero pp8-CAT y 1 µg del plásmido pCMV/β-gal (control de eficiencia de transfección). Según el esquema de tratamientos se transfeció 1 µg del plásmido pEGFP-IP15 o 1 µg del plásmido pEGFP. La expresión de la proteína de fusión IP15/EGFP se evidenció por fluorescencia verde directa permitiendo confirmar la eficiencia de la transfección. Para el estudio de la influencia de las Rho-GTPasas (Cdc42 – Rac1 – RhoA) en sus formas WT – CA – DN sobre pp8, conjuntamente se transfeció 1 µg del plásmido de la Rho-GTPasa correspondiente. Las transfecciones se efectuaron con FuGENE según el protocolo del fabricante (Roche Molecular Biochemicals, USA).

A) Curva de Concentración de Plásmidos

- 1- pp8-CAT (0.5 µg) + pCMV/βgal (0.5 µg) + pEGFP (0.5 µg)
- 2- pp8-CAT (1.0 µg) + pCMV/βgal (1.0 µg) + pEGFP (1.0 µg)
- 3- pp8-CAT (1.0 µg) + pCMV/βgal (1.0 µg) + pEGFP-IP15 (0.1 µg)
- 4- pp8-CAT (1.0 µg) + pCMV/βgal (1.0 µg) + pEGFP-IP15 (0.3 µg)
- 5- pp8-CAT (1.0 µg) + pCMV/βgal (1.0 µg) + pEGFP-IP15 (0.5 µg)
- 6- pp8-CAT (1.0 µg) + pCMV/βgal (1.0 µg) + pEGFP-IP15 (1.0 µg)

B) Relación entre el promotor de p8, la vía de las Rho-GTPasas (WT Cdc42 – CA Cdc42 – DN Cdc42 – WT Rac1 – CA Rac1 – DN Rac1 – WT RhoA – CA RhoA – DN RhoA) e IP15

- i- pp8-CAT (1.0 µg) + pCMV/βgal (1.0 µg) + pEGFP (1.0 µg) + pRho-GTPasa estudiada (1.0 µg)
- ii- pp8-CAT (1.0 µg) + pCMV/βgal (1.0 µg) + pEGFP-IP15 (1.0 µg) + pRho-GTPasa estudiada (1.0 µg)

C) Relación entre el promotor de p8 y la vía de las MAPKs (ERK – JNK – p38) a través de la inhibición farmacológica e IP15.

- i- pp8-CAT (1.0 µg) + pCMV/βgal (1.0 µg) + pEGFP (1.0 µg) + inhibidor de MAP kinasa estudiada (10 µM)
- ii- pp8-CAT (1.0 µg) + pCMV/βgal (1.0 µg) + pEGFP-IP15 (1.0 µg) + inhibidor de MAP kinasa estudiada (10 µM)

Ensayo del gen reportero

La actividad del gen reportero fue medida como ya descrita ⁽⁵³⁻⁵⁵⁾. Brevemente, el extracto celular fue preparado con el “reporter lysis buffer” (Promega, USA) 30 h luego de efectuada la transfección y la actividad de CAT se midió a través del método de extracción de fase ⁽⁵³⁾. El ensayo de la β-galactosidasa se realizó como está descrito en Sambrook et al. ⁽⁵⁶⁾. La actividad de CAT se normalizó con respecto a la actividad de la β-galactosidasa.

RESULTADOS

Resultados

1-Expresión de la proteína de fusión IP15/EGFP en células Cos1

Las células Cos1 transfectadas con pEGFP-IP15 expresaron la proteína de fusión IP15/EGFP como se evidenció a través de fluorescencia verde directa (figura 8). Este procedimiento permitió confirmar la eficiencia de la transfección previo a realizar los experimentos enumerados.

2-Influencia de IP15 sobre el promotor de p8

La proteína p8 promueve la proliferación celular cuando el cDNA de p8 es transfectado en las células Cos7⁽⁴¹⁾; en el caso de IP15 se observa un efecto opuesto al transfectar las mismas células con el cDNA de IP15⁽⁴⁹⁾. Al evaluar la influencia de IP15 sobre el promotor de p8 a través de la actividad del gen reportero correspondiente a la construcción pp8-CAT en células Cos1, observamos que la actividad de CAT es fuertemente inducida por el promotor de p8 (1 ug pcDNA) y es significativamente inhibida por IP15. Al co-transfectar pp8-CAT y pEGFP-IP15 la actividad de CAT inducida por pp8 se reduce en un 50%. La actividad de CAT se normalizó a través de la actividad de β -galactosidasa. Este experimento permitió seleccionar las concentraciones óptimas de DNA a transfectar para pp8-CAT (1.0 ug) y pEGFP-IP15 (1.0 ug) en los estudios posteriores (figura 9).

3-Influencia de IP15 asociado a Rho-GTPasas (Cdc 42 – Rac1 – RhoA) sobre la actividad del promotor de p8

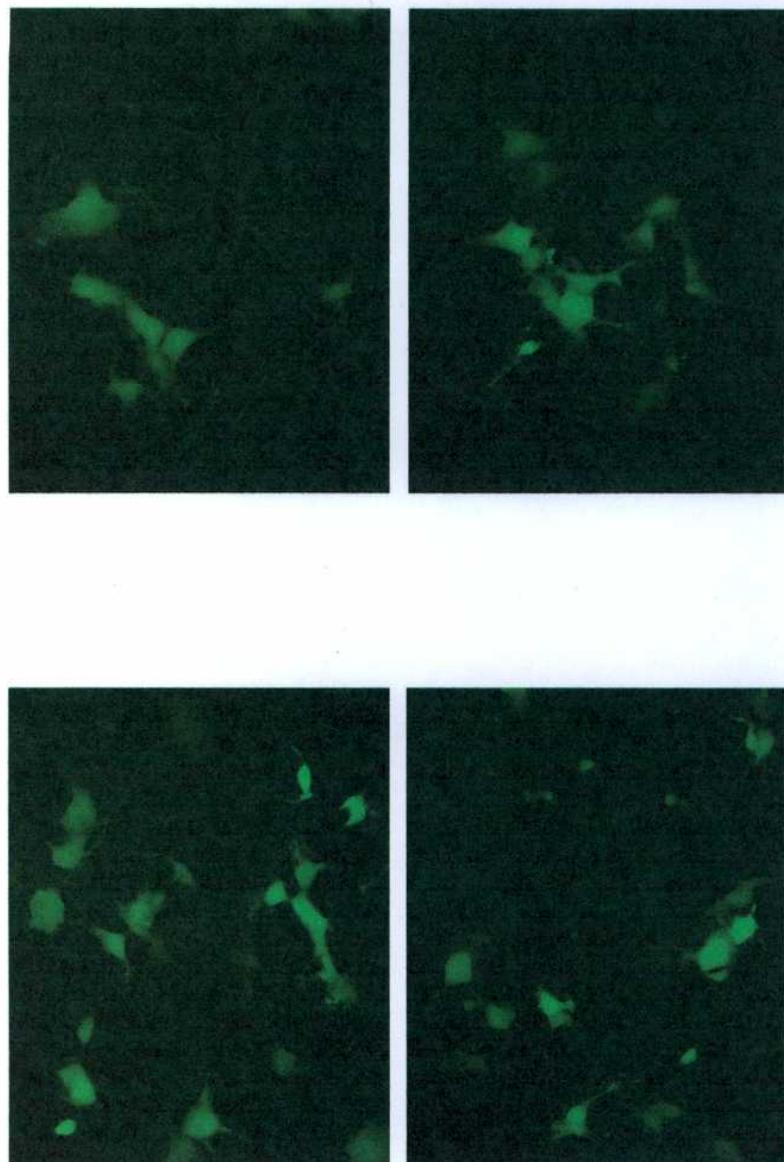
Nuestros resultados manifiestan que IP15 disminuye el marcado incremento en la actividad de CAT asociado a la inducción del promotor de p8. La actividad de CAT es estimulada al co-transfectar con pRho-GTPasas siendo este efecto más importante en el caso de Rac1 ; la forma CA acentúa el incremento en la actividad de CAT mientras que la forma DN la disminuye. Al asociar las distintas formas de las Rho-GTPasas e IP15 se observó la inhibición sobre la actividad del promotor de p8 en todos los casos. Tanto la mayor estimulación por parte de la forma CA como la máxima inhibición por parte de la forma DN correspondió a Rac1. Estos resultados indican que las vías de las Rho-GTPasas Cdc42 – Rac1 – RhoA están involucradas en la regulación de la expresión de p8 como reguladores positivos (figuras 10 y 11). A su vez podemos inferir que IP15 no requiere de las Rho-GTPasas para ejercer su acción ya que la máxima

inhibición por parte de IP15 se observó al co-transfectar pEGFP-IP15 junto con las formas DN de las Rho-GTPasas. Este hecho nos hace suponer que las Rho-GTPasas se contraponen a la acción de IP15.

4-Influencia de ERK – JNK – p38 sobre el promotor de p8 y relación con IP15

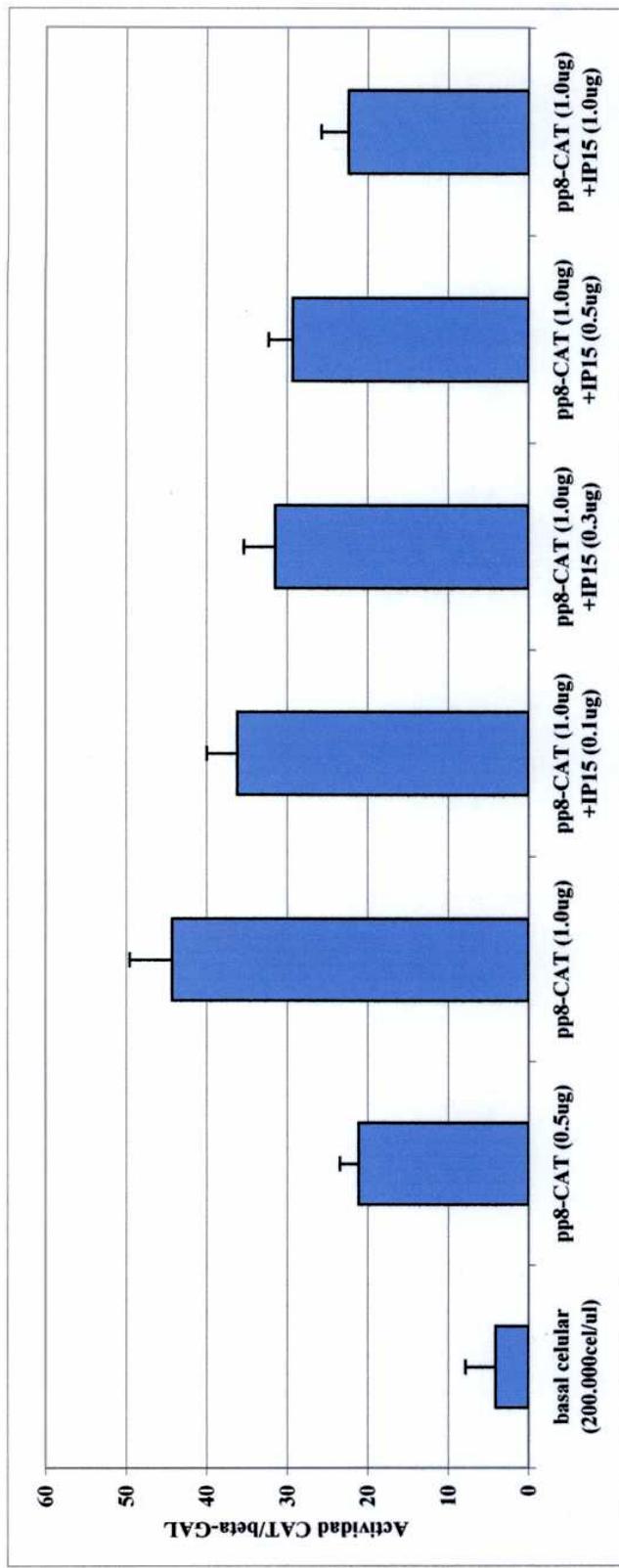
Con el objetivo de investigar el rol de ERK, JNK y p38 sobre la actividad del promotor de p8 se inhibió farmacológicamente por separado cada una de ellas. Si bien la actividad de CAT disminuyó en presencia de los respectivos inhibidores de cada una de las MAPKs mencionadas este efecto fue más importante en el caso de la inhibición de JNK. La asociación de IP15 con el inhibidor farmacológico decreció aún más la actividad de CAT. El menor valor en la actividad de CAT correspondió a la combinación de IP15 con el inhibidor de JNK. Estos resultados indican que las vías de ERK – JNK y p38 están involucradas en la regulación de la expresión de p8 actuando probablemente como reguladores positivos (figura 12). A su vez podemos inferir que IP15 no requiere de las MAPKs estudiadas para ejercer su acción ya que se logró una inhibición significativa sobre la actividad del promotor de p8 por parte de IP15 al inhibir farmacológicamente a ERK – JNK – p38. Este hecho nos hace suponer que ERK – JNK – p38 se contraponen a la acción de IP15.

Figura 8: Expresión de la proteína de fusión IP15/EGFP en células Cos1



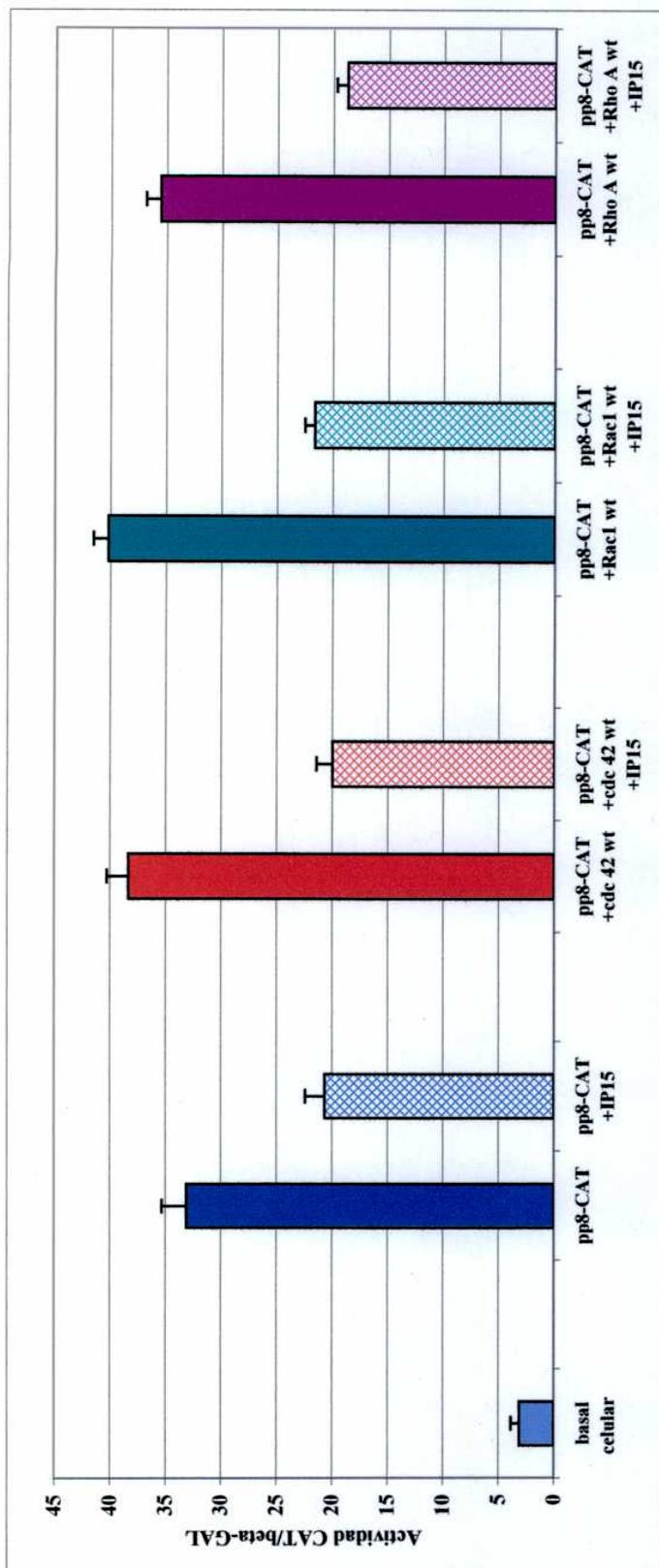
Las células Cos1 transfectadas con el plásmido pEGFP-IP15 expresaron la proteína de fusión correspondiente a las 24 horas como se evidenció por fluorescencia verde directa.

Figura 9: Curva de concentración de plásmidos de pp8-CAT vs IP15. Influencia de IP15 sobre pp8.



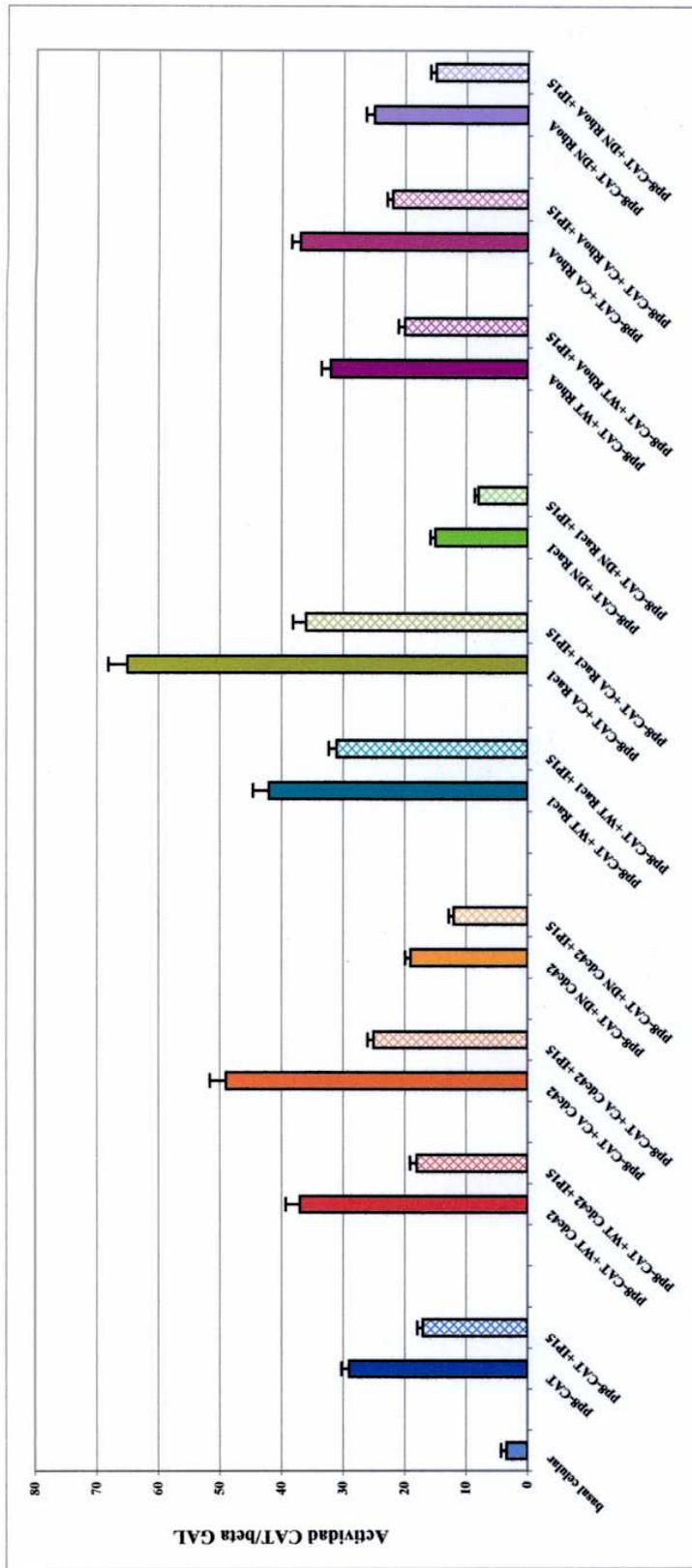
La actividad de pp8 es inhibida por IP15. Células Cos1 fueron sembradas en placas de cultivo de 30 mm de diámetro durante 24 horas y luego co-transfectadas en forma transitoria con distintas cantidades de plásmidos de pp8-CAT, pCMV/β-gal y pEGFP-IP15. Los extractos celulares fueron preparados 24 horas después de la transfección y se midió la actividad de CAT la que se normalizó a través de la actividad de β-galactosidasa. Las barras representan el promedio de tres experimentos independientes y cada uno de ellos fue realizado por triplicado; los resultados se expresan como la media ± DS.

Figura 10: Influencia de Cdc42 - Rac1 - Rho A sobre el promotor de p8 y relación con IP15



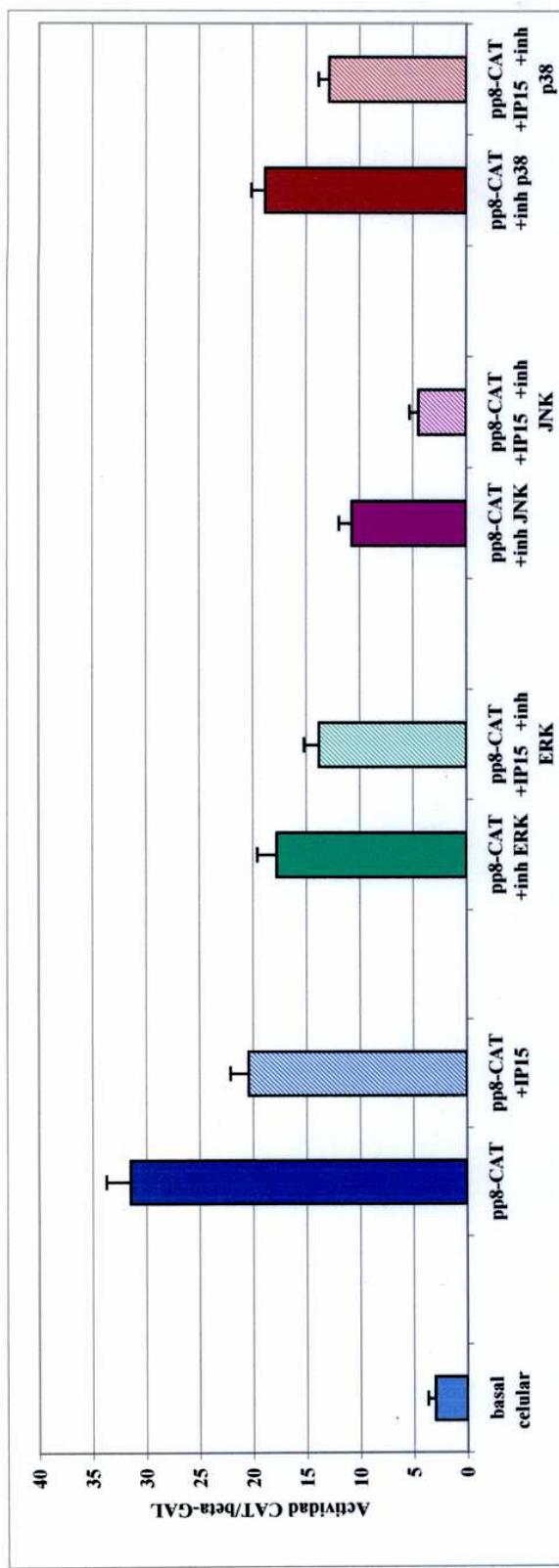
La actividad del promotor de p8 es estimulada por las Rho-GTPasas siendo este efecto más acentuado para Rac1. La co-transfección con pEGFP-IP15 disminuye la actividad de pp8 estimulada por las Rho-GTPasas. Los extractos celulares fueron preparados 24 horas después de la transfección y se midió la actividad de CAT la que se normalizó a través de la actividad de β -galactosidasa. Las barras representan el promedio de tres experimentos independientes y cada uno de ellos fue realizado por triplicado; los resultados se expresan como la media \pm DS.

Figura 11: Influencia de las Cdc42 – Rac1 - RhoA (WT – CA – DN) sobre el promotor de p8 y relación con IP15



La actividad del promotor de p8 es significativamente estimulada por la forma CA de las Rho-GTPasas e inhibida por la forma DN siendo este efecto más acentuado para Rac1. La co-transfección con pEGFP-IP15 disminuye aún más la actividad de pp8 en todos los casos. Los extractos celulares fueron preparados 24 horas después de la transfección y se midió la actividad de CAT la que se normalizó a través de la actividad de β -galactosidasa. Las barras representan el promedio de tres experimentos independientes y cada uno de ellos fue realizado por triplicado; los resultados se expresan como la media \pm DS.

Figura 12: Influencia de la inhibición de las MAPKs (ERK – JNK – p38) sobre el promotor de p8 y relación con IP15



La inhibición farmacológica de ERK, JNK y p38 disminuyen la actividad de pp8 siendo este efecto más significativo al asociarse a IP15. Los extractos celulares fueron preparados 30 horas después de la transfección; los inhibidores específicos de las MAP kinasas SB203580, U0126 y SP600125 fueron utilizados 24 horas post-transfección a una concentración 10 uM. Luego se midió la actividad de CAT que se normalizó a través de la actividad de β -galactosidasa. Las barras representan el promedio de tres experimentos independientes y cada uno de ellos fue realizado por triplicado; los resultados se expresan como la media \pm DS.

DISCUSSION

Discusión

Dado que p8 es una proteína inducida por el stress celular se evaluó la influencia de algunos componentes de estas vías sobre la actividad del promotor de p8. Con este fin se estudió la regulación del promotor de p8 en células Cos1 por parte de las vías de las Rho-GTPasas y las MAP kinasas y las consecuencias de su asociación con la proteína IP15. Tanto Cdc42 – Rac1 – RhoA como ERK – JNK – p38 parecen actuar como reguladores positivos sobre la actividad del promotor de p8 ejerciendo una acción opuesta a IP15. Por sí sola IP15 logró una significativa inhibición sobre la actividad del promotor de p8 indicando estar involucrada en la regulación de la expresión de p8 actuando como regulador negativo de la misma. La acción de IP15 es independiente de la presencia de las Rho-GTPasas y MAPKs siendo aún más potente en ausencia de las mismas.

La activación de las vías de Cdc42 – Rac1 y RhoA estimulan la actividad de pp8 en células Cos1

Si bien las Rho-GTPasas fueron mejor caracterizadas por sus efectos sobre el citoesqueleto de actina cabe considerar el efecto que ejercen sobre la inducción de la apoptosis, la inflamación, la fagocitosis, la proliferación celular y la transcripción génica vía JNK y cómo ésto contribuye a la transformación maligna ⁽²⁷⁾.

Dado que se observó que la expresión de IP15 se ve aumentada en células epiteliales intestinales ante la infección con *Salmonella* cabe señalar el posible rol de las Rho-GTPasas en esta circunstancia. La *Salmonella* promueve su ingreso a la célula epitelial del intestino inyectando dos proteínas, SpoE y SpoE2, en la célula huésped. Estas dos proteínas son potentes GEFs para Rac y Cdc42 los que inducen el “ruffling” de membrana en los sitios de adhesión bacteriana, llevando a la fagocitosis de la bacteria. Habiendo entrado a la célula huésped, *Salmonella* secreta otra proteína, denominada SptP, que es tanto una tirosín-fosfatasa como una GAP para Rac y Cdc42. Se presume que una vez dentro de la célula huésped la *Salmonella* busca suprimir la actividad de Rac y Cdc42 para restaurar un estado quiasciente del citoesqueleto ⁽⁵⁷⁾. A su vez parece ser que las Rho-GTPasas también están involucradas en la infección por parte del *Helicobacter pylori* el cual es un patógeno específico del hombre que causa una gastritis activa crónica y úlcera péptica. El *Helicobacter pylori* se adhiere a la superficie de la célula gástrica y

promueve la activación de las Rho-GTPasas y la activación secuencial de las MAPKs JNK y p38, responsables de estimular la transcripción. Como resultado, los factores de transcripción NF- κ B son activados, seguidos de la secreción de las ILs-1-6-8 y TNF α ⁽²⁸⁻⁵⁷⁾. Como se ha descrito en *Salmonella* TNF α induce la expresión de IP15⁽⁴⁹⁾. Cabe destacar que IL-1 y TNF α han sido descritos en la fase temprana de la PA actuando como punto de partida en la amplificación de la cascada inflamatoria en la PA siendo responsables de la severidad del cuadro⁽⁵⁸⁾.

Los experimentos realizados indicaron que las tres principales Rho-GTPasas (Cdc42 – Rac1 – RhoA) actúan como reguladores positivos de la actividad del promotor de p8 viéndose que dicha actividad es aún más marcada ante la sobre-expresión de las Rho-GTPasas y disminuye significativamente al inhibirlas mediante el uso de las formas dominantes negativas. En todos los casos IP15 disminuye la activación del promotor inducido por la Rho-GTPasa y la máxima inhibición se observó al asociar IP15 con las distintas construcciones DN. Los cambios más significativos correspondieron a las distintas formas de Rac1. Esto lleva a considerar que las Rho-GTPasas se oponen a la acción de IP15 y el rol de IP15 que se potencia en ausencia de las Rho-GTPasas es independiente de las mismas.

La activación de la vía de JNK estimula la actividad de pp8 en células Cos1

C-Jun NH₂-terminal kinase (JNK) es importante en la vía de las MAPKs dado que convierte señales extracelulares en expresión de genes específicos a través de la fosforilación y activación de factores de transcripción. La activación de JNK está asociada a varios procesos, muchas veces con efectos celulares opuestos, tales como proliferación celular, transformación y apoptosis⁽⁵⁹⁾. Al tratar a las células Cos1 con el inhibidor específico de JNK (SP600125) la actividad del gen reportero pp8-CAT disminuyó y este efecto se acentuó más al asociarlo con IP15.

Estos resultados indican que la vía de JNK está involucrada en la regulación de la expresión de p8, situación que se ve influenciada ante la expresión de IP15. Posiblemente JNK sea un regulador positivo del pp8 y su acción se opone a la de IP15. IP15 no requiere de JNK para inhibir a pp8 ya que su acción inhibitoria se potencia ante la ausencia de JNK (figura 12).

La vía de p38 estimula la actividad de pp8 en células Cos1

La vía de p38 también juega un rol esencial en la regulación de varias funciones celulares incluyendo la proliferación, la respuesta a la inflamación, la diferenciación y la apoptosis. Es más, en células de cáncer pancreático, p38 es un fuerte inhibidor de la proliferación contrario a las vías Ras→Raf→Mek→ERK y JNK ⁽⁴¹⁻⁴²⁾. Por lo tanto se ha estudiado el posible rol de la vía de p38 en la regulación de la actividad del promotor de p8 y su interacción con IP15 en células Cos1. Nuestros estudios usando SB 203508, un inhibidor específico de p38, arrojaron como resultado que la actividad de pp8-CAT disminuyó al inhibirse esta vía siendo este efecto mayor al asociarse a IP15. Estos hallazgos indican que la vía de p38 es posiblemente un regulador positivo en la expresión de p8 en células Cos1 y su acción se opone a la de IP15. IP15 no requiere de p38 para inhibir a pp8 ya que su acción inhibitoria se potencia ante la ausencia de p38 (figura 12).

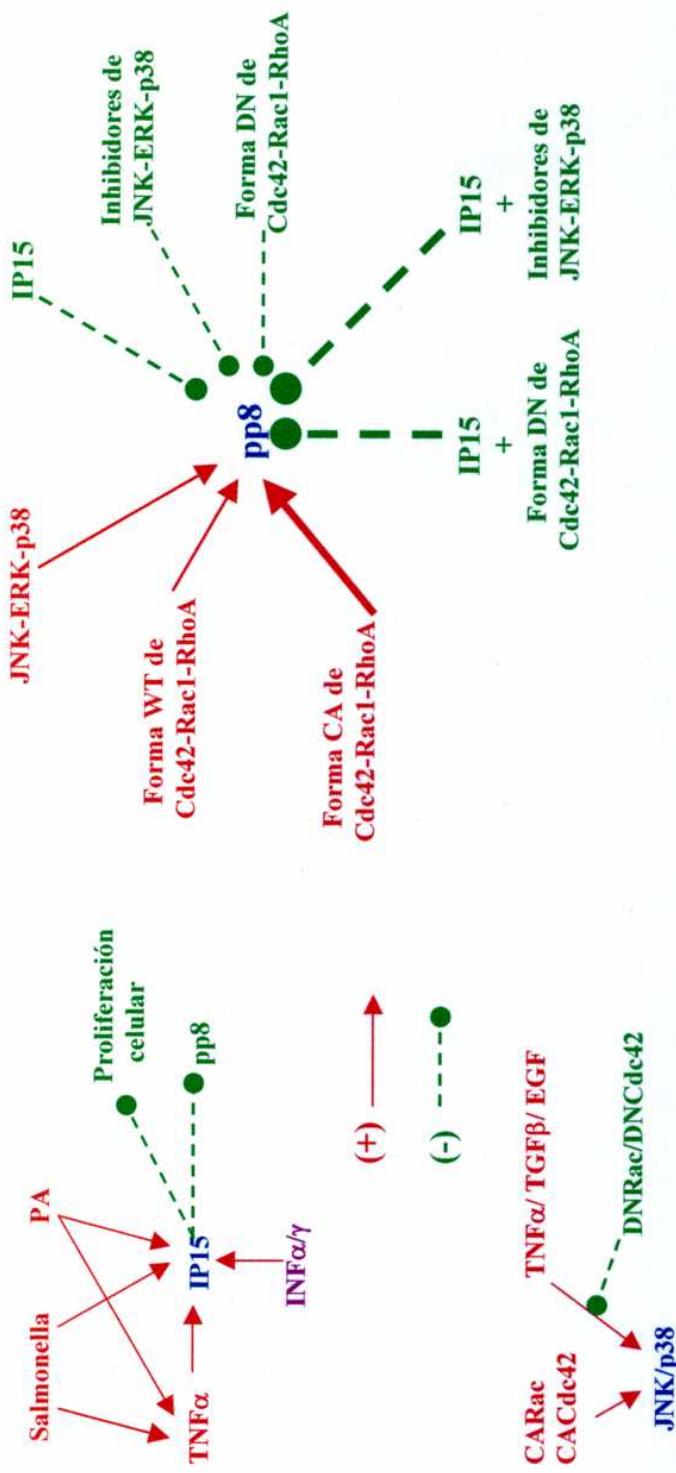
La vía de ERK estimula la actividad de pp8 en células Cos1

Los ERKs (kinasas reguladas extra-celularmente) son activadas por diversos agonistas que promueven la proliferación celular. Cuando ERK es activado transmite la señal mitogénica al núcleo al fosforilar proteínas blanco que se encuentran río-abajo como lo son los factores de transcripción c-myc y c-jun, los cuales controlan la expresión de proteínas involucradas en la proliferación ⁽⁵⁹⁾. Al tratar a las células Cos1 con el inhibidor específico de ERK (U0126), la actividad del gen reportero pp8-CAT disminuyó y este efecto se acentuó ligeramente al asociarlo a IP15. Esto nos lleva a suponer que posiblemente ERK sea un regulador positivo de pp8 en células Cos1 y su acción se opone a la de IP15. IP15 no requiere de ERK para inhibir a pp8 ya que su acción inhibitoria se potencia ante la ausencia de ERK (figura 12).

Si bien la menor actividad del promotor de p8 se logró al inhibir farmacológicamente la vía de JNK este efecto también se observó en las vías de ERK y p38 indicando que las tres MAPKs probablemente estimulen positivamente al promotor de p8 en células Cos1. En células de cáncer pancreático Panc1 (wt para Smad4/DPC4 y mutada para K-ras) la inhibición de JNK generó el efecto contrario; mientras que en el caso de p38 existió una respuesta similar a la generada en células Cos1 siendo p38 un regulador positivo de la actividad del promotor de p8 ⁽⁴¹⁾.

Basándonos en el modelo de las células Cos1 podemos deducir que las vías de stress promueven la actividad del promotor de p8, el cuál está involucrado en la proliferación celular, y ésto es inhibido por IP15 (figura 13).

Figura 13: Regulación del promotor de p8 y relación con IP15



La PA y la infección por *Salmonella* inducen la expresión de IP15 mientras que TNF α e INF α/γ estimulan directamente su síntesis. A su vez IP15 inhibe la proliferación celular y la actividad de pp8. Las Rho-GTPasas y las MAPKs estimulan al actividad de pp8 oponiéndose al efecto de IP15 cuya acción como regulador negativo de pp8 es más marcado en ausencia de las mismas.

Las flechas rojas indican estimulación y las verdes inhibición, el grosor de las mismas señalan la intensidad con que ejercen el efecto de regulación.

Colofón

Si bien la PA es una patología de baja frecuencia, en su forma severa la misma presenta un alto índice de mortalidad. Los diversos estudios apuntan a lograr un mejor entendimiento de los procesos íntimos en el genio evolutivo de la PA para desarrollar nuevas conductas preventivas y terapias paliativas-curativas. En este sentido, y como consenso general en las ciencias de la vida, las bases celulares soportan estructuralmente las manifestaciones orgánicas de las enfermedades.

Este trabajo busca aportar mayores conocimientos en cuanto a los mecanismos celulares de diversas patologías, principalmente de la PA.

Específicamente hemos estudiado la regulación que ejercen las Rho-GTPasas y las MAPKs sobre el promotor de p8 y el efecto que surge ante la asociación de IP15. Esto llevó a la observación que el stress celular cristalizado en este caso a través de la sobre-expresión de las Rho-GTPasas y las MAPKs inducen la activación del promotor de p8 mimetizando el sufrimiento de la célula acinar. A su vez IP15, también inducido por la noxa sobre el acino pancreático, limitaría la expresión de la p8 buscando mantener la homeostasis celular.

BIBLIOGRAFIA

Bibliografía

1. Dagorn J. *Physiopathologie de l'inflammation pancréatique au cours de la pancréatite aiguë*. Hepatogastro., 1999; 6: 9-15.
2. Rinderknecht H. *Fatal pancreatitis: a consequence of excessive leukocyte stimulation?* Int. J. Pancreatol., 1988; 33: 102-112.
3. Simms H.; D'Amico R. *Polymorphonuclear leukocyte dysregulation during the systemic inflammatory response syndrome*. Blood, 1994; 83: 1398-1407.
4. Tiscornia O; Hamamura S; Bank S; et.al. *Biliary acute pancreatitis review*. World. J. Gastroenterol., 2000; 6: 157-168.
5. Cosen-Binker L, Binker MG, Negri G, Tiscornia O. *Acute pancreatitis possible initial triggering mechanism and prophylaxis*. Pancreatology. 2003; 3 (6): 445-56.
6. Cosen-Binker L, Binker MG, Negri G, Tiscornia O. *Influence of Stress in Acute Pancreatitis and Correlation with Stress Induced Ulcer*. Pancreatology. 2004; 4 :470-484.
7. Bhatia M; Saluja A; Steer M; et.al. *The effects of neutrophil depletion on a completely non-invasive model of acute pancreatitis associated lung injury*. Int. J. Pancreatol., 1998; 24: 77-83.
8. McFadden, D. *Organ failure and multiple organ system failure in pancreatitis*. Pancreas, 1991; 6: S37-S43.
9. Lerch M; Saluja A; Steer M; et.al. *Luminal endocytosis and intracellular targeting by acinar cells during early biliary pancreatitis in the opossum*. J. Clin. Invest., 1995; 95: 2222-2231.
10. Luthen R; Niederau C; Grendell J. *Intrapancreatic zymogen activation and levels of ATP and glutathione during caerulein pancreatitis in rats*. Am. J. Physiol., 1995; 268: G592-G604.
11. Ortiz E.; Dusetti N.; Dagorn J.; et.al. *The pancreatitis-associated protein is induced by free radicals in AR4-2J cells and confers cell resistance to apoptosis*. Gastroenter., 1998; 114: 808-816.
12. Huguier M. *Les pancréatites aigües*. 111-126. En : Bernardes P; Huguier M. *Maladies du Pancréas Exocrine*. Paris, France. DOIN EDITEURS.1987.
13. Kaiser A; Saluja A; Steer M; et.al. *Relationship between severity, necrosis and apoptosis in five models of experimental pancreatitis*. Am. J. Physiol., 1995; 269: C1295-C1304.

14. Steer M. *Etiology and pathophysiology of acute pancreatitis*. 513-592. En : Go V.; Gardener J.; Brooks F.; Lebenthal E.; Di Magno E.; Scheele G. *The Exocrine Pancreas : Biology, Pathobiology and Disease*. Segunda Edición, New York-USA; Raven Press, 1993.
15. Barganza J.; Rinderknecht H. *Free radicals and acute pancreatitis*. Gastroenterol., 1988; 94: 1111-1112.
16. Blinman T.; Gukovsky I.; Gukovskaya S.; et.al. *Pancreatic acinar cells express a variety of cytokines that are regulated in experimental pancreatitis*. Gastroenterol., 1997; 112: A429.
17. Jones B.; Gores G. *Physiology and pathophysiology of apoptosis in epithelial cells of the liver, pancreas and intestine*. Am. J. Physiol., 1997; 273: G1174-G1188.
18. Leist M.; Single B.; Castoldi A.; et.al. *Intracellular ATP concentration : a switch in the decision between apoptosis and necrosis*. J. Exp. Med., 1997; 185: 1481-1486.
19. Kroemer G.; Dallaporta B.; Resche-Rigon M. *The Mitochondrial death/life regulator in apoptosis and necrosis*. Annu.Rev.Physiol., 1998; 60: 619-642.
20. Norman J.; Fink G.; Denham W.; et.al. *Tissue-specific cytokine production during experimental acute pancreatitis : a probable mechanism for distant organ dysfunction*. Dig.Dis.Sci., 1997; 42: 1783-1788.
21. Ammori B.; Leeder P; King R.; et.al. *Early increase in intestinal permeability in patients with severe acute pancreatitis : correlation with endotoxemia, organ failure and mortality*. J. Gastrointest. Surg., 1999; 3: 252-262.
22. Lerch M.; Hernandez C.; Adler G. *Acute Pancreatitis*. N. Engl. J. Med., 1994; 331: 948-949.
23. McKay C.; Gallagher G.; Brooks B.; et.al. *Increased monocyte cytokine production in association with systemic complications in acute pancreatitis*. Br. J. Surg., 1996; 83: 919-923.
24. Balkwill F.; Burke F. *The cytokine network*. Immunol.Today, 1996; 10: 299-303.
25. Pfau J. *Pancreatitis Aguda II: Complicaciones y Tratamiento*. 354-373. En : Armas R.; Parrochia E.; Soto J. *Hígado. Vías Biliares .Páncreas*. Santiago de Chile-Chile.Fundación de Investigación y Perfeccionamiento Médico.1990.
26. Scita G; Tenca P; Frittoli E; et al. *Signaling from Ras to Rac and beyond: not just a matter of GEFs*. EMBO, 2000; 19 (11): 2393-2398.
27. Hall A. *Rho GTPases and actin cytoskeleton*. Science, 1998; 279: 509-514.
28. Bishp A; Hall A. *Rho GTPases and their effector proteins*. Bichem. J , 2000; (348) 241-255.

- 29.Casanova J. *Epithelial cell cytoskeleton and intracellular trafficking. Confluence of membrane trafficking and motility in epithelial cell models.* Am.J.Physio.Gastroint.Liver Physiol., 2002; (283) :G1015-G1019.
- 30.Lowes V; Ip N; Wong Y. *Integration of signals from receptor coupled tyrosine kinases and G protein-coupled receptors.* Neurosignals, 2002; 11: 5-19.
- 31.Edmunds J; Mahadevan L. *MAP kinases as structural adaptors and enzymatic activators in transcription complexes.* J.Cell Sci., 2004; 117: 3715-3723.
- 32.Iovanna J. Redifferentiation and Apoptosis of Pancreatic Cells During Acute Pancreatitis. Pancreatology, 1996; 20 (2) : 77-84.
- 33.Keim V ;Iovanna J ;Dagorn J. *The Acute Phase Reaction of the Exocrine Pancreas :Gene Expression and Synthesis of Pancreatitis Associated Proteins.* Digestion, 1994; 55: 65-72.
- 34.Keim V; Iovanna J ; Dagorn J ; et al. *Rat Pancreatitis Associated Protein is Expressed in Relation to Severity of Experimental Pancreatitis.* Pancreas, 1994; 9 (5) : 600-612.
- 35.Fiedler F; Iovanna J; Dagorn J; Keim V ; et al. *Acute-Phase response of the rat pancreas protects against further aggression with severe necrotizing pancreatitis.* Crit.CareMed., 1998; 26 (5) :887-894.
- 36.Iovanna J ; Keim V ; Michel R ; Dagorn J. *Pancreatic Gene Expression is altered during acute experimental pancreatitis in the rat.* Am.J.Physiol.,1991; 261 :G485-G489.
- 37.Orelle B ; Keim V ; Masciotra L ;Dagorn J ;Iovanna J. *Human Pancreatitis Associated Protein.* J.Clin.Invest., 1992; 90 :2284-2291.
- 38.Hoffmeister A ;Ropolo A ; Vasseur S ; Mallo G ;Vaccaro MI ;Dagorn J ;Moreno S ;Canepa E ;Iovanna J. *The HMG-I/Y related Protein p8 Binds to p300 and PAX trans-Activation Domain interacting Protein to Regulate the trans-Activation Activity of the Pax 2A and Pax2B Transcription Factors on the Glucagon Gene Promotor.* J.Biol.Chem., 2002; 277 (25) :22314-22 319.
- 39.Vasseur S; Hoffmeister A; Iovanna J; et.al. *p8 is critical for tumor development induced by rasV12 mutated protein and EIA oncogene.* EMBO, 2002; 3:165-170.
- 40.Vasseur S; Iovanna J. *p8 gene is necessary for tumor establishment.* Med. Sci. (Paris), 2003; 19 (12):1259-1264.

41. Malicet C; Lesavre N; Vasseur S; Iovanna J. *p8 inhibits the growth of human pancreatic cancer cells and its expression is induced through pathways involved in growth inhibition and repressed by factors promoting cell growth.* Molecular Cancer, 2003; 2: 37-49.
42. Ding X ; Thomas A. *MEK/ERK-Mediated Proliferation is Negatively Regulated by p38 MAP Kinase in the Human Pancreatic Cancer Cell Line PANC-1.* Biochemical and Biophysical Research Communications, 2001; 282 : 447-453.
43. Mucadel V ; Totaro M ; Dagorn J ; Iovanna J ; et al. *The homeobox gene Cdx1 belongs to the p53-p21^{WAK}-Bcl 2 network in intestinal epithelial cells.* Biochemical and Biophysical Research Communications, 2002; 297 :607-615.
44. Mallo G ; Vasseur S ; Iovanna J ; et al. *Cloning and Expression of the Rat p8 cDNA, a New Gene Activated in Pancreas during the Acute Phase of Pancreatitis , Pancreatic Developement and Regeneration and which Promotes Cellular Growth.* J.Biochem.Molec.Biol., 1997; 272 (51) :32360-32369.
45. Dusetti N ; Dagorn J ; Iovanna J ; et al. *Molecular Cloning ,Genomic Organization and Chromosomal Localization of the Human Pancreatitis Associated Protein Gene.* Genomics, 1994; 19 :108-114.
46. Dusetti N ; Vasseur S ; Dagorn J ; Iovanna J ; et al. *The Pancreatitis Associated Protein I Promoter Allows targeting to the Pancreas of a Foreign Gene whose Expression is up-regulated during Pancreatic Inflammation.* J.of Biochem.Molec.Biol., 1997; 272 (9) :5800-5804.
47. Calvo E; Mallo G; Fiedler F; Malka D; Vaccaro M; Keim V; Morisset J; Dagorn J; Iovanna J. *Clusterin overexpression in rat pancreas during the acute phase of pancreatitis and pancreatic development.* Eur. J. Biochem., 1998; 254: 282-289.
48. Dusetti N; Tomasini R; Azizi A; Barthet M; Vaccaro M; Fiedler F; Dagorn J; Iovanna J. *Expression profiling in pancreas during the acute phase of pancreatitis using cDNA microarrays.* Biochem. Biophys. Res. Commun., 2000; 277: 660-667.
49. Ropolo A; Tomasini R; Grasso D; Dusetti N; Cerquetti M; Iovanna J; Vaccaro M. *Cloning of IP15, a pancreatic -induced gene whose expression inhibits cell growth.* Biochem. Biophys. Res. Commun., 2004; 319: 1001-1009.

- 50.Kawaguchi M ;Onuchic C ;Huang S. *Activation of Extracellular Signal-Regulated kinase (ERK ½) but not p38 and c JUN N-terminal kinase is involved in Signaling of a novel cytokine ML-1.* J.Biol.Chem., 2002; 277 (18) :15229-15232.
- 51.Fasata M ;Horiuchi K ;Manos E ;Trzaskus J. *Identification of a Novel Inhibitor of Mitogen Activated Protein Kinase.* J.Biol.Chem., 1998; 273 (29) :18623-18632.
- 52.Dwivedi P ;Hii C ;May B ; et al. *Role of MAP Kinases in the 1,25-Dihydroxyvitamin D₃-induced Transactivation of the Rat Cytocrome P450C24 (CYP24) Promoter.* J.Biol.Chem., 2002; 277 (33) :29643-29653.
- 53.Seed B; Sheen J.. *A simple phase-extraction assay for chloramphenicol acyltransferase activity.* Gene, 1988; 67:271-277.
- 54.Dusetti N ; Mallo G ; Dagorn J ;Iovanna J. *Pancreatitis-associated protein I (PAP I), an acute phase protein induced by cytokines. Identification of two functional interleukin-6 response elements in the rat PAP I promoter region.* J.Biol.Chem., 1995; 270 (38):22417-22421.
- 55.Vasseur S, Mallo GV, Garcia Montero A, Ortiz EM, Fiedler F, Canepa E, Moreno S, Iovanna JL. *Structural and functional characterization of the mouse p8 gene: promotion of transcription by the CAAT-enhancer binding protein alpha (C/EBPalpha) and C/EBP beta trans-acting factors involves a C/EBP cis-acting element and other regions of the promoter.* Biochem J, 1999; 343: 777-383.
- 56.Sambrook J, Fritsch E, Maniatis T. *Molecular Cloning : A Laboratory Manual.* 2nd edition. Cold Spring Harbor Lab. Press, Plainview, NY; 1989.
- 57.Burridge K; Wennerberg K. *Rho and Rac take center stage.* Cell, 2004; 116: 167-179.
- 58.Norman, J. *The role of cytokines in the pathogenesis of acute pancreatitis.* Am. J. Surg. 1998; 175: 76-83.
- 59.Pearson G ; Robinson F ; Cobb M ; et al. *Mitogen-Activated Protein (MAP) Kinase Pathways : Regulation and Physiological Functions.* Endocrine Reviews, 2001; 22 : 153-183.

RESUMENES

Resumen

El páncreas genera un programa de emergencia en respuesta a la pancreatitis aguda (PA) induciendo la síntesis de una serie de proteínas para contrarrestar la agresión con una rápida adaptación del fenotipo celular ya que probablemente las alteraciones iniciales se manifiesten dentro de la célula acinar. Entre estas proteínas se encuentran la p8, inducida por el stress y vinculada a la modulación de la proliferación celular; y la IP15, inducida por el INF α que se expresa en la fase inicial de la PA e inhibe la proliferación celular.

La hipótesis de trabajo se basó en una posible interacción entre p8 e IP15. Esto generó el objetivo de evaluar la influencia de IP15 sobre la actividad del promotor de p8 (pp8) e investigar la modulación de pp8 por las Rho-GTPasas y MAPKs considerando el rol de IP15.

Células Cos1 fueron co-transfектadas con pp8-CAT + pEGFP-IP15 y la correspondiente forma WT o CA o DN de Cdc42 o Rac1 o RhoA. Con respecto a las MAPKs, se inhibió alternativamente y en forma específica a JNK (SP600125), ERK (U0126) y p38 (SB203580) en células Cos1 que habían sido co-transfектadas con pp8-CAT + pEGFP-IP15. La actividad de CAT se normalizó a través de la de β -galactosidasa.

Los resultados mostraron que IP15 inhibió la actividad de pp8. Mientras que las Rho-GTPasas estimularon la actividad de pp8 la forma DN la disminuyó y esto se acentuó más ante la asociación con IP15. El bloqueo de las MAPKs también disminuyó la actividad de pp8 siendo esto más marcado al co-expresar IP15.

Por lo que concluimos que IP15 es un regulador negativo de pp8 que actúa por una vía independiente de las Rho-GTPasas y MAPKs. Tanto Cdc42-Rac1-RhoA como JNK-ERK-p38 son reguladores positivos de pp8 y en su ausencia el rol inhibitorio de IP15 sobre pp8 es más marcado.

Summary

In acute pancreatitis (AP) the pancreas generates an emergency program inducing the synthesis of proteins to modulate the response to aggression by a quick adaptation of the cellular phenotype. Amongst these proteins we focused on p8, a protein induced by stress and linked to the regulation of cell proliferation; and IP15, a protein induced INF α that is expressed in the early phase of AP and that is responsible for the inhibition of cell proliferation.

Our hypothesis was that there might be an interaction between p8 and IP15. This led to the aim of evaluating the role of IP15 on the activity of the promoter of p8 (pp8) and studying the modulation of pp8 by the Rho-GTPases and MAPKs considering the influence of IP15.

We then proceeded to co-transfect Cos1 cells with pp8-CAT + pEGFP-IP15 and the corresponding form of WT or CA or DN of Cdc42 or Rac1 or RhoA. Also the MAPKs pathways were specifically inhibited one by one using SP600125 for JNK, U0126 for ERK and SB203580 for p38 in Cos1 cells co-transfected with pp8-CAT + pEGFP-IP15. CAT activity was normalized to β -galactosidase activity.

IP15 resulted a negative regulator of pp8 activity. While the over-expression of the Rho-GTPases stimulated pp8 activity the DN form diminished it. This inhibitory effect was more accentuated when IP15 was expressed. The blockage of the MAPKs also decreased pp8 activity being this more remarkable when co-expressing IP15.

We then conclude that in Cos1 cells IP15 is a negative regulator of pp8 that acts by a pathway that is independent of Rho-GTPases and MAPKs. Also in Cos1 cells, Cdc42-Rac1-RhoA as well as JNK-ERK-p38 are positive regulators of pp8 and in their absence the inhibitory role of IP15 is more emphasized.