

Tesis Doctoral

Estudio del rol de la proteína VMP1 en los procesos de autofagia, muerte y sobrevida celular en la fisiopatología pancreática

Pardo, Romina Paola

2010

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 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:

Pardo, Romina Paola. (2010). Estudio del rol de la proteína VMP1 en los procesos de autofagia, muerte y sobrevida celular en la fisiopatología pancreática. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Pardo, Romina Paola. "Estudio del rol de la proteína VMP1 en los procesos de autofagia, muerte y sobrevida celular en la fisiopatología pancreática". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2010.

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Química Biológica

**ESTUDIO DEL ROL DE LA PROTEÍNA VMP1 EN LOS PROCESOS DE
AUTOFAGIA, MUERTE Y SOBREVIDA CELULAR EN LA
FISIOPATOLOGÍA PANCREÁTICA.**

Tesis presentada para optar al título de Doctora de la Universidad de Buenos Aires en el área Química Biológica

Romina Paola Pardo

Directora de Tesis: Dra. María Inés Vaccaro

Consejera de Estudios: Dra. Elba Vázquez

Lugar de trabajo: Laboratorio de Fisiología Digestiva. Departamento de Fisiología. Facultad de Medicina. Universidad de Buenos Aires.

Buenos Aires, 2010

**Estudio del rol de la proteína VMP1 en los procesos de
autofagia, muerte y sobrevivencia celular en la
fisiopatología pancreática.**

Estudio del rol de la proteína VMP1 en los procesos de autofagia, muerte y sobrevida celular en la fisiopatología pancreática.

La autofagia es un proceso de degradación de componentes citoplasmáticos que en algunos casos puede jugar un rol citoprotectivo, mientras que en otros puede llevar a la muerte celular. En trabajos previos hemos descrito a la proteína transmembrana VMP1, la cual se encuentra inducida en la pancreatitis experimental. Con el objetivo de determinar su función, se estudió su participación en el proceso de autofagia. Los resultados obtenidos en esta tesis demostraron que la sobreexpresión de VMP1 induce autofagia en células cultivadas en un medio rico en nutrientes. Además, VMP1 está involucrada en la autofagia inducida por ayuno y rapamicina. Más aún, el silenciamiento de VMP1 inhibe la formación de autofagosomas por el tratamiento con ayuno o rapamicina sugiriendo que VMP1 es necesaria para la autofagia.

Aún no ha sido esclarecido el rol de la autofagia en el cáncer de páncreas. Los estudios desarrollados en este trabajo sobre la autofagia y VMP1 en el cáncer de páncreas, indican que el tratamiento con gemcitabina induce autofagia en las líneas celulares de cáncer de páncreas PANC-1 y MIAPaCa-2, y que este proceso promueve la muerte celular por apoptosis. La inhibición de la autofagia con 3-metiladenina redujo significativamente el porcentaje de células apoptóticas en respuesta a la gemcitabina. También se observó que la gemcitabina induce la expresión temprana de VMP1, que el silenciamiento de VMP1 disminuye la apoptosis inducida por este agente quimioterapéutico y que la sobreexpresión de VMP1 aumenta significativamente el porcentaje de células apoptóticas. Estos resultados demuestran que la vía de autofagia mediada por VMP1 participa en la muerte celular por apoptosis inducida por gemcitabina. Con el objetivo de profundizar el estudio de los mecanismos moleculares mediante los cuales VMP1 interviene en la sobrevida o muerte celular, se buscaron

interactores de esta proteína utilizando la estrategia de doble híbrido. Se demostró que VMP1 interacciona con S100A10, un miembro de la familia de proteínas S100 que se encontró sobreexpresado en adenocarcinomas pancreáticos. También se observó que la expresión basal del mRNA de S100A10 en las células MIAPaCa-2 es mayor que en las células HeLa. S100A10 se induce bajo estímulos autofágicos, como el tratamiento de ayuno y la gemcitabina, en células HeLa, pero no en las células tumorales MIAPaCa-2, sugiriendo que en estas su expresión se encuentra desregulada.

El análisis del rol de la interacción VMP1-S100A10 en las células tumorales mostró que la sobreexpresión de VMP1 induce la expresión del mRNA de S100A10, sugiriendo que S100A10 forma parte de la respuesta celular mediada por VMP1. Cuando la proteína sobreexpresada es S100A10, se modifica la distribución intracelular de VMP1, disminuyendo su patrón punteado característico y aumentando la distribución en una estructura reticulada semejante al retículo endoplásmico.

Finalmente se investigó la participación de S100A10 en el proceso de autofagia mediado por VMP1. Se observó que la sobreexpresión de S100A10 disminuye la formación de autofagosomas tanto en respuesta al tratamiento con gemcitabina como ante la inducción directa por la sobreexpresión de VMP1. Se determinó también que S100A10 reduce la apoptosis inducida por gemcitabina, ya que su silenciamiento aumentó la apoptosis causada por este agente quimioterapéutico. Por lo tanto, la expresión de S100A10 disminuye la autofagia y la apoptosis mediadas por VMP1, favoreciendo la resistencia a la muerte de las células de cáncer de páncreas.

Los resultados de este trabajo contribuyen a elucidar el rol de la autofagia en el cáncer de páncreas, señalando a la autofagia mediada por VMP1 como un mecanismo molecular que conduce a la muerte por apoptosis de las células neoplásicas de origen pancreático, y a la proteína S100A10 como un mecanismo posible de supervivencia de las células de cáncer de páncreas, que actúa disminuyendo la capacidad de desarrollar autofagia y apoptosis. En base a los resultados obtenidos, proponemos a la

vía de autofagia mediada por VMP1 como posible blanco para el estudio de nuevas estrategias terapéuticas para el cáncer de páncreas.

Palabras Claves:

autofagia, VMP1, cáncer de páncreas, apoptosis, S100A10, gemcitabina

**Study of the role of protein VMP1 in the process of autophagy, death
and cell survival in the pancreatic physiopathology.**

Autophagy is a process of degradation of cytoplasmic components, in some cases can play a cytoprotective role, while in other cases can lead to cell death. In previous works we have described the transmembrane protein VMP1, which is induced in experimental pancreatitis. In order to determine its function, its participation in the process of autophagy was studied. The results obtained in this thesis showed that overexpression of VMP1 triggers autophagy in cells grown in a culture media rich in nutrients. VMP1 is also involved in starvation or rapamycin-induced autophagy. Moreover, the silencing of VMP1 gene inhibits the formation of autophagosomes by starvation or rapamycin treatments, suggesting that VMP1 is necessary for autophagy.

The role of autophagy in pancreatic cancer has not been clarified yet. Studies developed in this work on autophagy and VMP1 in pancreatic cancer indicate that treatment with gemcitabine induces autophagy in PANC-1 and MIAPaCa-2 pancreatic cancer cell lines, and this process promotes cell death by apoptosis. Inhibition of autophagy with 3-methyladenine significantly reduced the percentage of apoptotic cells in response to gemcitabine. It was also observed that gemcitabine induces early expression of VMP1. Furthermore, the silencing of VMP1 reduces this chemotherapeutic agent-induced apoptosis and VMP1 overexpression significantly increases the percentage of apoptotic cells. These results demonstrate that the pathway of VMP1-mediated autophagy participates in apoptotic cell death induced by gemcitabine. With the aim of study the molecular mechanisms by which VMP1 participates in cell death or survival, interactors of this protein were searched using the two-hybrid strategy. It was shown that VMP1 interacts with S100A10, a member of the family of proteins S100 found to be overexpressed in pancreatic adenocarcinoma. It

was also noted that the basal expression of the S100A10 mRNA in MIAPaCa-2 cells is higher than in HeLa cells. S100A10 is induced under autophagic stimuli such as starvation or treatment with gemcitabine in HeLa cells, but not in MIAPaCa-2 tumor cells, suggesting that in these cells its expression is unregulated. The analysis of the role of VMP1-S100A10 interaction in tumor cells showed that the overexpression of VMP1 induces S100A10 mRNA expression, suggesting that S100A10 is part of the VMP1-mediated cell response. When S100A10 protein is overexpressed, VMP1 intracellular distribution is modified, lowering its characteristic dotted pattern and increasing distribution in a reticulated structure similar to the endoplasmic reticulum. Finally the involvement of S100A10 in the process of autophagy mediated by VMP1 was investigated. It was found that S100A10 overexpression reduces the formation of autophagosomes induced by gemcitabine treatment or by VMP1 overexpression. It was also determined that S100A10 reduces gemcitabine –induced apoptosis, since its silencing increased apoptosis caused by this chemotherapeutic agent. Therefore, the expression of S100A10 reduces the autophagy and apoptosis mediated by VMP1, increasing death resistance of pancreatic cancer cells. The results of this work contribute to elucidate the role of autophagy in pancreatic cancer, pointing out VMP1-mediated autophagy as a molecular mechanism leading to death by apoptosis of neoplastic pancreatic cells, and protein S100A10 as a possible survival mechanism of pancreatic cancer cells, which acts decreasing the ability to develop autophagy and apoptosis. Based on these results, we postulate the pathway of VMP1-mediated autophagy as a possible target for the study of new therapeutic strategies for pancreatic cancer.

Key words:

autophagy, VMP1, pancreas cancer, apoptosis, S100A10, gemcitabine,

AGRADECIMIENTOS

A Maria Inés, por la ayuda y las enseñanzas.

A Ale, Vero, Dani, Andre, Inés y Lidia, por ayudarme y aguantarme (especialmente el último año!).

A todos los del labo de Maki, porque me salvan en momentos de apuro y me reciben siempre con una sonrisa.

A Elba Vázquez, por estar siempre disponible para mis preguntas.

A Ana y Paula, porque me alegran los eternos días de escritura y por la ayuda.

A mis padres, Pepe y Stella, por el apoyo incondicional y porque los quiero.

A la familia de Maki, porque son también mi familia y siempre puedo contar con ellos.

A mis hermanos, Nora y Pepo, porque los quiero. Y a Kari y Nestor por acompañarlos en la vida.

A mis sobrinos, Cheque, Chiara, Hanna, Lucas, Bruno y Ian, por alegrarme la vida.

A las chicas de hockey, mis amigas, porque son parte fundamental de mi vida.

A mis amigas de los dúplex, por su amistad de siempre.

A mis amigas Caro y Nana, porque siempre puedo contar con ellas (aunque una se me haya ido lejos).

A Maite, el sol de mi vida, por hacerme la vida más feliz.

A Maki, mi amor y compañero, por la ayuda infinita, por todo el apoyo, porque lo amo.

*A mis dos amores, Maki y Maite,
y al "hermanito" que viene en camino.*

A mis padres

ABREVIATURAS

% p/v: Porcentaje peso en volumen

μg: Microgramos

μl: Microlitro

μM: Micromolar

3-MA: 3 metiladenina

7AAD: 7-Amino-actinomycin D

ATB: Antibiótico

ATG: Relacionado a autofagia

cm: Centímetro

Col.: Colaboradores

DMEM: *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

DNA: Ácido desoxiribonucleico

E.S.: Error standard

EBSS: *Earle's Balanced Salt Solution*

EGFP: Proteína verde fluorescente

GDP: Guanidina difosfato

GST: Glutation S-transferasa

GTP: Guanidina trifosfato

hs: Horas

IPTG: Isopropil-β-D-tio-galactosa

LB: Luria broth

LC3: Microtubule-associated protein 1 light chain 3

LEU: Leucina

MDC: Monodansylcadaverina

ml: Mililitro

mM: Milimolar

mRNA: RNA mensajero

Myr: Miristilación

O.N.: Overnight

OVO: Ovoalbúmina

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

PI3K: Fosfatidilinositol 3 kinasa

RFP: Proteína roja fluorescente

RNA: Ácido ribonucleico

RT: Transcripción reversa

S100A10: S100 calcium binding protein A10

SDS: Dodecil sulfato de sodio

SFB: Suero fetal bovino

shRNA: *Short harpin RNA*

siRNA: *Small interfering RNA*

SOS: *Son of sevenless*

TCL: Lisado total celular

UFC: Unidades formadoras de colonias

URA: Uracilo

VMP1: *Vacuole membrane protein 1*

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN

• Cáncer de Páncreas	1
• Autofagia	7
• Apoptosis	13
• Vía extrínseca	16
• Vía intrínseca	17
• Autofagia y Apoptosis	18
• La autofagia cuando la apoptosis es inhibida	19
• La apoptosis cuando la autofagia es inhibida	20
• Muerte celular mediada por autofagia	21
• Autofagia y Cáncer	22
• La autofagia y la sobrevida del cáncer	22
• La autofagia y la supresión del cáncer	24
• Regulación de la autofagia en la supresión y sobrevida del cáncer	26
• Modulación de la autofagia por drogas	29
• Autofagia y cáncer de páncreas	30
• VMP1	31
• S100A10	34

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

• Hipótesis y Objetivos	41
-------------------------	----

MATERIALES Y MÉTODOS

• Medios, Reactivos y Anticuerpos	43
-----------------------------------	----

• Medios y reactivos para cultivo de líneas celulares	43
• Medios y reactivos para cultivo bacteriano	43
• Medios y reactivos para cultivo de levaduras	43
• Anticuerpos	44
• Plásmidos y siRNA	44
• Cultivo de células	45
• Trypan Blue	46
• Transfección	47
• Porcentaje de células con RFP-LC3 agrupado	47
• Western Blot	47
• Extracción y purificación de RNA	48
• RT-PCR y Real Time RT-PCR	49
• Citometría de Flujo	50
• Naranja de Acridina y Bromuro de Etidio	51
• Naranja de Acridina	52
• Actividad de caspasa 3 y 7	52
• Microscopía electrónica	53
• Inmunofluorescencia y Microscopia de fluorescencia	53
• Doble Híbrido	54
• Amplificación de la biblioteca de células HeLa	54
• Clonado de los fragmento de VMP1	55
• Ensayo Doble Híbrido	56
• Pull-down	57
• Anticuerpo VMP1	58
• Clonado	58
• Expresión	59
• Purificación	59

• Inmunización	60
• Bacterias competentes	60
• Transformación	60
• Miniprep	61
• Análisis estadístico	61

RESULTADOS

1. Producción del anticuerpo anti VMP1	62
1.1 Clonado y expresión del fragmento COOH y el fragmento B2 de VMP1	62
2. Función de VMP1 en el proceso de Autofagia	64
2.1 VMP1 induce autofagia en células de mamíferos	64
2.2 VMP1 es inducida por el tratamiento con rapamicina y ayuno	71
2.3 VMP1 es necesaria para la autofagia inducida por rapamicina y ayuno	72
3. Estudio del rol de VMP1 en el desarrollo tumoral	76
3.1 Cuantificación de la expresión del mRNA de VMP1	76
3.2 Efecto de la gemcitabina en la viabilidad de células PANC-1 y MIAPaCa-2	78
3.3 La gemcitabina induce autofagia en células PANC-1 y MIAPaCa-2	79
3.4 La autofagia inducida por gemcitabina promueve la muerte celular por apoptosis en células MIAPaCa-2	83
3.5 Clonado en pCMS3-H1p-EGFP para el silenciamiento de VMP1	89
3.6 La autofagia inducida por gemcitabina esta mediada por VMP1	90
4. Detección de nuevas proteínas que interaccionan con VMP1	98
4.1 Clonado de los fragmentos de VMP1	98
4.2 Amplificación de la biblioteca HeLa clonada en pMyr	100
4.3 Doble Híbrido de VMP1	100

5. Caracterización de la interacción VMP1-S100A10 y su efecto sobre la formación de autofagosomas y la muerte celular	105
5.1 Clonado de S100A10	105
5.2 Confirmación de la interacción entre VMP1 y S100A10	107
5.3 Localización intracelular de S100A10-EGFP en células HeLa	108
5.4 Expresión de S100A10 en células HeLa y MIAPaCa-2	110
5.5 La sobreexpresión de S100A10 modifica la distribución intracelular de VMP1	112
5.6 La sobreexpresión de VMP1 induce la expresión de S100A10	113
5.7 La expresión de S100A10 disminuye la formación de autofagosomas	115
5.8 Efecto de la expresión de S100A10 sobre la apoptosis inducida por gemcitabina	118

DISCUSIÓN

• Discusión	122
-------------	-----

CONCLUSIONES

• Conclusiones	142
----------------	-----

REFERENCIAS

• Referencias	144
---------------	-----

Introducción

CÁNCER DE PÁNCREAS

El cáncer de páncreas es uno de los tumores malignos con peor pronóstico. En Estados Unidos de América se diagnostican entre 28.000 y 30.300 nuevos casos anuales de cáncer pancreático y se produce aproximadamente el mismo número de muertes por esta enfermedad [Greenlee R y col., 2001; American Cancer Society 2002]. Si bien los adenocarcinomas ductales constituyen menos del 2% de nuevos casos de cáncer en los Estados Unidos, son la quinta causa de muerte relacionada con el cáncer [Parker SL y col., 1997]. La razón de este grave pronóstico se relaciona en parte con su insensibilidad a la quimioterapia, radioterapia e inmunoterapia.

La mayoría de los pacientes se presenta con la enfermedad en su última etapa. Así, aunque la resección quirúrgica puede producir tasas de supervivencia de hasta el 40%, la mayoría de pacientes con adenocarcinoma pancreático realmente no son elegibles para cirugía [Yeo CJ y col., 1995].

El adenocarcinoma ductal es la forma más común de cáncer pancreático. La tasa de incidencia anual para todos los tipos de cáncer pancreático es de aproximadamente 9 nuevos casos cada 100.000 personas, ocupando el 11^{vo} lugar entre los diferentes tipos de cáncer [Greenlee R y col., 2001]. El pico de incidencia ocurre durante la séptima y octava década de vida, siendo la edad promedio de diagnóstico de 60 a 65 años. La tasa de incidencia es ligeramente mayor en hombres que en mujeres (riesgo relativo 1,35) [Ahlgren JD, 1996]. La sobrevida en pacientes con cáncer pancreático sin tratar es muy baja. Para todas las fases combinadas, la tasa de sobrevida de 1 año es del 19%, mientras que la tasa de sobrevida de 5 años baja a un 4% [Greenlee R y col., 2001], esto también se debe al desarrollo tardío de síntomas clínicos. Así, el 80% de los casos de cáncer de páncreas son metastásicos al momento del diagnóstico.

La resección quirúrgica es la mejor posibilidad para la cura del cáncer pancreático, mejorando la tasa de supervivencia de 5 años al 40 % cuando es realizado en instituciones especializadas [Sohn TA y col., 2000]. En los Estados Unidos las tasas de incidencia de cáncer pancreático aumentaron al triple entre 1920 y 1978, un aumento que también ha sido observado en otros países desarrollados. Una parte de este aumento puede explicarse por un diagnóstico más preciso y una mejor vigilancia de la enfermedad [Devesa S y col., 1995]. Desde 1978, las tasas de incidencia para hombres y mujeres han disminuido ligeramente y parecen haberse estabilizado en los niveles actuales.

Son pocas las publicaciones que analizan el cáncer de páncreas en Argentina, siendo una ellas la evaluación de 208 casos de cirugía clínica publicada por Tiscornia [Tiscornia y col., 1965]. Por otro lado, según el "Atlas de mortalidad de cáncer en Argentina" elaborado por el Ministerio de Salud de la Nación y el Instituto de Oncología Dr. Angel H. Roffo en el período 1997-2001 la tasa de mortalidad anual por cáncer de páncreas fue de 7,8 en varones y de 5,5 en mujeres (expresada en muertes/100.000 personas), siendo en ambos casos la 5^{ta} causa de muerte por cáncer.

Muchos estudios han encontrado que existe una relación entre ciertas exposiciones ambientales y casos de cáncer pancreático, incluyendo el fumar cigarrillos, el humo de tabaco ambiental, y la exposición a ciertos químicos [Gold EB y col., 1998]. Los fumadores tienen un riesgo aumentado de 2 a 3 veces de desarrollar cáncer pancreático. Se ha estimado que el fumar tabaco contribuye con casi el 30 % de los cánceres pancreáticos desarrollados, aunque el cese del tabaquismo puede reducir este riesgo. Otros factores de riesgo asociados con el desarrollo de cáncer pancreático son una dieta alta en grasas, la cirrosis y la pancreatitis crónica [Wynder E y col., 1975; Everhart J y col., 1995]. Michaud y col. encontraron que un índice de masa corporal alto y actividad física reducida aumentan el riesgo de cáncer pancreático

[Michaud DS y col., 2001]. Los factores que han sido estudiados y parecen no tener ninguna asociación con el desarrollo de cáncer pancreático incluyen la ingesta de alcohol moderada, la pancreatitis aguda no hereditaria y el consumo de café.

Ciertos factores de riesgo demográficos han sido asociados con el desarrollo de cáncer pancreático. Entre ellos se incluyen la edad avanzada, la raza negra, el sexo masculino, el bajo nivel socioeconómico, y la herencia judía Ashkenái [Gold EB y col., 1998]. Los factores etiológicos del huésped asociados con un riesgo aumentado de cáncer pancreático incluyen la diabetes mellitus, pancreatitis, y colecistectomía previa [Greenlee R y col., 2001; Ahlgren JD, 1996; Silverman DT y col., 1999; Lowenfels AB y col., 1993; Offerhaus GJA y col., 1988]. La asociación entre diabetes, pancreatitis y el desarrollo de cáncer pancreático es compleja, porque el cáncer pancreático, como destruye el parénquima pancreático, puede causar por sí mismo diabetes y pancreatitis. Un número creciente de evidencias experimentales sugiere que la predisposición genética desempeña un rol fundamental en el riesgo de cáncer pancreático [Ghadirian P y col., 2002].

Los adenocarcinoma ductales representan casi tres cuartas partes de las neoplasias pancreáticas malignas. Estas neoplasias son blanco-amarillentas, mal definidas, de masas firmes que suelen obstruir y dilatar el conducto biliar y los ductos pancreáticos. Microscópicamente los adenocarcinomas ductales se componen de células epiteliales infiltradas que forman glándulas de diversas formas y tamaños, rodeadas por un tejido conectivo fibroso, denso y reactivo. Los núcleos de estas células pueden mostrar marcado pleomorfismo (variación en tamaño y forma), hipercromasia (aumento de tinción nuclear), pérdida de polaridad, y nucleolos prominentes. La mayoría de los adenocarcinomas ductales se infiltran en los espacios perineural, linfático, y vascular.

Además, las metástasis al ganglio linfático son identificadas en la mayoría de los adenocarcinomas ductales reseccionados.

Muchos de los avances en la comprensión de la genética molecular se centraron en eventos que ocurren en el desarrollo y la progresión genética temprana de la enfermedad, siendo considerado actualmente el adenocarcinoma pancreático una de las neoplasias mejor caracterizada a nivel genético. La progresión genética está asociada con la acumulación de múltiples mutaciones en diversos genes causantes de cáncer. Aproximadamente el 95% de los cánceres pancreáticos ductales tienen una mutación puntual activadora en el oncogen K-ras [Hruban RH y col., 1993; Almoguerra C y col., 1998]. El producto del gen K-ras funciona como una GTPasa. Mutaciones en K-ras disminuyen la actividad GTPasa intrínseca, resultando en una proteína que es constitutivamente activa en la transducción de señales. La mayoría de estas mutaciones cambia el codón 12 de glicina (*wild type*) a ácido aspártico o valina. Mutaciones en los codones 13 y 61, así como nuevas mutaciones dinucleótido, ocurren menos frecuentemente [Hruban RH y col., 1993; Wilentz RE y col., 2000]. P16 es el gen supresor de tumor más comúnmente mutado en cáncer pancreático. Se encuentra localizado en el cromosoma 9p y está inactivado en el 95% de los carcinomas ductales pancreáticos. La proteína p16 funciona como un inhibidor de los complejos de kinasa 4 ciclina D-ciclina dependiente (cdk4). A su vez esto inhibe la fosforilación de diversas proteínas de crecimiento y regulatorias, incluyendo Rb, conduciendo a fallas en el control del ciclo celular y proliferación descontrolada [Caldas C y col., 1994; Schutte M y col., 1997]. El gen P53 está localizado en el cromosoma 17p y se encuentra mutado en aproximadamente el 75% de los carcinomas ductales pancreáticos [Yu J y col., 1999; Hermeking H y col., 1997]. El gen *p53* codifica para una proteína supresora de tumor que funciona como un factor de transcripción de vida corta, crucial en el control del ciclo celular y la apoptosis, y es

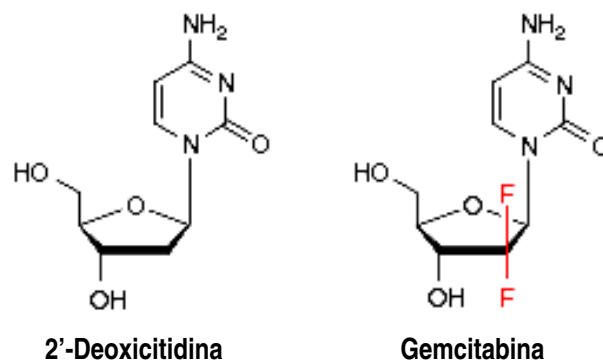
activado y estabilizado en respuesta a una amplia variedad de estreses celulares genotóxicos. El gen *p53* regula muchos genes río abajo, incluyendo *p21*, *mdm-2* (que inhibe a *p53* en un lazo de retroalimentación negativa), varios *PIGs* (*p53*-induced genes) y *14-3-3* [Yu J y col., 1999]. El gen *DPC4* (*SMAD4* o *MADH4*) es un gen supresor de tumor localizado en el cromosoma 18q y mutado o deletado homocigóticamente en aproximadamente un 55% de los cánceres ductales pancreáticos [Hahn SA y col., 1996]. *DPC4* es miembro de la familia de genes *SMAD*, pudiendo funcionar como un activador o represor de transcripción [Zawel L y col., 1998]. Mutaciones que interfieran con su capacidad de unión de DNA, o con la capacidad de *DPC4* para reaccionar a la señalización mediada por ligando, contribuyen a la tumorigénesis.

El gen *BRCA2*, localizado en el cromosoma 13q, se encuentra inactivado en aproximadamente el 7 al 13% de los cánceres pancreáticos. La mutación de *BRCA2* es usualmente una mutación germinal heredada, en oposición a las mutaciones somáticas adquiridas que comúnmente se observan en *p16*, *p53* y *DPC4* [Goggins M y col., 1996; Goggins M y col., 2000]. La proteína *BRCA2* podría funcionar como un “gen de mantención genómica”, previniendo la rotura de las cadenas de DNA que ocurren durante la división normal del ciclo celular. La inactivación bialélica de *BRCA2* es un evento tardío, con la pérdida del alelo *wild-type* remanente luego de la progresión de la neoplasia en pacientes con mutaciones de la línea germinal de *BRCA2*. Esto probablemente explique porqué los portadores de *BRCA2* no tienen una frecuencia incrementada de lesiones precursoras en el páncreas, y porqué la edad de aparición de cáncer pancreático en portadores de *BRCA2* no se encuentra reducida.

Actualmente, el tratamiento médico contra el cáncer pancreático se basa en la utilización de gemcitabina. Cuando es usado como terapia única tiene una tasa de respuesta del 12%, permitiendo un tiempo de sobrevida media de 5 meses [Rocha

Lima CM y col., 2004]. Lamentablemente aún se ignora la razón de esta falta de eficacia. La hipótesis mas aceptada es que la falta de respuesta al tratamiento oncológico se debe al hecho de que el cáncer de páncreas es altamente resistente a los estímulos apoptóticos. Varios mecanismos de supervivencia actúan para prevenir la muerte celular, resultando en la promoción del crecimiento del tumor y la metástasis. La resistencia de las células tumorales a la muerte en el cáncer de páncreas es el factor clave que previene la respuesta al tratamiento [Safioleas MC y col., 2004].

La gemcitabina (2',2'-difluorodeoxycytidine, dFdC) es un análogo del nucleósido deoxicitidina que posee 2 átomos de flúor en el azúcar.



Estructura de la deoxicitidina y la gemcitabina

Aunque inicialmente se desarrolló como un agente antiviral, rápidamente fue reconocido por su actividad antitumoral. [Heinemann y col., 1988; Hertel y col., 1990]. Como ara-C, otro análogo de deoxicitidina, la gemcitabina requiere la fosforilación intracelular por la deoxycitosina kinasa y se acumula en la célula principalmente como el trifosfato (dFdCTP), el cual compite con el dCTP por la incorporación al DNA [Huang y col., 1991]. La incorporación de un único nucleótido de gemcitabina es menos

eficiente inhibiendo la extensión de la cadena de DNA que, por ejemplo, ara-C, mientras que la incorporación en tándem de gemcitabina es más inhibitoria para la extensión y por lo tanto causa la terminación [Plunkett y col., 1995, 1996]. Además, a diferencia de otros análogos de base, la gemcitabina posee un segundo mecanismo de acción que contribuye a su citotoxicidad. El difosfato de gemcitabina (dFdCDP) sirve como un sustrato inhibitorio alternativo para la ribonucleótido reductasa y la inactivación de esta enzima clave lleva a un decrecimiento en el pool de deoxinucleótidos [Baker y col 1991; van der Donk y col., 1998; Wang y col., 2007]. El cambio en la proporción dFdCDP: dCTP probablemente lleva a un aumento en la incorporación de gemcitabina y por lo tanto a una mayor inhibición de la síntesis de DNA, acción conocida como auto-potenciación [Heinemann y col., 1990, 1992]. Estas diferencias en el metabolismo de la droga y su mecanismo de acción probablemente expliquen las diferencias en la actividad clínica al comparar con otras drogas de estructura similar. La gemcitabina es activa en una amplia variedad de tumores sólidos como cáncer pancreático, de ovarios, de mama metastásico y de pulmón.

El estudio de los genes involucrados en la muerte celular en cáncer de páncreas y la investigación de los mecanismos que participan en este proceso deberían conducir al mejoramiento de las actuales estrategias terapéuticas.

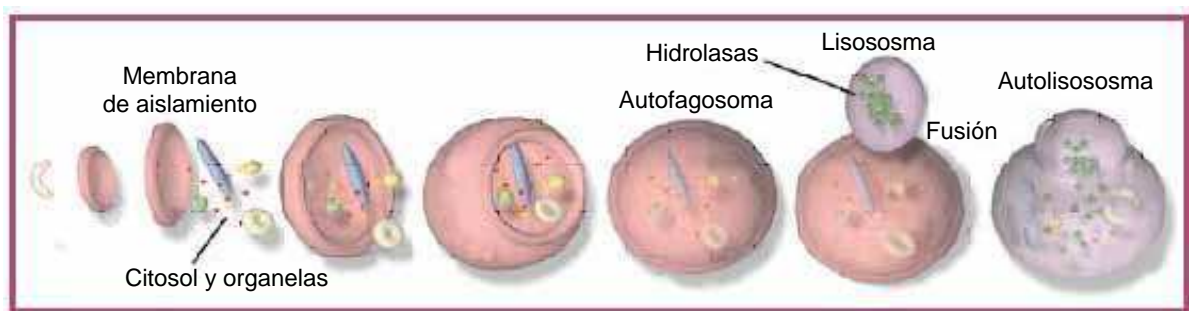
AUTOFAGIA

La autofagia ha sido caracterizada inicialmente como una forma alternativa de muerte celular llamada muerte celular programada tipo II, que se caracteriza por la acumulación de vesículas autofágicas [Edinger AL y col., 2004]. Numerosos estudios han sido realizados para comprender este nuevo mecanismo, y nuevas funciones relacionadas con la homeostasis celular también han sido descritas. La autofagia es

un proceso de degradación de componentes citoplasmáticos altamente conservado, que sirve como un mecanismo de supervivencia frente a condiciones de ayuno [Kroemer G y col., 2005; Codogno P y col., 2005]. La autofagia ocurre a nivel basal en la mayor parte de los tejidos y contribuye al recambio rutinario de los componentes citoplasmáticos. Está implicada en el desarrollo, la diferenciación y la remodelación de tejidos en distintos organismos [Levine B y col., 2004]. Se han descrito 3 tipos de autofagia: la macroautofagia, la microautofagia y la autofagia mediada por chaperonas [Klionsky DJ, 2004b]. La macroautofagia juega un importante papel fisiológico en la salud humana y en general el proceso se llama simplemente autofagia. Existen otras formas más especializadas de autofagia como la mitofagia [Kanki T y col., 2008], en la cual se degrada la mitocondria, pexofagia [Sakai Y y col., 2006; Iwata J y col., 2006], cuando se degradan selectivamente los peroxisomas y xenofagia [Levine B, 2005; Huang J y col., 2007], cuando se degradan bacterias y virus intracelulares.

La macroautofagia, o simplemente autofagia, es un proceso bien comprendido en levaduras, pero los detalles sobre el proceso y todas las proteínas involucradas en mamíferos sigue siendo parcialmente desconocido. Durante la autofagia una membrana en forma de copa se va formando, envolviendo componentes citoplasmáticos. Un complejo PI3K (fosfatidilinositol-3 kinasa) clase III que consiste en, al menos, las proteínas Beclina 1, PIK3C3, PIK3R4, UVRAG y AMBRA es necesario para la formación de esta membrana. La forma citosólica de la proteína LC3 (LC3-I) sufre proteólisis y lipidación, convirtiéndose en LC3-II y translocando desde el citoplasma a la membrana, anclándose vía una fosfoetanolamina (PE). El aumento de LC3-II se utiliza como un marcador específico de autofagia [Kabeya Y y col., 2000; Klionsky DJ y col., 2007]. Esta membrana se fusiona completamente encerrando el contenido citoplasmático y formando una vesícula de doble membrana llamada autofagosoma [Mizushima N y col., 2002; Wang CW y col., 2003]. Aún no se conoce

el origen de la membrana del autofagosoma, aunque estudios recientes sugieren que podría derivar del retículo endoplásmico (RE) [Axe EL y col., 2008]. Luego la membrana externa del autofagosoma se fusiona al lisosoma, la membrana interna del autofagosoma junto con todo el contenido son degradados por las enzimas lisosomales y las macromoléculas resultantes son recicladas. La vesícula resultante de la fusión del autofagosoma con el lisosoma es llamada autolisosoma.

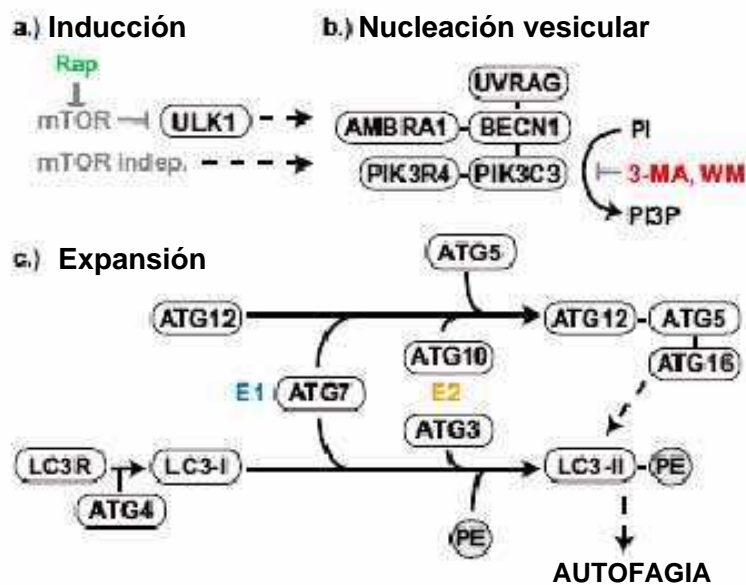


Proceso de autofagia

El autofagosoma también puede fusionarse con cuerpos multivesiculares y endosomas tempranos o tardíos antes de unirse al lisosoma. Todavía no ha sido aclarado si es posible la fusión directa del autofagosoma con el lisosoma, o si previamente los endosomas deben aportar enzimas esenciales para la maduración del autofagosoma, ya que el contenido del autofagosoma posee inicialmente el mismo pH del citoplasma y luego se va acidificando durante su maduración [Punnonen EL y col., 1992, Tanaka Y y col., 2000]. Se sabe que al menos 12 proteínas relacionadas con la autofagia (ATG, autophagy-related) y otras 4 proteínas están involucradas en los pasos de iniciación y ejecución del proceso de autofagia [Klionsky DJ, 2004b; Klionsky DJ y col., 2003]. La formación del autofagosoma parece seguir diferentes pasos que se

encuentran conservados entre las especies. La mayoría de los descubrimientos se realizaron en levaduras.

La inducción de autofagia puede ser dependiente o independiente de la vía de la proteína mTOR (blanco de rapamicina de mamíferos), la cual induce la nucleación y expansión de la membrana de aislamiento. La rapamicina inhibe mTOR e induce la autofagia, mientras que los inhibidores de la PI3K, como 3-metiladenina y wortmanina, inhiben la autofagia. Una vez inducida la autofagia se forma un complejo multiproteico alrededor de Beclina 1 con actividad de PI3K, la cual es importante para la formación de la membrana del autofagosoma. Dos complejos modificadores son esenciales para la autofagia. En primer lugar ATG12 es activada por ATG7, transferida a ATG10 y conjugada con ATG5 para finalmente formar un complejo con ATG16. Este paso es necesario para la formación de la membrana de aislamiento. Por otro lado, la proteína LC3 es clivada por ATG4, activada por ATG7, transferida a ATG3 y conjugada al fosfolípido fosfoetanolamina. Esta forma se conoce como LC3-II, se localiza en la membrana del autofagosoma y luego es degradada en el lisosoma.



Jaeger PA y col., Mol Neurodegener. 2009

Formación del autofagosoma

Puesto que la autofagia desempeña un rol clave en la homeostasis celular, varias vías de señalización están implicadas en su regulación. El conocimiento de estas vías de regulación ha sido establecido principalmente en levaduras, por lo tanto no todo puede ser trasladado a células de mamíferos [Botti J y col., 2006; Kadowaki M y col., 2006; Meijer AJ y col., 2006]. Uno de los reguladores claves de la autofagia es el nivel de aminoácidos, tanto extracelular como intracelular. Las células pueden censar el nivel de aminoácidos a través de la proteína kinasa EIF2AK4. Bajos niveles de RNA de transferencia activan la autofagia por la fosforilación del factor eIF2 α [Talloczy Z y col., 2002]. Los niveles de aminoácidos extracelulares son censados por un receptor putativo en la membrana celular [Kanzawa T y col., 2003] el cual parece señalar a través de mTOR. Esta es una proteína kinasa que juega un rol central en el censado de nutrientes, la proliferación y metabolismo celular [Corradetti MN y col., 2006; Blommaert EF y col., 1995; Noda T y col., 1998]. La activación de mTOR promueve la síntesis de proteínas e inhibe la autofagia mediante la fosforilación de ULK1 (proteína que se une a ATG13), mientras que la inhibición de mTOR estimula la autofagia [Pattingre S y col., 2008]. La insulina y los factores de crecimiento activan a mTOR a través de Akt [Corradetti MN y col., 2006; Young JE y col., 2008] e inhiben la autofagia, mientras que condiciones de baja energía [Inoki K y col., 2003], o de alta concentración de calcio intracelular [Hoyer-Hansen M y col., 2007] inhiben a mTOR a través de la proteína kinasa activada por AMP (AMPK) y, por lo tanto, activan la autofagia. Otras cascadas de señalización implicadas en la regulación de la autofagia incluyen las vías Ras/Raf y ERK, las cuales son mTOR dependiente o independiente [Furuta S y col., 2004], y la vía de inositol, la cual es mTOR independiente [Criollo A y col., 2007; Sarkar S y col., 2005].

Poco se sabe sobre el control transcripcional de la autofagia, sin embargo varios factores de transcripción importantes han sido asociados con la regulación de los genes de autofagia. En un estudio se identificó un sitio de unión en el promotor de Beclina 1 para el factor de transcripción E2F4. En algunos tipos celulares se determinó que el factor de transcripción FOXO3 se une directamente a los promotores de los genes *LC3*, *ATG12* y *GABARAP*, aumentando su expresión e induciendo autofagia [Mammucari C y col., 2007]. También se determinó que FOXO3 aumenta la expresión de *ATG4*, *PIK3C3* y Beclina 1, pero aún no se conoce el mecanismo involucrado [Zhao J y col., 2007]. Miembros de la familia de p53 también juegan un rol importante en el control de la autofagia. p53 citosólica inhibe la autofagia mientras que p53 nuclear la activa [Tasdemir E y col., 2008; Crighton D y col., 2006]. La localización de p53 parece ser un censor para el estrés genotóxico. Además, p53 actúa río arriba de mTOR inhibiendo su actividad a través de AMPK y, por lo tanto, induciendo autofagia. Recientemente ha sido descrito que p73, un homólogo de p53, se une a las regiones reguladoras de varios genes de autofagia (*Atg5*, *Atg7*, *UVRAG*, *GABARAP*, *AMBRA1*, *Atg16*, *PIK3C3*) [Rosenbluth JM y col., 2008; Rosenbluth JM y col., 2009].

Numerosos trabajos describen a la autofagia como un mecanismo de muerte celular [Yu L y col., 2004; Pattingre S y col., 2006; Hara T, 2006]. La muerte celular por autofagia también tiene lugar en células en las que la apoptosis fue bloqueada mediante el uso de inhibidores [Mills KR y col., 2004]. Por otro lado se describió que ante una injuria oxidativa, la célula utiliza la autofagia para remover la mitocondria dañada y el DNA mitocondrial mutado [Rodríguez-Enriquez S y col., 2004]. En consecuencia, la autofagia podría no sólo ser una causa de muerte celular, sino que podría también preceder a la apoptosis como un mecanismo de defensa.

Mediante estudios mayoritariamente morfológicos, la autofagia ha sido relacionada también con procesos patológicos como enfermedades neurodegenerativas, pancreatitis y cáncer. Aún no está claro si la autofagia protege o causa la enfermedad [Shintani T, 2004]. Los primeros estudios sobre autofagia en tejido humano aparecieron durante la década del 70 del siglo pasado, y la autofagia fue descrita en páncreas con pancreatitis en 1989 [Willemer G, 1989]. En efecto, la pancreatitis aguda fue uno de los primeros procesos patológicos en los que se describieron cambios morfológicos característicos de autofagia. Paradójicamente, la autofagia puede constituir un mecanismo de defensa, y proteger a la célula de la muerte ante una enfermedad aguda como la pancreatitis o, por el contrario, contribuir al daño causado por la misma.

APOPTOSIS

Los conocimientos que teníamos hasta hace muy poco permitían dividir a la muerte celular inducida por procesos patológicos en dos clases principales, apoptosis y necrosis. La necrosis ha sido pensada tradicionalmente como una forma pasiva de muerte celular. Siempre se consideró a la necrosis como el resultado final de una catástrofe bioenergética, que resulta de la depleción de ATP a niveles incompatibles con la vida celular y se caracteriza también por la inducción de inflamación local. Pero nuevas evidencias sugieren que, como en la apoptosis, hay genes específicos involucrados en la regulación de la muerte celular por necrosis [Golstein P y col., 2007; Festjens N y col., 2006]. Ha sido difícil caracterizar los reguladores esenciales de la necrosis en ausencia de apoptosis. La mayor parte de la literatura describiendo la muerte por necrosis consiste de experimentos hechos en líneas celulares sometidas a

muerte por ligando [Eguchi Y y col., 1997; Goossens V y col., 1995; Boone E y col., 2000], o en neuronas sometidas a glutamato o hipoxia-isquemia [Ankarcrona M y col., 1995; Zhu C y col; 2005].

La apoptosis se ha utilizado como sinónimo de la expresión “muerte celular programada”, desde el momento en que constituye un mecanismo intrínseco de suicidio celular, el que es regulado por una variedad de caminos de señalización intracelular. Conocemos ahora a la apoptosis como muerte celular programada tipo I. Las características morfológicas de la apoptosis son la condensación del citoplasma y la cromatina, la fragmentación del DNA y la fragmentación de la célula formando cuerpos apoptóticos, seguido de la remoción de los mismos por fagocitosis. La muerte celular por apoptosis requiere energía en forma de ATP y es notable la ausencia de inflamación local [Danial NN y col., 2004].

Un evento temprano en el proceso apoptótico es la externalización de la fosfatidilserina. Normalmente este fosfolípido se encuentra en la cara interna de la membrana plasmática y es expuesto en la cara externa de dicha membrana cuando comienza el proceso de apoptosis. La anexina-V es una proteína que se une específicamente a la fosfatidilserina y puede ser utilizada, unida a un sustrato fluorescente, para su detección. Más avanzado el proceso, los estímulos inductores de apoptosis convergen hacia un punto común que implica la activación de las caspasas [Alnemri ES, 1997], verdaderos ejecutores del programa de muerte y responsables de los cambios morfológicos y bioquímicos que se producen en la célula. Las caspasas constituyen una familia de cisteína-proteasas altamente conservadas a lo largo de la evolución que producen cortes proteolíticos tras un residuo de ácido aspártico [Earnshaw WC y col., 1999]. Actualmente, se han descrito hasta 14 miembros de la familia. La síntesis de caspasas da lugar a un enzima inactiva, o proenzima, llamada

procaspasa. En la estructura de esta procaspasa se distingue una región N-terminal muy variable tanto en secuencia como en longitud, que tiene funciones de regulación y activación, y una región catalítica que está formada por dos dominios, uno grande y otro pequeño, los cuales darán lugar a las dos subunidades de la enzima una vez activada [Stennicke HR y col., 1998]. Las señales apoptóticas provocan que estas enzimas sean procesadas por autoproteólisis o por la intervención de otras proteasas, cortando el prodominio. De esta forma, el prodominio se pierde y la enzima activa queda formada por un heterodímero compuesto por la subunidad grande y la subunidad pequeña. Dentro del subgrupo de caspasas apoptóticas pueden distinguirse las caspasa iniciadoras y las caspasas efectoras. Las caspasas iniciadoras son aquellas que inician la cascada apoptótica (caspasas 8, 9 y 10). Las caspasas 8 y 10 contienen en sus prodominios repeticiones de una secuencia de interacción proteína-proteína llamada dominio efector de muerte o DED (*death effector domain*); mientras que la procaspasa 9 contiene dominios de reclutamiento de caspasas o CARDS (*caspase recruitment domains*) [Hofmann K, 1999]. Las caspasas efectoras son las que ejecutan la apoptosis (caspasas 3, 6 y 7). En la cascada de amplificación de la señal apoptótica las caspasas efectoras son activadas por alguna de las caspasas iniciadoras. Una vez activadas actúan proteolíticamente sobre una gran variedad de sustratos celulares, que son procesados de manera coordinada con la finalidad de hacerles perder su función o modificársela, de tal manera que la organización celular resulte desmantelada. El mecanismo de acción de su función enzimática es muy específico y eficaz. Cortan después de un residuo de aspártico, cuando existe en el sustrato una secuencia de reconocimiento, que varía significativamente entre las diferentes caspasas, compuesta por cuatro aminoácidos [Pop C y col., 2009].

El inicio de la señal de apoptosis puede encontrarse tanto fuera de la célula, en los receptores de superficie, como dentro de ella respondiendo a estímulos de estrés

celular a nivel de mitocondria o a disfunciones dentro del ciclo celular. De esta forma, se distinguen dos vías principales de inducción de apoptosis.

Vía extrínseca o vía de los receptores de muerte

Cuando el estímulo apoptótico proviene del exterior celular, se habla de vía extrínseca. Esta vía se desencadena por unión de determinados ligandos a receptores integrales de la membrana citoplasmática y resulta en la activación de la procaspasa 8. Tras la unión del ligando se producen cambios conformacionales en las colas citoplasmáticas de los receptores de membrana, y se unen a ellas diferentes proteínas mediante su dominio de interacción proteína-proteína. El reclutamiento de la procaspasa 8 mediante la participación también de proteínas adaptadoras como TRADD o FADD dispara el autoprosesamiento de la procaspasa inducido por proximidad. El complejo proteico formado en este punto se denomina DISC (*death-inducing signaling complex*). Los principales receptores, que al ser estimulados inducen la activación de la cascada de señales que conduce a la apoptosis, pertenecen a la superfamilia de los receptores del Factor de Necrosis Tumoral (TNF), cuyos miembros tienen en común un dominio extracelular rico en cisteína y una secuencia en el dominio intracitoplasmático que servirá para acoplar al receptor con el resto de la maquinaria apoptótica [Jin Z y col., 2005]. Los receptores mejor caracterizados son la molécula Fas (CD95) y los receptores del TNF (TNFR). Fas se expresa de forma bastante general en distintos tejidos y ha sido detectada en células epiteliales, fibroblastos, osteoblastos y ciertos tipos de células endoteliales. Por su parte, el ligando de Fas (FasL o CD95L) se expresa predominantemente en células T y NK activadas, lo cual demuestra su implicación en procesos fisiológicos relacionados con el sistema inmune. El receptor 1 de TNF es una proteína que se expresa en la mayoría de los tipos celulares y su ligando es el TNF, una citoquina producida principalmente por macrófagos activados y células T en respuesta a una infección. A diferencia de la pareja formada por

Fas/FasL, el par TNFR1/TNF es capaz de transmitir a la célula dos tipos de señales muy distintas entre sí: inducción de genes con carácter proinflamatorio e inmunomodulador y apoptosis [Wallach D y col., 2008].

Vía intrínseca o vía mitocondrial

La activación intrínseca de las procaspasas implica la liberación del citocromo c del espacio intermembrana mitocondrial al citosol de la célula, y resulta en la activación de la procaspasa 9. En líneas generales, el estímulo intracelular provoca que la proteína Bcl-2, la cual se encuentra en la membrana externa de las mitocondrias unida a la proteína Apaf-1, libere dicha proteína al citoplasma. Al mismo tiempo, otra proteína relacionada, denominada Bax, penetra en las membranas mitocondriales y provoca la liberación del citocromo c al citoplasma. El citocromo c liberado y las moléculas de Apaf-1 se unen a la procaspasa 9 y junto con ATP constituyen un complejo proteico denominado apoptosoma. En el apoptosoma se produce la activación de la procaspasa 9 que luego cliva a la procaspasa 3 y 7, desencadenándose la cascada apoptótica. Cabe destacar que todas las vías señalizadoras de apoptosis pueden interaccionar entre sí en gran medida. De este modo, se ha visto que en numerosos tipos celulares la activación de la apoptosis por la vía extrínseca puede resultar también en la activación de la procaspasa 9, amplificando la señal apoptótica [Denecker y col., 2001; Kidd y col., 2000]. A su vez, las caspasas finales efectoras también pueden procesar de nuevo a las caspasas iniciadoras para amplificar la señal.

AUTOFAGIA Y APOPTOSIS

En los últimos años, la muerte por autofagia ha sido caracterizada como muerte celular programada tipo II. La autofagia puede en algunos casos jugar un rol citoprotectivo, mientras que en otros puede llevar a la muerte celular. Todavía no se conoce que determina la respuesta final de la autofagia, por ejemplo la autofagia protege del ayuno a las células de carcinoma de cérvix HeLa, pero contribuye a la muerte bajo el tratamiento con interferón- γ [Boya P y col., 2005; Pyo JO y col., 2005]. El tratamiento con tunicamicina, que induce autofagia, aumenta la sobrevivencia de células de cáncer de colon, pero contribuye a la muerte en fibroblastos de embrión de ratón [Ding WX y col., 2006]. El tipo de muerte por apoptosis o por autofagia depende en parte del tipo celular, del contexto y del estímulo [Levine B y col., 2005; Maiuri MC y col., 2007]. Este rol dual de la autofagia es en parte el resultado de una relación compleja entre las vías de autofagia y apoptosis.

En distintos estudios se observan diferencias en cuanto a la función de la autofagia, en algunos casos se propone como un mecanismo que protege de la apoptosis, en otros que actúa como una vía alternativa a la apoptosis para inducir la muerte celular y por último que actúa en conjunto con la apoptosis llevando a la muerte celular [Maiuri MC y col., 2007; Yousefi S y col., 2006; Gonzalez-Polo RA y col., 2005; Boya P y col., 2005]. La relación funcional entre la apoptosis y la autofagia es compleja en el sentido que, en muchas ocasiones la autofagia constituye un mecanismo de adaptación al estrés evitando la muerte celular, mientras que en otros, la autofagia constituye un camino alternativo de muerte celular llamado muerte celular por autofagia (o muerte celular tipo II) [Lum JJ y col., 2005; Baehrecke EH y col., 2005; Levine B y col., 2005; Kroemer G y col., 2005; Kondo Y y col., 2005; Gozuacik D y col., 2007; Lockshin RA y

col., 2001]. Al parecer estímulos similares pueden desarrollar autofagia y apoptosis como un fenotipo mixto, mientras que en otros casos pueden producir apoptosis o autofagia exclusivamente.

La autofagia cuando la apoptosis es inhibida

Bax y Bak son 2 proteínas multidominio pertenecientes a la familia de Bcl-2, que son necesarias para la permeabilización de la membrana externa mitocondrial (MOMP), uno de los pasos decisivos de la muerte por apoptosis (BOX 2). Como resultado del doble knockout *Bax*^{-/-} *Bak*^{-/-} los fibroblastos de embrión de ratón (MEFs) son resistentes a un rango de inducción de apoptosis. Cuando son tratados con agentes que dañan el DNA como el etopósido, las MEFs *Bax*^{-/-} *Bak*^{-/-} fallan en la activación de la apoptosis y manifiestan autofagia masiva seguida de muerte celular [Shimizu S y col., 2004]. En otros contextos celulares, otras perturbaciones en la maquinaria de la apoptosis, como la inhibición de caspasas, también ha sido reportada de inducir la muerte por autofagia. Notablemente, cuando las células son expuestas a señales de estrés que causan la disminución de la concentración de metabolitos intracelulares, la autofagia que surge de la inhibición de la apoptosis protege a la célula de la muerte celular. Estos resultados fueron demostrados en líneas celulares inmortalizadas dependientes de interleuquina 3 (IL3) noqueadas para *Bax*^{-/-} *Bak*^{-/-}. Estas células fallan en la inducción de apoptosis cuando se las priva de IL3 (el cual es la vía por *default* en las células *wild type*) y comienzan un proceso de autofagia que dura un mes, donde las células reducen su tamaño y remueven la mayor parte del citoplasma. La inhibición de la autofagia por *knockdown* de *Atg5* o *Atg7* o por el agregado de 3-MA o cloroquina mata a las células, lo cual indica que en este contexto la autofagia estaría actuando como un mecanismo de supervivencia [Lum JJ y col., 2005a; Lum JJ y col., 2005b]. La autofagia en este contexto celular es un proceso catabólico que moviliza nutrientes por la degradación de macromoléculas para proveer a la célula de energía,

y de esta forma previene una catástrofe bioenergética que podría llevar a la muerte celular. Todos estos datos sugieren que la remoción o la inhibición funcional de proteínas esenciales de la maquinaria apoptótica pueden inhibir la autofagia o cambiar de una respuesta apoptótica a una de aumento de la autofagia. Sin embargo existen otros ejemplos en donde la apoptosis solo se desencadena cuando la autofagia es inhibida, lo cual implica que según el contexto en el que se desarrollen ambos procesos podrían inhibirse mutuamente.

La apoptosis cuando la autofagia es inhibida

Cuando las células de cáncer HeLa o HCT116 son cultivadas en ausencia de nutrientes, rápidamente inducen autofagia con el fin de reciclar metabolitos esenciales, como lípidos y aminoácidos, para proveer de combustible a la maquinaria bioenergética. En estas circunstancias, la inhibición de la autofagia resulta en una muerte celular acelerada donde se manifiestan marcas específicas de apoptosis [Gonzalez-Polo RA y col., 2005]. Esta muerte celular puede ser retrasada por un periodo de tiempo si se depleta a las células de Bax y Bak o por la inhibición de caspasas, indicando que se debe a la muerte por apoptosis. El fenotipo de las células antes de disparar la apoptosis está profundamente influenciado por el paso en el cual la autofagia esta inhibida. Cuando la autofagia esta bloqueada en estadios tempranos por depleción de Beclina 1, ATG5, ATG10, ATG12 o VPS34, no se observan vacuolas autofágicas y la morfología observada es de muerte celular tipo I. En contraste, cuando se inhibe la fusión entre los lisosomas y los autofagosomas, por el agregado de inhibidores lisosomales como cloroquina o bafilomicina A o por la depleción de proteínas del lisosoma como LAMP2, las vacuolas autofágicas se acumulan y la célula manifiesta una morfología mixta de muerte tipo I y tipo II [Gonzalez-Polo RA y col., 2005,; Boya P y col., 2005]. Estos resultados demuestran que la inhibición de la autofagia en diferentes estadios puede llevar a la muerte por apoptosis. Además, la

vacuolización autofágica no es siempre el resultado del aumento de la autofagia si no que también puede deberse a la falla en la eliminación del *debris* autofágico. Es necesario aclarar que la inhibición de la autofagia no siempre induce la muerte por apoptosis, y por lo tanto otros tipos de muerte celular pueden resultar de la inhibición de la autofagia [Golstein P y col., 2007].

Muerte celular mediada por autofagia

La autofagia puede proteger a la célula de la muerte y también puede llevar a la muerte celular, dependiendo de las circunstancias específicas. La citotoxicidad puede ser explicada por la acción directa de la autofagia o porque el proceso autofágico lleva a la activación de la apoptosis. La muerte celular a través de la autofagia ha sido documentada en modelos *in vivo*. En la glándula salivar de *D. Melanogaster* el fenotipo autofágico es seguido de la fragmentación de DNA apoptótico. En este modelo la expresión del inhibidor de caspasa p35 o la pérdida de función por mutación de una caspasa (*drice*) o APAF1 (*ark*) previene parcialmente la pérdida celular. Esto sugiere que, aún cuando la apoptosis es parte del mecanismo a través del cual la célula es destruida, la autofagia también puede mediar la muerte celular como un mecanismo efector genuino [Baehrecke EH y col., 2005; Martin DN y col., 2004]. En estudios más recientes se observó que la sobreexpresión de ATG1 en *D. Melanogaster* transgénica causa una reducción del tamaño celular y, finalmente, la pérdida celular, la cual fue bloqueada por la delección de *Atg3* o *Atg8*. En este sistema, la pérdida celular fue acompañada de morfología apoptótica y fue retrasada por la expresión de p53 [Scott RC y col., 2007]. Por otro lado, la autofagia se desarrolla como una respuesta primaria al estímulo de estrés y luego gatilla apoptosis o necrosis. Por ejemplo células T expresando CD4/CXCR4 que interactúan con células que expresan HIV-1 desarrollan autofagia y luego apoptosis. En este modelo la depleción de Beclina 1 o ATG7 inhibe la apoptosis [Espert L y col., 2006].

AUTOFAGIA Y CÁNCER

En el cáncer, el proceso de autofagia está comúnmente alterado en la inducción, la regulación y la degradación lisosomal. Esto se debe a que los bajos niveles de oxígeno y nutrientes aumentan las señales autofágicas, las alteraciones genéticas que afectan la regulación de mTOR y la modificación de la actividad y el tráfico de lisosomas [Mathew R y col., 2007a; Gozuacik D y col., 2004]. Así, se produce un incremento de la autofagia para proveer de energía a la célula en ese ambiente desfavorable. Numerosos estudios describen la autofagia como un mecanismo esencial que provee a la célula tumoral de nutrientes, por lo cual la autofagia serviría para mantener la viabilidad de células tumorales bajo estrés metabólico [Boya P y col., 2005; Lum JJ y col., 2005a]. Paradójicamente la autofagia también ha sido descrita como un mecanismo supresor de tumor. Estudios recientes sugieren que el aumento de la supervivencia y la capacidad de adaptación de las células por medio de la autofagia podrían suprimir la tumorigénesis. Asimismo la autofagia disminuye la lisis celular, inhibiendo la respuesta inflamatoria y limitando la agresividad del tumor [Degenhardt K y col., 2006; Karin M y col., 2005]. El rol de la autofagia en la salud y la enfermedad ha sido descrito como una espada de doble filo, debido a que se encuentra relacionada tanto en la supervivencia como en la muerte celular [Shintani T y col., 2004]. Esta decisión depende del estado de la carcinogénesis, del contexto célula/tejido, de las características moleculares de la célula blanco y de la naturaleza del estrés [Ogier-Denis E y col., 2003].

La autofagia y la supervivencia del cáncer

La autofagia como una forma de mantener la síntesis de macromoléculas y la producción de ATP puede ser vista como un importante mecanismo de supervivencia en las células normales y cancerosas. Esto puede ocurrir en una amplia variedad de

condiciones, por ejemplo cuando las células están limitadas en sus abastecimientos de glucosa y nutrientes, cuando la señalización de factores de crecimiento está comprometida, o cuando hay un gran incremento de las necesidades metabólicas [Levine B y col., 2008]. Su contribución como un mecanismo de supervivencia es particularmente evidente en células deficientes de apoptosis que son privadas de factores de crecimiento [Lum JJ y col., 2005a]. Como estrategia de supervivencia, ha sido propuesto que bajos niveles de autofagia podrían ser necesarios para la iniciación del tumor [Edinger A y col., 2004]. De acuerdo con este concepto, grupos emergentes de células transformadas podrían utilizar la autofagia como una estrategia de supervivencia temporal previa al reclutamiento de neovasculatura. Los tumores sólidos pueden tomar ventaja de la autofagia para sobrevivir cuando afrontan estrés metabólico, como en situaciones de hipoxia debido a la pobre vascularización. De hecho, ha sido propuesto que la sobreactivación del camino de Ras, característica de varios tipos de cáncer, podría gatillar la autofagia como una estrategia de supervivencia de las células de cáncer pertenecientes a la parte interna del tumor, hasta que la neoangiogenesis pueda proveer mayor cantidad de nutrientes [Kang C y col., 2008]. Una evidencia adicional sobre el rol de supervivencia de la autofagia proviene de estudios en los cuales genes *Atg* han sido knockeados, observándose un aumento en otras formas de muerte. Por ejemplo, el silenciamiento de un gen de autofagia, como Beclina 1 o *Atg5*, ha sido reportado como activador de la muerte celular por apoptosis inducida por estrés o ayuno en células HeLa. Esto sugiere que la autofagia está demorando la muerte mediada por otros mecanismos de muerte, y que existe una interacción cruzada entre la muerte celular tipo I y tipo II [Boya P y col., 2005]. También debe considerarse que la remoción autofágica de organelas dañadas y proteínas, como aquellas producidas durante condiciones de estrés oxidativo, podría ser otra estrategia protectora de las células de cáncer para evitar el daño al DNA y consecuentemente la inestabilidad genómica [Jin S y col., 2007]. Con respecto a esto, la autofagia es estimulada en

tumores durante la exposición a radiaciones ionizantes y agentes quimioterapéuticos [Paglin S y col., 2001; Moretti L y col., 2007a; Kondo Y y col., 2005; Rubinsztein D y col., 2006; Kondo Y y col., 2006; Pouyssegur J y col., 2006; Arsham A y col., 2006]. De igual modo se ha sugerido que la autofagia puede proteger a las células de cáncer de las consecuencias fatales de la excesiva necrosis e inflamación que prosigue a la acumulación de desechos celulares [Mathew R y col., 2007b, Jin S y col., 2007].

La autofagia y la supresión del cáncer

Sin embargo también existe evidencia de que la autofagia esta asociada con la supresión del cáncer [Alva A y col., 2004]. Por ejemplo, la degradación excesiva de constituyentes intracelulares es una característica de la autofagia que podría en última instancia llevar a la muerte celular [Rubinsztein D y col 2006]. Sin embargo, existe evidencia que, quizás bajo ciertas condiciones, la autofagia actúa principalmente como una muerte celular programada de tipo II, que es importante para la supresión del tumor, antes que como una respuesta de sobrevida celular prolongada y sobreactivada que resulta fatal.

La apoptosis defectiva es una condición celular anormal en la cual la consecuencia de la autofagia defectuosa puede ser particularmente evidente. Por ejemplo, el silenciamiento de genes de la autofagia en células deficiente de apoptosis tratadas con agentes que dañan el DNA bloquea la muerte celular esperada. Además, una falla de la autofagia en el contexto de una apoptosis defectiva podría crear un ambiente propicio para el daño la integridad genómica y el desarrollo de un fenotipo mutante, debido a deficiencias en la eliminación de macromoléculas celulares dañadas [Mathew R y col., 2007b y 2007c; Karantza-Wadsworth V y col., 2007]. Asimismo, como consecuencia de la inhibición de las caspasas necesarias para la apoptosis en fibroblastos de ratón L929 se observó la degradación selectiva de catalasa, acumulación de ROS, pérdida de la integridad de membrana y en última instancia la

muerte asociada a la autofagia. Estos cambios, sin embargo, fueron prevenidos mediante la supresión de la autofagia por inhibidores químicos o por *knockout* de proteínas de la autofagia [Levine B y col., 2005; Yu L y col., 2004]. Esta respuesta a la inhibición de las caspasas no ha sido reportada en otras células y es necesario un estudio mas profundo.

Aún en células capaces de realizar apoptosis, la autofagia puede ser una contribución esencial a la muerte de la células [Pyo J y col., 2005; Guillon-Munos A y col., 2006]. De hecho, la sobreexpresión del gen de autofagia *Atg1* es suficiente para inducir la muerte en células de *Drosophila* capaces de realizar apoptosis [Scott R y col., 2007]. Además, la autofagia, a través de su capacidad de incrementar la producción de ATP, es necesaria para la eliminación de los cuerpos celulares apoptóticos durante el desarrollo embrionario [Qu X y col., 2007]. El requerimiento de genes de la autofagia en el proceso de eliminación de cuerpos celulares apoptóticos se evidencia en las señales dependiente de autofagia que inducen la eliminación de células para generar cavidades [Qu X y col., 2007; Yoshimori T, 2007]. Existen trabajos que describen como la interferencia de la autofagia o la apoptosis en la formación de células humanas de acino de mama, puede llevar al llenado del espacio luminal, lo que recuerda a la hiperplasia (lesiones de mama precancerosas) [Mills K y col., 2004; Nelson D y col., 2004].

La función de la autofagia como supresora del cáncer es respaldada por modelos de tumores animales inducidos por diferentes químicos, uno de los cuales incluye un ratón *knockout* para *atg4*. Gozuacik demuestra en un modelo de cáncer de hígado inducido químicamente que las lesiones pre-neoplásicas y los carcinomas de hígado poseen menor capacidad autofágica que el hígado sin lesiones neoplásicas [Gozuacik A y col., 2004]. Durante condiciones de estrés de nutrientes, una variedad de líneas celulares transformadas muestran una tasa menor de degradación de proteínas, un indicador de autofagia reducida, comparada con las células no transformadas. En otro

estudio de cáncer de hígado, un escenario propuesto por Schwarze y Seglen consiste en que la disminución de la autofagia en los hepatocitos pre-neoplásicos provee una ventaja para la supervivencia, previniendo la pérdida excesiva de proteínas durante situaciones de bajos nutrientes o fluctuaciones en los niveles de nutrientes y, por lo tanto, asegurándose reservas celulares para continuar su crecimiento durante los periodos subsiguientes de progresión neoplásica [Schwarze P y col., 1985; Seglen P y col., 1986]. En un modelo de cáncer pancreático los trabajos de Rez G y Toth S coinciden en que la capacidad autofágica de las lesiones pre-neoplásicas es mayor que en las lesiones pancreáticas que se transforman en malignas [Rez G y col., 1999; Toth S y col., 2002]. En otro modelo, en ratones knockout para *atg4* y tratados con el carcinogénico metilcolantreno la incidencia de fibrosarcoma es mayor, y la latencia mucho mas corta, que en los ratones tratados *wild type* [Marino G y col., 2007]. Estos resultados son atribuibles a la menor capacidad de los ratones *knockout* para poner en marcha una respuesta autofágica ante las condiciones de estrés inducidas por el carcinógeno. En humanos el rol de la autofagia en la tumorigénesis ha sido sugerido por la asociación de la pérdida de un alelo de Beclina 1 con cáncer de ovario, mama y próstata [Yue Z y col., 2003].

Colectivamente, estos datos proveen evidencia que la autofagia puede funcionar como un contribuidor primario a la supresión del cáncer pero podría ser especialmente importante en respuesta a un estrés específico o bajo condiciones específicas, como cuando la apoptosis esta comprometida.

Regulación de la autofagia en la supresión y sobrevida del cáncer

Los factores celulares, los genes y las vías de señalización que controlan si la autofagia contribuye a la supresión del cáncer o a su sobrevida y como la autofagia interactúa con los otros mecanismos de muerte celular aun no están bien definidos. Una hipótesis es que la decisión sobre si la autofagia contribuye a la inhibición o

sobrevida del cáncer, depende de la tasa o de la magnitud de la degradación autofágica y de la especificidad del blanco de englobamiento de componentes, por ejemplo mitocondrias y retículo endoplásmico [Kundu M y col., 2005]. A la luz de las observaciones que evidencian que la autofagia celular prolongada y la depleción parcial de masa celular pueden ser revertidas en condiciones de reabastecimiento de nutrientes, puede argumentarse que la muerte celular por autofagia no sería simplemente una cuestión de cruzar un umbral de auto-digestión [Levine B y col., 2008]. Se han identificado varias redes de señalización, algunas involucrando diferentes ATG, que pueden actuar como un *switch* para regular las decisiones de muerte celular [Degenhardt K y col., 2006; Moretti L y col., 2007b]. Ha sido propuesto que el metabolismo de los esfingolípidos, y particularmente la generación de ceramidas específicas, podría jugar un rol importante en mediar la contribución de la autofagia a la muerte celular o la supervivencia. Por ejemplo, C2-ceramida y C2-dihidroceraida exógenas y, presumiblemente, endógenas, son capaces de inducir autofagia y muerte celular en células de cáncer [Scarlati F y col., 2004; Zheng W y col., 2007]. Por otro lado, esfingosina-1-fosfato, frecuentemente considerada un promotor de tumor, puede también inducir autofagia, pero llevando a la supervivencia celular [Lavieu G y col., 2006]. Por lo tanto un nuevo modelo ha sido propuesto, en el cual el metabolismo de esfingolípidos sirve como un sistema de reóstato, con la C2-ceramida promoviendo la muerte celular asociado a la autofagia y la esfingosina-1-fosfato gatillando la supervivencia celular asociada a la autofagia [Lavieu G y col., 2007].

Los niveles relativos de Bcl-2 y Beclina 1 y la unión entre ambos ha sido sugerido como otro mecanismo que determina si la oncogénesis es inhibida o estimulada [Patingre S y col., 2005; Patingre S y col., 2006]. La interacción entre ambos involucra la participación de otros genes como el gen supresor de tumor UVRAG y probablemente otros genes de autofagia y otros miembros de la familia Bcl-2 [Liang C

y col., 2007; Shimizu S y col., 2004; Maiuri M y col., 2007a]. En *Drosophila*, la sobreexpresión de ATG1 es suficiente no solo para inducir autofagia, sino también para matar a células capaces de inducir apoptosis [Scott R y col., 2007]. El rol de ATG1 en autofagia incluye también la participación en las vías de señalización que controlan el crecimiento y modulan la actividad de mTOR [Stephan J y col., 2006].

La interacción cruzada entre apoptosis y autofagia podría ser un importante regulador del destino celular. Por ejemplo, ATG5 ha emergido como otra proteína que participa en la interacción con la maquinaria de apoptosis. ATG5 originalmente fue caracterizada como un interactor de ATG12 en levaduras, formando un complejo que regula el procesamiento de LC3 (ATG8) y la formación del autofagosoma. Ha sido establecido recientemente que ATG5, tras un estímulo de muerte, puede ser clivado por calpaína en un fragmento que luego promueve la apoptosis [Yousefi S y col., 2006; Codogno P y col., 2006, Luo S y col., 2007]. Esta función apoptótica de ATG5 es independiente de la autofagia. Si estas nuevas funciones de ATG1 y ATG5 pueden extenderse a los mamíferos y afectan la tumorigénesis todavía no ha sido establecido. Sin embargo, estos descubrimientos destacan que la autofagia puede ser un regulador importante e independiente de la muerte celular, con un rol en la carcinogénesis que necesita ser mejor caracterizado. Enfatizan este punto los continuos descubrimientos que relacionan la desregulación de otros genes ligados a la pérdida de la capacidad autofágica, como *c-Myc*, *Ras*, *PTEN*, *PI3K*, *Akt* y *DAPK*, con el desarrollo del cáncer [Gozuacik A y col., 2004].

Es necesario aclarar que la decisión de una célula normal o cancerosa de aumentar los niveles de autofagia o apoptosis y entonces incrementar la supervivencia celular o la muerte no es un simple proceso de elección. Estas 2 vías de muerte celular comparten señalización lo cual puede, por un lado, desembocar en la activación conjunta de los 2 procesos, o, por otro lado, activarse en una respuesta de muerte celular mutuamente exclusiva [Maiuri M y col., 2007b]. Además, la promoción de la muerte celular o la

sobrevida depende también en parte de otras vías compensatorias de autofagia, como la autofagia mediada por chaperonas, que podría ser gatillada cuando la macroautofagia esta comprometida [Wang Y y col., 2008]. Por lo tanto, el tipo celular, la naturaleza y magnitud del estrés, los caminos de señalización intracelular activados, el nivel de metabólico de la célula, la integridad de la maquinaria de autofagia y apoptosis y la función clave de oncogenes y genes supresores de tumores contribuyen a la compleja respuesta de autofagia o apoptosis que determina la supervivencia o la muerte celular [Moretti L y col., 2007b; Maiuri M y col., 2007b; Thorburn A y col., 2008].

Modulación de la autofagia por drogas

La inducción de la muerte de células de cáncer por autofagia es un conocido mecanismo de citotoxicidad resultante del tratamiento con una variedad de drogas.

Un ejemplo de esto es el antiestrógeno tamoxifeno, una droga actualmente utilizada clínicamente por sus beneficios terapéuticos, y por ser una importante herramienta en la estrategia de quimioprevención del cáncer de mama. Ha sido informado que el tamoxifeno, en una dosis de 1 $\mu\text{mol/L}$, induce autofagia en células humanas de cáncer de mama MCF-7, generando una respuesta que lleva a la muerte celular [Kondo Y y col., 2005, Bursch W y col., 1996; Bursch W y col., 2000; Petrovski G y col., 2007; Bilir A y col., 2001], aunque también existen trabajos indicando una acción de supervivencia de la autofagia en células tratadas con tamoxifeno [Qadir M y col., 2008]. Interesantemente, la vacuolización autofágica inducida por tamoxifeno parece estar mediada por metabolitos de esfingolípidos, incluida la ceramida [Scarlati F y col., 2004]. El trióxido de arsénico (As_2O_3) puede estimular la muerte asociada a la autofagia y la apoptosis en células malignas de glioma y leucemia, y estos cambios están acompañados por la estimulación de Beclina 1 [Kanzawa T y col., 2003; Qian W y col., 2007]. El inhibidor de tirosina kinasa imatinib, el alcaloide vocamine, el análogo de la vitamina D EB1089 y el quinonoide natural plumbagin, son ejemplos de otros

compuestos citotóxicos que actúan en parte vía la inducción de la muerte celular por autofagia [Ertmer A y col., 2007; Cui Q y col., 2007; DeMasters G y col.; 2006; Meschini S y col., 2007; Kuo P y col., 2006]. Quizás el estimulador de autofagia mejor conocido es la droga rapamicina, un inhibidor de mTORC1. Actualmente se encuentra bajo investigación su uso en varias terapias contra el cáncer [Tsang C y col., 2007].

Algunos agentes que causan daño al DNA como la camptotecina, la temolozamida y el etopósido, también pueden estimular la autofagia [Katayama M y col., 2007; Abedin M y col., 2007]. Es interesante notar que el derivado sintético del ácido retinoico fenretinida, puede estimular la autofagia y la muerte celular en células de cáncer de mama, mientras que en células malignas de glioma el tratamiento con fenretinida permite la supervivencia asociada a la autofagia [Tiwari M y col., 2008; Fazi B y col., 2008]. Por ejemplo en líneas celulares de glioma maligno, la temolozamida y el etopósido llevan a la producción de ATP asociado a la autofagia, que protege a las células de la catástrofe mitótica [Katayama M y col., 2007]. Además, en células de cáncer de mama MCF-7 tratadas con camptotecina, ambos procesos, autofagia y apoptosis, son estimulados [Abedin M y col., 2007]. Por lo tanto, la manipulación de la autofagia podría ser una forma de aumentar la respuesta a los agentes quimioterapéuticos, aunque la especificidad del tumor y la sensibilidad deben ser mejor caracterizadas.

Autofagia y cáncer de páncreas

Es poco lo que se conoce sobre el rol de la autofagia en el cáncer de páncreas, uno de los más agresivos y refractario a los agentes citotóxicos tradicionales y la radioterapia [Warshaw AL y col., 1992; Jaffee EM y col., 2002; Soengass MS y col., 2003]. Algunos resultados revelan que una mayor expresión de LC3-II se asocia a un peor pronóstico [Fujii S y col., 2008], lo cual describe a la autofagia como un proceso que le permite a las células cancerosas sobrevivir en el ambiente tumoral. Por otro lado, ha sido reportado que las células de cáncer de páncreas tienen reducida la autofagia y esto

podría proveer resistencia al tratamiento. Estudios de la inducción de la carcinogénesis en células pancreáticas en modelos animales, mostraron que las células de adenocarcinoma pancreático tienen reducida su capacidad autofágica en comparación con las células pre-malignas [Tóth S y col., 2002]. Otros estudios en líneas celulares de cáncer de páncreas muestran que la expresión de la transglutaminasa de tejido (TG2) confiere protección contra la autofagia. La regulación negativa de TG2 por siRNA o el tratamiento con Rottlerin lleva a la inducción de la autofagia y a la inhibición del crecimiento en las líneas células de cáncer de páncreas [Akar U y col., 2007]. En estos casos la autofagia parecería actuar como un tipo de muerte celular. Estos datos proveen evidencia que la autofagia puede funcionar como un contribuidor primario a la supresión del cáncer, pero podría ser especialmente importante en respuesta a un estrés específico o bajo condiciones específicas.

VMP1 (*Vacuole Membrane Protein 1*)

El estudio de los cambios fenotípicos que la célula acinar pancreática pone en marcha en respuesta a la pancreatitis permitió caracterizar el gen VMP1 (*Vacuole Membrane Protein 1*). La pancreatitis aguda es una condición clínica cuya incidencia se ha incrementado durante los últimos años [Bhatia M, 2004]. En la mayoría de los pacientes la enfermedad es leve, pero alrededor del 25 % de los pacientes sufre de ataques severos y entre el 30 y el 50% muere. A pesar de la importancia de la muerte celular en pancreatitis, se conoce muy poco acerca de los mecanismos involucrados en la misma.

Con el objetivo de caracterizar a nivel molecular el programa de emergencia que las células pancreáticas ponen en marcha en respuesta a la pancreatitis, centramos

nuestra atención en los cambios de la expresión génica de la célula acinar pancreática durante la pancreatitis aguda. VMP1 fue clonada y secuenciada mediante el desarrollo de una biblioteca de cDNA que se sobreexpresan en la pancreatitis experimental inducida por taurocolato en ratas. VMP1 fue elegida por su alta y rápida expresión en respuesta a la pancreatitis aguda experimental. La caracterización posterior de VMP1 determinó que codifica una proteína teórica de 406 aminoácidos con un punto isoeléctrico teórico de 6,28 y un peso molecular teórico de 45,9 kDa. La estructura teórica indica que VMP1 es una proteína transmembrana con 6 dominios hidrofóbicos y en su estructura primaria no se encontró péptido señal.

Altos niveles de mRNA de VMP1 se observan durante el desarrollo en el páncreas de fetos de ratas en el día 19 de gestación y esta expresión permanece elevada hasta el día 11 luego del nacimiento. Luego decrece bruscamente y permanece muy baja hasta el día 23 después del cual ya no se detecta. El mRNA de VMP1 se expresa diferencialmente en órganos de ratas control. Una alta expresión se registra en intestino, riñón, ovario y placenta, y una expresión moderada en hígado, pulmón, estómago, timo, cerebro y testículo. En páncreas y bazo la expresión del mRNA de VMP1 no fue detectada. Durante la pancreatitis aguda experimental la expresión del mRNA de VMP1 solo es afectada en páncreas. La expresión de VMP1 no es exclusiva de la injuria pancreática, ya que una fuerte inducción de VMP1 se observa en ratas sometidas a 30 minutos de isquemia en el riñón. Estudios en líneas celulares Cos7 demostraron que la proteína de fusión VMP1-EGFP se localiza en el área del retículo endoplásmico y el aparato de Golgi. La expresión de esta proteína de fusión promueve la formación de vacuolas citoplasmáticas y VMP1-EGFP se encuentra localizada en la membrana de dichas vacuolas. Un gran número de las células que sobreexpresan esta proteína mueren a las 48 hs [Dusetti NJ y col., 2002].

Estos resultados *in vitro* concuerdan con datos obtenidos *in vivo* en la pancreatitis experimental inducida por L-arginina en ratas. Los resultados del *northern blot* demuestran que VMP1 raramente se expresa en páncreas pero su expresión es fuertemente activada durante la pancreatitis experimental. La expresión del mRNA de VMP1 es máxima a las 24 hs y permanece alta hasta las 48 hs después del tratamiento. La fuerte inducción del mRNA de VMP1 también fue observada en la pancreatitis experimental inducida por Ceruleína a partir de 1 h de tratamiento hasta las 18 hs de duración del estudio. Es interesante notar que en el análisis del *northern blot* se observan 2 transcritos de 1,9 y 2,7 Kb, los cuales serían resultado de splicing alternativo, y ambos se encuentran fuertemente inducidos en el páncreas inflamado. La estructura del páncreas exócrino fue analizada en cortes ultrafinos luego de 24 y 48 hs de la inducción de pancreatitis con L-arginina. A las 24 hs se observan numerosas vacuolas en el citoplasma. Luego de 48 hs se evidencia un daño mayor del tejido exócrino y se observan también vacuolas citoplasmáticas en las células sobrevivientes. La expresión de VMP1, evaluada por hibridación *in situ*, está restringida a las células acinares, no encontrándose señal ni en las células ductales ni en las células del islote. En el tratamiento a 48 hs se observa una fuerte expresión de VMP1 en las células acinares sobrevivientes, indicando que la expresión de VMP1 es parte de la respuesta de la célula acinar a la agresión. El análisis de estos resultados demostró una correlación positiva entre la expresión de VMP1 y la formación de vacuolas en las células acinares *in vivo*. El análisis de la apoptosis mediante la técnica de TUNEL demostró que el tratamiento con L-arginina causa un incremento en el número de células marcadas en relación al control. La expresión máxima de VMP1 a las 24 hs es simultánea con el incremento de las células apoptóticas detectadas por TUNEL. Es posible que las células acinares disparen un mecanismo alternativo frente a la injuria en el cual estaría involucrado la expresión de VMP1 [Vaccaro MI y col., 2003].

Por otro lado la expresión de VMP1 también ha sido relacionada con la capacidad de invasión del cáncer. Se ha determinado que la expresión del mRNA de VMP1 esta disminuida en metástasis de cáncer de riñón comparada con el tumor primario. Esta disminución también se verificó en líneas celulares de cáncer de mama, donde se determinó que las líneas invasivas tienen disminuida la expresión del mRNA de VMP1 con respecto a las líneas no invasivas. Esta función parecería estar relacionada con la unión célula-célula, ya que se ha determinado una co-localización de VMP1 con la proteína de unión estrecha Zonula Occludens-1. Además la regulación negativa de VMP1 resulta en una pérdida de adherencia celular y un incremento de la capacidad invasora en líneas celulares de riñón [Sauermann M y col., 2008]. El análisis conjunto de estos resultados relaciona a VMP1 con la respuesta temprana ante la injuria tisular, con la formación de vacuolas y la muerte celular y, por otro lado, con la invasión y metástasis de células cancerosas.

S100A10 (S100 proteína de unión a calcio A10)

La familia de proteínas S100 se encuentran exclusivamente en vertebrados. Son proteínas ácidas y pequeñas con un tamaño de entre 10 y 12 kDa y constituyen la subfamilia más grande de proteínas con dominio mano-EF de unión a calcio [Schafer B y col., 1996]. Las proteínas S100 fueron identificadas por primera vez por Moore en el año 1965 y tienen entre un 25 y un 65% de identidad a nivel de aminoácidos [Moore B y col., 1965]. Contienen 2 dominios mano-EF flanqueados por residuos hidrofóbicos conservados y separados por una región de unión [Schafer B y col., 1996]. La secuencia de la región de unión y la región C-terminal son las partes que presentan mayor variabilidad. Los miembros de la familia S100 poseen tres características exclusivas. Primero, los 2 dominios mano-EF difieren en secuencia y afinidad al calcio

[Donato R, 1986]. En segundo lugar, forman homodímeros y heterodímeros, lo que indica la capacidad de intercambio dinámico entre las proteínas S100, dependiendo de la población presente en el compartimiento celular. Finalmente, las proteínas S100 se expresan de modo célula y tejido específico. Las proteínas S100 están involucradas en la regulación de diversos procesos como fosforilación de proteínas, crecimiento y movilidad celular, regulación del ciclo celular, transcripción, diferenciación y supervivencia celular [Donato R, 2001].

S100A10 también conocida como p11, pertenece a la familia de proteínas S100 y fue descrita originalmente en un complejo con la proteína anexina A2 [Gerke V y col., 1984; Gerke V y col., 1985; Glenney JR Jr y col., 1985]. Su expresión fue detectada en diversos tipos celulares y tejidos, mostrando una expresión máxima en pulmón, intestino y riñón [Saris CJ y col., 1987; Zokas L y col., 1987]. El promotor de S100A10 carece de TATA box pero presenta varios sitios de unión para factores de transcripción específicos [Harder T y col., 1992, Huang XL y col., 2003]. Una característica única de S100A10 es que contiene mutaciones en los dominios mano-EF haciéndola insensible a la concentración de calcio [Gerke V y col., 1985]. La comparación de la estructura de S100A10 con otras proteínas de la familia S100 en la dos conformación posibles (con unión a calcio o libre de calcio), demostró que la estructura de S100A10 se encuentra permanentemente en la conformación equivalente de unión a calcio [Rety S y col., 1999]. La mayor parte de la proteína se encuentra intracelularmente, en el citosol o en la superficie interna de la membrana plasmática, aunque también se ha descrito en la región extracelular de diferentes tipos celulares, donde se une al activador de plasminógeno tisular [Zobiack N y col., 2003; Kassam G y col., 1998].

La anexina A2 pertenece a la familia de anexinas que comprende diferentes clases de proteínas que unen calcio, y que son capaces de interactuar con fosfolípidos

acídicos de manera calcio dependiente [Gerke V y col., 2005]. El complejo anexina A2-S100A10 es un heterotetrámero, en el cual un dímero central de S100A10 interactúa con 2 anexinas. Mediante la unión con anexina A2, S100A10 puede ser direccionada a membranas. Esto probablemente ocurre en presencia de calcio, puesto que la anexina requiere calcio para la unión a membrana. La expresión de S100A10 parece estar íntimamente ligada a la presencia de anexina A2, probablemente porque S100A10 es bastante inestable y su tiempo de vida medio se incrementa dramáticamente cuando forma el complejo con anexina A2 [Puisieux A y col., 1996]. La unión a membrana del complejo anexina A2-S100A10 está mediada por la anexina A2. Como otras anexinas, esta tiene preferencia por fosfolípidos cargados negativamente, que se encuentran en la cara citosólica de las membranas. Sin embargo la unión a membranas no está igualmente distribuida, encontrándose predominantemente en la membrana plasmática y en los endosomas tempranos [Rescher U y col., 2004a]. En la membrana plasmática la especificidad está dada principalmente por la unión directa del complejo anexina A2-S100A10 al fosfatidilinositol (4,5) bifosfato (PI(4,5)P₂) [Hayes MJ y col., 2004a, Rescher U y col., 2004b]. El complejo es reclutado a dominios ricos en colesterol y PI(4,5)P₂, en donde se producen rearrreglos de actina y reclutamiento de F-actina. Evidencias experimentales sugieren que es el complejo anexina A2-S100A10 el que permite el reclutamiento de F-actina a los dominios ricos en colesterol y (PI(4,5)P₂) [Hayes MJ y col., 2004b].

Hace unos años se han encontrado nuevas interacciones con proteínas de membrana, sugiriendo que S100A10 puede acoplarse en múltiples interacciones que podrían requerir a la anexina A2 solo para la localización en membrana [Rescher U y col., 2008]. Varios trabajos relacionan a la proteína S100A10 con numerosos tipos de tumores. Se ha determinado la sobreexpresión del mRNA S100A10 en estudios de cáncer de páncreas, cáncer de pulmón, linfoma, carcinoma de riñón, meduloblastoma

y cáncer gástrico [Iacobuzio-Donahue CA y col., 2003; Liu J y col., 2008; Lindsey JC y col., 2007; Domoto T y col., 2007; Rust R y col., 2005; Remmelink M y col., 2005]. Aunque se ha determinado la sobreexpresión, aún no se ha dilucidado cuál es su participación en la enfermedad.

Observaciones recientes han cambiado la visión de S100A10 de ser una proteína estructural en el complejo con anexina A2 a ser un regulador activo de varias proteínas de membrana, tales como receptores y canales. Una función potencial en el tráfico de proteínas a la membrana plasmática surgió como hipótesis cuando S100A10 fue identificado en un experimento de doble híbrido como un interactor del canal de sodio Nav1.8 [Okuse K y col., 2002]. Unos meses después Girard y colaboradores reportaron la identificación de S100A10, nuevamente en un experimento de doble híbrido, como un interactor para el canal de potasio TASK1 [Girard C y col., 2002]. S100A10 sería importante para que TASK1 alcance la membrana plasmática. Sin embargo, aunque Renigunta y colaboradores también demostraron la interacción con TASK1, sus resultados contradicen a Girard y proponen que S100A10 actúa como un factor de retención en el retículo endoplásmico en el tráfico de TASK1 [Renigunta V y col., 2006]. Los resultados muestran que al silenciar S100A10 o mutar el sitio de unión de S100A10 en TASK1 aumenta la cantidad de canales en membrana plasmática. Otras evidencias de la participación de S100A10 en la localización de canales en la membrana plasmática fueron provistas por la identificación de la interacción con TRPV5 y TRPV6, ASIC1a y 5-HT1B [van de Graaf SF y col., 2003; Donier E y col., 2005; Svenningsson P y col., 2006]. Los resultados de estos estudios plantean que la unión de S100A10 a un dominio citosólico de proteínas integrales de membrana es necesaria para una eficiente presentación en la membrana y por lo tanto para su actividad.

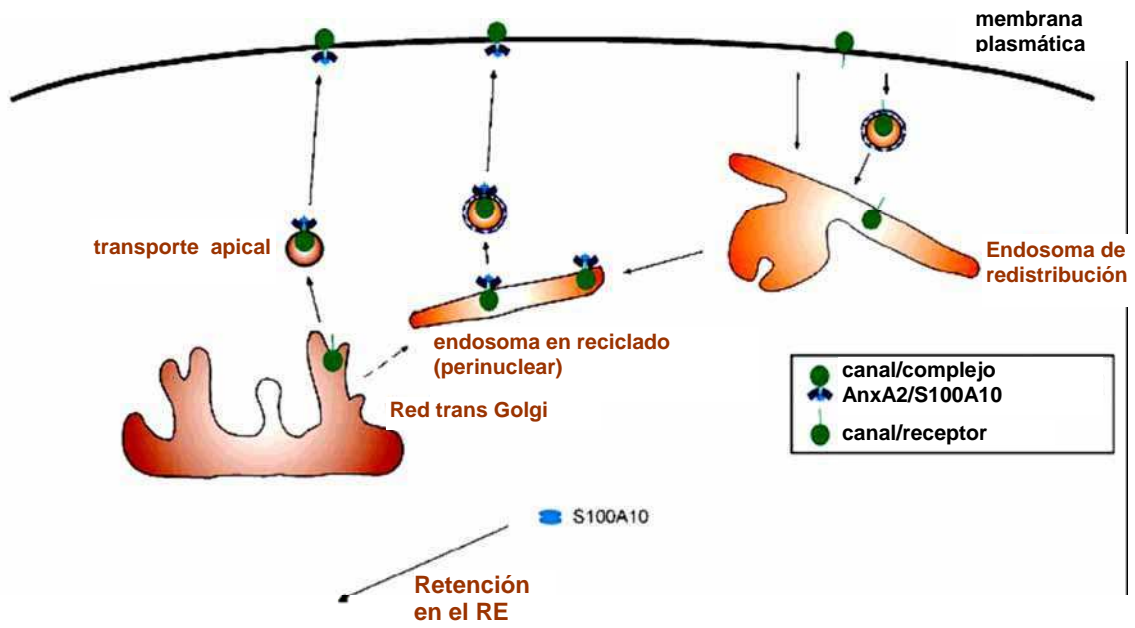
También fueron descritas interacciones con complejos citosólicos y proteínas asociadas a membranas periféricas como AHNAK y NS3 [Benaud C y col., 2004; De Seranno S y col., 2006; Beaton AR y col., 2002]. Aunque la proteína S100A10 no contenga secuencia señal para el retículo endoplásmico, se la ha detectado en la superficie de la membrana plasmática, probablemente con anexina 2, y podría funcionar como un receptor del activador de plasminógeno (tPA) [Kwon M y col., 2005; Deora AB y col., 2004].

También se ha demostrado que S100A10 interacciona con el receptor de serotonina 5-HT1B. Con el objetivo de analizar la relevancia fisiológica de esta interacción, se utilizó un ratón knockout para la proteína S100A10. Los ratones son viables, indicando que S100A10 no es necesario para el desarrollo normal, pero presentan un fenotipo depresivo y muestran una respuesta reducida a la serotonina (agonista del receptor 5-HT1B). Más aún, los ratones responden menos a los antidepresivos, sugiriendo un fuerte rol regulador de la proteína S100A10 sobre la función del receptor y, por lo tanto, su participación en el desorden depresivo [Svenningsson P y col., 2006]. Sin embargo en un estudio reciente no se encontraron evidencias de una relación entre variaciones de la secuencia de S100A10 y desórdenes depresivos mayores recurrentes [Verma R y col., 2007]; aunque por otro lado los niveles y las funciones de S100A10 probablemente están regulados también por otros componentes.

En los casos anteriores, la observación de que la expresión en la membrana plasmática de diferentes canales y proteínas integrales de membrana está afectada por S100A10, permite sugerir que el tráfico de estas proteínas a la membrana plasmática y su remoción parecen estar controlados por S100A10 [Rescher U y col., 2008]. Se han propuesto dos mecanismos diferentes en los cuales no solo se requiere a S100A10, sino también su interacción con anexina A2, para permitir su asociación a membrana plasmática, a endosomas tempranos y endosomas reciclados. Estos

modelos se esquematizan en la figura que se muestra a continuación. El primer modelo plantea que el tiempo de vida media o actividad de la proteína (canal o receptor) en la membrana plasmática se incrementa por la interacción con el complejo anexina A2-S100A10. Esto podría deberse a la unión de anexina A2 a dominios de membrana ricos en colesterol y PI(4,5)P₂. A través de la interacción con S100A10 la proteína de membrana puede ser llevada al dominio de lípidos y este reclutamiento podría afectar la función de la proteína, o estabilizar su asociación a membrana. Es importante destacar que distintas proteínas, canales y receptores, que interaccionan con el complejo anexina A2-S100A10 han sido encontradas en micro dominios ricos en colesterol [Martens JR y col., 2004, Ambudkar IS y col., 2006].

El segundo modelo sugiere que S100A10 afecta directamente el tráfico del canal o receptor. Ya está establecido que la asociación del complejo anexina A2-S100A10 con endosomas muestra un enriquecimiento en Rab11 (marcador de endosomas de reciclado) [Rescher U y col., 2004a]. La depleción de anexina A2 y S100A10 afecta la distribución intracelular y la morfología de los endosomas reciclados, y también tiene impacto en la formación de endosomas multivesiculares [Mayran N y col., 2003; Zobiack N y col., 2003]. Sin embargo, la internalización del receptor en la membrana plasmática no se modifica en células que carecen del complejo. Por lo tanto parece posible que el complejo anexina A2-S100A10 regule la vía de reciclado de endosomas, que es común a los receptores y canales que se unen a S100A10. En este modelo el complejo anexina A2-S100A10 participa del traslado de los endosomas reciclados. Al menos en el caso de TRPV5 y TRPV6 se piensa que los canales pueden ser guardados en compartimientos intracelulares positivos para Rab11, y que la internalización y el traslado hacia la membrana plasmática desde un endosoma desempeñan un importante rol en la regulación de la actividad del canal [van de Graaf SF y col., 2003].



Rescher U, Gerke V. Pflugers Arch - Eur J Physiol. 2008.

Vías de S100A10 involucradas en el tráfico de proteínas de membrana

Hipótesis y Objetivos

La resistencia a la muerte de las células de cáncer de páncreas es el factor clave que disminuye la respuesta al tratamiento y permite el crecimiento del tumor y el establecimiento de metástasis. Actualmente, el tratamiento médico contra el cáncer pancreático se basa en la utilización de gemcitabina, un análogo de deoxycitidina.

VMP1 (*Vacuole Membrane Protein 1*) se caracterizó por su inducción temprana en células acinares durante la pancreatitis. Se observó que la expresión de VMP1 correlaciona significativamente con la formación de vacuolas y precede a la muerte celular, sugiriendo que la expresión de VMP1 participa del proceso de autofagia y de muerte celular. La autofagia es un proceso de degradación de proteínas y organelas durante la cual se forman estructuras vacuolares características denominadas autofagosomas. Mediante estudios morfológicos la autofagia ha sido relacionada con la muerte celular en una variedad de procesos patológicos tales como enfermedades neurodegenerativas y tumorigénesis. Sin embargo, no está claro si la autofagia permite la supervivencia o causa la muerte celular, y menos aún si la autofagia se relaciona con la resistencia de la célula tumoral al tratamiento.

Por lo tanto, la hipótesis de trabajo consiste en que VMP1 se encuentra involucrada en el proceso de autofagia y que su expresión puede alterar el comportamiento de las células tumorales y la respuesta a agentes quimioterápicos.

Los objetivos generales de este proyecto consisten en estudiar el rol de la proteína de membrana VMP1 en los procesos de autofagia y muerte celular, analizar su participación en la respuesta de las células tumorales pancreáticas al tratamiento con gemcitabina y detectar proteínas interactoras de VMP1 que estén participando de este proceso. Los objetivos específicos son:

- Producir el anticuerpo anti-VMP1 con el objetivo de poder detectar su localización y su expresión.
- Determinar si VMP1 forma parte del proceso de autofagia.

- Estudiar a VMP1 y al proceso de autofagia en líneas celulares de cáncer de páncreas bajo el tratamiento con gemcitabina.
- Detectar nuevas proteínas que interaccionan con VMP1.
- Caracterizar la interacción de VMP1 con la proteína encontrada y determinar su efecto sobre la autofagia y la muerte celular en líneas de cáncer de páncreas tratadas con gemcitabina.

Materiales y Métodos

MEDIOS, REACTIVOS Y ANTICUERPOS.

Medios y reactivos para cultivo de líneas celulares: El medio Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) y el medio Earle's Balanced Salt Solution (EBSS), utilizado para el tratamiento de ayuno, fueron adquiridos a HyClone. El suero fetal bovino (SFB) es de Natocord. En Invitrogen se obtuvieron los antibióticos (ATB) para las líneas celulares penicilina G y estreptomina. La Rapamicina y la Monodansylcadaverina (MDC) utilizadas fueron adquiridas en Sigma. La gemcitabina y la 3-Metiladenina (3-MA) fueron obtenidas de Eli Lilly y Sigma respectivamente. Los reactivos para transfección Lipofectamine 2000 y Oligofectamine Reagent fueron adquiridos en Invitrogen.

Medios y reactivos para cultivo bacteriano: Para el crecimiento bacteriano se utilizó medio Luria Broth (LB) líquido (1 % p/v triptona, 0,5 % p/v extracto de levaduras, 1% p/v NaCl), LB agar (LB líquido mas 1,5 % p/v Agar) y Caldo Súper Óptimo con Represión Catabólica (SOC) (2 % p/v triptona, 0,5 % p/v extracto de levadura, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 20 mM glucosa). Los reactivos fueron adquiridos en Britania. Todos los medios fueron esterilizados por autoclavado. La Ampicilina se utilizó en una concentración 100 µg/ml y fue adquirida en Genbiotech y la kanamicina se utilizó 25 µg/ml y fue obtenida en Invitrogen. El Isopropil-β-D-tio-galactosa (IPTG) fue adquirido a Promega y se utilizó 1 mM.

Medios y reactivos para cultivo de levaduras: Para el crecimiento de las levaduras se utilizó medio YPAD (1 % p/v extracto de levaduras, 2 % p/v peptona, 2 % p/v dextrosa, 40 mg/l sulfato de adenina), YPAD agar (YPAD líquido mas 2 % p/v Agar), Medio Mínimo Glucosa sin leucina y uracilo agar (0,17 % p/v base nitrógeno de levaduras sin aminoácidos, 0,5 % p/v sulfato de amonio, 2 % p/v dextrosa, 0,062 % p/v suplemento de aminoácidos sin leucina y uracilo y 1,7 % p/v agar) y Medio Mínimo Galactosa sin leucina y uracilo (agar 0,17 % p/v base nitrógeno de levaduras sin

aminoácidos, 0,5 % p/v sulfato de amonio, 2 % p/v galactosa, 1 % p/v rafinosa, 0,062 % p/v suplemento de aminoácidos sin leucina y uracilo y 1,7 % p/v agar). Todos los medios fueron esterilizados por autoclavado. Los reactivos utilizados para la competencia y transformación de las levaduras fueron los siguientes: LiSORB (100 mM LiOAc, 10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA, 1 M sorbitol), PEG/LiOAc (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA pH 8.0, 100 mM LiOAc pH 7.5, 40 % p/v PEG 3350), 1,4 M β -mercaptoetanol y DNA de esperma de salmón.

Anticuerpos: Los anticuerpos primarios utilizados fueron anti EGFP, LC3, y β -tubulina (Santa Cruz Biotechnology), S100A10 (BD Transduction Laboratorios), V5 (Invitrogen), VMP1 fragmento COOH. Los anticuerpos secundarios utilizados fueron anti-ratón, anti-cabra y anti-conejo conjugados con peroxidasa y anti-cabra Alexa 488 (Molecular Probes).

PLÁSMIDOS Y siRNA.

El siRNA utilizado fue diseñado por Ambion para VMP1 humana (ID32935). La secuencia es la siguiente: Fw 5'-GGCAGAAUUAUUGUCCUGUGtt-3', y Rv 5'-CACAGG ACAAUAUUCUCUGCtt-3'. El plásmido pCMS3-H1p-EGFP fue provisto por el Dr D. Billadeau (Department of Immunology, College of Medicine, Mayo Clinic, Rochester, MN 55905, USA). El plásmido contiene una construcción con un *short hairpin* RNA de VMP1 o de S100A10 el cual permite el silenciamiento de la proteína elegida. El plásmido también contiene un cassette de transcripción separado que expresa EGFP para poder identificar las células transfectadas [Gomez TS y col., 2005]. Por lo tanto las células transfectadas expresan EGFP y el shRNA de VMP1 o de S100A10. La secuencia shRNA clonada dentro del plásmido contiene el sitio para las enzimas de restricción, la secuencia target de la proteína de interés y una secuencia *loop* para la formación del shRNA. La secuencia clonada de shRNA de VMP1 dentro del plásmido contiene la misma secuencia target que el siRNA. Para el silenciamiento de la proteína

S100A10 se utilizó la siguiente secuencia target 5'-AATGCCATCTCAAATGGAA-3' [Morel E y col., 2007]. La secuencia completa del shRNA es la siguiente 5'-GATCCCCAATGCCATCTCAAATGGAATTCAAGAGATTCCATTTGAGATGGCATT TTTTGGAAA-3'. La secuencia inespecífica utilizada para el shRNA Control fue la siguiente 5'-GATCCCCATTGTATGTGATCGCAGACTTCAAGAGAGTCTGCGATCACA TACAATTTTGGAAA-3'. El plásmido pRFP-C1 fue amablemente provisto por la Dr. María I. Colombo (Universidad Nacional de Cuyo, Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Argentina), contiene clonada la secuencia de LC3 de rata y produce la proteína de fusión RFP-LC3. El plásmido de expresión procariota pGEX-5X-2 (Amersham Biosciences), posee el promotor tac, un híbrido derivado de los promotores de triptofano y lactosa, el cual es inducible por IPTG y permite la expresión de la proteína fusionada a GST (glutathion S-transferasa). El plásmido pEFGP (Clontech) es un plásmido de expresión eucariota que permite la expresión de la proteína fusionada a EGFP (proteína fluorescente verde). El plásmido de expresión eucariota pcDNA4 (Invitrogen) permite la expresión de la proteína fusionada a 6 histidinas (His₆) y a la secuencia GKPIPPLLGLDST (V5) que pertenece a la región C-terminal de las proteínas P y V del Virus Simian 5.

CULTIVO DE CÉLULAS.

Se utilizaron las líneas celulares de cáncer pancreático PANC-1 (carcinoma epitelioide ductal de páncreas humano) y MIAPaCa-2 (carcinoma de páncreas humano) También la línea celular de carcinoma cervical HeLa y la 293T, que es una línea derivada de las HEK (riñón de embrión humano) que además contiene el antígeno largo T de SV40, el cual permite la replicación episomal de plásmidos transfectados que contengan el origen de replicación SV40. La línea celular de fibroblasto de embrión de ratón NIH3T3 fue obtenida a partir de embrión de ratón Swiss NIH y es óptima para experimentos de transformación.

Las células se cultivaron a 37°C en CO₂: aire (5%: 95%) en DMEM 10% de suero fetal bovino (SFB), L-glutamina (4 mM), penicilina (50 unidades/ml) y estreptomina (50 µg/ml). Cuando se alcanzó el 80-90% de confluencia se disociaron con 0,05% tripsina y 0.02% EDTA, y se repicaron en botellas de cultivo de 25 cm² de superficie para su mantenimiento. Luego de los diferentes tratamientos las células se lisaron en Trizol (Invitrogen) para la extracción de RNA, se lisaron en buffer de lisis para ensayo de pull-down (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 0,5% Tritón X-100, 10 mM Imidazol), en buffer de lisis para ensayo de western blot (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 150 mM NaCl, 1% Tritón X-100), o fueron fijadas durante 10 minutos en paraformaldehido 4% en PBS frío para estudios morfológicos o de inmunofluorescencia. En todos los casos donde se agregó buffer de lisis, se utilizaron los siguientes inhibidores de proteasas, 1 mg/mL aprotinin, 1 mg/mL leupeptin, 1 mg/mL pepstatin A y 1 mM phenylmethylsulphonyl fluoride inhibitor.

TRYPAN BLUE.

Se utilizaron placas de 24 well donde se sembraron 5×10^4 células por well utilizando 500 µl de medio DMEM, 10% SFB, 1% ATB. Al día siguiente se agregó la gemcitabina en la concentración elegida. El número de células viables luego de 24, 48 y 72 hs se determinó por el método de Trypan Blue (Trypan blue 0, 2 % en PBS). Se levantaron las células por suave pipeteo en el medio de crecimiento. Se tomaron 0,5 ml de la suspensión de células y se mezclaron con 0,5 ml de una solución de Trypan Blue (0,4% p/v). Se dejó que las células estén en contacto con el colorante durante 3 min. Se contaron en cámara de Neubauer las células coloreadas (muertas) y no coloreadas (vivas). Se determinó el porcentaje de células vivas respecto al control según la siguiente formula: % Células viables = $N_T / N_C \times 100$, donde N_C es el número

de células viables del control y N_T es el número de células viables tratadas con gemcitabina.

TRANSFECCIÓN.

Para la incorporación de plásmidos, las células fueron plaqueadas el día anterior a la transfección para que logren una confluencia entre el 80% y 90% al tiempo del experimento. Luego de lavar con PBS, la transfección fue realizada utilizando Lipofectamine 2000 (Invitrogen) en medio sin antibióticos. Para los experimentos de siRNA se utilizó Oligofectamine Reagent (Invitrogen). Las células fueron plaqueadas para obtener un 50% de confluencia al momento de transfección. Luego de lavar con PBS, la transfección fue realizada en medio sin antibióticos según el protocolo del fabricante.

PORCENTAJE DE CÉLULAS CON RFP-LC3 AGRUPADO.

Las células fueron transfectadas con el plásmido pRFP-LC3 solo, o co-transfectado con otros plásmidos. Se contabilizó el número de células con RFP-LC3 agrupado cada 100 células transfectadas o cada 100 células co-transfectadas, observando al microscopio al menos 8 campos. Los datos se expresan como la media \pm E.S. de al menos 3 experimentos independientes. Para detectar la fluorescencia se utilizó un microscopio Nikon Eclipse 200 (Plan100x).

WESTERN BLOT.

Las células fueron lavadas con PBS y lisadas en buffer de lisis frío (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 150 mM NaCl, 1% Tritón-X100) conteniendo 1 mg/mL aprotinin, 1 mg/mL leupeptin, 1 mg/mL pepstatin A y 1 mM phenylmethylsulphonyl fluoride inhibitor. Alícuotas de igual cantidad de proteína fueron resueltas en SDS-PAGE, y transferidas a membranas de PVDF (Bio-Rad) durante 1 hora a 200 mA. La membrana fue

bloqueada en buffer TBS (Tris-HCl 20 mM pH 7,4; NaCl 0,15 M) con leche en polvo descremada (Molico) al 5% durante 1 hora a temperatura ambiente. El anticuerpo primario se agregó en buffer de bloqueo. El tiempo de incubación del anticuerpo varió según el anticuerpo primario utilizado. Se realizaron 3 lavados con TBST (TBS con Tween-20 al 0,01%) y se incubó con el anticuerpo secundario marcado con peroxidasa durante 1 hora. Después de 2 lavados con TBST y 2 con TBS, se reveló con el kit ECL (GE Healthcare) o con el Kit Super Signal Pico (Pierce). Las diluciones de los anticuerpos utilizadas fueron las siguientes: LC3 1/200, β -Tubulina 1/800, VMP1 fragmento COOH 1/200, S100A10 1/1000, EGFP 1/700, V5 1/5000. Anticuerpos secundarios anti-ratón, cabra y conejo conjugados con peroxidasa 1/5000.

EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DE RNA.

La extracción del RNA de cultivos celulares, se realizó con el reactivo Trizol (Invitrogen). Las células se crecieron en un multiwell de 6 y luego se les realizó el tratamiento deseado. Para la purificación del RNA se lavaron las células con PBS, se agregó 1 ml de Trizol por well y se pipeteó para levantar las células. Luego se pasó el contenido de cada well a un tubo de 1,5 ml, en donde se agregaron 0,2 ml de cloroformo. A continuación se centrifugó a 12000 x g durante 15 min a 4°C. Se transfirió la fase acuosa a un nuevo tubo en donde se agregaron 0,5 ml de isopropanol. Se dejó incubando 10 min y después se centrifugó a 12000 x g por 10 min a 4°C. El pellet de RNA obtenido luego de la centrifugación se lavó con etanol 75 %, se centrifugó nuevamente y se resuspendió en agua. Se determinaron las concentraciones de RNA midiendo la absorbancia a 260 nm. Para chequear su calidad se realizó una corrida en gel de agarosa y se visualizó por tinción con Bromuro de Etidio.

RT-PCR Y REAL-TIME RT-PCR.

Se utilizaron 2 µg del RNA purificado y se trataron con 1 µl de RNase-free DNase I (Invitrogen) en un volumen final de 10 µl conteniendo buffer de RNasa 1X. Se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente y luego se incubó a 65°C durante 10 min. A continuación se incubaron los 10 µl del tratamiento DNasa con 100 nM random primers (N₆) a 70°C durante 5 min. A continuación se utilizó la mezcla de RNA más random primers y se agregó 1 mM dNTPs y 1 µl de la enzima transcripasa reversa MMLV (Promega) en un volumen final de 20 µl conteniendo buffer MMLV 1X. La mezcla se incubó a 25°C durante 5 min y luego a 37°C durante 1 hora. Para la reacción de PCR se utilizaron 0,5 µl de reacción de RT en una mix con 200 µM dNTPs, 4 mM MgCl₂, 200 nM de primer Foward (Fw) y Reverse (Rv) y 1 µl de la enzima Go Taq (Promega) en una volumen de 25 µl conteniendo buffer Go Taq 1X. Las condiciones de la PCR fueron las siguientes 94°C 2 minutos y 35 ciclos de: 94°C 20 segundos, 58°C 20 segundos y 72°C 30 segundos. Los primers utilizados fueron

- para VMP1:

Fw → 5' GGTGCTGAACCAGATGATGA 3'

Rv → 5' GCACCAAAGAAGGTCCAAA 3'

- para S100A10:

Fw → 5' AAATTCGCTGATAGG 3'

Rv → 5' CTGTGGGGCAGATTCCTTAA 3'

- para β-actina:

Fw → 5' GACTTCGAGCAAGAGATGGT 3'

Rv → 5' GCACTGTGTTGGCGTACAG 3'

- para GADPH

Fw → 5' ACCACAGTCCATGCCATCAC 3'

Rv → 5' TCCACCACCCTGTTGCTGT 3'.

En las reacciones de RT-PCR las alícuotas fueron sometidas a una corrida electroforética en agarosa 1,5 % y se visualizaron mediante tinción con Bromuro de Etidio. La reacción de RT-PCR fue realizada en un ciclador Techne. Para la PCR para el clonado de S100A10 se utilizaron los siguientes primers:

Fw → 5' CCCAAGCTTCACACCAAATGCC 3'

Rv → 5' GGGGGATCCCTCATTCTGCATAC 3'

y se utilizó como templado el plásmido purificado del clon interactor 24. Para la Real Time PCR se utilizaron los primers antes descritos con 0,5 µl de RT por reacción en un volumen final de 25 µl utilizando la master mix Mezcla Real (Biodynamics). La Real-Time RT-PCR fue realizada en un ciclador RG 6000 (Corvette). Las condiciones de ciclado fueron las siguientes: 95 °C for 2 min seguido de 40 ciclos de 95 °C por 20 seg, 58 °C por 20 seg, y 72 °C por 30 seg. Los niveles del mRNA de VMP1 y S100A10 fueron calculados relativos al mRNA de β-actina.

CITOMETRÍA DE FLUJO.

Se utilizó el Kit Annexin V-PE Apoptosis Detection Kit I (BD Pharmingen). Las células fueron levantadas mediante suave pipeteo y centrifugadas por 5 min a 1500 x g. A continuación fueron lavadas 2 veces en PBS frío y resuspendidas en binding buffer en una concentración aproximada de 1×10^6 cél/ml. Luego, 100 µl de la resuspensión celular fueron teñidos agregando 5 µl annexina V-PE y 5 µl de 7AAD e incubada en la oscuridad. Al cumplirse los 15 minutos se agregaron 400 µl de binding buffer. Las células fueron analizadas utilizando un Citómetro de Flujo PAS III (PARTEC) del departamento de Microbiología e Inmunología de la Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA.

Para los experimentos con los plásmidos que expresan shRNA S100A10, shRNA VMP1 y EGFP-VMP1 se analizó solo el grupo de células EGFP. De ese grupo se determinaron las células apoptóticas tempranas (anexina V positiva y 7AAD negativa)

de 3 experimentos independientes. En los experimentos de expresión de shRNA S100A10 y shRNA VMP1 se utilizó como control el plásmido que expresa el shRNA control. En el experimento de expresión de EGFP-VMP1 se utilizó el plásmido vacío como control. Para cada medición al menos 20.000 células fueron contadas. Los datos fueron expresados como la media \pm E.S.

Para realizar los experimentos de sorting se utilizó el citómetro FAX AREA 2 del Hospital de Clínicas. Se crecieron células MIAPaCa-2 y luego se transfectaron con los plásmidos que expresan el shRNA S100A10 y el shRNA control. A las 24 hs las células fueron lavadas con PBS, tripsinizadas y resuspendidas en medio DMEM 10% SFB y 1% ATB, en una concentración aproximada de 5×10^6 células/ml. Inmediatamente las células fueron sometidas al sorting con el objetivo de obtener solo las células EGFP positivas. Las células separadas por sorting fueron recuperadas en medio DMEM 10% SFB y 1% ATB.

Para el experimento de actividad de caspasas 3 y 7 se sembraron 2×10^4 células por well en un multiwell de 96 y se dejaron creciendo durante 24 hs antes de realizar el tratamiento con gemcitabina.

Para realizar el western blot de S100A10 las células EGFP positivas obtenidas se centrifugaron y el pellet se resuspendió en buffer de lisis con inhibidores de proteasas.

NARANJA DE ACRIDINA Y BROMURO DE ETIDIO.

Las células fueron levantadas mediante suave pipeteo, centrifugadas por 5 min a 1500 x g y resuspendidas en PBS. Veinticinco microlitros (entre 5×10^5 y 5×10^6 cél./ml) fueron mezclados con 1 μ l de la mezcla de Naranja de Acridina y Bromuro de Etidio (50 μ g/ml de NA y 50 μ g/ml de BE en PBS). Luego las células fueron visualizadas inmediatamente en un microscopio de fluorescencia (Nikon Eclipse 200). Las células apoptóticas fueron definidas por criterio morfológico. La Naranja de Acridina es usada para determinar cuantas células dentro de una determinada población están bajo

apoptosis (visualizando la morfología) y el Bromuro de Etidio para diferenciar entre células viables y no viables. Se determinó el porcentaje de células apoptóticas contando 100 células.

NARANJA DE ACRIDINA.

Las células fueron lavadas 2 veces con PBS. A continuación se montaron las células sobre 3 μ l de 50 μ g/ml de Naranja de Acridina en PBS. Las células fueron visualizadas inmediatamente en un microscopio de fluorescencia (Nikon Eclipse 200). Se determinaron las vacuolas ácidas por la visualización directa del color rojo.

ACTIVIDAD DE CASPASA 3 Y 7.

La actividad de caspasa 3 y 7 fue determinada utilizando los kits Apo-ONE™ Homogeneous Caspase-3/7 Assay y Apo Live-Glo Multiplex Assay (Promega) según las instrucciones del fabricante. Con el kit Apo-ONE™ Homogeneous Caspase-3/7 Assay fue determinada la actividad de caspasa 3 y 7, monitoreando el clivado del sustrato Z-DEVD-R110 y la viabilidad celular se determinó por el método de Trypan Blue. Las células MIAPaCa-2 se sembraron 2×10^5 cel/well en un multiwell de 12. Luego de la transfección y el tratamiento, las células se levantaron por suave pipeteo. Se sembraron 100 μ l en un multiwell de 96 y se agregó el reactivo para medir la actividad de las caspasa 3 y 7. El resto se utilizó para determinar la viabilidad celular por el método de Tripán Blue.

Con el kit Apo Live-Glo Multiplex Assay se determinó la viabilidad celular y la actividad de caspasa. Las células MIAPaCa-2 se sembraron 2×10^4 cel/ml en un multiwell de 96. Luego del tratamiento se agregó el sustrato para determinar la viabilidad celular, se incubó 30 min a 37°C y se midió la fluorescencia a 505 nm. A continuación se agregó el sustrato para medir la actividad de las caspasa 3 y 7, se incubó 30 min a temperatura ambiente y se midió la luminiscencia. La viabilidad celular fue

determinada por el clivaje del sustrato GF-AFC (glycylphenylalanyl-amino fluorocoumarin) y medido por fluorescencia. La actividad de caspasas 3 y 7 fue determinada por un sustrato luminiscente que contiene el tetrapéptido DEVD. En ambos casos el valor de la actividad de caspasas fue normalizado con la viabilidad celular y expresado relativo al control. Las mediciones se realizaron en el equipo Victor³ (Perkin Elmer) del departamento de Microbiología e Inmunología de la Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA.

MICROSCOPIA ELECTRÓNICA.

Las células fueron fijadas en glutaraldehído al 1%, en una solución reguladora de fosfato 0,1 M. Posteriormente, en tetróxido de osmio en la misma solución reguladora. Después de la inmersión en acetato de uranilo, las muestras fueron deshidratadas gradualmente en soluciones de etanol y clarificadas con acetona. Luego fueron embebidas en Embed 812 (Electron Microscopy Scientific). Cortes de 1 µm de grosor fueron coloreados con azul de toluidina en bórax, mientras que los cortes ultrafinos fueron coloreados con citrato de plomo y acetato de uranilo. Las grillas fueron examinadas con un microscopio electrónico Zeiss.

INMUNOFLUORESCENCIA Y MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA.

Las células fueron fijadas en paraformaldehído 4 % en PBS frío durante 10 minutos. Para microscopia de fluorescencia las células fueron montadas con DABCO y observadas en el microscopio. Para la expresión de S100A10-EGFP en células HeLa, se lavaron las células con PBS, luego se incubó durante 1 min con el Buffer de lavado de citosol (100 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 1 mM CaCl₂, 1 mM Hepes, PH= 6,9), a continuación se lavaron las células con PBS y se fijaron en paraformaldehído 4 % en PBS frío durante 10 minutos. Finalmente se montaron en DABCO y se observaron al microscopio.

Para la inmunofluorescencia de LC3, luego de fijar las células, se lavaron 2 veces con PBS, se permeabilizaron con Tritón X-100 durante 5 min, nuevamente se lavaron 2 veces con PBS y se bloquearon durante 30 min utilizando 1% BSA en PBS. A continuación se agregó el anticuerpo primario en 1% BSA en PBS y se incubaron durante 2 hs. Luego se lavaron 2 veces con PBS y se agregó el anticuerpo secundario conjugado con Alexa 488 en 1% BSA en PBS. Finalmente se realizaron 2 lavados con PBS y se montaron los vidrios con DABCO. Los preparados fueron visualizados en el microscopio confocal del IByME.

DOBLE HÍBRIDO.

Para realizar el doble híbrido se utilizó el sistema Cyto Trap Two Hybrid System, (Stratagene).

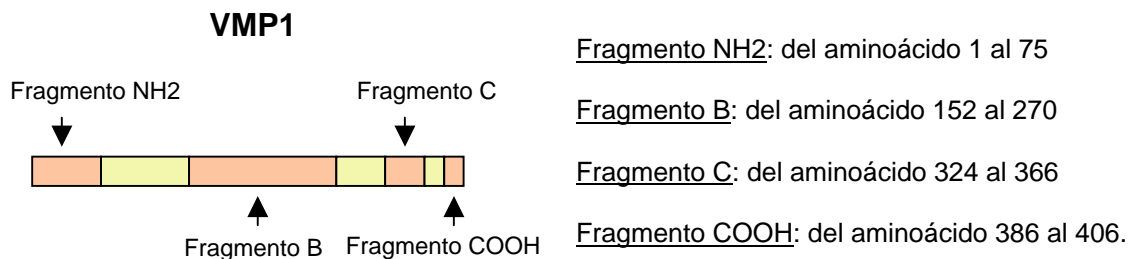
Amplificación de la biblioteca de células HeLa

Se amplificó la biblioteca de células HeLa (Stratagene) que se encuentra en la cepa *E. Coli* XL10-Gold KanR (Stratagene), clonada en el plásmido pMyr. En primer lugar se determinaron las unidades formadoras de colonias/ml (UFC/ml) de la biblioteca. Se realizaron distintas diluciones de las bacterias que contienen la biblioteca, se plaquearon en medio LB con kanamicina y luego se contaron las colonias obtenidas. Se obtuvieron $1,5 \times 10^8$ UFC/ml. Sabiendo que la biblioteca posee $3,7 \times 10^6$ clones (dato provisto por Stratagene), se decidió amplificar por duplicado la biblioteca, es decir obtener $7,4 \times 10^6$ clones. Se utilizaron placas de petri de 15 cm x 15 cm y se sembraron distintas cantidades de colonias (20.000, 40.000, 60.000, y 80.000 colonias por placa) para determinar cual era el número de colonias apropiado por placa. Se determinó que con 40.000 clones se obtienen la mayor cantidad de clones por placa sin obtener césped. Por lo tanto se plaquearon 185 placas con 40.000 clones cada una. Se dejaron crecer overnight (O.N.), se agregó a las placas medio LB líquido y se levantaron las colonias con rastrillo. A continuación se realizaron 3 maxi prep para

purificar los plásmidos amplificados. Se midió la absorbancia a 260 nm para obtener la concentración, y por último se realizó una corrida en gel de agarosa para comprobar el estado del DNA purificado.

Clonado de los fragmento de VMP1

Como VMP1 es una proteína de membrana el screening fue realizado con distintos fragmentos correspondientes a las regiones hidrofílicas.



Para cada fragmento se diseñaron un par de primers específicos con adaptadores para cortes con las enzimas *Bam*HI y *Sal*I. La secuencia de los primers es la siguiente:

- Fragmento NH2

Fw → 5' CCCGGATCCGATCTATGAAATGGCAGA 3'

Rv → 5' GGGGTCTGACTGACGATGCCATAA 3'

- Fragmento B

Fw → 5' CCCGGATCCATTTCCCTGAGCCACCCTAT 3'

Rv → 5' GGGGTCTGACCGAACAGGGGATTTGGAATA 3'

- Fragmento C

Fw → 5' CCCGGATCCTCATTGGTGCTGTC 3'

Rv → 5' GGGGTCTGACATCCAGGACAACCA 3'

- Fragmento COOH

Fw → 5' CCCGGATCCATGGCACAAAGCTA 3'

Rv → 5' GGGGTCTGACTTTAGTCTTCTCCT 3'.

Luego se realizaron las reacciones de PCR utilizando como templado pcDNA4-VMP1. Las condiciones de la PCR fueron las siguientes 94°C 2 minutos y 35 ciclos de: 94°C 20 segundos, 57°C 20 segundos y 72°C 30 segundos. Los distintos fragmentos amplificados fueron clonados en el plásmido pSOS con las enzimas *BamHI* y *Sall*. Todas las construcciones fueron confirmadas por restricción y secuenciación.

Ensayo Doble Híbrido

Preparación de levaduras competentes

Se crecieron 3 colonias de levaduras, de una placa fresca, en medio YPAD líquido O.N. A continuación se diluyó el cultivo a una $DO_{600} = 0,2$ y se incubó durante 3 hs hasta que alcanzó las $DO_{600} = 0,7$. Luego se centrifugó, se resuspendió en medio LiSORB y se dejó incubando durante 30 min. Posteriormente se centrifugó, se resuspendió el pellet en una mezcla de 40% esperma de salmón en medio LiSORB y luego se agregaron PEG/LiOAc y DMSO.

Transformación

Se mezclaron en partes iguales DNA de pSOS-fragmento VMP1 y de pMyr que contiene la biblioteca de células HeLa. Luego se agregó 1,4 M β -mercaptoetanol y se dejó incubando durante 30 min a temperatura ambiente. A continuación se calentaron a 42°C durante 20 min y luego se pasaron a hielo por 3 min. Finalmente se centrifugaron las levaduras, se resuspendieron en 1M Sorbitol y se plaquearon en medio con glucosa sin leucina ni uracilo para seleccionar las levaduras co-transformadas. Las placas se incubaron a 25°C durante 3 días.

Screening

Una vez obtenidas las colonias co-transformadas, se realizó una réplica en placa en medio con galactosa sin leucina ni uracilo y se crecieron a 37°C hasta 10 días. Los clones que fueron apareciendo (los posibles clones interactores) fueron pasados a una placa con medio con glucosa a 25°C en donde se dejaron crecer durante 2 días. Una vez crecidos los clones se realizó una réplica en placa en medio con glucosa y con

galactosa y ambas placas fueron crecidas a 37°C (conservando también la placa original de donde se realizó la réplica incubándola a 25 °C). Se determinaron los clones que crecieron en medio con galactosa y no en medio con glucosa. Luego se volvió a la placa original (crecida a 25°C), los clones positivos se resuspendieron en 50 µl de agua y se sembraron 15 µl en la misma posición en una placa de glucosa y la otra de galactosa y nuevamente fueron crecidos a 37°C. El crecimiento diferencial en ambas placas determinó los clones positivos.

A cada una de las colonias positivas se la creció y se le realizó una miniprep agregando un paso de agitación con bolitas de vidrio para romper la membrana de la levadura. A continuación se le realizó una PCR a cada miniprep obtenida con primers que flanquean el sitio de clonado de pMyr. La secuencia de los primers es la siguiente:

- pMyr

Fw → 5' GCGGCCCTCTAGAGCTTATT 3'.

Rv → 5' AACCCCGGATCGGACTACTA 3'.

Luego se enviaron a secuenciar los productos de PCR y de cada secuencia obtenida se identificó la proteína interactora por medio del BLAST. Para confirmar la interacción se transformaron levaduras con pSOS-fragmento VMP1 y con el plásmido pMyr aislado del clon positivo (del que se realizó la PCR que se envió a secuenciar). Las placas fueron crecidas inicialmente en glucosa a 25°C en medio sin Leucina ni Uracilo, para seleccionar las transformadas, y finalmente se realizó réplica en placa en medio con glucosa y galactosa y se crecieron a 37°C, obteniéndose nuevamente el crecimiento diferencial que confirma la interacción.

PULL-DOWN.

Se utilizó el plásmido pEGFP-VMP1 que expresa una proteína de fusión EGFP-VMP1. La proteína S100A10 obtenida en el doble híbrido se fusionó a 6 histidinas y V5, mediante el clonado de su cDNA en el vector pcDNA4. Se co-transfectaron células

293T con el reactivo Lipofectamine 2000 (Invitrogen). A las 24 hs se levantaron las células en PBS, se centrifugaron 10 minutos a 800 rpm y al pellet se le agregó 1 ml de buffer de lisis para ensayo de pull down (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 0,5% Tritón X-100, 10 mM Imidazol con los inhibidores de proteasas 1 mg/ml aprotinin, 1 mg/ml leupeptin, 1 mg/ml pepstatin A y 1 mM phenylmethylsulphonyl fluoride inhibitor). Se utilizaron 20 µl de columna NiNTA Agarosa y 100 µg del lisado celular. Después de 3 horas de incubación a 4° C, se lavó 3 veces y luego se eluyó. El material eluido fue sometido a un SDS-PAGE y luego se transfirió a una membrana de nitrocelulosa. Sobre estas membranas se detectaron las proteínas VMP1-EGFP y S100A10-V5 con anticuerpos anti-EGFP (Santa Cruz) y anti-V5 (Invitrogen) mediante un western blot.

ANTICUERPO VMP1

Clonado.

Con el objetivo de obtener el anticuerpo anti-VMP1 se amplificó por PCR el Fragmento B2 utilizando como templado 50 ng del plásmido pcDNA4-VMP1. Se encargaron primers específicos con adaptadores para que posean sitios de corte para las enzimas de restricción *Bam*HI y *Sal*I. Los primers utilizados fueron los siguientes

- Fragmento B2

Fw → 5' GGGGGATCCGAATTGAAGCCTGCA 3'

Rv → 5' GGGGTCGACTGCCAGTTTAGCTCG 3'

Para la PCR se utilizó el siguiente protocolo de amplificación: desnaturalización 2 minutos a 94° C y luego 35 ciclos de desnaturalización de: 20 segundos a 94°C, annealing 20 segundos a 59° C, extensión 30 segundos a 72° C y luego 5 minutos de extensión final a 72 °C. Para la mix de PCR se utilizó enzima GoTaq, 200uM dNTPs (Promega) y 200 nM primers en un volumen final de 25 µl. El producto de PCR se corrió en un gel de agarosa 1,5% se visualizó mediante tinción con Bromuro de Etidio. Se extrajo y purificó la banda del gel con el kit SV Gel and PCR Clean Up System

(Promega). Se realizó la restricción del producto de PCR y del plásmido pGEX-5X-2 durante 2 hs a 37°C con las enzimas *Bam*HI y *Sa*II. Luego se dejó ligado O.N. a 4°C utilizando T4 DNA ligasa (Promega) y posteriormente se transformaron bacterias competentes *E. Coli* JM109, las cuales se crecieron en placas con medio LB y ampicilina (100 µg/ml). La cepa *E.Coli* JM109 es defectiva en la endonucleasa *endA* y en recombinasa *recA*. Estas características permiten alta calidad del DNA al realizar la miniprep y aumenta la estabilidad del inserto. Los clones obtenidos se amplificaron en medio líquido LB con ATB O.N. a 37°C con agitación y al día siguiente se realizó una miniprep para purificar los plásmidos. Finalmente se realizó una restricción con las enzimas *Bam*HI y *Sa*II durante 2 hs a 37°C. El análisis de la restricción permitió determinar cuáles clones poseían el inserto. Se confirmó la secuencia del inserto y el clonado en el marco de lectura correcto por secuenciación. Con el plásmido se transformaron bacterias *E.coli* BL21. La cepa *E.coli* BL21 es defectiva en la producción de las proteasas OmpT y Lon, lo que permite una mayor producción de proteína recombinante.

Expresión.

Se transformaron bacterias *E.coli* BL21. Se creció un cultivo O.N. a 37°C en 25 ml de medio LB más ampicilina con agitación. Al día siguiente se realizó una dilución 1/50 del cultivo O.N. en un volumen final de 1 litro. Se creció hasta alcanzar una $DO_{600} = 0,5$. Luego se indujo la expresión de la proteína recombinante agregando 1mM IPTG (Isopropil-β-D-tio-galactosa) y se dejó creciendo durante 4 hs. Finalmente se centrifugó el cultivo a 4000 x g durante 20 minutos para obtener el pellet bacteriano.

Purificación.

La purificación se realizó con el GST Purification Kit (Clontech). Se mezcló una parte de pellet bacteriano con 2,5 partes de Alúmina, luego se agregó el buffer de extracción y posteriormente se centrifugó. El sobrenadante se transfirió a una columna que une GST previamente equilibrada. Luego se lavó la columna con buffer de extracción y se

agregó el buffer de elución en 6 alícuotas de 1 ml cada una. Se realizó un SDS-PAGE y se sembró una fracción de cada alícuota de elución obtenida para identificar las fracciones con la proteína recombinante.

Inmunización.

El plan de inmunización se llevo a cabo en la cátedra de Inmunología de la Facultad de Farmacia y Bioquímica. Se utilizaron 2 conejos de 12 semanas. Se realizó un esquema de inmunización de 3 inoculaciones por animal, a intervalos de 2 semanas por vía intramuscular y subcutánea utilizando una cantidad total de 0,50 mg/animal de proteína. Después de 10 días de la última inoculación, a los animales se les realizaron extracciones de sangre para la medición del título del anticuerpo.

BACTERIAS COMPETENTES.

Se produjeron bacterias competentes *E.coli* JM109 o *E.coli* BL21 por el método de CaCl_2 . Se creció un cultivo O.N. a 37°C en 3 ml de medio LB con agitación, utilizando una colonia crecida en una placa fresca (hecha el día anterior). Al día siguiente se realizó una dilución 1/100 en un volumen final de 20 ml del cultivo O.N. Se creció hasta alcanzar una $\text{DO}_{600} = 0,5$. Se centrifugó a 5000 rpm durante 5 minutos a 4°C y se resuspendió el pellet en 10 ml de 0.1M CaCl_2 . Luego se centrifugó nuevamente y se resuspendió en 1 ml de 0.1M CaCl_2 . Se utilizaron alícuotas de 200 μl para cada transformación. En algunos casos fueron utilizadas bacterias competentes compradas *E.coli* JM109 (Promega).

TRANSFORMACIÓN.

Se mezclaron 200 μl de bacterias competentes con 50 ng de DNA y se incubaron en hielo durante 10 minutos. Luego se pasaron a 42°C durante 45 segundos y se agregó 1 ml de medio SOC. De dejaron 1 hs a 37°C con agitación y luego se plaquearon en medio agar LB + ampicilina o kanamicina según la resistencia del plásmido.

MINIPREP.

Para la purificación de plásmido se utilizó el Kit Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega). Las bacterias que poseían el plásmido deseado se crecieron en 7 ml de medio LB líquido con antibiótico a 37°C con agitación O.N. Al día siguiente se centrifugó el cultivo y se resuspendió el pellet en buffer de resuspensión. A continuación se agregó buffer de lisis incubándose durante 5 minutos y posteriormente se agregó la solución de neutralización. Luego se centrifugó y se pasó el sobrenadante por una columna que une DNA. Finalmente se lavó la columna 2 veces con buffer de lavado y se eluyó el DNA pegado a la columna con agua. La concentración de DNA obtenida se determinó por absorbancia a 260 nm.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Los datos fueron expresados como la media \pm E.S. (error estándar). El Student's *t*-test fue utilizado para comparar entre 2 grupos y el test de ANOVA para más de 2 grupos. Las diferencias se consideraron significativas cuando $P < 0,05$.

Resultados

1. PRODUCCIÓN DEL ANTICUERPO ANTI-VMP1

El análisis de la secuencia de VMP1 mediante herramientas informáticas permite predecir que es una proteína transmembrana de 406 aminoácidos que posee 6 dominios hidrofóbicos. Para profundizar en la caracterización de esta proteína es necesario detectar su expresión y determinar su localización intracelular. Con este objetivo se procedió a la producción de 2 anticuerpos policlonales capaces de detectarla.

1.1 Clonado y expresión del fragmento COOH y el fragmento B2 de VMP1

Con el objetivo de obtener el anticuerpo anti-VMP1 se seleccionaron 2 péptidos de la proteína. El primero corresponde a los últimos 20 aminoácidos de la proteína. La secuencia del péptido elegido es “MAQSYAKRIQQRLNSEEKTK”, y se lo llamó Fragmento COOH. El segundo péptido se encuentra entre los aminoácidos 187 y 247 (Fragmento B2) y su secuencia es “VRIEACMWGIGTAIGELPPYFMARAARLSGAEPDDEE YQFEEMLEHAESAQDFASRAKLA” (Fig. 1). En la elección de los péptidos se tuvo en cuenta que sea una zona con un alto valor predictivo de hidrofiliidad y también un alto valor predictivo de localización superficial y antigenicidad, con el objeto de permitir la interacción con los linfocitos y posteriormente con el anticuerpo. Para expresar el fragmento B2 se diseñaron primers específicos con sitios de corte para las enzimas de restricción *Bam*HI y *Sal*I para permitir su clonado. Se utilizó como templado el plásmido pcDNA4-VMP1 y se amplificó por PCR. El producto obtenido fue clonado en el plásmido pGEX-5X-2 que permite la expresión del fragmento de VMP1 fusionado a GST (Glutation S-transferasa) para su posterior purificación. El análisis de la restricción permitió determinar cuáles clones poseían el inserto. Se confirmó la secuencia del inserto y el clonado en el marco de lectura correcto por secuenciación. Con el plásmido se transformaron bacterias *E.coli* BL21 y se expresó la proteína de

fusión según el protocolo correspondiente (ver Materiales y Métodos). El cultivo bacteriano se centrifugó y se purificó la proteína recombinante GST-Fragmento B2 utilizando el GST Purification Kit (Clontech).

Para obtener el anticuerpo anti Fragmento COOH se envió a sintetizar el péptido fusionado a Ovoalbúmina (OVO). Finalmente los dos péptidos, Fragmento COOH-OVO y GST-Fragmento B2, fueron inoculados a conejos, en dos planes de inmunización que se llevaron a cabo en la cátedra de Microbiología e Inmunología de la Facultad de Farmacia y Bioquímica, y se obtuvieron los anticuerpos respectivos.

MAENGKNCQRRVAMNKEHHNGNFTDPSSVNEKKRREREERQNIVLWRQPLITLQ
 YFSLEILVILKEWTSKLVHRQSIVVSFLLLLLAVLIATYYVEGVHQYVQRIEKQF
 LLYAYWIGLGLSSVGLGTGLHTFLLYLGPFIASVTLAAYECNSVNFPEPPYPDQ
 IICPDEEGTEGTISLWSIISKVRIEACMWGIGTAIGELPPYFMARAARLSGAEPD
DEEYQEFEEMLHAESAQDFASRAKLAVQKLVQKVGFFGILACASIPNPLFDLAG
 ITCGHFLVPFWTFFGATLIGKAIKMHQKIFVITFSKHIVEQMVAFIGAVPGI
 GPSLQKPFQEYLEAQRQKLHHKSEMGTPOGENWLSWMFEKLVVVMVCYFILSIIN
SMAQSYAKRIQQLNSEEKTK

Figura 1

Secuencia de aminoácidos de la proteína VMP1 humana. En Azul se indica la secuencia perteneciente al Fragmento B2 y en rojo la secuencia del Fragmento COOH.

2. FUNCIÓN DE VMP1 EN EL PROCESO DE AUTOFAGIA

2.1 VMP1 induce autofagia en células de mamíferos

Nuestros hallazgos previos sobre la capacidad de VMP1 de inducir la formación de vacuolas citoplasmáticas y posteriormente la muerte celular, nos condujeron a pensar que la expresión de VMP1 estaría implicada en el proceso de autofagia. El compuesto fluorescente, Monodansylcadaverina (MDC) ha sido propuesto como trazador *in vivo* para vacuolas autofágicas, debido a que las estructuras MDC positivas contienen enzimas lisosomales pero no contienen marcadores de endosomas [Mizushima N, 2004]. Para analizar si las vacuolas inducidas por VMP1 son autofágicas se transfectaron células HeLa con el plásmido pcDNA4-VMP1, que expresa la proteína VMP1 fusionada con la secuencia GKIPNPLLGLDST (V5) y 6 histidinas (His₆), o con el plásmido vacío como control. A las 24 horas se registró en el microscopio invertido la aparición de vacuolas citoplasmáticas producidas por la transfección con el plásmido que expresa VMP1-V5. Luego se incorporó al medio de incubación 0,1 mM MDC, al cabo de 10 minutos las células vivas se observaron al microscopio de fluorescencia. Los resultados mostraron que las estructuras vacuolares inducidas por la expresión de VMP1-V5 se tiñeron con el trazador fluorescente. La Figura 2 muestra la imagen obtenida en células HeLa en las que la expresión de VMP1 indujo la formación de estructuras MDC positivas que se corresponden a las vacuolas autofágicas.

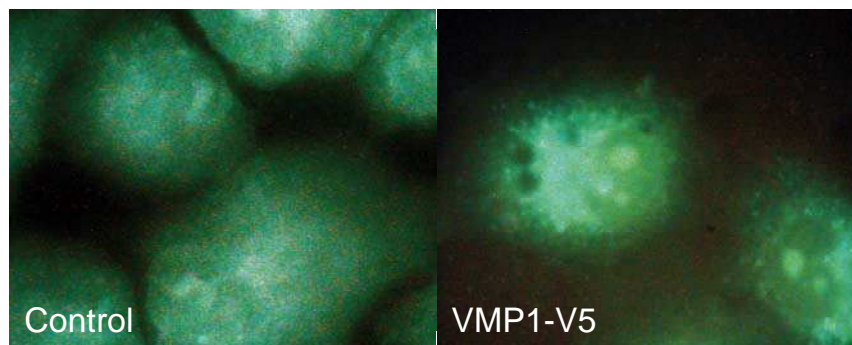


Figura 2

Microscopía de fluorescencia de células HeLa transfectadas con pcDNA4-VMP1 que expresa la proteína de fusión VMP1-V5 o el plásmido vacío como control durante 24 hs e incubadas con MDC durante 10 min. Se observan grandes vacuolas fluorescentes en las células que expresan VMP1-V5.

Para profundizar el estudio de las vacuolas producidas por VMP1 se analizó su ultraestructura utilizando microscopía electrónica, considerado el método *gold standard* para reconocer vacuolas autofágicas. Con este objetivo se transfectaron células HeLa con el plásmido pcDNA4-VMP1, o con el plásmido vacío como control. A las 24 hs las células fueron fijadas en glutaraldehído 1%. La inclusión y las grillas fueron realizadas en el Instituto de Biología Celular De Robertis. El análisis de la microscopía electrónica demostró que las células que expresan VMP1-V5 presentan múltiples características autofágicas. En la Figura 3 se pueden observar estructuras en forma de copa, estructuras de doble membrana conteniendo material citoplasmático (como los autofagosomas), y estructuras de membrana simple que contienen material citoplasmático en diferentes estados de degradación (estructuras compatibles con autolisosomas) [Gozuacik D y col., 2004; Klionsky DJ, 2004a].

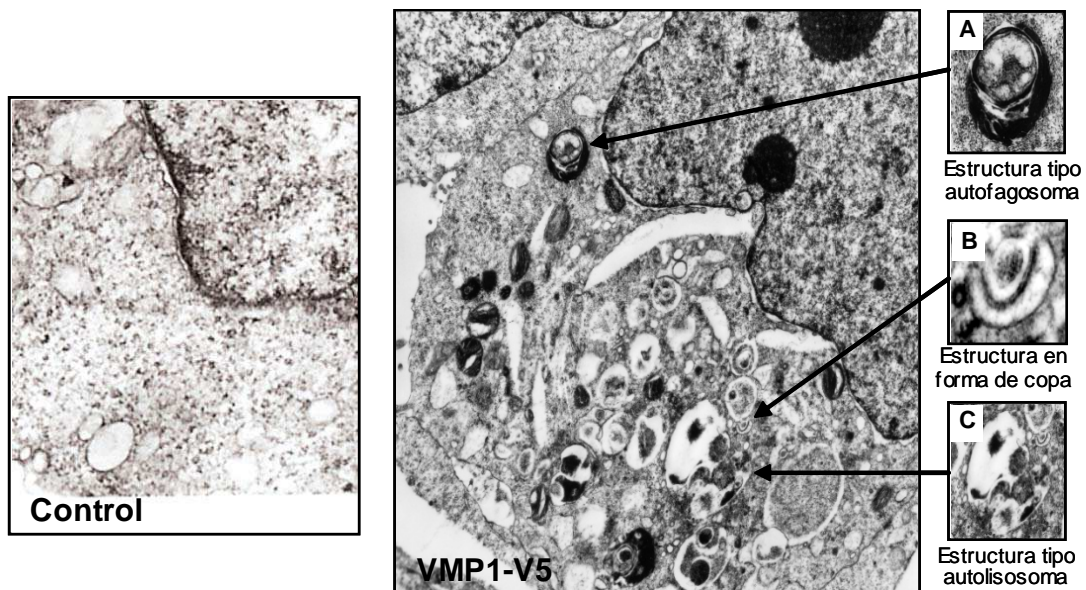


Figura 3

Microscopía electrónica de células HeLa transfectadas con pcDNA4-VMP1 o con pcDNA4 vacío como control y crecidas en medio rico en factores de crecimiento y nutrientes (magnificación X5000). En detalle ejemplos de estructuras observadas en las células que expresan VMP1-V5 que corresponden a: A) autofagosomas; B) estructura en forma de copa, como los preautofagosomas y C) autolisosomas.

La proteína *microtubule-associated protein 1 light chain 3* (LC3) se utiliza como marcador específico de vacuolas autofágicas. Durante la autofagia la forma citosólica de LC3 (LC3-I) se modifica por clivaje y lipidación, convirtiéndose en LC3-II, y se transloca desde el citosol a la membrana del autofagosoma [Kabeya Y y col., 2000]. La distribución intracelular de LC3 se observa como un patrón difuso en el citoplasma, sin embargo, al reclutarse LC3-II en los autofagosomas se observa un patrón punteado [Yoshimori T, 2004; Klionsky DJ y col., 2007]. Por lo tanto, las células que no están en proceso de autofagia muestran a LC3 difuso, mientras que las células que se encuentran en proceso de autofagia muestran un patrón punteado de LC3. El aumento de LC3-II durante la autofagia también puede observarse mediante el análisis por

western blot ya que las células aumentan la fracción LC3-II durante la autofagia, comparado con las células que no se encuentran en proceso de autofagia.

Para confirmar la especificidad de la inducción de autofagosomas obtenida por la expresión de VMP1, células 293T se transfectaron con el plásmido pcDNA4-VMP1 durante 24 horas. A continuación las células fueron fijadas en paraformaldehído 4% en PBS y se realizó una inmunofluorescencia utilizando un anticuerpo primario específico anti-LC3 y un anticuerpo secundario (Alexa 488) que permite detectar a LC3 por microscopia de fluorescencia. Como se observa en la Figura 4A, las células que expresan VMP1-V5 presentan la proteína LC3 endógena agrupada en un patrón punteado consistente con autofagia. Por otro lado el análisis por western blot permitió observar el aumento de la forma LC3-II en las células que expresan VMP1-V5 en comparación con el tratamiento con el plásmido vacío. Como parte de la proteína LC3-II queda dentro del autofagosoma y es degradada por los lisosomas, se bloqueó la proteólisis agregando un inhibidor de proteasas lisosomales, E64d, 4 hs antes de la transfección [Tanida I y col., 2005]. Como se observa en la figura el tratamiento con el inhibidor permite observar el aumento de la expresión de LC3-II en las células que expresan VMP1-V5 (Fig. 4B). Para realizar el western blot se utilizó el anticuerpo primario anti LC3, un anticuerpo secundario conjugado a peroxidasa y se reveló por quimioluminiscencia utilizando el kit ECL (Amersham Biosciences).

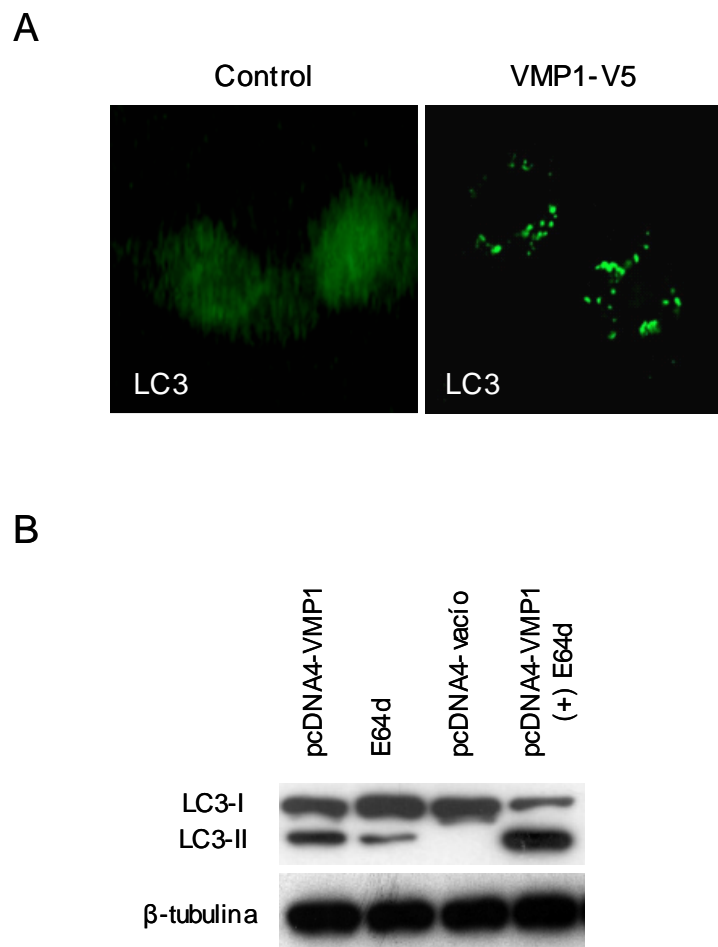


Figura 4

A) Inmunofluorescencia de LC3 endógeno en células 293T transfectadas con pcDNA4-VMP1 donde se observa el reclutamiento de LC3 en comparación con las células control en donde permanece difuso. B) Western blot de LC3 en células transfectadas con pcDNA4-VMP1 con y sin tratamiento con el inhibidor E64d. (*IB*: inmunoblotting). Se observa el aumento de la banda LC3-II que se hace más evidente al inhibir las enzimas lisosomales con E64d. Se utilizaron como control células tratadas con el plásmido pcDNA4 vacío.

Para confirmar estos resultados se utilizaron otras líneas celulares. Las líneas HeLa, NIH3T3 y nuevamente la línea 293T fueron crecidas en condiciones óptimas de nutrientes y factores de crecimiento. Luego fueron co-transfectadas con el plásmido

pcDNA4-VMP1 y con pRFP-LC3, que expresa la proteína LC3 fusionada a la proteína fluorescente roja (RFP), para poder visualizar la distribución intracelular de LC3. Como la progresión de la autofagia puede ser detenida por la inhibición de la fosfatidilinositol 3 kinasa (PI3K), un grupo de células co-transfectadas con el pRFP-LC3 y pcDNA4-VMP1 fueron tratadas con 3-metiladenina (3-MA), un conocido inhibidor de la autofagia que actúa inhibiendo a la PI3K. Las células fueron tratadas con 3-MA una hora antes y durante la co-transfección. La Figura 5 muestra el reclutamiento de RFP-LC3 en estructuras punteadas solo en las células transfectadas con el plásmido que expresa VMP1 en ausencia del inhibidor 3-MA, en contraste con el patrón difuso observado con el plásmido vacío o en las células transfectadas con VMP1 y tratadas con 3-MA. Se determinó el porcentaje de células con RFP-LC3 agrupado (como se explica en Materiales y Métodos) observándose un incremento significativo en el porcentaje de células con RFP-LC3 agrupado en las transfectadas con VMP1. En las células tratadas con 3-MA se observó una disminución del porcentaje de RFP-LC3 agrupado cercano al de las células transfectadas con el plásmido vacío. Todos estos resultados demuestran que la expresión de VMP1 gatilla autofagia en células de mamíferos aún bajo condiciones óptimas de nutrientes.

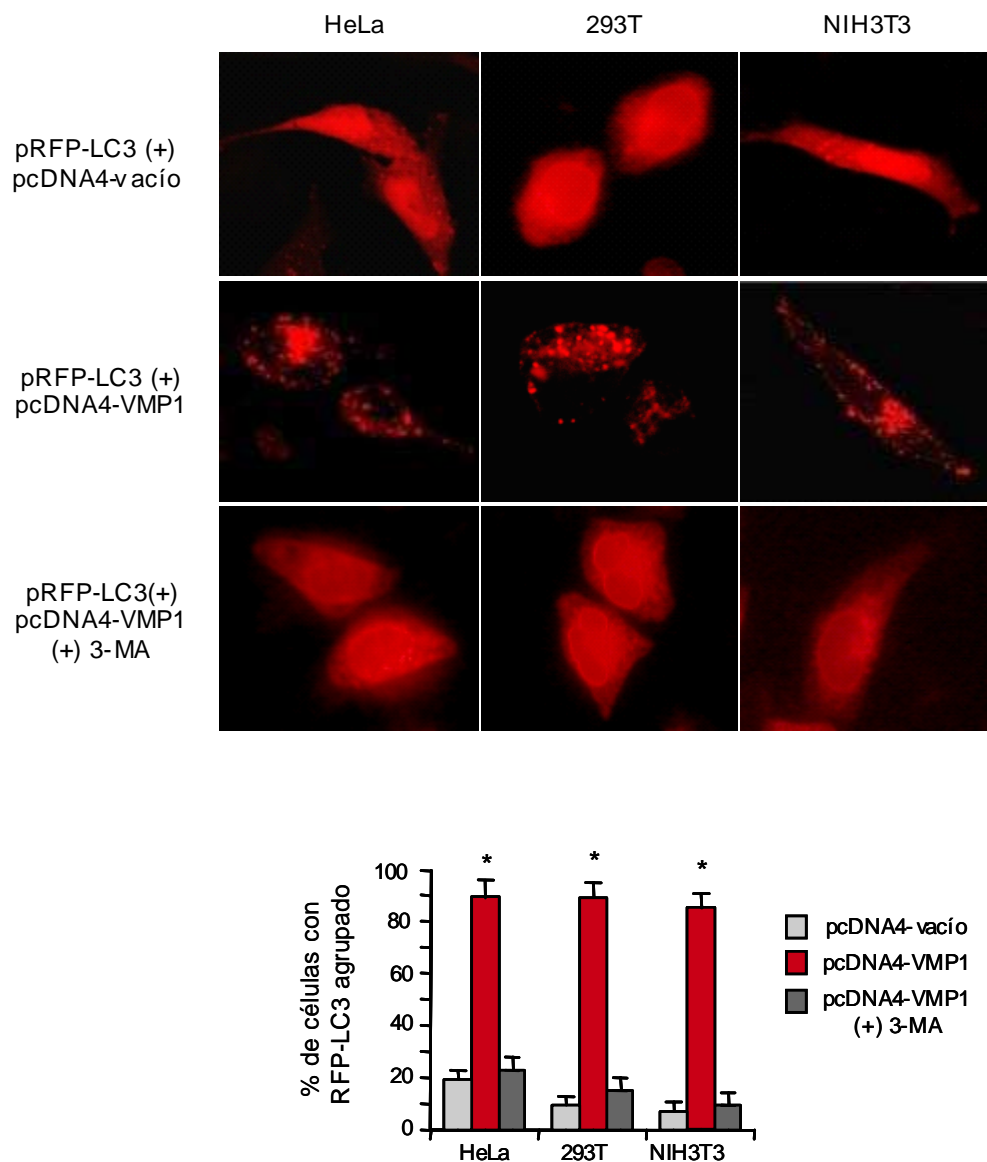


Figura 5

Las células HeLa, 293T y NIH3T3 fueron co-transfectadas con pRFP-LC3 y pcDNA4-VMP1 o el vector vacío y, cuando se indica, también fueron tratadas con 3-MA. Determinación del porcentaje de células con RFP-LC3 agrupado. Se observa un aumento de la agrupación de RFP-LC3 en las células transfectadas con VMP1 a diferencia de las células tratadas con 3-MA y las células control que presentan un patrón difuso de RFP-LC3. * $P < 0.05$, versus células con pcDNA4-vacío y pcDNA4-VMP1 + 3-MA.

2.2 VMP1 es inducida por el tratamiento con rapamicina y ayuno

El tratamiento de ayuno y el agregado de rapamicina son dos reconocidos tratamientos inductores de autofagia. La rapamicina inhibe la actividad de la proteína quinasa mTOR (Blanco de la Rapamicina en mamíferos) induciendo la autofagia. Bajo el tratamiento de ayuno la célula induce autofagia como un mecanismo de adaptación. Para demostrar que VMP1 está involucrada en el proceso de autofagia inducido por ambos estímulos se desarrollaron los siguientes experimentos. Para el tratamiento de ayuno se crecieron células HeLa y se reemplazó el medio Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) 10% suero fetal bovino (SFB), por medio Earle's Balanced Salt Solution (EBSS) que no contiene aminoácidos ni suero y es utilizado como inductor de autofagia. Para el tratamiento con rapamicina se agregó 5 µg/ml rapamicina al medio DMEM 10% SFB. Ambos tratamientos se realizaron durante 2 y 4 horas. Con el objetivo de determinar si se produce una inducción de la expresión del mRNA de VMP1 las células HeLa con ambos tratamientos y células sin tratar utilizadas como control fueron resuspendidas en Trizol. Se purificó el RNA y se llevó a cabo una RT-PCR utilizando primers específicos para VMP1. Como control interno se utilizó la amplificación del mRNA de GAPDH. La RT-PCR demostró que a las 2 y 4 hs de tratamiento se observa un aumento de la expresión del mRNA de VMP1 en la autofagia inducida por rapamicina y ayuno (Fig. 6A). Paralelamente células HeLa con los mismos tratamientos descritos previamente se lisaron en buffer de lisis con inhibidores de proteasas para western blot. Para realizar el western blot se utilizó el anticuerpo primario anti VMP1 desarrollado previamente contra el fragmento COOH, un anticuerpo secundario conjugado a peroxidasa y se reveló por quimioluminiscencia utilizando el kit ECL (Amersham Biosciences). Como control, se utilizó un anticuerpo anti β -tubulina (Santa Cruz Biotechnology). Como se puede observar en la Figura 6B los tratamientos de ayuno y rapamicina aumentan la expresión de VMP1 en los 2

tiempos ensayados. Estos resultados confirman que ambos tratamientos inducen la expresión de VMP1 y sugieren que la expresión de VMP1 se encuentra implicada en la respuesta de la célula a los estímulos autofágicos.

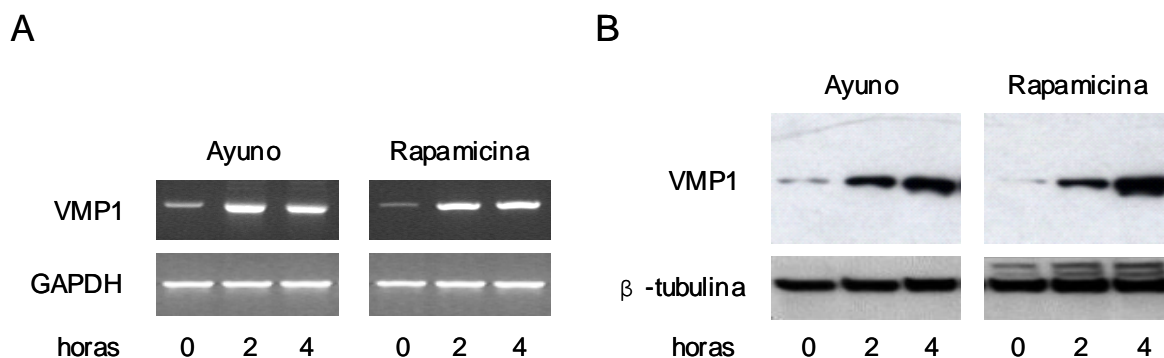


Figura 6

Las células HeLa fueron tratadas con rapamicina o con medio de cultivo EBSS para tratamiento de ayuno. La expresión de VMP1 fue analizada por RT-PCR (A), y western blot (B). Se observa en el aumento de la proteína y del mRNA de VMP1 a las 2 y 4 hs. bajo ambos tratamientos inductores de autofagia.

2.3 VMP1 es necesaria para la autofagia inducida por rapamicina y ayuno

Con el objetivo de determinar si VMP1 es necesaria para la inducción de autofagia, se disminuyó la expresión de VMP1 utilizando la estrategia del siRNA. El siRNA utilizado fue diseñado por Ambion para VMP1 humana. Las células HeLa fueron transfectadas con el siRNA de VMP1 y luego de 24 horas fueron tratadas con 5 μ g/ml rapamicina o con el medio EBSS para tratamiento de ayuno. Las muestras se procesaron para RT-PCR y western blot. El análisis del mRNA evaluado por RT-PCR mostró una disminución de la expresión del mRNA de VMP1 en las células transfectadas con el siRNA de VMP1 comparadas con el siRNA control en los dos tratamientos realizados (Fig. 7A). El análisis de la proteína VMP1 realizado por western blot también mostró

una disminución en la expresión de VMP1 en células transfectadas con el siRNA de VMP1 en ambos tratamientos (Fig. 7B). Estos resultados indican que la expresión de VMP1 fue eficientemente silenciada por el siRNA específico ante los tratamientos inductores de autofagia. Se utilizó entonces esta estrategia para investigar si la expresión de VMP1 es requerida para el desarrollo de autofagia inducida por ayuno y rapamicina.

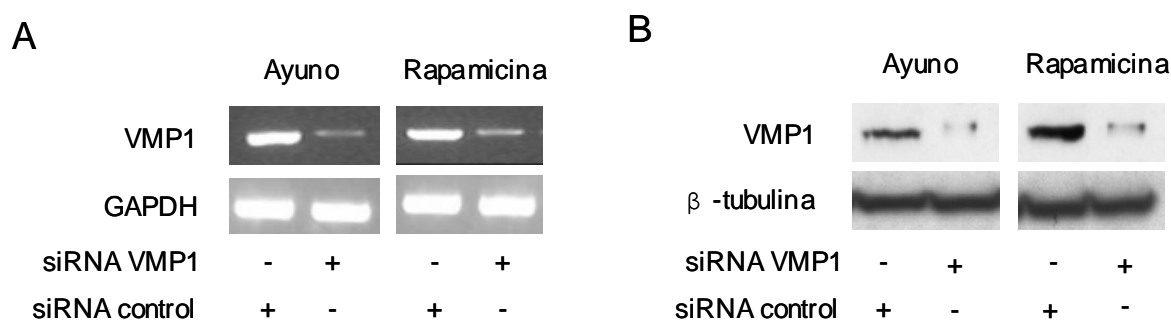


Figura 7

Las células HeLa fueron transfectadas con el siRNA de VMP1 o siRNA control y luego tratadas con rapamicina o con medio de cultivo EBSS para tratamiento de ayuno. La expresión de VMP1 fue analizada por RT-PCR (A), y western blot (B). La transfección con el siRNA de VMP1 disminuyó la expresión del mRNA y de la proteína VMP1 durante el tratamiento con ayuno y rapamicina.

Para evaluar si la expresión de VMP1 es necesaria para el desarrollo de autofagia, se analizó la formación de autofagosomas utilizando el marcador LC3. Las células HeLa fueron transfectadas durante 24 horas con pRFP-LC3 y siRNA de VMP1 o siRNA control y posteriormente fueron tratadas con 5 μ g/ml rapamicina o ayuno durante 4 hs. Luego del tratamiento las células fueron fijadas y analizadas en un microscopio de fluorescencia. Los resultados muestran que las células tratadas con ayuno y rapamicina en las que la expresión de VMP1 fue silenciada mediante el siRNA específico presentan una distribución difusa de la proteína de fusión RFP-LC3, a

diferencia de las células transfectadas con el siRNA control en las cuales se observa el patrón agrupado ante los tratamientos inductores de autofagia. Al analizar el porcentaje de células con RFP-LC3 agrupado en ambos tratamientos se observa que en las células tratadas con el siRNA de VMP1 el porcentaje de agrupación se encuentra significativamente disminuido en comparación con las células transfectadas con el siRNA control (Fig. 8). Estos resultados indican que la expresión de VMP1 es necesaria para la formación de autofagosomas durante la autofagia inducida por rapamicina y ayuno.

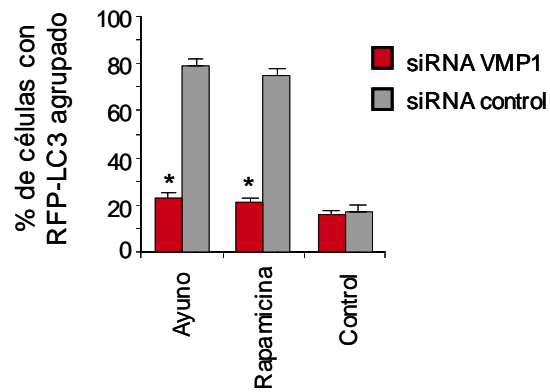
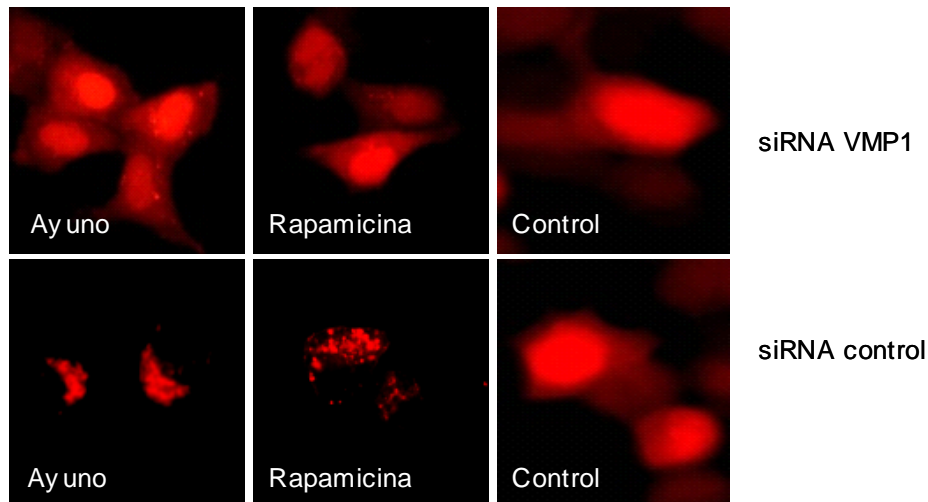


Figura 8

Microscopía de fluorescencia de RFP-LC3 en células HeLa transfectadas con pRFP-LC3 y siRNA de VMP1 o siRNA control y tratadas con 5 $\mu\text{g/ml}$ rapamicina o con medio de cultivo EBSS para tratamiento de ayuno. Determinación del porcentaje de células con RFP-LC3 agrupado. Se observa que en las células transfectadas con el siRNA de VMP1 y tratadas con ayuno y rapamicina está disminuida la agrupación de RFP-LC3 comparada con las células transfectadas con el siRNA control. * $P < 0.05$, versus células transfectadas con siRNA control con el mismo tratamiento.

3. ESTUDIO DEL ROL DE VMP1 EN EL DESARROLLO TUMORAL

La autofagia interviene tanto en la promoción como en la prevención del cáncer, y estos roles pueden ser alterados durante la progresión del tumor. Actualmente, el tratamiento médico contra el cáncer pancreático se basa en la utilización de gemcitabina. Lamentablemente sólo el 12% de los pacientes responden a este tratamiento y la razón de esta falta de eficacia aún se desconoce. La autofagia es considerada actualmente un mecanismo importante de muerte o supervivencia de las células tumorales y una potencial herramienta de tratamiento antitumoral. En consecuencia, la evaluación de autofagia en la célula tumoral en respuesta a los agentes antitumorales tiene una importante relevancia clínica. La hipótesis de trabajo es que VMP1 interviene en la respuesta de las células de cáncer al tratamiento antitumoral. Las células tumorales pancreáticas se caracterizan por su resistencia al tratamiento, se analizó entonces la expresión de VMP1 y la capacidad de realizar autofagia en estas células. Se utilizó como modelo la respuesta de las líneas tumorales pancreáticas PANC-1 y MIAPaCa-2 al tratamiento con gemcitabina. Luego, se buscó una dosis letal del fármaco y se analizaron los mecanismos de muerte celular en respuesta al tratamiento.

3.1 Cuantificación de la expresión del mRNA de VMP1

Se determinó la expresión basal del mRNA de VMP1 en la línea tumoral PANC-1 y MIAPaCa-2 y se lo comparó con la expresión basal en células HeLa utilizando la técnica de RT-PCR Real Time. Como control interno se amplificó la β -actina. Los niveles de mRNA de VMP1 fueron relativizados al mRNA de β -actina. Los resultados mostraron que la expresión basal del mRNA de VMP1 de las células PANC-1 y MIAPaCa-2 es significativamente mayor que el de las células HeLa (Fig. 9).

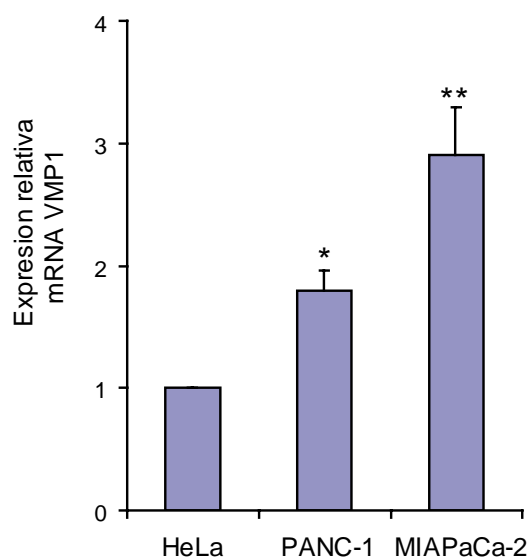


Figura 9

Expresión relativa del mRNA de VMP1 medido por RT-PCR Real time en células HeLa, PANC-1 y MIAPaCa-2 sin tratamiento. Se observa un aumento en la expresión basal del mRNA de VMP1 en las células PANC-1 y MIAPaCa-2 comparado con células HeLa. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ versus células HeLa.

Luego se determinó como varía la expresión de VMP1 en las células tumorales ante distintos tratamientos quimioterápicos. Se cuantificó el nivel de expresión del mRNA de VMP1 relativo al de las células sin tratamiento. Se utilizaron células PANC-1 y MIAPaCa-2 y se les realizaron 2 tratamientos diferentes. El primer tratamiento consistió en la administración durante 8 hs de 200 μM gemcitabina, el tratamiento utilizado para el cáncer de páncreas. El segundo tratamiento fue la administración de 5 $\mu\text{g/ml}$ rapamicina durante 8 hs. La rapamicina, además de ser un conocido inductor de la autofagia, es utilizada para el tratamiento de diferentes tipos de cáncer.

Luego se purificó el RNA y se realizó la RT-PCR Real. Como control interno se utilizó la amplificación de la β -actina. Como se muestra en la Figura 10, se observa un aumento en la expresión del mRNA de VMP1 en respuesta a los dos tratamientos. Los

resultados obtenidos sugieren que VMP1 está involucrada en la respuesta celular a los agentes antitumorales.

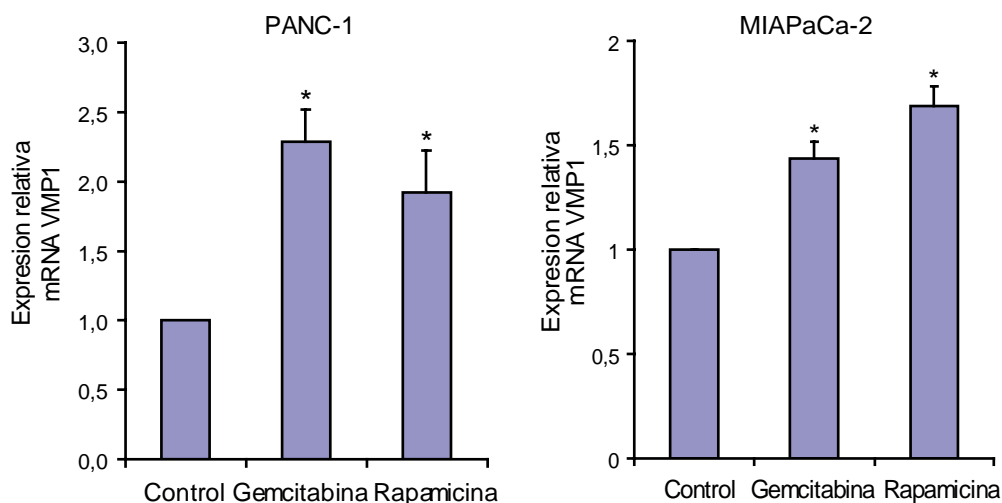


Figura 10

Las células PANC-1 y MIAPaCa-2 fueron tratadas con 200 μ M gemcitabina y 5 μ g/ml rapamicina durante 8 horas y el mRNA de VMP1 fue medido por RT-PCR Real time. Se observa un aumento en la expresión del mRNA de VMP1 bajo los tratamientos con rapamicina y gemcitabina. * $P < 0.05$, versus control.

3.2 Efecto de la gemcitabina en la viabilidad de células PANC-1 y MIAPaCa-2.

Se analizó la sensibilidad de las células de cáncer pancreático al tratamiento con gemcitabina. Las líneas celulares PANC-1 y MIAPaCa-2 fueron tratadas con 20 μ M, 200 μ M y 2000 μ M de gemcitabina. Luego de 24 horas se realizó el recuento de células con Tripán Blue y se determinó el porcentaje de células viables respecto al control. La Figura 11A muestra el porcentaje de células viables respecto al control en función de la dosis de gemcitabina aplicada durante 24 horas. El tratamiento con 200 μ M y 2000 μ M de gemcitabina afectó significativamente la supervivencia celular. A continuación las células fueron tratadas con gemcitabina 200 μ M y se determinó la

viabilidad celular a las 24, 48 y 72 horas (Fig. 11B). Se observó que la sobrevivencia celular disminuyó significativamente en ambas líneas celulares en los 3 tiempos ensayados. Los siguientes experimentos se realizaron utilizando 200 μ M de gemcitabina.

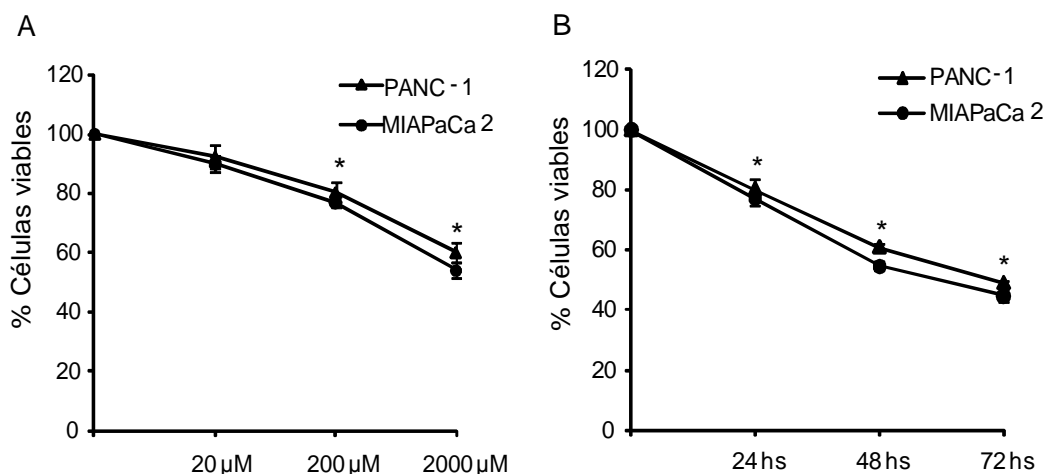


Figura 11

(A) Las células PANC-1 y MIAPaCa-2 fueron tratadas con 20, 200 y 2000 μ M gemcitabina durante 24 hs. (B) Las células fueron tratadas con 200 μ M gemcitabina y se determinó la viabilidad celular a las 24, 48 y 72 hs. El número de células viables fue determinado por el método de Trypan Blue. Los valores fueron normalizados con las células control (media \pm E.S.; n = 3). * $P < 0.05$, versus células control.

3.3 La gemcitabina induce autofagia en células PANC-1 y MIAPaCa-2.

Con el objetivo de determinar si el tratamiento con gemcitabina induce autofagia, células PANC-1 y MIAPaCa-2 fueron tratadas con gemcitabina 200 μ M y a distintos tiempos de tratamiento (3, 8, 18 y 24 hs) las células fueron teñidas con Naranja de Acridina. La Naranja de Acridina tiñe el núcleo y citoplasma de las células y fluoresce de color verde, mientras que en los compartimentos ácidos fluorescen de color rojo, de esta forma se pueden detectar compartimentos acídicos como los producidos durante la autofagia [Klionsky DJ. y col, 2007]. A las 8 horas de tratamiento con 200 μ M

gemcitabina se observó la mayor acumulación de vesículas acídicas iguales a las producidas durante el proceso de autofagia en ambas líneas celulares (Fig. 12A). En estas condiciones se prepararon células para estudios de microscopía electrónica. La inclusión y las grillas fueron realizadas en el Instituto de Biología Celular De Robertis. El análisis de la microscopía electrónica reveló características ultraestructurales correspondientes a autofagosomas (Fig. 12B).

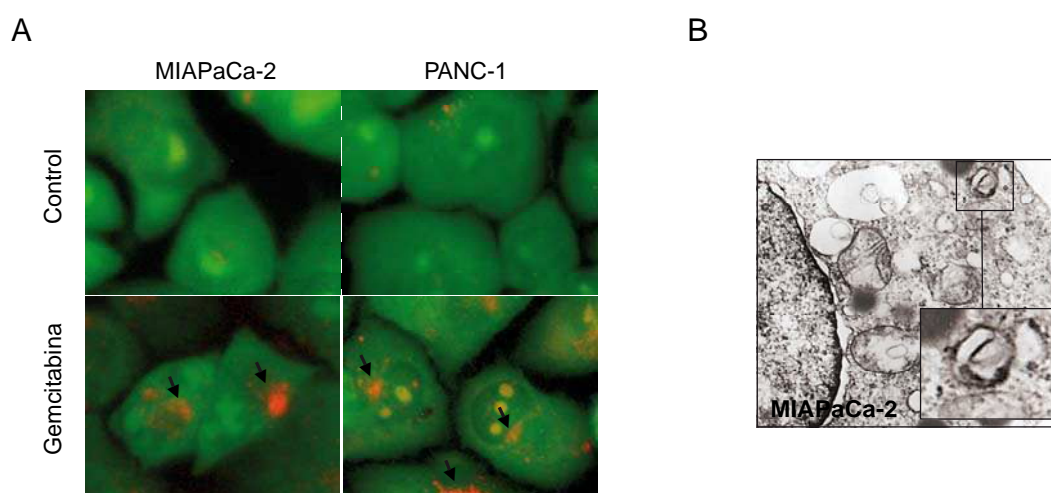


Figura 12

Las células PANC-1 y MIAPaCa-2 fueron tratadas con 200 μ M gemcitabina durante 8 hs. (A) Microscopía de fluorescencia que muestra organelas acídicas teñidas con Naranja de Acridina (flechas). Fotos representativas de 3 experimentos independientes. (B) Microscopía electrónica de células MIAPaCa-2 tratadas con 200 μ M gemcitabina (magnificación, x5000). En el recuadro se observa una ultraestructura compatible con autofosoma.

Luego se estudió el marcador de autofagia LC3. Las células PANC-1 y MIAPaCa-2 fueron transfectadas con el plásmido de expresión pRFP-LC3 y después de 24 horas fueron tratadas con 200 μ M gemcitabina durante 8 horas. Un grupo de células fuer lisado con buffer de lisis y se analizaron las proteínas RFP-LC3-I y RFP-LC3-II por western blot. Para realizar el western blot se utilizó el anticuerpo primario anti LC3, un

anticuerpo secundario conjugado a peroxidasa y se reveló por quimioluminiscencia utilizando el kit SuperSignal West Pico, (Pierce). Se observó un aumento de la forma RFP-LC3-II en las células tratadas con gemcitabina (Fig. 13A). El grupo de células restante fue fijado y la fluorescencia fue observada en el microscopio. La Figura 13B muestra que en las células tratadas con gemcitabina se observa el reclutamiento de la proteína de fusión RFP-LC3 en un patrón punteado a diferencia de las células control en donde el patrón observado es difuso. Se determinó el porcentaje de células transfectadas con pRFP-LC3 con patrón punteado y se observaron diferencias significativas en células tratadas con gemcitabina respecto a las células control. El análisis del conjunto de los resultados obtenidos indica que el tratamiento con gemcitabina induce la autofagia en células PANC-1 y MIAPaCa-2.

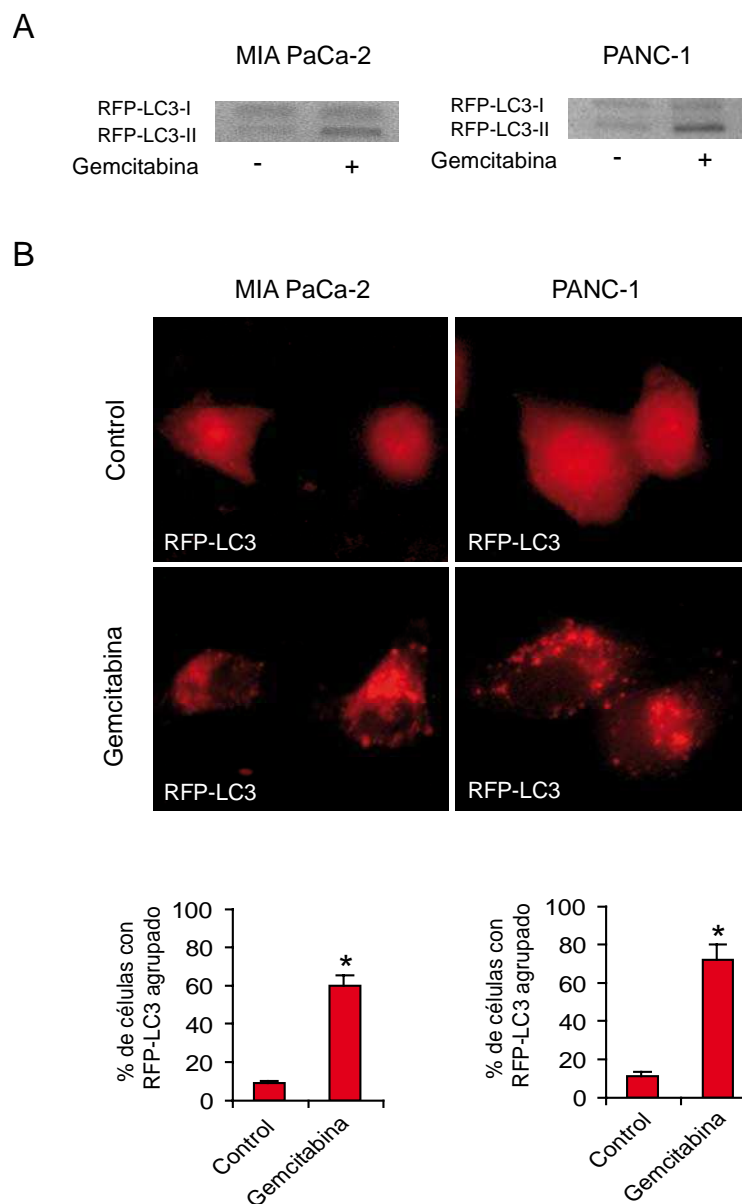


Figura 13

Las células fueron transfectadas con pRFP-LC3 durante 24 hs y luego tratadas con 200 μ M gemcitabina durante otras 8 hs. (A) Western blot de RFP-LC3-I, RFP-LC3-II. (B) Microscopia de fluorescencia y determinación del porcentaje de células con puntado RFP-LC3 (media \pm E.S.; n = 3). En las células tratadas con 200 μ M gemcitabina durante 8 hs se observa un aumento de la banda RFP-LC3-II y un patrón agrupado de RFP-LC3 en comparación con las células control. * $P < 0.05$, versus células control.

3.4 La autofagia inducida por gemcitabina promueve la muerte celular por apoptosis en células MIAPaCa-2.

Se ha propuesto que la autofagia lleva a la apoptosis o que actúa como una muerte programada diferente de la apoptosis [Maiuri MC y col., 2007b; Yousefi S y col., 2006; Gonzalez-Polo RA 2005; Boya P y col., 2005]. Al mismo tiempo, se ha informado que la autofagia representa un mecanismo de protección contra la muerte en condiciones de ayuno y también se ha observado que constituye un mecanismo de resistencia contra la apoptosis en células tumorales sometidas a diversos tratamientos [Mizushima N y col., 2004; Yoshimori T 2004; Klionsky DJ y col., 2007; Tanida I y col., 2005]. A continuación se estudió el rol de la autofagia en la muerte de células MIAPaCa-2 inducida por gemcitabina.

En primer lugar se determinó el porcentaje de apoptosis mediante la detección de células marcadas con anexina V y 7-Amino-actinomycin D (7AAD) utilizando citometría de flujo. El fosfolípido fosfatidilserina se encuentra en la cara interna de la membrana plasmática y es expuesto en la cara externa de dicha membrana cuando comienza el proceso de apoptosis. La anexina V es una proteína que se une específicamente a la fosfatidilserina permitiendo su detección. Por lo tanto las células en apoptosis exponen la fosfatidilserina y se marcan con anexina V debido a su afinidad. También se utilizó 7AAD, el cual permite diferenciar entre células vivas y muertas. El compuesto 7AAD solo puede ingresar en las células que tienen dañada la membrana plasmática, por lo tanto las células vivas con la membrana intacta no se colorean, mientras que las células muertas con la membrana dañada se tiñen con el compuesto. Para inhibir la autofagia las células fueron tratadas con 10 mM 3-MA, un inhibidor de autofagia comúnmente utilizado. Las células MIAPaCa-2 fueron tratadas con 200 μ M gemcitabina o con 200 μ M gemcitabina y 10 mM 3-MA durante 24 y 48 horas. Los gráficos de la citometría de flujo muestran que el porcentaje de células anexina V positivas se incrementó significativamente luego del tratamiento por 24 horas con

gemcitabina comparadas con el control y que este incremento fue mayor luego de las 48 horas. Sorprendentemente, la inhibición de autofagia con 3-MA disminuyó el porcentaje de células anexina V positivas luego de 24 y 48 horas de tratamiento (Fig. 14A). Es importante destacar que la inhibición de la autofagia prácticamente revierte el efecto letal de la gemcitabina a las 24 hs de tratamiento. Para confirmar que sólo las células apoptóticas fueran evaluadas, se analizó por citometría de flujo el porcentaje de células apoptóticas tempranas, es decir, células que se encuentran aún vivas pero que comenzaron el proceso de apoptosis ya que tienen expuesta la fosfatidilserina en la membrana externa. Por consiguiente, se marcan con anexina V pero no con 7AAD (células Anexina V positivas y 7AAD negativas). Se utilizó este grupo para confirmar que solo las células apoptóticas fueran evaluadas, ya que no todas las células anexina V positivas son apoptóticas debido a que las células marcadas con anexina V y 7AAD pueden ser células necróticas. La Figura 14B muestra que el porcentaje de células apoptóticas tempranas aumentó significativamente luego de 24 horas de tratamiento con gemcitabina. Notablemente este incremento no fue observado cuando las células fueron tratadas con gemcitabina y 3-MA en donde los valores obtenidos fueron similares al control, confirmando que la inhibición de la autofagia disminuye la apoptosis inducida por gemcitabina y sugiriendo que la acción letal de la gemcitabina sobre las células tumorales pancreáticas esta mediada por el desarrollo de autofagia como respuesta celular al tratamiento. Luego de 48 horas de tratamiento, la 3-MA reduce significativamente, pero no inhibe completamente, la apoptosis inducida por gemcitabina.

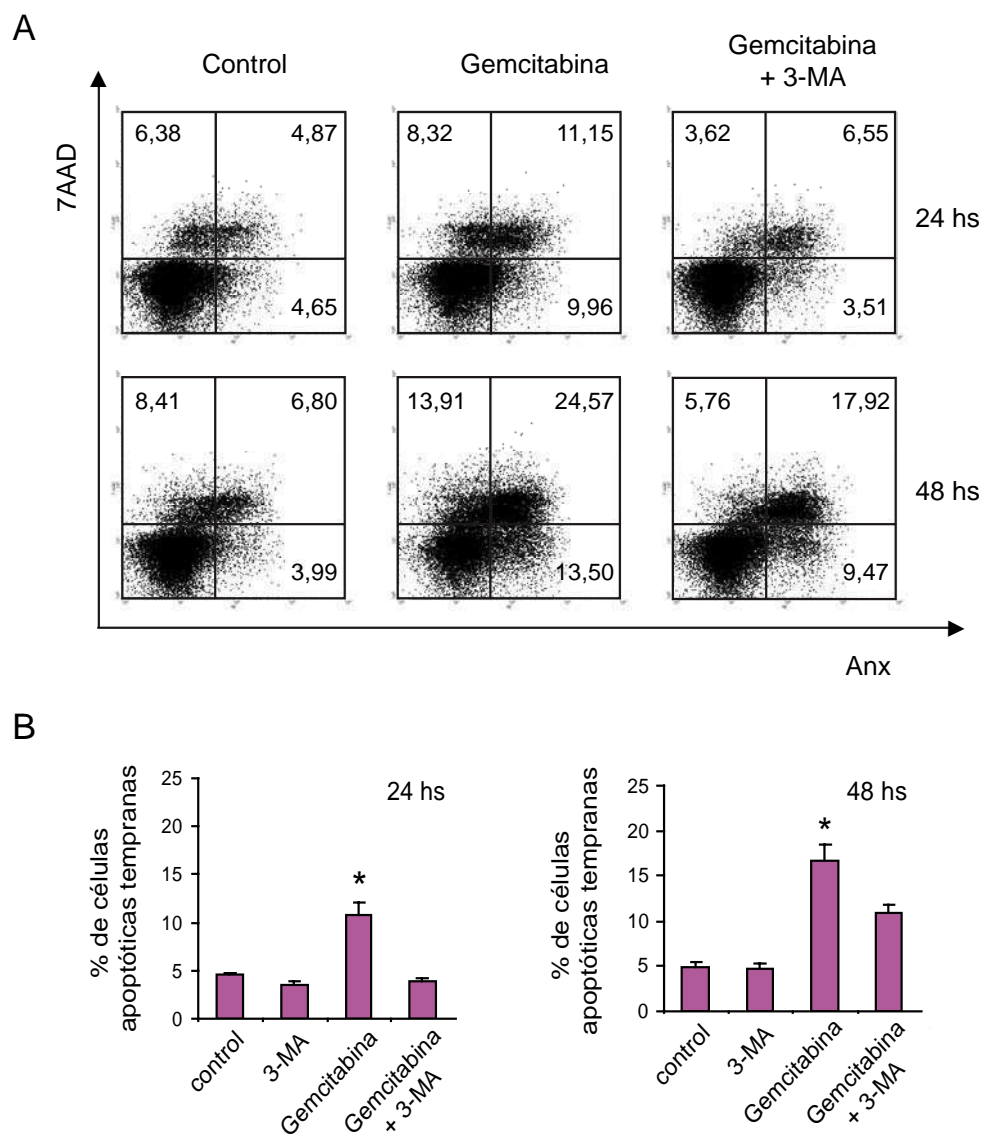


Figura 14

Las células MIAPaCa-2 fueron tratadas con 200 μ M gemcitabina durante 24 y 48 hs. Cuando se indica las células también fueron tratadas con 10 mM 3-MA 1 hora antes de agregar la gemcitabina. (A) Análisis por citometría de flujo. Los gráficos son representativos de 3 experimentos independientes. (B). Porcentaje de células apoptóticas tempranas (células Anexina V positivas, 7AAD negativas). Se observó un aumento de células apoptóticas tempranas luego de 24 y 48 hs de tratamiento con gemcitabina. El tratamiento con 3-MA disminuyó la apoptosis inducida por la gemcitabina. En cada medición al menos 20.000 células fueron contadas (media \pm E.S.; n = 3). * $P < 0.05$, versus tratamiento control y gemcitabina + 3-MA.

Los estímulos inductores de apoptosis convergen hacia un punto común que implican la activación de las caspasas [Alnemri ES, 1997]. Las caspasas efectoras son las que ejecutan la apoptosis (caspasas 3, 6 y 7), actúan proteolíticamente sobre multitud de sustratos celulares que son procesados de manera coordinada con la finalidad de hacerles perder su función o modificársela, de tal manera que la organización celular resulte desmantelada. Cortan después de un residuo de aspártico, cuando existe en el sustrato una secuencia de reconocimiento específica compuesta por cuatro aminoácidos [Pop C y col., 2009]. Para confirmar el rol de la autofagia en la muerte celular por apoptosis las células MIAPaCa-2 fueron tratadas por 24 hs con 200 μ M gemcitabina o con 200 μ M gemcitabina y 10 mM 3-MA y luego se determinó la viabilidad celular y la actividad de las caspasas 3 y 7 utilizando el kit Apo Live-Glo Multiplex Assay (Promega). La actividad obtenida fue normalizada con la viabilidad celular y fue expresada relativa al control. El resultado se muestra en la Figura 15. La actividad relativa de las caspasas 3 y 7 aumentó significativamente en células tratadas con gemcitabina respecto a las células control. Además, la actividad de las caspasas 3 y 7 en células tratadas con gemcitabina fue mayor que en las células tratadas con gemcitabina y 3-MA. Una vez más la inhibición de la autofagia con 3-MA revirtió el efecto del tratamiento con gemcitabina en las células tumorales pancreáticas. Estos resultados confirman los datos obtenidos utilizando citometría de flujo, y sugieren que la autofagia inducida por gemcitabina favorece la apoptosis de las células MIAPaCa-2.

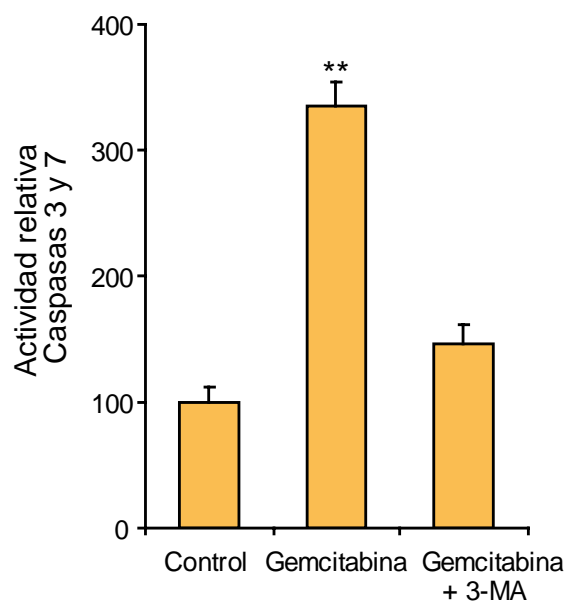


Figura 15

Determinación de la actividad de las caspasa 3 y 7. Las células MIAPaCa-2 fueron tratadas con 200 μ M gemcitabina o con 200 μ M gemcitabina más 10 mM 3-MA durante 24 hs. La actividad de caspasa 3 y 7 está normalizada por la viabilidad celular y expresada relativa al control. El tratamiento con gemcitabina aumenta significativamente la actividad de las caspasa 3 y 7 comparado con el control y con el tratamiento con gemcitabina + 3-MA. ** $P < 0.01$, versus tratamiento control y gemcitabina + 3-MA.

Finalmente las células MIAPaCa-2 fueron tratadas por 24 horas con 200 μ M gemcitabina o con 200 μ M gemcitabina y 10 mM 3-MA. Luego las células se levantaron y se agregó una mezcla con 50 μ g/ml Naranja de Acridina y 50 μ g/ml Bromuro de Etidio en PBS. Finalmente las células fueron visualizadas en un microscopio de fluorescencia. En la Figura 16 se muestran evidencias morfológicas de apoptosis. En el gráfico se observa el número de células apoptóticas cada 100 células observadas. Los resultados muestran que las células apoptóticas aumentan bajo el tratamiento con gemcitabina, sin embargo este aumento no se observa cuando las células son tratadas con gemcitabina más el inhibidor de autofagia 3-MA. El conjunto

de los resultados obtenidos mediante citometría de flujo, actividad de caspasas y estudios morfológicos demuestran que el efecto letal de la gemcitabina sobre las células tumorales pancreáticas esta mediado por la inducción temprana de autofagia y sugieren que la vía de autofagia inducida por gemcitabina promueve la apoptosis en células de cáncer pancreático.

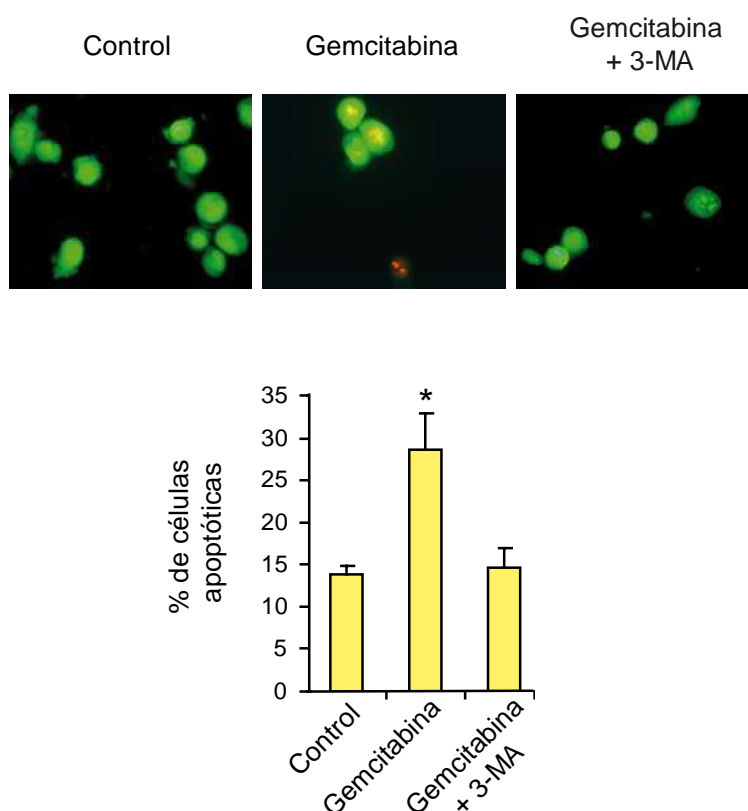


Figura 16

Determinación del porcentaje de células apoptóticas. Las células MIAPaCa-2 fueron tratadas con 200 μ M gemcitabina o con 200 μ M gemcitabina y 10 mM 3-MA durante 24 hs, teñidas con Naranja de Acridina y Bromuro de Etidio y visualizadas en microscopio de fluorescencia. El tratamiento con gemcitabina aumenta significativamente la morfología apoptótica comparado con el control y con el tratamiento con gemcitabina + 3-MA. * $P < 0.05$ versus tratamiento control y gemcitabina + 3-MA.

3.5 Clonado en pCMS3-H1p-EGFP para el silenciamiento de VMP1

Con el objeto de evaluar la participación de VMP1 durante el tratamiento con gemcitabina en las células tumorales pancreáticas, se silenció su expresión utilizando la estrategia *short hairpin* RNA. Para este fin utilizamos el plásmido pCMS3-H1p-EGFP [Gomez TS y col., 2005]. El plásmido posee un sitio en donde fue clonada una secuencia *short hairpin* RNA específica para silenciar VMP1 (shRNA de VMP1) y también contiene un cassette de transcripción separado que expresa EGFP, para poder identificar las células transfectadas. Por lo tanto las células transfectadas expresan EGFP y el shRNA de VMP1, y de esta forma se puede identificar a las células con VMP1 silenciado por su fluorescencia verde. La secuencia de shRNA de VMP1 esta formada por los sitios para las enzimas de restricción *Bgl*II y *Hind*III, la secuencia blanco de VMP1 y una secuencia loop para la formación del shRNA. La secuencia blanco elegida de VMP1 fue la misma que para el siRNA de VMP1 (ver Materiales y Métodos). Para el clonado se compraron los oligos con la secuencia shRNA de VMP1 y luego se clonaron en el plásmido pCMS3-H1p-EGFP el cual fue previamente cortado con las enzimas *Bgl*II y *Hind*III. Como control se utilizó una secuencia inespecífica. En primer lugar se verificó la eficiencia del vector que contiene el shRNA de VMP1 para disminuir la expresión de VMP1. Se transfectaron células MIAPaCa-2 con el vector control o el vector que contiene el shRNA de VMP1, luego de 24 horas las células fueron tratadas con 200 μ M gemcitabina durante 8 horas y posteriormente se lisaron en buffer de lisis con inhibidores de proteasas. Para realizar el western blot se utilizó el anticuerpo primario anti VMP1 contra el fragmento COOH, un anticuerpo secundario conjugado a peroxidasa y se reveló por quimioluminiscencia utilizando el kit ECL (Amersham Biosciences). El análisis realizado por western blot mostró una disminución en la expresión de VMP1 en células transfectadas con el shRNA de VMP1 durante el tratamiento con gemcitabina comparado con la expresión en células transfectadas con el shRNA control con el mismo tratamiento (Fig. 17).

Estos resultados confirman que la transfección con el plásmido que expresa el shRNA de VMP1 disminuye eficientemente la expresión de VMP1

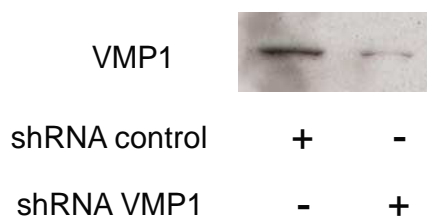


Figura 17

Western blot de VMP1 en células MIAPaCa-2 transfectadas durante 24 hs con los vectores que expresan shRNA control o shRNA de VMP1 y luego tratadas con 200 μ M gemcitabina durante 8 hs. Se observa la disminución en la expresión de VMP1 en las transfectadas con el plásmido que expresa el shRNA de VMP1 comparada con las células transfectadas con el plásmido control.

3.6 La autofagia inducida por gemcitabina esta mediada por VMP1.

Como hemos descrito previamente, la proteína VMP1 es una proteína de membrana que participa del proceso de autofagia en células de mamíferos. VMP1 es una proteína transmembrana cuya expresión gatilla la autofagia en diferentes células de mamíferos y es necesaria para la formación de autofagosomas. Por otro lado, como ya se demostró anteriormente, la gemcitabina induce la expresión del mRNA de VMP1. Con el objetivo de determinar si VMP1 está involucrada en la vía de autofagia inducida por gemcitabina, se evaluó el reclutamiento de LC3 en células tratadas con gemcitabina que poseen VMP1 silenciado. Las células MIAPaCa-2 fueron co-transfectadas con el plásmido pRFP-LC3 y el plásmido pCMS3-H1p-EGFP que expresa el shRNA de VMP1 y, en forma separada, la proteína EGFP o el plásmido control. Luego de 24 horas las células fueron tratadas con 200 μ M gemcitabina durante 8 horas y luego visualizadas en un microcopio de fluorescencia. Se observó que en las células tratadas con

gemcitabina y que expresan el shRNA de VMP1 (observado por la fluorescencia verde), la distribución de RFP-LC3 se encuentra difusa a diferencia de las células tratadas con gemcitabina y que expresan el shRNA control, las cuales muestran un patrón agrupado de RFP-LC3 (Fig. 18). El punteado en la foto delimita una célula tratada con gemcitabina pero que no está transfectada con el plásmido que expresa el shRNA de VMP1, ya que no se observa la expresión de EGFP. Por este motivo se observa el patrón punteado de RFP-LC3 a diferencia de la célula que se observa en la misma foto que presenta el patrón difuso de RFP.LC3 por poseer VMP1 silenciado. Luego se determinó el porcentaje de células con patrón punteado de RFP-LC3 en 100 células co-transfectadas, es decir en células que expresan RFP-LC3, shRNA de VMP1 y EGFP o el vector control. El análisis determinó que el porcentaje de células con patrón agrupado de RFP-LC3 tratadas con gemcitabina que expresan el shRNA de VMP1 es significativamente menor al que se obtiene en células con el mismo tratamiento pero que expresan el shRNA control (Fig. 18). Estos resultados muestran que durante el tratamiento con gemcitabina, VMP1 es necesaria para la formación de autofagosomas y, por lo tanto, que la expresión de VMP1 es necesaria para la autofagia inducida por gemcitabina.

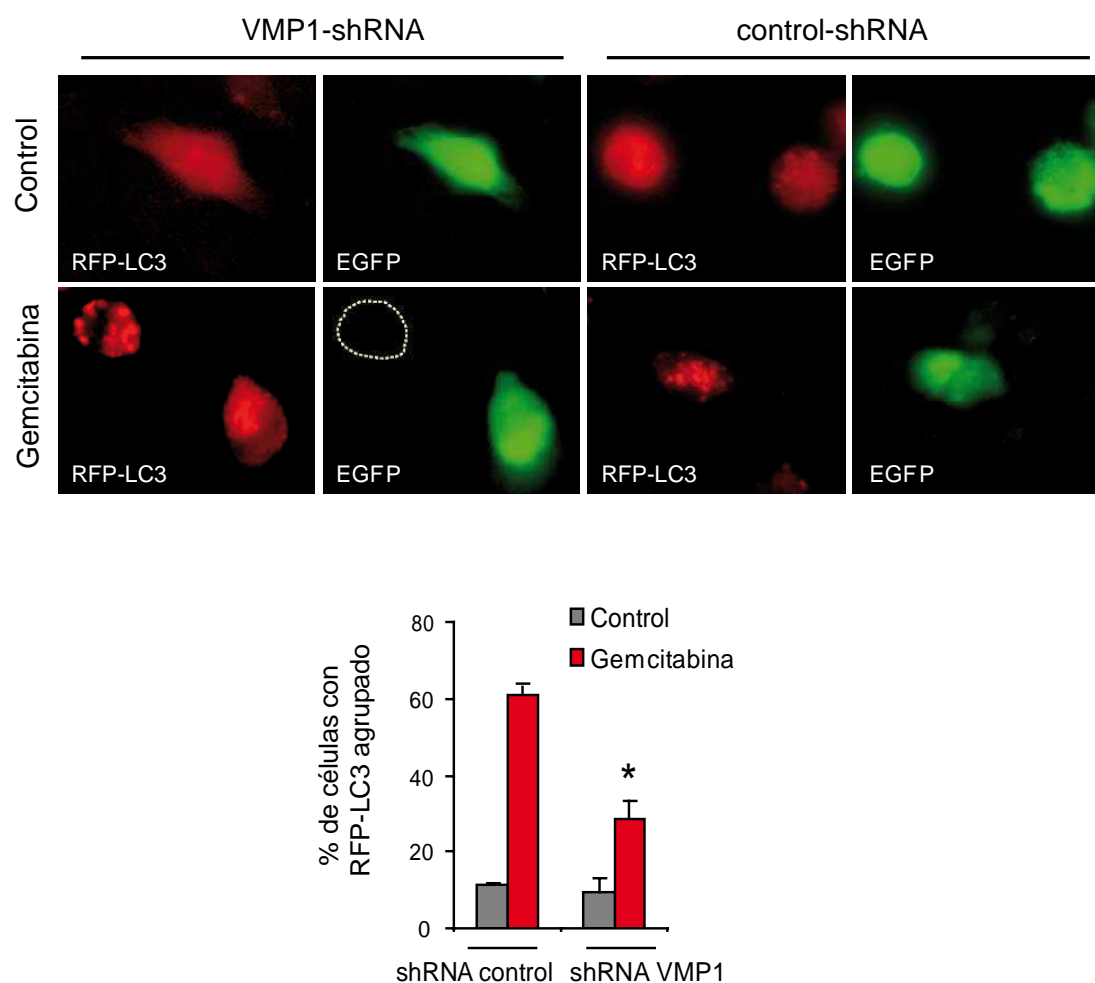


Figura 18

Microscopía de fluorescencia. Las células MIAPaCa-2 fueron co-transfectadas con pRFP-LC3 y con los plásmidos que expresan shRNA control o shRNA de VMP1. Luego de 24 hs las células fueron tratadas con 200 μ M gemcitabina durante 8 hs. Determinación del porcentaje de células con punteado RFP-LC3 (media \pm E.S.; n = 3). Se observa que en las células tratadas con gemcitabina que expresan el shRNA de VMP1 esta disminuida la agrupación de RFP-LC3 comparada con las células transfectadas con el sh RNA control. * $P < 0.05$, versus células transfectadas con shRNA control y tratadas con gemcitabina.

Con el objetivo de determinar el rol de VMP1 en la apoptosis inducida por gemcitabina se utilizó nuevamente el silenciamiento de VMP1 en células tratadas con gemcitabina y se analizó la apoptosis por citometría de flujo. Las células MIAPaCa-2 fueron transfectadas con el plásmido que expresa el shRNA de VMP1, que permite silenciar VMP1, o el plásmido control y 24 horas más tarde fueron tratadas con 200 μ M gemcitabina por otras 24 horas. Luego se analizaron por citometría de flujo las células apoptóticas tempranas (anexina V positivas y 7AAD negativas) solo en las células transfectadas, es decir en las células que poseen silenciado VMP1 y que expresan EGFP. Por lo tanto para el análisis solo se consideraron a las células fluorescentes verdes. Los datos fueron analizados en 3 experimentos independientes. Para cada ensayo se contaron al menos 20.000 células. Se encontró una reducción significativa del número de células apoptóticas tempranas en células silenciadas para VMP1 tratadas con gemcitabina comparadas con las células que expresan el shRNA control con el mismo tratamiento (Fig. 19). Estos resultados sugieren que la expresión de VMP1 inducida por gemcitabina participa en la apoptosis de las células tumorales pancreáticas en respuesta al tratamiento.

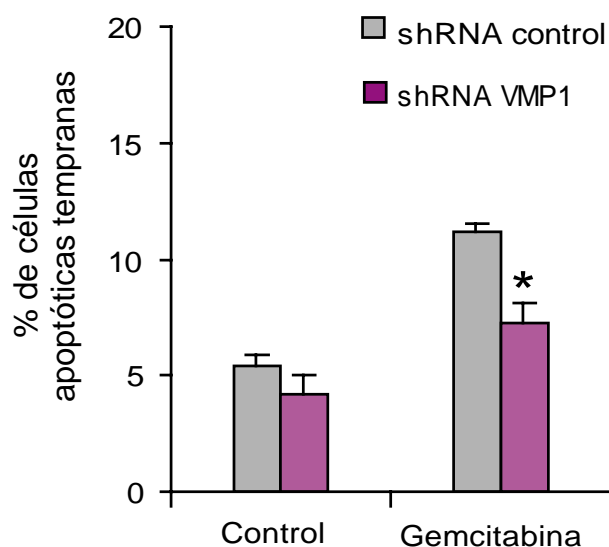


Figura 19

Análisis por citometría de flujo. Las células MIAPaCa-2 fueron transfectadas durante 24 hs con los vectores que expresan shRNA control o shRNA de VMP1 y luego tratadas con 200 μ M gemcitabina durante otras 24 hs. Se determinó el porcentaje de células apoptóticas tempranas (células Anexina V positivas, 7AAD negativas) dentro del grupo de células EGFP positivas. Se observó una disminución significativa en el porcentaje de células apoptóticas tempranas en las células tratadas con gemcitabina que expresan el shRNA de VMP1 comparado con las células que expresan el shRNA control bajo el mismo tratamiento (media \pm E.S.; n = 3). * $P < 0.05$ versus células transfectadas con shRNA control y tratadas con gemcitabina.

Para confirmar estos resultados se determinó la actividad de las caspasas 3 y 7 utilizando un siRNA específico para silenciar VMP1. Las células MIAPaCa-2 fueron transfectadas con siRNA de VMP1 o siRNA control y luego de 24 horas fueron tratadas con 200 μ M gemcitabina por otras 24 horas. Finalmente fueron levantadas en el mismo medio de crecimiento mediante un pipeteo suave. Se sembraron 100 μ l en un multiwell de 96 y se agregó el reactivo para la medición de la actividad de caspasas 3 y 7. El resto fue utilizado para determinar la viabilidad celular por el método de Tripán Blue. Para realizar el ensayo de caspasas se utilizó el kit Apo-ONE™

Homogeneous Caspase-3/7 Assay (Promega). La actividad de las caspasas 3 y 7 fue normalizada por la viabilidad celular y se expresó relativa al siRNA control sin tratamiento. La actividad de las caspasas 3 y 7 se redujo significativamente en células tratadas con gemcitabina que expresan el siRNA de VMP1 comparada con las células tratadas con gemcitabina que expresan el siRNA control (Fig. 20). Estos resultados confirman los obtenidos por citometría de flujo. En conjunto demuestran que VMP1 participa de la apoptosis inducida por el tratamiento con gemcitabina.

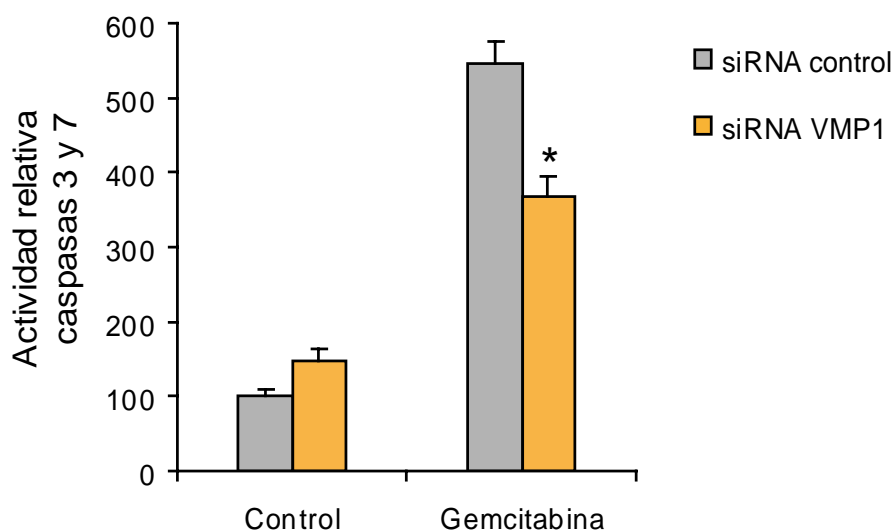


Figura 20

Determinación de la actividad de las caspasas 3 y 7. Las células MIAPaCa-2 fueron transfectadas durante 24 hs con siRNA de VMP1 o siRNA control y luego tratadas con 200 μ M gemcitabina durante otras 24 hs. La actividad de las caspasas 3 y 7 está normalizada por la viabilidad celular y expresada relativa al siRNA control sin tratamiento. La actividad de las caspasas 3 y 7 disminuyó en las células tratadas con gemcitabina y transfectadas con el siRNA de VMP1 comparadas con las células con el siRNA control con el mismo tratamiento (media \pm E.S.; n = 3). * $P < 0.05$, versus células transfectadas con siRNA control y tratadas con gemcitabina.

Finalmente para confirmar que la vía de autofagia mediada por VMP1 promueve la apoptosis en las células de cáncer pancreáticas, se determinó en las células MIAPaCa-2 el efecto de la sobreexpresión de VMP1. Las células MIAPaCa-2 fueron transfectadas con el plásmido de expresión pEGFP-VMP1 o con el plásmido vacío durante 48 hs y luego se analizaron por citometría de flujo las células apoptóticas tempranas. Los resultados indican que las células que sobreexpresan VMP1 muestran un aumento significativo en el porcentaje de células apoptóticas tempranas respecto a las células control (Fig. 21).

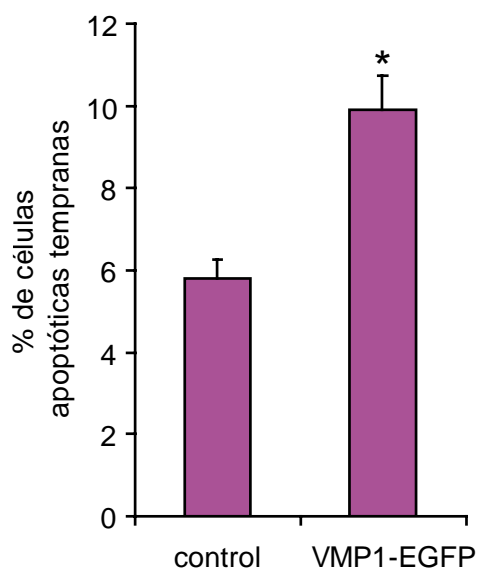


Figura 21

Análisis por citometría de flujo. Las células MIAPaCa-2 fueron transfectadas durante 48 hs con el plásmido pEGFP-VMP1 o pEGFP vacío como control. Se determinó el porcentaje de células apoptóticas tempranas (células Annexina V positivas, 7AAD negativas). Se observó un aumento en el número de células apoptóticas tempranas en las células que expresan VMP1-EGFP respecto a las células transfectadas con el plásmido vacío (media \pm E.S.; n = 3). * $P < 0.05$, versus control.

Los resultados obtenidos por citometría de flujo fueron validados mediante la determinación de la actividad de caspasas 3 y 7. Las células MIAPaCa-2 fueron

transfectadas con el plásmido pcDNA4-VMP1 que expresa la proteína de fusión VMP1-V5 o con el plásmido vacío como control durante 48 hs. Luego se determinó la viabilidad celular y la actividad de las caspasas 3 y 7 utilizando el kit Apo Live-Glo Multiplex Assay (Promega). La actividad obtenida fue normalizada con la viabilidad celular y fue expresada relativa al control (Fig. 22). La actividad relativa de las caspasas 3 y 7 aumentó en las células que sobreexpresan a la proteína VMP1-V5, estos resultados concuerdan con los obtenidos por citometría de flujo confirmando que la sobreexpresión de VMP1 induce apoptosis en las células de cáncer de páncreas. El análisis en conjunto demuestra que la vía de autofagia mediada por VMP1 promueve la apoptosis inducida por gemcitabina en células de cáncer pancreático.

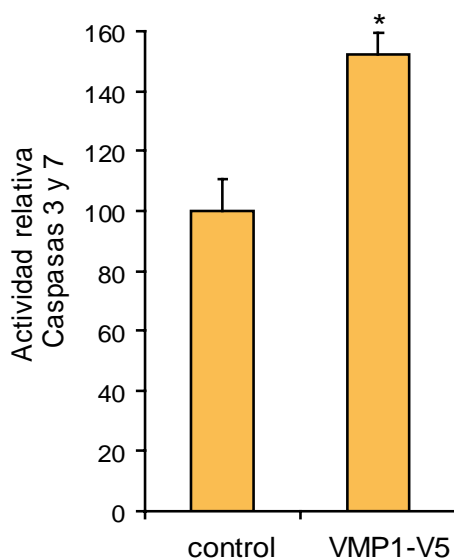


Figura 22

Determinación de la actividad de las caspasa 3 y 7. Las células MIAPaCa-2 fueron transfectadas durante 48 hs con el plásmido pcDNA4-VMP1 que expresa la proteína de fusión VMP1-V5 o transfectadas con el plásmido vacío como control. La actividad de las caspasas 3 y 7 está normalizada por la viabilidad celular y expresada relativa al control. Se observa que las células sobreexpresando VMP1-V5 durante 48 hs aumentan la actividad de las caspasas 3 y 7 comparadas con las células control. * $P < 0.05$, versus control.

4.1. DETECCIÓN DE NUEVAS PROTEÍNAS QUE INTERACCIONAN CON VMP1.

Los resultados antes descritos plantearon la necesidad de conocer las proteínas que interaccionan con VMP1 para profundizar la búsqueda de las vías moleculares en las que la autofagia mediada por VMP1 está implicada, y en especial su relación con la resistencia a quimioterápicos de las células tumorales pancreáticas.

La hipótesis de trabajo es que VMP1 debe interactuar con otras proteínas en la célula y el análisis de estas interacciones nos permitirá conocer los caminos moleculares en los que interviene. El objetivo fue determinar las proteínas que interaccionan con VMP1 y evaluar el posible rol de esas interacciones en los modelos celulares de autofagia y de resistencia al tratamiento de las células tumorales pancreáticas.

4.1 Clonado de los fragmentos de VMP1

Con el objetivo de hallar proteínas que interactúen con VMP1 se utilizó la técnica de doble híbrido (Stratagene). El sistema está basado en proteínas de fusión, que al interaccionar en el citoplasma de las levaduras activan la vía de señalización de Ras induciendo su crecimiento. Se utilizaron 2 proteínas de fusión, un fragmento de la secuencia de VMP1 fusionada a la proteína SOS (plásmido pSOS) y los cDNAs de la biblioteca de células HeLa fusionadas a una secuencia de myristilación (plásmido pMyr). La proteína de fusión formada por un fragmento de VMP1 con SOS se encuentra en citoplasma y se expresa constitutivamente. La proteína de fusión formada por las proteínas de la biblioteca con Myr se encuentra anclada a la membrana plasmática y solo se expresa en presencia de galactosa. Los vectores pSOS y pMyr también poseen los genes para la biosíntesis en levaduras de LEU2 y URA3, respectivamente, para poder seleccionar las levaduras transformadas basándose en los requerimientos nutricionales de los aminoácidos leucina y uracilo.

La cepa de levadura utilizada posee una mutación termosensible, la cual le permite crecer a 25°C, pero le impide crecer a 37°C. Cuando se produce la interacción de una proteína de la biblioteca con un fragmento de VMP1, SOS es reclutada a la membrana, activa la cascada de señalización de Ras y permite su crecimiento a 37°C, esto significa que solo se produce el crecimiento a 37°C cuando ocurre la interacción (Fig. 23).

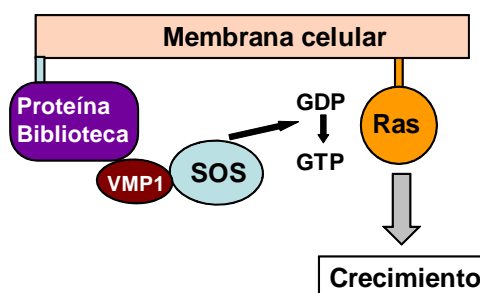
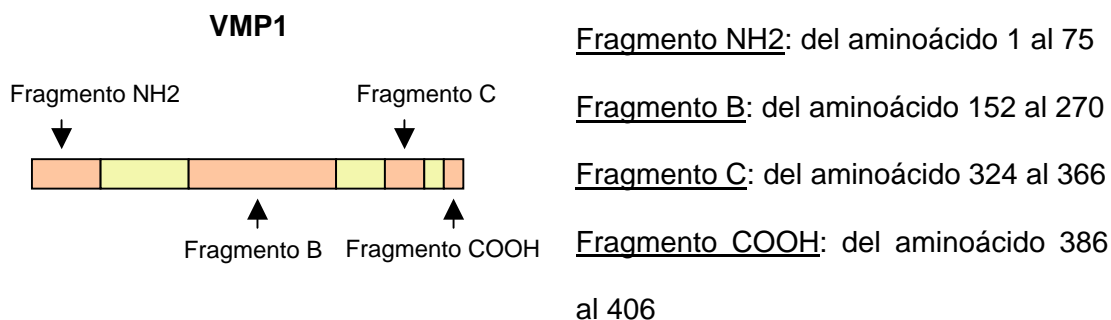


Figura 23

Diagrama esquemático de la activación del camino de señalización de Ras utilizado en el sistema de doble híbrido. La proteína de la biblioteca se expresa en presencia de galactosa y se encuentra anclada a la membrana. El fragmento de VMP1 se encuentra fusionado a la proteína SOS en el citoplasma. Cuando hay interacción entre la proteína de la biblioteca y el fragmento de VMP1, SOS es reclutada a la membrana donde activa a Ras. Este evento le permite a la levadura crecer a 37°C.

Como VMP1 es una proteína de membrana el screening se realizó con distintos fragmentos correspondientes a las regiones hidrofílicas.



Para cada fragmento se diseñó un par de primers. Luego se realizó una PCR utilizando como templado pcDNA4-VMP1. Los distintos fragmentos amplificados fueron clonados en el plásmido pSOS con las enzimas *BamHI* y *SalI*. Todas las construcciones fueron confirmadas por restricción y secuenciación.

4.2 Amplificación de la biblioteca HeLa clonada en pMyr

Por otro lado se amplificó la biblioteca de células HeLa (Stratagene) que se encuentra en la cepa *E.Coli* XL10-Gold KanR (Stratagene), clonada en el plásmido pMyr. Se determinaron las unidades formadoras de colonias/ml (UFC/ml) obteniéndose $1,5 \times 10^8$ UFC/ml. Sabiendo que la biblioteca posee $3,7 \times 10^6$ clones (dato provisto por Stratagene), se decidió amplificar por duplicado la biblioteca, es decir obtener $7,4 \times 10^6$ clones. Con este objetivo se plaquearon 185 placas de petri con 40.000 colonias cada una. Una vez crecidas, se agregó a las placas medio LB líquido y se levantaron las colonias con rastrillo. A continuación se realizaron 3 maxi prep para purificar los plásmidos amplificados. Se midió la absorbancia a 260 nm para obtener la concentración, y por último se realizó una corrida en gel de agarosa para comprobar el estado del DNA purificado.

4.3 Doble Híbrido de VMP1

Una vez terminada la amplificación de la biblioteca y las construcciones de los plásmidos se co-transformaron levaduras con el plásmido pMyr, que contiene la biblioteca de células HeLa, y con el plásmido pSOS, que contiene un fragmento de VMP1. Se seleccionaron los clones transformados a 25°C en medio con glucosa utilizando medio sin uracilo ni leucina para seleccionar las levaduras transformadas con ambos plásmidos. Una vez crecidos los clones transformados, se realizó una réplica en placa en medio con galactosa y se cultivaron a 37°C para detectar cuales eran los clones interactores. Esto se debe a que en medio con galactosa se expresa la

proteína de la biblioteca, y como se encuentran a 37°C solo podrán crecer cuando se produzca una interacción y se active la vía de Ras. Posteriormente, a los clones que crecieron en medio con galactosa a 37°C, esto significa, los clones detectados como positivos, se los sometió a una nueva ronda de selección para confirmar la interacción. Los clones de levaduras fueron resuspendidos en agua y luego 15 μ l fueron sembrados en la misma posición en 2 placas a 37°C. Una de las placas posee medio rico en glucosa y la otra medio con galactosa. En la Figura 24 se puede observar que la mayoría de los clones crecieron en medio con galactosa, donde se inducen las proteínas de la biblioteca, pero no crecieron en medio con glucosa ya que al no haber expresión de las proteínas de la biblioteca no es posible la interacción. Este resultado indica una interacción positiva, ya que el crecimiento diferencial en glucosa y galactosa está indicando la necesidad de la expresión de las proteínas de la biblioteca para que se induzca la vía de señalización de Ras y se permita el crecimiento. Esto significa que estos clones expresaron una proteína de la biblioteca que se une al fragmento de VMP1. Aquellos clones que crecen en ambas placas son clones revertantes, es decir, clones que por alguna mutación adquirieron la capacidad de crecer a 37°C sin necesidad de interacción con las proteínas de la biblioteca, por esa razón, poseen la habilidad de crecer a 37°C independientemente de la composición del medio de cultivo. Este procedimiento fue realizado dos veces con cada una de las construcciones (Fragmento NH₂, B y C). El fragmento COOH no pudo ser analizado ya que no pasó los controles experimentales. Al expresar el Fragmento COOH fusionado a SOS los clones crecían a 37°C sin necesidad de interacción con las proteínas de la biblioteca.

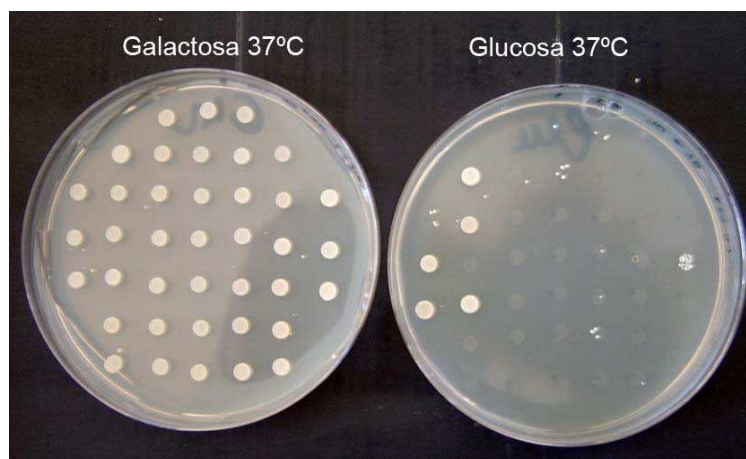


Figura 24

Último paso de selección. Los clones de levaduras se crecieron en medio con glucosa y galactosa a 37°C en la misma posición en ambas placas y se determinaron los clones interactores por su crecimiento diferencial. Los clones que crecieron en galactosa pero no en glucosa fueron considerados positivos. Los clones que crecieron en ambas placas fueron considerados revertantes.

Del screening se obtuvieron 94 clones positivos, todos pertenecientes al fragmento B de VMP1. A cada una de las colonias positivas se la creció y se le realizó una miniprep. Luego, a cada miniprep obtenida se le realizó una PCR con primers que flanquean el sitio de clonado de pMyr, con el objetivo de amplificar la secuencia de la biblioteca con la que se obtuvo una interacción positiva con el fragmento B de VMP1. Los productos de PCR se corrieron en un gel de agarosa. Se eligieron aquellos que dieron una única banda como producto de PCR para enviar a secuenciar. Se envió el producto de PCR para secuenciar de los primeros 20 clones que cumplieron con ese requisito. En otros casos no dieron producto de amplificación seguramente debido a una baja eficiencia en la miniprep o dieron bandas múltiples. De cada secuencia obtenida se identificó la proteína interactora por medio del programa BLAST. En varios casos se obtuvo la secuencia completa, o un fragmento de la proteína, y en algunos

casos las secuencias resultaron ser péptidos muy pequeños producto de la expresión de una secuencia fuera del marco de lectura correcto.

Como aproximadamente la mitad de los primeros 20 clones secuenciados correspondieron a la proteína S100 calcium binding protein A10 (S100A10), se diseñaron primers específicos para S100A10 y se realizó una PCR con los plásmidos purificados de los clones positivos aun no enviados a secuenciar. Este procedimiento se realizó con el objetivo de identificar el resto de los clones que posean la proteína S100A10 ya que esta proteína tuvo una alta frecuencia de aparición. Luego de identificarlos por PCR se secuenciaron los clones restantes. En la siguiente lista figuran todas las proteínas de la biblioteca de células HeLa que interaccionaron con el Fragmento B de VMP1 en el doble híbrido.

S100A10: S100 calcium binding protein A10. Clones Secuenciados: 7, 10, 11, 13, 17, 19, 20, 21, 24. Obtenidos por PCR: 31, 32, 35, 59, 65, 67, 89, 90, 94

EEF1G: eukaryotic translation elongation factor 1 gamma. Clones secuenciados: 1, 16, 38, 48, 68, 85

EIF3S12: eukaryotic translation initiation factor 3, subunit 12. Clon secuenciado: 14

FADD: Fas (TNFRSF6)-associated via death domain. Clon secuenciado: 25

AlphaL-1 Fucosidase: fucosidase, alpha-L-1, tissue. Clon secuenciado: 22

Ribosomal protein S10: ribosomal protein S10. Clon secuenciado: 23

BiP protein (HSPA5): heat shock protein 5. Clon secuenciado: 44

Kinesin 2 isoform 1: kinesin 2. Clon secuenciado: 49

TARBP2: Tar RNA binding protein 2. Clones secuenciados: 2, 74

LARP1: La ribonucleoprotein domain family, member 1. Clon secuenciado: 75

USP9X: ubiquitin specific peptidase 9, X-linked. Clon secuenciado: 63.

Una vez obtenido los interactores positivos se procedió a una nueva confirmación de la interacción en las levaduras. Se utilizaron los plásmidos purificados con la secuencia de los 11 interactores positivos (plásmido pMyr obtenido de la miniprep utilizada para la PCR). Luego se co-transformó cada plásmido pMyr, con cada uno de los interactores encontrados, con el plásmido pSOS que contiene el fragmento B de VMP1. Las placas fueron crecidas inicialmente en glucosa a 25°C en medio sin Leucina ni Uracilo para seleccionar las transformadas y finalmente se realizó una réplica en placa en medio con glucosa y galactosa y se crecieron a 37°C. Los resultados mostraron que los 11 clones crecen diferencialmente en glucosa y galactosa confirmando la interacción positiva con el fragmento B de VMP1.

De cada uno de los interactores encontrados se tuvo en cuenta la frecuencia de aparición, sabiendo también que esto puede deberse a que se encuentra más representado en la biblioteca original. Para cada interactor encontrado se realizó una búsqueda bibliográfica con el fin de conocer su función o el camino metabólico en el que está involucrado. De los interactores encontrados seleccionamos S100A10 debido a su alta frecuencia de aparición en el doble híbrido, a que fue relacionada con el transporte de vesículas [Mayran N y col., 2003; Zobiack N y col., 2003] y a que, interesantemente, se había reportado su sobreexpresión en cáncer de páncreas [Iacobuzio-Donahue CA y col., 2003].

El siguiente objetivo fue entonces profundizar el estudio de la relación entre VMP1 y S100A10 y analizar su rol en la autofagia y en la resistencia de las células tumorales al tratamiento con gemcitabina.

5.2. CARACTERIZACIÓN DE LA INTERACCIÓN VMP1-S100A10 Y SU EFECTO SOBRE LA FORMACIÓN DE AUTOFAGOSOMAS Y LA MUERTE CELULAR.

5.12.1 Clonado de S100A10

S100A10, también conocida como p11, es una proteína de 97 aminoácidos que pertenece a la familia de proteínas S100. La mayoría de la proteína se encuentra intracelularmente en el citoplasma o unida a la membrana plasmática o a membranas internas a través de otra proteína, aunque también se ha descrito en la región extracelular donde se une al activador de plasminógeno tisular [Zobiack N y col., 2003; Kassam G y col., 1998]. Varios reportes relacionan la proteína S100A10 con numerosos tipos de tumores. Se ha determinado la sobreexpresión del mRNA de S100A10 en estudios de cáncer de páncreas, cáncer de pulmón, linfoma, carcinoma de riñón, meduloblastoma y cáncer gástrico [Iacobuzio-Donahue CA y col., 2003; Liu J y col., 2008; Lindsey JC y col., 2007; Domoto T y col., 2007; Rust R y col., 2005; Remmelink M y col., 2005]. Aunque se ha determinado la sobreexpresión, aún no se conoce cual es su participación en la enfermedad.

Para expresar la proteína S100A10 en células eucariotas y luego detectarla con un *tag* se realizó el clonado de la secuencia en los plásmidos pcDNA4, que produce una proteína de fusión con el epítipo de V5 y His₆ y en el pEGFP que permite la expresión de una proteína de fusión con EGFP. En primer lugar se confirmó que la secuencia de S100A10 presente en los plásmidos obtenidos de los clones interactores del doble híbrido estuviera completa y sin mutaciones. Se diseñaron primers específicos con sitios de corte para las enzimas *Bam*HI y *Hind*III para amplificar la secuencia de S100A10 de los clones aislados y poder insertarla en los plásmidos de expresión eucariota. Para realizar la PCR se utilizó el plásmido purificado del clon interactivo 24. Luego se corrió el producto de PCR en un gel de agarosa y se visualizó por tinción con bromuro de etidio, el producto amplificado se purificó con el kit "SV Gel and PCR

Clean-Up System" (Promega). Luego se cortó el fragmento amplificado por PCR y los plásmidos antes descritos con las enzimas *Bam*HI y *Hind*III y se dejó ligando overnight (O.N.) a 4°C. Con el producto de ligación fueron transformadas bacterias competentes *E.Coli* JM109. Las bacterias transformadas fueron plaqueadas en medio LB Agar con el antibiótico correspondiente (ampicilina para pcDNA4 y kanamicina para pEGFP). Los clones obtenidos se crecieron y se realizó una miniprep. Se confirmó el correcto clonado por restricción y secuenciación.

Por otro lado, con el fin de silenciar S100A10 se utilizó el plásmido pCMS3-H1p-EGFP, el cual expresa un short hairpin RNA para silenciar S100A10 (shRNA de S100A10) y también contiene un cassette de transcripción separado que expresa EGFP para poder identificar las células transfectadas. La secuencia shRNA de S100A10 clonada dentro del plásmido contiene el sitio para las enzimas de restricción, la secuencia blanco de S100A10 y una secuencia loop para la formación del shRNA. La secuencia blanco elegida de S100A10 fue publicada por Morel y se detalla en Materiales y Métodos [Morel E y col., 2007]. Para el clonado se adquirieron los oligos con la secuencia shRNA de S100A10 y luego se clonaron en el plásmido pCMS3-H1p-EGFP el cual fue previamente cortado con las enzimas *Bgl*II y *Hind*III. Se dejó ligando O.N. y luego se transformaron bacterias competentes *E.Coli* JM109. Los clones obtenidos se crecieron y se realizó una miniprep Se determinó el correcto clonado por restricción y secuenciación. Luego se verificó la eficiencia del vector que expresa el shRNA de S100A10 para disminuir la expresión de S100A10. Se transfectaron células MIAPaCa-2 con el vector que expresa el shRNA de S100A10 o el vector control durante 48 hs. Luego las células fueron tripsinizadas y sometidas a un sorting con el fin de separar las células transfectadas (que expresan el shRNA de S100A10 o el control y EGFP) de aquellas que no se transfectaron. Las células obtenidas EGFP positivas fueron lisadas en buffer de lisis con inhibidores de proteasas. Para realizar el western blot se utilizó el anticuerpo primario anti S100A10 (BD Transduction Laboratories), un anticuerpo

secundario conjugado a peroxidasa y se reveló por quimioluminiscencia utilizando el kit ECL (Amersham Biosciences). El análisis por western blot mostró que la expresión de S100A10 se encuentra disminuida en las células que expresan el shRNA de S100A10 en comparación con las células que expresan el shRNA control (Fig. 25). Esto demuestra que el plásmido que expresa el shRNA de S100A10 disminuye eficientemente la expresión de S100A10.

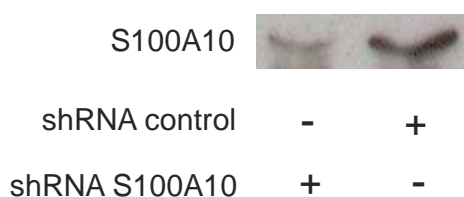


Figura 25

Western blot de S100A10 en células MIAPaCa-2 transfectadas durante 48 hs con los vectores que expresan el shRNA de S100A10 o shRNA control. Las células EGFP positivas fueron separadas por sorting y lisadas en buffer de lisis para western blot. La expresión de S100A10 disminuye en las células que expresan el shRNA de S100A10 comparado con las células control.

5.2 Confirmación de la interacción entre VMP1 y S100A10

Para confirmar la interacción de VMP1 con S100A10 obtenida por el doble híbrido se realizó un ensayo de pull-down y western blot. Se crecieron células 293T y se co-transfectaron con pEGFP-VMP1 y pcDNA4-S100A10, o con los plásmidos vacíos como control. A las 24 hs se levantaron las células y se resuspendieron en buffer de lisis con inhibidores de proteasas. Se utilizaron 100 µg de lisado celular y se incubaron en una columna de Ni-NTA agarosa (que pega His y por lo tanto retiene a la proteína de fusión S100A10-V5-His₆). Se realizaron 3 lavados y luego se eluyó la columna. Las

fracciones obtenidas fueron corridas en un SDS-PAGE (electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio), y luego se realizó un western blot. Se utilizaron los anticuerpos anti V5 para detectar S100A10 o anti EGFP para detectar VMP1. Se utilizó un anticuerpo secundario conjugado a peroxidasa y se reveló por quimioluminiscencia utilizando Luminol (Santa Cruz). En la Figura 26 se muestra el Western blot, en donde se observa que VMP1 eluyó junto con S100A10. De esta forma se confirma por pulldown la interacción entre VMP1 y S100A10 obtenida en el doble híbrido.

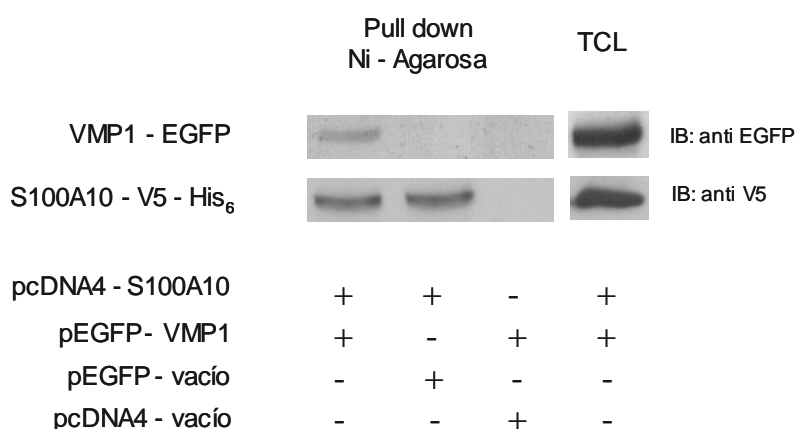


Figura 26

Las células 293T se co-transfectaron con pEGFP-VMP1 y pcDNA4-S100A10 o con los plásmidos vacíos como control durante 24 hs. Luego se lisaron las células, se realizó el ensayo de pull-down y el western blot. TCL: Lisado total celular, IB: inmunoblotting. Se observa que VMP1 eluye junto a S100A10.

5.3 Localización intracelular de S100A10-EGFP en células HeLa

Se utilizó el plásmido pS100A10-EGFP que expresa la proteína S100A10 fusionada a la proteína fluorescente verde, de forma tal de poder visualizar su distribución

intracelular por fluorescencia directa. Se utilizaron células HeLa las cuales fueron transfectadas durante 24 hs con el plásmido de expresión. Luego fueron fijadas en 4% paraformaldehído y observadas al microscopio de fluorescencia. Las imágenes mostraron una distribución pareja en toda la célula. La proteína S100A10 es una proteína citoplasmática que también se encuentra en membrana a través de su interacción directa con proteínas que se unen a membrana. Por lo tanto, pensamos que al sobreexpresarse la proteína en citoplasma impedía ver la proteína asociada a membrana. Por ese motivo nuevamente se transfectaron células HeLa con el plásmido de expresión durante 24 hs y, previamente a la fijación, se trataron las células con un buffer de lavado que permite lavar la proteína citoplasmática y dejar la proteína asociada a membrana [Morel E y col., 2007]. Como se puede observar en la Figura 27, luego del lavado se observa la distribución de S100A10 en estructuras punteadas característica de la unión a membranas internas y también se observa la localización en la membrana plasmática (flechas).

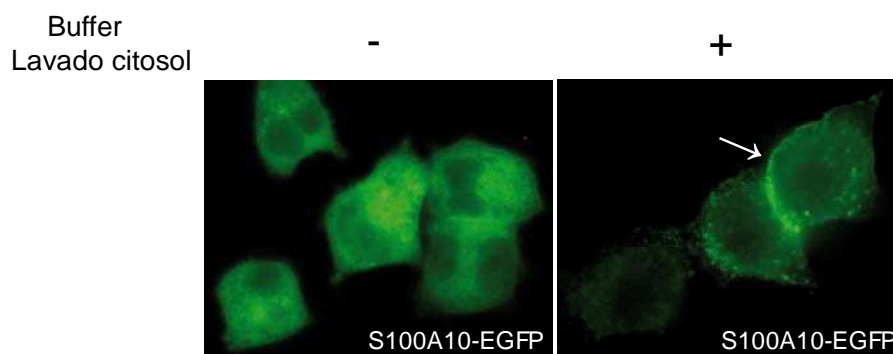


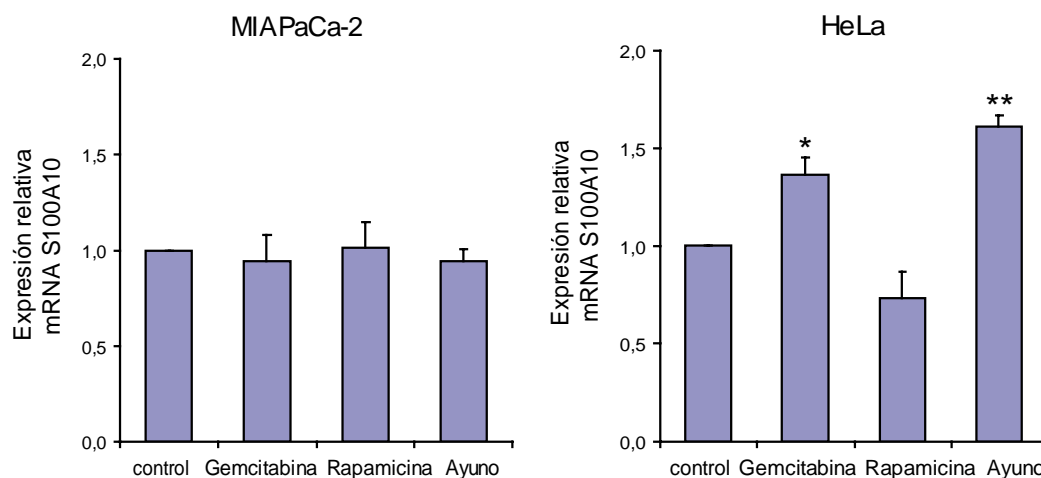
Figura 27

Microscopia de fluorescencia. Las células HeLa fueron transfectadas con el plásmido de expresión pS100A10-EGFP durante 24 hs y tratadas o no con buffer de lavado previo a la fijación. Luego del lavado se observa a S100A10 unida a membrana formando parte de estructuras punteadas. La flecha indica la marca de S100A10-EGFP en la membrana plasmática.

5.4 Expresión de S100A10 en células HeLa y MIAPaCa-2

Se determinó como varía la expresión de S100A10 en las células tumorales ante distintos tratamientos quimioterápicos y ante condiciones de ayuno. Se cuantificó el nivel de expresión del mRNA de S100A10 relativo al de las células sin tratamiento. Como control interno se utilizó la amplificación de la β -actina. Se utilizaron células HeLa y células MIAPaCa-2 y se les realizaron 3 tratamientos diferentes. El primer tratamiento consistió en el tratamiento con 200 μ M gemcitabina durante 8 hs. El segundo tratamiento fue la incubación con 5 μ g/ml rapamicina durante 8 hs. En el tercer tratamiento las células fueron ayunadas utilizando el medio de cultivo EBSS. Luego las células se levantaron con TRIzol. Se purificó el RNA y se realizó una RT-PCR Real Time. Como se muestra en la Figura 28A, en las células HeLa se observa un aumento en la expresión del mRNA de S100A10 en respuesta a los tratamientos con gemcitabina y ayuno mientras que no se observa una variación significativa de la expresión por el tratamiento con rapamicina. Al analizar la expresión en las células MIAPaCa-2 no se observan variaciones respecto al control. Este resultado nos condujo a pensar que la expresión de S100A10 podría estar desregulada en las células de cáncer de páncreas, por lo tanto a continuación se evaluó la expresión basal en ambas líneas celulares. Como puede observarse en la Figura 28B la expresión basal en las células MIAPaCa-2 está significativamente aumentada respecto a la expresión en las células HeLa. Este resultado coincide con los datos observados por Iacobuzio-Donahue donde demuestra la sobreexpresión del mRNA de S100A10 en estudios en células de cáncer de páncreas [Iacobuzio-Donahue CA y col., 2003] y sugiere que en la línea celular de cáncer de páncreas están alterados los mecanismos de regulación de la expresión de S100A10.

A



B

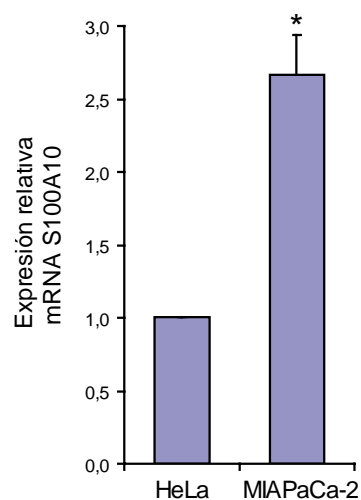


Figura 28

(A) Las células HeLa y MIAPaCa-2 fueron tratadas con gemcitabina, rapamicina y ayuno durante 8 hs. y el mRNA de S100A10 fue medido por RT-PCR Real time. Se observa un aumento del mRNA de S100A10 en las células HeLa tratadas con gemcitabina y ayuno respecto al control y no se observa diferencia con el tratamiento de rapamicina. En las células MIAPaCa-2 no hay aumento del mRNA de S100A10 en ninguno de los tratamientos respecto al control. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ versus control. (B) Comparación de la expresión basal de mRNA de S100A10. Se observa un aumento en la expresión basal de S100A10 en células MIAPaCa-2 respecto a las células HeLa. * $P < 0.05$, versus células HeLa.

5.5 La sobreexpresión de S100A10 modifica la distribución intracelular de VMP1

Las células MIAPaCa-2 fueron co-transfectadas con los plásmidos pEGFP-VMP1 y pcDNA4-S100A10 o el plásmido vacío como control durante 24 hs. Luego las células fueron fijadas y observadas al microscopio de fluorescencia. La distribución intracelular de VMP1-EGFP se observa principalmente en un patrón punteado, polarizada hacia un lado alrededor del núcleo formando una figura que asemeja un cometa. Al sobreexpresar a S100A10-V5 se produce una alteración del patrón de VMP1 y se observa un patrón reticulado que se distribuye alrededor del núcleo (Fig. 29A). Para cuantificar se contaron 100 células expresando VMP1-EGFP y se determinó la distribución punteada o reticulada. Como se muestra en la Figura 29B la sobreexpresión de S100A10 modificó la distribución de la proteína VMP1-EGFP. La distribución de VMP1-EGFP se observa principalmente en forma punteada pero al estar sobreexpresada la proteína S100A10-V5 disminuye el patrón punteado y se observa un aumento en la distribución reticulada de un poco más del 20 %.

Diversos estudios describen la participación de S100A10 en la expresión de canales en la membrana plasmática, sin embargo no todos los datos son coincidentes. Algunos trabajos plantean que la unión de S100A10 a un dominio citosólico de proteínas integrales de membrana es necesaria para una eficiente presentación en la membrana plasmática, sin embargo, Renigunta y colaboradores demostraron que la interacción de S100A10 con el canal de potasio TASK1 actúa como un factor de retención en el retículo endoplásmico. Los resultados muestran que al silenciar S100A10 o mutar el sitio de unión de S100A10 en TASK-1 hay una mayor cantidad de canales en membrana [Renigunta V y col., 2006]. Nuestro resultado parece coincidir con esta descripción y sugiere que S100A10 podría estar reteniendo a VMP1 en el retículo endoplásmico.

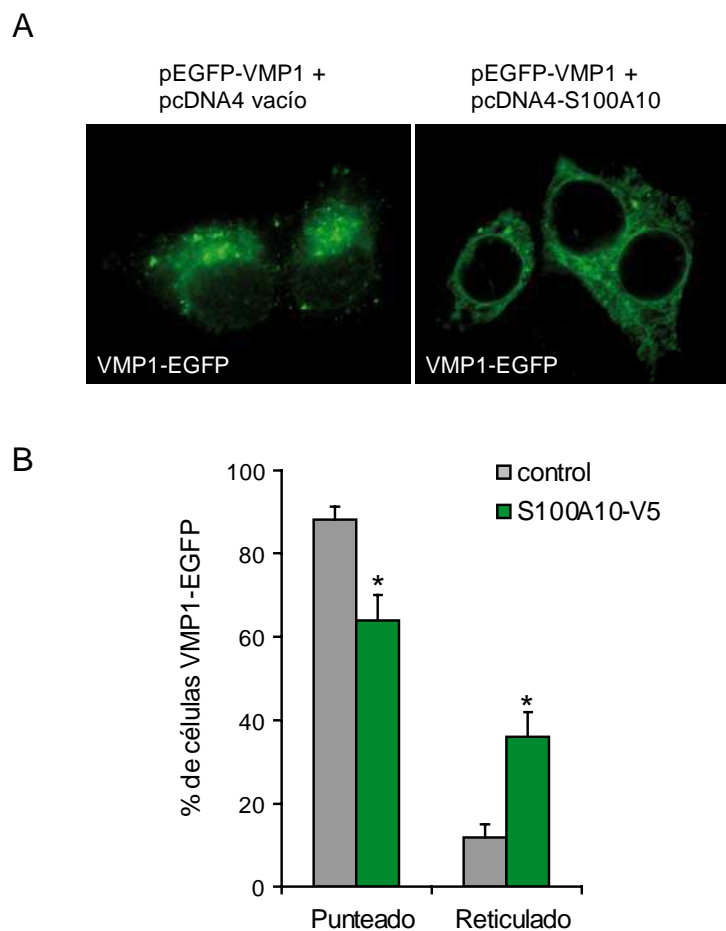


Figura 29

Microscopía de fluorescencia. A) Las células MIAPaCa-2 fueron co-transfectadas con pEGFP-VMP1 y con los plásmidos pcDNA4-S100A10 o el plásmido vacío como control. Luego de 24 hs las células fueron fijadas y observadas al microscopio de fluorescencia. B) Determinación del porcentaje de células VMP1-EGFP con distribución punteada o reticulada (media \pm E.S.; n = 3). Se observa que la sobreexpresión de S100A10-V5 aumenta la distribución reticulada de VMP1-EGFP. * $P < 0.05$, versus células control con la misma distribución.

5.6 La sobreexpresión de VMP1 induce la expresión de S100A10

Como ya fue demostrado anteriormente, VMP1 está involucrada en el proceso de autofagia y su sobreexpresión induce la autofagia en diferentes líneas celulares. Para determinar si la expresión de VMP1 modifica la expresión de S100A10 se

transfectaron células MIAPaCa-2 con el plásmido pEGFP-VMP1 o con el plásmido vacío como control. A las 24 hs de transfección las células se lavaron y levantaron en TRIzol. Se purificó el RNA y se realizó una RT-PCR Real Time. La Figura 30A muestra que al sobreexpresar VMP1 aumenta la expresión del mRNA de S100A10 respecto al control. Estudiamos entonces si la expresión de VMP1 se modifica con el aumento de la expresión de S100A10 en las células tumorales pancreáticas. Con este objetivo se transfectaron células MIAPaCa-2 con el plásmido pEGFP-S100A10 o con el plásmido vacío como control y se realizó una RT-PCR Real Time de mRNA de VMP1. En la Figura 30B se observa que la expresión de VMP1 no se modifica significativamente al sobreexpresar S100A10, indicando que la expresión de VMP1 no es regulada por la expresión de S100A10.

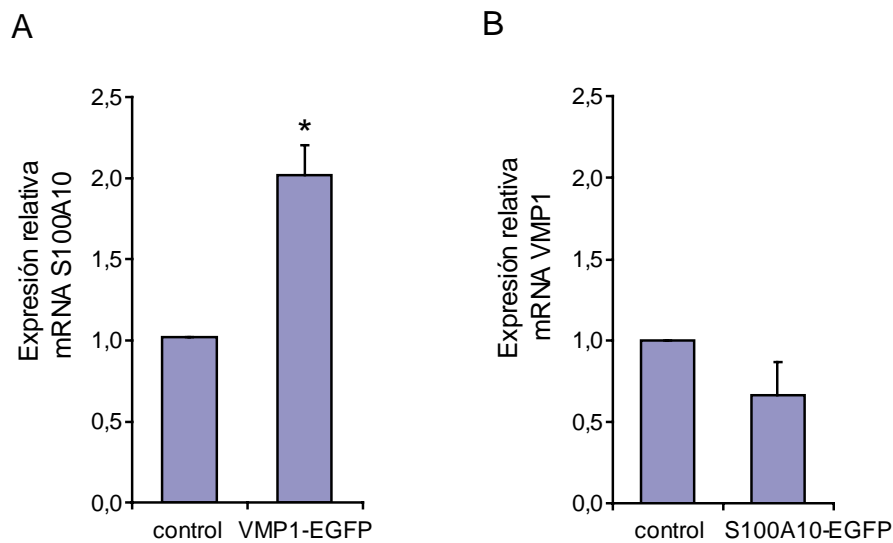


Figura 30

(A) Las células MIAPaCa-2 fueron transfectadas con pEGFP-VMP1 y el mRNA de S100A10 fue medido por RT-PCR Real Time, o (B) fueron transfectadas con pEGFP-S100A10 y el mRNA de VMP1 fue medido por RT-PCR Real Time. En ambos casos el plásmido vacío fue utilizado como control. Se observó que la sobreexpresión de VMP1 aumenta la expresión del mRNA de S100A10. Por el contrario la sobreexpresión de S100A10 no modificó la expresión del mRNA de VMP1. * $P < 0.05$ versus control.

En conjunto, estos resultados indican que la expresión de S100A10 constituye un cambio fenotípico en respuesta a la sobreexpresión de VMP1 y sugieren la participación de S100A10 en los mecanismos moleculares mediados por VMP1. Nuestro siguiente objetivo entonces fue analizar el efecto de la expresión de S100A10 sobre la formación de autofagosomas

5.7 La expresión de S100A10 disminuye la formación de autofagosomas

Como se demostró en los resultados anteriores VMP1 induce la formación de autofagosomas. Teniendo en cuenta que S100A10 interactúa con VMP1, que la sobreexpresión de VMP1 induce la expresión de S100A10, y que la sobreexpresión de S100A10 modifica el patrón de distribución de VMP1, se estudió el efecto de S100A10 sobre la formación de autofagosomas inducida por el tratamiento con gemcitabina y por la sobreexpresión de VMP1. Se utilizó como marcador el reclutamiento de la proteína de fusión fluorescente roja RFP-LC3. Se crecieron células MIAPaCa-2 en medio rico en nutrientes. Para el tratamiento con gemcitabina se transfectaron las células con los plásmidos pRFP-LC3 y pEGFP-S100A10 o con el plásmido vacío pEGFP. A las 24 hs las células se trataron con 200 μ M gemcitabina durante 8 hs. Para el tratamiento con VMP1 se transfectaron con los plásmidos pcDNA4-VMP1, pRFP-LC3 y pEGFP-S100A10 o con el plásmido vacío pEGFP como control. A las 24 hs se fijaron las células en paraformaldehído 4% y se contaron las células con punteado de RFP-LC3 mediante microscopia de fluorescencia. Los resultados muestran que las células tratadas con gemcitabina o transfectadas con VMP1 que sobreexpresan S100A10 presentan una distribución difusa de la proteína de fusión RFP-LC3, a diferencia de las células transfectadas con el plásmido vacío, en las cuales se observa el patrón agrupado durante los dos tratamientos. Al analizar el porcentaje de células con RFP-LC3 agrupado en ambos tratamientos se observa que en las células que expresan S100A10-EGFP el porcentaje de agrupación está disminuido en

comparación con las células transfectadas con el plásmido control (Fig. 31). Estos hallazgos indican que la sobreexpresión de S100A10 disminuyó significativamente la formación de autofagosomas inducida por el tratamiento con gemcitabina y por la sobreexpresión de VMP1-V5. Los resultados obtenidos muestran que S100A10 disminuye la formación de autofagosomas y señalan a S100A10 como un posible regulador de la magnitud de la respuesta autofágica de las células tumorales pancreáticas ante el tratamiento con gemcitabina.

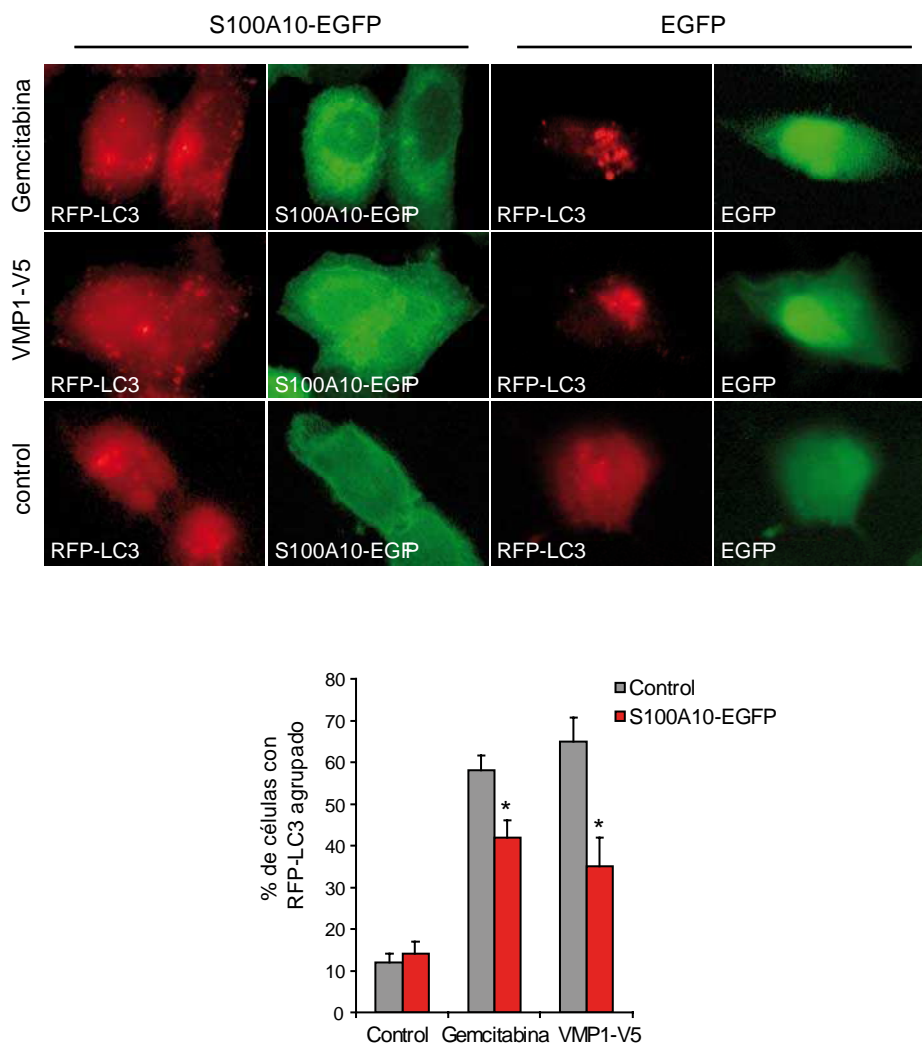


Figura 31

Microscopía de fluorescencia de RFP-LC3. A las células MIAPaCa-2 se les realizaron 2 tratamientos. Para el tratamiento con gemcitabina las células fueron transfectadas con los plásmidos pRFP-LC3 y pEGFP-S100A10 o con el plásmido pEGFP vacío durante 24 hs y luego fueron tratadas con 200 μ M gemcitabina durante 8 hs. Para el tratamiento con VMP1 las células fueron transfectadas con pRFP-LC3, pcDNA4-VMP1 y pEGFP-S100A10 o con el plásmido pEGFP vacío durante 24 hs. Las células control fueron transfectadas con los plásmidos pRFP-LC3 y pEGFP-S100A10 o con el plásmido pEGFP vacío durante 24 hs. Determinación del porcentaje de células con RFP-LC3 agrupado. Se observa que las células tratadas con gemcitabina o transfectadas con pcDNA4-VMP1 que sobreexpresan S100A10-EGFP poseen disminuida la agrupación de RFP-LC3 comparada con las células control. * $P < 0.05$, versus células control con el mismo tratamiento.

5.8 Efecto de la expresión de S100A10 sobre la apoptosis inducida por gemcitabina

Como anteriormente observamos que la autofagia mediada por VMP1 está involucrada en la muerte celular por apoptosis durante el tratamiento con gemcitabina, y luego determinamos que la sobreexpresión de S100A10 disminuyó la formación de autofagosomas, se evaluó si la expresión de este gen afecta la muerte celular por apoptosis ante el tratamiento con gemcitabina. Las células MIAPaCa-2 fueron transfectadas con el plásmido que expresa shRNA de S100A10 para silenciar S100A10 o el plásmido control y 24 hs más tarde fueron tratadas con 200 μ M gemcitabina por otras 24 horas. Luego se analizaron por citometría de flujo las células apoptóticas tempranas (anexina V positivas y 7AAD negativas) solo en las células transfectadas. Con esta finalidad el análisis se realizó seleccionando solo las células EGFP positivas, ó sea las que fueron transfectadas con el plásmido que expresa el shRNA de S100A10 (que silencia S100A10) o el shRNA control. Se encontró un aumento significativo del número de células apoptóticas tempranas en células silenciadas para S100A10 tratadas con gemcitabina, comparadas con las células que expresan el shRNA control con el mismo tratamiento (Fig. 32). Este resultado sugiere que la expresión de S100A10 permite la supervivencia de las células de cáncer de páncreas al tratamiento con gemcitabina ya que su silenciamiento lleva a una mayor apoptosis.

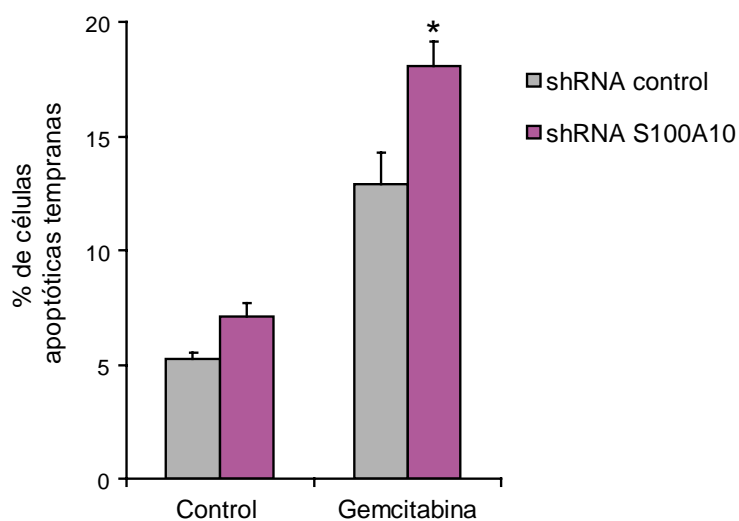


Figura 32

Análisis por citometría de flujo. Las células MIAPaCa-2 fueron transfectadas durante 24 hs con los vectores que expresan shRNA control o shRNA de S100A10 y luego tratadas con 200 μ M gemcitabina durante otras 24 hs. Se determinó el porcentaje de células apoptóticas tempranas (células Anexina V positivas, 7AAD negativas) (media \pm E.S.; n = 3). Se observó un aumento en el número de células apoptóticas tempranas en las células que expresan shRNA de S100A10 respecto a las células transfectadas con el plásmido control * $P < 0.05$ versus células transfectadas con shRNA control y tratadas con gemcitabina.

Los resultados obtenidos por citometría de flujo fueron confirmados mediante la determinación de la actividad de las caspasas 3 y 7. Las células MIAPaCa-2 fueron transfectadas con el plásmido que expresa el shRNA de S100A10 o con el shRNA control durante 24hs. Luego las células fueron tripsinizadas y sometidas a un sorting para separar las células EGFP positivas, con el fin de obtener solamente las células transfectadas que expresan el shRNA de S100A10 o el control. Luego del sorting las células EGFP positivas fueron crecidas 24 hs y luego tratadas con 200 μ M

gemcitabina durante otras 24 hs. A continuación se determinó la viabilidad celular y la actividad de las caspasas 3 y 7 utilizando el kit Apo Live-Glo Multiplex Assay (Promega). La actividad obtenida fue normalizada con la viabilidad celular y fue expresada relativa al control (Fig. 33). La actividad relativa de las caspasa 3 y 7 aumentó en las células con S100A10 silenciado. Estos resultados confirman los obtenidos por citometría de flujo, demostrando que la expresión de S100A10 está implicada en la sobrevivencia de las células MIAPaCa-2 ante el tratamiento con gemcitabina.

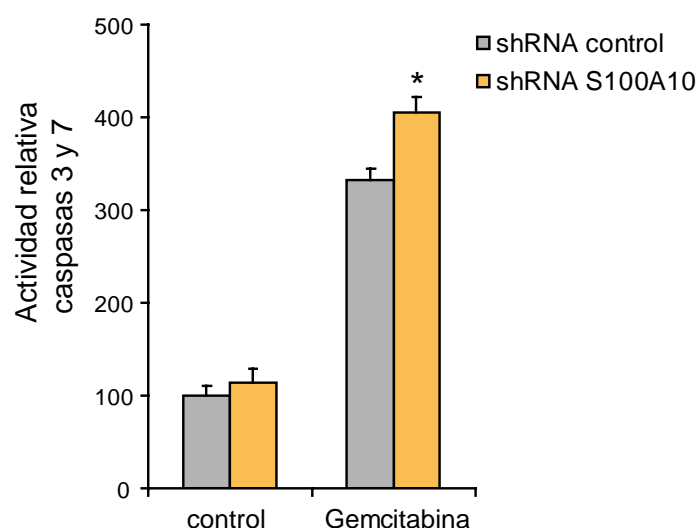


Figura 33

Determinación de la actividad de las caspasas 3 y 7. Las células MIAPaCa-2 fueron transfectadas durante 24 hs con shRNA de S100A10 o shRNA control. Primero fueron separadas por sorting las células EGFP positivas y a las 24 hs fueron tratadas con 200 μ M gemcitabina durante otras 24 hs. La actividad de las caspasas 3 y 7 está normalizada por la viabilidad celular y expresada relativa al shRNA control sin tratamiento (media \pm E.S.; n = 3). Se observa que las células expresando shRNA de S100A10 aumentan la actividad de las caspasas 3 y 7 comparadas con las células expresando el shRNA control. * $P < 0.05$, versus células transfectadas con shRNA control y tratadas con gemcitabina.

Como demostramos previamente, la gemcitabina induce autofagia mediada por la expresión de VMP1 que finalmente conduce a la apoptosis de las células de cáncer de páncreas. Demostramos también que la expresión de S100A10 disminuye la formación de autofagosomas inducidos por VMP1 y por el tratamiento con gemcitabina. Por otro lado, el silenciamiento de S100A10 aumenta la apoptosis en las células tratadas con gemcitabina. Estos resultados sugieren que bajo el tratamiento con gemcitabina la expresión de S100A10 regula negativamente la respuesta autofágica mediada por VMP1 disminuyendo la apoptosis y permitiendo la supervivencia de las células tumorales pancreáticas en respuesta al tratamiento con gemcitabina.

Discusión

El objetivo de nuestro laboratorio es investigar la respuesta de la célula pancreática a la enfermedad. En trabajos previos se estudió la respuesta de la célula pancreática a la enfermedad causada por la pancreatitis aguda experimental. El análisis de la expresión diferencial mediante la técnica de *microarrays* permitió detectar 96 nuevos genes activados o reprimidos en respuesta a la pancreatitis [Duseti NJ y col., 2000]. Nuestro interés se centró en el estudio de aquellos que se sobreexpresan. Los genes identificados y caracterizados hasta el momento se encuentran en diferentes etapas de estudio [Samir AA y col., 2000; Tomasini R y col., 2001; Duseti NJ y col., 2002; Ropolo A y col., 2004; Hoffmeister A y col., 2002; Vaccaro MI y col., 2003].

El gen VMP1 fue caracterizado por su rápida y alta expresión en células pancreáticas en respuesta a la enfermedad. Los primeros estudios sobre VMP1 determinaron que codifica para una proteína teórica de 406 aminoácidos, cuya estructura teórica indica que es una proteína transmembrana con 6 dominios hidrofóbicos. Estudios realizados en cortes de tejido, mediante hibridación *in situ* del RNA mensajero para VMP1, permitieron demostrar que la expresión de VMP1 se restringe a las células acinares tempranamente durante el desarrollo de la pancreatitis experimental. El análisis de la localización intracelular de la proteína VMP1, a través de la visualización de la proteína de fusión VMP1-EGFP, evidenció que VMP1 se ubica en la región del aparato de golgi. Es interesante destacar que las células transfectadas con el plásmido de expresión de VMP1 sufren modificaciones intracelulares, formando vacuolas citoplasmáticas. Como la proteína de fusión fluorescente se detectó en la membrana de esas vacuolas a este nuevo gen se lo llamó VMP1 (*Vacuole Membrane Proteín 1*). Llamativamente, las células transfectadas que sobreexpresan VMP1 mueren a las 48 horas. Se estudió entonces si la expresión de VMP1 *in vivo* se relaciona con la formación de vacuolas. Se determinó que, tanto en pancreatitis aguda como en pancreatitis crónica, la formación de vacuolas citoplasmáticas es uno de los eventos celulares iniciales, y que en ambos casos la expresión *in vivo* de VMP1 se correlaciona

positivamente con la formación de vacuolas y precede a la muerte celular. Además se comprobó mediante RT-PCR e hibridación *in situ* que el tratamiento con L-arginina induce la expresión de VMP1 [Vaccaro MI y col., 2003; Jiang PH y col., 2004].

El hallazgo de la capacidad de VMP1 de inducir la formación de vacuolas citoplasmáticas y posteriormente la muerte celular, nos condujo a postular que la expresión de VMP1 induce la formación de vacuolas autofágicas. Por lo tanto nuestro primer objetivo fue comprobar esta hipótesis. Se desarrollaron entonces los métodos para evaluar autofagia aceptados en la bibliografía para demostrar que la expresión de VMP1 induce autofagia en células de mamífero. Debido a que cada vez más trabajos relacionan a la autofagia con la fisiopatología humana, el interés para detectar este proceso se ha incrementado. Las 3 principales metodologías para monitorear autofagia son, la microscopía, los métodos bioquímicos y el estudio de las modificaciones de proteínas observadas mediante la técnica de western blot. Dentro de los métodos de microscopía se incluyen los ensayos de naranja de acridina, monodansylcadaverina (MDC), localización de GFP-LC3, LysoTracker Red (para detectar compartimentos acídicos) y microscopía electrónica, que permite detectar ultraestructuras características de autofagia. Dentro de los métodos bioquímicos se encuentra el secuestro y degradación de marcadores citosólicos, pero si bien en principio puede utilizarse, se debe tener en cuenta que la degradación de las proteínas citoplasmáticas no ocurre solamente por autofagia, y en realidad se estarán incluyendo también otros métodos de degradación de proteínas. Sin embargo la degradación de proteínas de vida media-larga es más específica, ya que son preferencialmente degradadas por autofagia. La estrategia general es utilizar la técnica de pulso para marcar las proteínas y luego monitorear su degradación. La utilización del inhibidor 3-MA confirma si la degradación observada es producto del proceso autofágico. Finalmente, pueden detectarse modificaciones de proteínas que ocurren durante la

autofagia, como el procesamiento de LC3-I a LC3-II, el cual puede ser detectado por western blot y, por lo tanto, ser utilizado como marcador de autofagia

En este trabajo encontramos que las vacuolas inducidas por VMP1 se tiñeron con el trazador fluorescente MDC y que la sobreexpresión de VMP1 en células HeLa indujo la formación de estructuras MDC positivas como las vacuolas autofágicas. Por otro lado se confirmó la presencia de ultraestructura autofágica, ya que células sobreexpresando VMP1 cultivadas en condiciones ricas en nutrientes presentan ultraestructuras características de autofagia, incluyendo estructuras en forma de copa, y estructuras tipo autofagosomas y autolisosomas. Además, VMP1 indujo la agrupación de la proteína fluorescente RFP-LC3. En todos los experimentos con líneas celulares en los cuales se sobreexpresó VMP1 al menos el 85 % de las células se encontraron agrupadas. Resultados similares fueron obtenidos con la agrupación de LC3 endógeno. Más aún, VMP1 indujo el procesamiento de LC3 endógeno de LC3-I a LC3-II, el que se incrementó en presencia del inhibidor de hidrolasa E64d. Ha sido reportado que, cuando se co-transfecta con otro plásmido, la sobreexpresión transiente de la proteína LC3 puede resultar en su agregación independientemente de la autofagia. Por esa razón la concentración de plásmido para la transfección fue puesta a punto previamente. Sin embargo, el procesamiento del LC3 endógeno de LC3-I a LC3-II no es afectado por la co-transfección, por lo que es ampliamente utilizado como método para detectar autofagia [Yoshimori T, 2004; Kuma A y col., 2007].

Nuestros resultados mostraron que el reclutamiento de LC3 inducido por VMP1 disminuyó al agregar el inhibidor 3-MA. La 3-MA fue reportada por tener efectos laterales aparte de inhibir la autofagia [Levine B y col., 2005], sin embargo la inhibición del reclutamiento de LC3 es debido a su habilidad para inhibir la autofagia. Por lo tanto se observó que las vacuolas inducidas por la expresión de VMP1 se tiñen con MDC,

presentan ultraestructura de organelas autofágicas, reclutan LC3-II y esta característica es inhibida por un inhibidor específico de autofagia. Por otro lado, se confirmó que el proceso inducido por VMP1 mantiene el flujo autofágico, ya que al inhibir enzimas lisosomales se promueve la acumulación de LC3-II. En conjunto, estos hallazgos confirman que la expresión de VMP1 induce autofagia, y sugieren que VMP1 está implicada en la formación de autofagosomas.

Para poder profundizar el estudio de VMP1 y verificar si su expresión media la formación de autofagosomas, desarrollamos dos anticuerpos policlonales específicos contra la proteína en estudio. El primer anticuerpo se desarrolló contra los últimos 20 aminoácidos de la proteína y el segundo contra el fragmento central, que contiene desde el aminoácido 187 al 247. Estos 2 fragmentos fueron seleccionados mediante estudios informáticos que permiten predecir las características de las secuencias, con el objetivo de seleccionar los fragmentos con mejores características antigénicas. Las pruebas realizadas con los anticuerpos obtenidos demostraron su funcionalidad en estudios de western blot, inmunohistoquímica e inmunocitoquímica.

Postulamos entonces que si VMP1 está implicada en la formación de autofagosomas su expresión debía estar activada por los tratamientos que favorecen la autofagia, y también debía ser necesaria para el desarrollo de autofagia en respuesta al estímulo. Nuestros resultados demostraron que tratamientos actualmente utilizados para gatillar autofagia, como el ayuno, e inhibidores farmacológicos de mTOR, como la rapamicina, indujeron la expresión de VMP1. Esto fue evidenciado por el aumento de mRNA de VMP1 analizado por RT-PCR y por el aumento de la proteína VMP1 observado por western blot. Más aún, el silenciamiento de VMP1 inhibió la formación de autofagosomas inducida por el tratamiento con ayuno o rapamicina, sugiriendo que VMP1 está involucrada en la autofagia inducida por estos dos estímulos y que su

expresión es necesaria para que la autofagia se desarrolle. Se comprobó así que la expresión de VMP1 es necesaria para la formación de autofagosomas inducida por estos 2 estímulos autofágicos.

Estos resultados se complementan con otros resultados obtenidos en nuestro laboratorio, los cuales no fueron desarrollados en esta tesis. Estos resultados demuestran la triple localización de VMP1, Beclina 1 y LC3 en las vacuolas inducidas por VMP1, sugiriendo a VMP1 como una proteína integral de la membrana del autofagosoma [A. Ropolo y col., 2007]. También se demuestra la interacción de VMP1 con Beclina 1, indicando que, en células de mamíferos, VMP1 funciona como una proteína transmembrana que interactúa con Beclina 1 y que podría permitir la localización de otras proteínas de autofagia en la membrana del autofagosoma. Hasta ahora, solo 2 proteínas de membrana relacionadas con la autofagia han sido descritas en levaduras, ATG9 [Reggiori F y col., 2005] y ATG27 [Yen WL y col., 2007; Legakis JE y col., 2007]. Sin embargo no ha sido descrito que ninguna de estas proteínas transmembrana induzca autofagia ni que interactúe con Beclina 1.

La proteína VMP1 no tiene homólogo conocidos en levaduras y es la primera proteína transmembrana descrita que induce un proceso autofágico en células de mamíferos. Estos hallazgos, sostienen la hipótesis que las células de mamíferos regulan el proceso de autofagia en forma diferente.

La autofagia juega un rol importante en la salud y enfermedad humana. Este proceso catabólico mantiene el control de calidad de componentes celulares esenciales, sin embargo, la desregulación o excesiva autofagia ha sido relacionada con diversas patologías como enfermedades neurodegenerativas y cáncer [Mizushima N y col., 2008].

El rol de la autofagia en el cáncer ha sido descrito como una espada de doble filo debido a que se encuentra relacionado tanto con la supervivencia como con la muerte celular [Shintani T y col., 2004]. Esta decisión depende del estado de la carcinogénesis, del contexto célula/tejido, de las características moleculares de la célula target y de la naturaleza del estrés [Ogier-Denis E y col., 2003]. Algunos estudios demuestran que las células de cáncer en general tienen desregulado el proceso de autofagia y reducida su capacidad autofágica comparada con las células no tumorales [Tóth S y col., 2002; Gozuacik A y col., 2004]. También se ha descrito que la mutación en un alelo del gen de autofagia Beclina 1 aumenta la frecuencia de malignidad espontánea y acelera el desarrollo de lesiones premalignas inducidas por virus [Qu X y col., 2003], sugiriendo que la regulación defectuosa de la autofagia promueve la tumorigénesis. Por otro lado, la autofagia puede permitir la supervivencia de las células cancerosas permitiendo el crecimiento en condiciones de bajo suplemento de oxígeno y estrés metabólico [Levine B, 2007]. Se ha propuesto que la autofagia juega un rol importante tanto en la promoción como en la muerte de las células de cáncer [Mathew R y col., 2007a], aunque los mecanismos moleculares responsables de esta acción dual todavía no han sido determinados.

Si bien se han hecho muchos progresos en el tratamiento de los tumores sólidos, el pronóstico del cáncer de páncreas sigue siendo pobre. Una de las razones es la resistencia de las células de cáncer de páncreas a los tratamientos como quimioterapia, radioterapia, inmunoterapia y terapia hormonal [DiMugno EP y col., 1999; Büchler M y col., 1991; Friess H y col., 1992]. La gemcitabina es el agente quimioterápico estándar para el tratamiento del cáncer de páncreas. Han sido descritos dos mecanismos de acción que contribuyen a la citotoxicidad de la gemcitabina. En el primero la gemcitabina compete con el dCTP por su incorporación al DNA causando la terminación de la cadena, en el segundo el difosfato de gemcitabina

(dFdCDP) sirve como sustrato alternativo inhibitorio para la ribonucleótido reductasa, inactivando esta enzima clave y llevando a la disminución del pool de deoxinucleótidos [Baker CH y col., 1991; van der Donk WA y col., 1998; Wang J y col., 2007].

Se sabe muy poco acerca del rol de la autofagia en el cáncer de páncreas. Los resultados obtenidos hasta el momento indican que la autofagia podría actuar como protector de la célula tumoral, permitiéndole proliferar en un ambiente hostil, pero a la vez podría ser un mecanismo de muerte celular activado por los agentes quimioterapéuticos. Algunos resultados revelan que en tejido de cáncer de páncreas resecaado se observa una mayor expresión de LC3-II en el área periférica, la cual incluye el borde invasivo, y que este resultado se asocia a un peor pronóstico [Fujii S. y col., 2008]. Estos hallazgos proponen a la autofagia como un proceso que permite a las células cancerosas sobrevivir en el ambiente tumoral. En otro trabajo se relaciona a la autofagia con la inflamación. Se ha visto una sobreexpresión del receptor inducido por inflamación RAGE (receptor for advanced glycation end product) en adenocarcinomas pancreáticos humanos y murinos. La expresión de RAGE se correlaciona con la habilidad de líneas celulares de cáncer de páncreas de sobrevivir a insultos citotóxicos [Abe R y col., 2008]. Por otro lado la sobreexpresión de RAGE está asociada con el aumento de la autofagia, la disminución de la apoptosis y la supervivencia celular [Kang R y col., 2009]. Estas observaciones sugieren que la expresión de RAGE está implicada en la respuesta de la célula del cáncer al estrés del ambiente tumoral a través de la inducción de la autofagia. Sin embargo, otras evidencias experimentales en modelos animales mostraron que las células de adenocarcinoma pancreático tienen reducida su capacidad autofágica en comparación con las células premalignas, sugiriendo que la disminución de la autofagia podría proveer resistencia al tratamiento [Tóth S y col., 2002]. Otro estudio demuestra que en líneas celulares de cáncer de

páncreas el aumento de la autofagia lleva a una menor sobrevivencia de las células [Akar U. y col., 2007]. En estos casos la autofagia parece actuar como un tipo de muerte celular. Estos datos coinciden con lo observado en este trabajo de tesis, aportando mayor evidencia de que la autofagia podría actuar como un proceso supresor de tumor.

Los datos presentes demostraron que en las líneas de cáncer de páncreas PANC-1 y MIAPaCa-2 la inducción temprana de la autofagia por el tratamiento con gemcitabina lleva a la apoptosis de las células, y que este proceso está mediado por la activación de VMP1. La gemcitabina es el único quimioterápico relativamente efectivo para el tratamiento del cáncer de páncreas. Entre las células de cáncer pancreático, PANC-1 y MIAPaCa-2 son las células más resistentes y la DL50 para el tratamiento con gemcitabina es 4 órdenes de magnitud mayor comparado con otras líneas celulares [Giroux V y col., 2006]. Sin embargo, PANC-1 y MIAPaCa-2 responden al tratamiento con gemcitabina incrementando la apoptosis.

En nuestros estudios, con el objetivo de caracterizar el mecanismo de respuesta celular temprana a la gemcitabina, se utilizó 200 μ M gemcitabina, que llevó, aproximadamente, al 80% de sobrevivencia luego de 24 hs de tratamiento. Los experimentos realizados en PANC-1 y MIAPaCa-2 mostraron que el tratamiento con gemcitabina indujo autofagia, evidenciada por la acumulación de vesículas acídicas detectadas con naranja de acridina, el reclutamiento de LC3 en estructuras punteadas, la detección de LC3-II por western blot y por la presencia de ultraestructura autofágica detectada por microscopía electrónica. No han sido dilucidados todos los mecanismos involucrados en la resistencia de la célula de cáncer de páncreas al tratamiento, sin embargo, nuestros resultados nos permiten proponer que la inducción de la autofagia podría incrementar la sensibilidad del cáncer a la quimioterapia.

Otros trabajos también demuestran la inducción de autofagia durante el tratamiento quimioterápico en células de cáncer de páncreas. Los inhibidores de farnesyltransferasa (FTIs) son drogas anticáncer que se encuentran en desarrollo clínico. Los mecanismos de acción de los FTIs involucran a Rheb y a la vía de PI3-K/Akt/ mTOR. También se ha demostrado que los FTIs inducen autofagia en la línea de cáncer pancreático PANC-1 de forma dosis dependiente. Sin embargo, a diferencia de nuestros resultados, el tratamiento con el inhibidor de autofagia 3-MA no disminuyó la muerte celular [Wong HH y col., 2008]. Por otro lado, el oleandrín, el principal componente citotóxico de *Nerium oleander*, es un glicósido cardíaco que media la muerte de las células tumorales a través de múltiples mecanismos. El tratamiento con oleandrín en células PANC-1 desencadena la muerte celular asociada con la formación de autofagosomas. En este caso las vías de Akt y ERK parecen estar involucradas en la muerte celular por autofagia inducida por oleandrín [Newman RA y col., 2007; Vivanco I y col., 2002].

Al profundizar el estudio de la autofagia inducida por gemcitabina demostramos que, luego de 8 hs de tratamiento con gemcitabina, las células de cáncer de páncreas MIAPaCa-2 activaron la vía de la autofagia y que esta condujo a la apoptosis. Luego de 24 hs de tratamiento con gemcitabina las células tumorales mostraron evidencias de apoptosis. El fosfolípido fosfatidilserina se encuentra en la cara interna de la membrana plasmática y es expuesto en la cara externa de dicha membrana cuando comienza el proceso de apoptosis. La anexina-V es una proteína que se une específicamente a la fosfatidilserina permitiendo su detección. Mediante citometría de flujo evaluamos las células apoptóticas tempranas a través de la marcación con anexina V-PE y 7AAD que permite diferenciar entre las células vivas y muertas y los resultados obtenidos fueron confirmados midiendo la actividad de las caspasas

efectoras 3 y 7. Los resultados demostraron que la gemcitabina llevó a la muerte celular por apoptosis, sin embargo la inhibición de la autofagia con 3-MA redujo significativamente el porcentaje de células apoptóticas en respuesta a la gemcitabina, lo que indica que la autofagia en este caso está actuando a favor de la apoptosis llevando a la muerte celular. Estos resultados concuerdan con el trabajo de Bommarreddy en el cual el tratamiento con fenetil isotiocianato (PEITC), un compuesto natural con efectos quimiopreventivos, induce autofagia y apoptosis en células de cáncer de próstata. En este caso se probó que la vía de autofagia activada por PEITC es dependiente de ATG5 [Bommarreddy A y col., 2009]. Asimismo, un estudio también probó que la inducción de la autofagia se encuentra involucrada en el mecanismo por el cual los cannabinoides promueven la apoptosis vía mitocondrial de las células de glioma [Salazar M y col., 2009]. Sin embargo, estudios en líneas celulares de cáncer de páncreas muestran que la inducción de autofagia inhibe el crecimiento pero no se encontraron evidencias de apoptosis. En este caso la expresión de la transglutaminasa de tejido (TG2) confiere protección contra la autofagia. Al silenciar TG2 se induce la autofagia y se inhibe el crecimiento celular sin evidencias de apoptosis, lo cual parece estar señalando a la autofagia como un mecanismo independiente de muerte celular [Akar U y col., 2007].

A pesar de los diferentes roles reportados para la autofagia en células de cáncer, es interesante notar que en células de cáncer de páncreas no se han descrito drogas quimioterápicas que maten a las células a través de la inhibición de la autofagia. Nuestros resultados demostraron que la inducción de autofagia inducida por gemcitabina llevó a la muerte celular por apoptosis y sugieren a la inducción de autofagia como una herramienta terapéutica para el tratamiento de cáncer de páncreas.

Durante el estudio de la participación de VMP1 en la respuesta tumoral al tratamiento, demostramos que en ambas líneas de cáncer de páncreas la gemcitabina indujo la expresión temprana del mRNA de VMP1 detectada por Real Time PCR. Al igual que en las células HeLa, se observó un aumento en la expresión por el tratamiento con rapamicina. Se ha probado que en la línea celular de cáncer de páncreas MDA-Panc28 la rapamicina no induce autofagia [Akar U y col., 2007]. Si bien nosotros utilizamos líneas diferentes de cáncer de páncreas, observamos un aumento del mRNA de VMP1 bajo el tratamiento con rapamicina, aunque la capacidad de inducir autofagia no fue evaluada.

Para poder evaluar la participación de VMP1 en la autofagia y apoptosis inducida por gemcitabina se utilizó el silenciamiento de VMP1. Una estrategia consistió en la transfección con el plásmido que expresa el shRNA de VMP1 y la proteína EGFP, ya que de esta forma se pudieron identificar las células con VMP1 silenciado a través de la fluorescencia verde y de este modo analizar la agrupación de LC3 solo en este grupo de células. Solo en el ensayo de actividad de caspasas 3 y 7 se utilizó un siRNA VMP1, ya que como en este caso no podemos diferenciar las transfectadas el siRNA resulta una mejor opción por la mayor eficiencia de transfección obtenida.

Se determinó que VMP1 participa de la autofagia inducida por gemcitabina ya que el silenciamiento de VMP1 disminuyó la autofagia evaluada por la agrupación del marcador RFP-LC3. Más aún, de acuerdo con los resultados anteriores donde se observó que la inhibición de la autofagia por 3-MA también disminuía la apoptosis, el silenciamiento de VMP1, que disminuye la autofagia, también disminuyó la apoptosis. Estos resultados relacionan nuevamente a VMP1 con apoptosis.

En trabajos anteriores ya se había observado que otras líneas celulares sobreexpresando VMP1-EGFP mueren a las 48 hs con evidencias morfológicas de apoptosis [Duseti NJ y col., 2002]. Nuestros resultados confirmaron, mediante citometría de flujo y actividad de caspasa 3 y 7, que la sobreexpresión de VMP1

aumentó la apoptosis a las 48 hs. Se puede concluir que la vía de autofagia mediada por VMP1 está involucrada en la muerte celular por apoptosis inducida por gemcitabina. La eficacia moderada de la gemcitabina en el tratamiento del cáncer de páncreas podría explicarse en parte por la autofagia mediada por VMP1. Por lo tanto una mayor inducción de la vía de autofagia mediada por VMP1 podría ser un complemento interesante para mejorar la respuesta a la gemcitabina en los tratamientos de cáncer pancreático.

Como ya fue discutido, VMP1 se une a Beclina 1 y colocaliza con LC3 [Ropolo A y col., 2007], lo que hace a VMP1 necesaria para la inducción de la autofagia. Por otro lado al ser VMP1 una proteína transmembrana que forma parte del autofagosoma es posible que funcione como una proteína de anclaje para que diversos complejos interactúen. La participación de VMP1 en la muerte celular podría deberse a que al sobreexpresar VMP1 se produce una gran cantidad de vacuolas, lo que podría inducir estrés celular por la acumulación de vacuolas, desencadenando la respuesta apoptótica. Es posible también que otros complejos de proteínas puedan formarse induciendo la señalización que lleva a la muerte por apoptosis.

Una estrategia para comprobar esta hipótesis es determinar que otras proteínas pueden interactuar con VMP1 y formar parte de nuevos complejos de señalización. Utilizamos entonces la técnica de doble híbrido con el fin de hallar proteínas que se unan a VMP1. Se detectaron 11 proteínas que interactuaron *in vivo* con el Fragmento B de VMP1, 8 de ellas se obtuvieron de un solo clon positivo, mientras que las 3 restantes fueron encontradas con una mayor frecuencia. Las proteínas identificadas fueron: EEF1G, EIF3S12, Ribosomal protein S10, LARP1, TARBP2, HSPA5, Kinesin 2 isoform 1, AlphaL-1 Fucosidase, USP9X, FADD y S100A10.

Se hallaron 3 proteínas relacionadas con la traducción de proteínas, EEF1G, EIF3S12 y Ribosomal protein S10. La proteína EEF1G (eukaryotic translation elongation factor 1

gamma) fue encontrada en 6 clones positivos y también ha sido relacionada con carcinoma gástrico y adenocarcinoma de colon, donde se comprobó su sobreexpresión [Mimori K y col., 1995; Chi K y col., 1992]. La proteína LARP1 posee un dominio de unión a mRNA y ha sido relacionada con el tráfico de mRNA entre diferentes compartimientos nucleares y también con la regulación de los mRNAs en los P-bodies [Nykamp K y col., 2008; Horke S y col., 2004]. La proteína TARBP2 también está relacionada con el RNA y fue encontrada en 2 clones positivos. Junto con Dicer y Ago2, TARBP2 forma parte del complejo silenciador inducido por RNA (RISC). TARBP2 es una proteína de unión a RNA doble cadena que lleva los siRNA dentro del RISC y se une directamente a Dicer a través de su dominio c-terminal. [Daniels SM y col., 2009]. La proteína de *heat shock* HSPA5, es una chaperona del retículo endoplásmico, y su principal función involucra el remodelado de polipéptidos [Wisniewska M y col., 2010]. Otra proteína relacionada con el retículo endoplásmico es la Kinesin 2 isoform 1. El retículo endoplásmico es una red dinámica de membranas interconectadas. Las kinesinas y los microtúbulos son esenciales en el mantenimiento de su estructura, ya que están involucrados en la expansión de las membranas [Vedrenne C y col., 2006]. También fueron encontradas la proteína AlphaL-1 Fucosidase, una glicosidasa lisosomal involucrada en la degradación de fucoglicoconjugados [Johnson SW y col., 1991], y la proteína USP9X, que remueve las ubiquitininas de diversas proteínas. Uno de sus sustratos es la proteína MCL 1, la cual al no ser degradada contribuye a la quimioresistencia y al avance de la enfermedad en linfomas [Schwickart M y col., 2010]. Una reconocida proteína relacionada con la muerte celular fue obtenida en el doble híbrido, el dominio de muerte asociado a Fas (FADD). Es una proteína adaptadora que se une a diferentes receptores luego de haber sido activados por sus ligandos. La unión de FADD permite la unión de caspasa 8 a través de su dominio de muerte formando el complejo DISC y desencadenando la vía de señalización de apoptosis. Aunque también FADD puede participar en otras

respuestas como la activación de genes. [Walczak H y col., 2008; Wilson NS y col., 2009].

Luego del *screening* se seleccionó a la proteína S100A10, ya que la misma fue encontrada en 18 clones positivos y varios reportes la relacionan con numerosos tipos de tumores. Más aún, se ha determinado la sobreexpresión del mRNA de S100A10 en estudios de cáncer de páncreas, lo que nos motivó a continuar nuestros estudios analizando si esta interacción tiene relación con la resistencia al tratamiento de las células tumorales pancreáticas. Otros estudios también la encontraron sobreexpresada en cáncer de pulmón, linfoma, carcinoma de riñón, meduloblastoma y cáncer gástrico [Iacobuzio-Donahue CA y col., 2003; Liu J y col., 2008; Lindsey JC y col., 2007; Domoto T y col., 2007; Rust R y col., 2005; Remmelink M y col., 2005]. Es interesante destacar que si bien S100A10 se ha encontrado aumentada en cáncer de páncreas, su participación en el desarrollo o progresión del tumor no ha sido dilucidada. Por otro lado, esta proteína fue relacionada con el transporte de vesículas. S100A10 fue descrita originalmente en un complejo con la proteína anexina A2 [Gerke V y col., 1984; Gerke V y col., 1985; Glenney JR Jr y col., 1985]. Se ha establecido la asociación del complejo anexina A2-S100A10 con endosomas [Rescher U y col., 2004a y 2004b]. La depleción de S100A10 y anexina A2 afecta la distribución intracelular y la morfología de los endosomas reciclados y también tiene impacto en la formación de endosomas multivesiculares [Mayran N y col., 2003; Zobiack N y col., 2003]. Recientemente se han encontrado nuevas interacciones con proteínas de membrana, sugiriendo que S100A10 puede acoplarse en múltiples interacciones independientes de su unión a Anexina A2 [Rescher U y col., 2008]. Se ha determinado su interacción con numerosos canales de membrana. Los resultados de estos estudios plantean que la unión de S100A10 a un dominio citosólico de proteínas integrales de membrana es necesaria para una eficiente presentación en la membrana y por lo tanto para su actividad. También fueron descritas interacciones con complejos citosólicos y

proteínas asociadas a membranas periféricas [Benaud C y col., 2004; De Seranno S y col., 2006, Beaton AR y col., 2002].

En primer lugar entonces, decidimos confirmar la interacción VMP1-S100A10. En los estudios utilizando la estrategia de doble híbrido, es indispensable confirmar las interacciones, ya que la interacción positiva en un experimento de doble híbrido no asegura que esa interacción se mantenga en otro modelo de estudio. Más aún en nuestro caso en que se utilizó solo un fragmento de VMP1. El estudio mediante *pull-down* permitió confirmar la interacción de S100A10 con VMP1 obtenida en el doble híbrido.

A continuación se analizó la distribución intracelular de S100A10 mediante la construcción de un plásmido de expresión de S100A10-EGFP que permite visualizar la proteína de fusión por fluorescencia directa. Los resultados obtenidos en células HeLa mostraron una distribución uniforme de S100A10. Esto se debe a que es una proteína citosólica que puede unirse a membrana a través de su interacción con una proteína transmembrana o una proteína que tenga la capacidad de unirse en forma periférica a la membrana. Así, puede estar unida a membrana o libre en citosol, por lo tanto no es extraño que al estar sobreexpresada se observe un patrón uniforme en toda la célula, salvo el núcleo que se observa menos marcado. Para poder detectar la fracción de S100A10 unida a membrana se utilizó un buffer que lava la proteína citoplasmática. Se obtuvo un patrón punteado distribuido por el citoplasma, donde se pudo observar también la localización en la membrana plasmática ya que presentó un patrón punteado delimitando algunas partes de la célula. Estos resultados coinciden con los trabajos previos donde obtienen el mismo patrón de distribución de S100A10 [Zobiack N y col., 2003; Morel E y col., 2007], confirmando que S100A10-EGFP se distribuye como ya fue descrito previamente en la literatura.

Al estar VMP1 involucrada en el proceso de autofagia, resulta interesante analizar la expresión del mRNA de S100A10 bajo tratamientos inductores de autofagia para

determinar si S100A10 está participando de la respuesta autofágica y si la interacción entre VMP1 y S100A10 se produce durante este proceso. Los resultados evaluados por la técnica de Real Time PCR en las células HeLa mostraron que el mRNA de S100A10 aumentó su expresión por ayuno o por el tratamiento con gemcitabina, lo que sugirió que esta proteína está involucrada en la respuesta a estos inductores de autofagia. Sorprendentemente, el análisis en las células MIAPaCa-2 no mostró diferencias en la expresión del mRNA S100A10 en respuesta a estos tratamientos. Estos resultados pueden indicar que la expresión está desregulada en las células de cáncer de páncreas. Cuando se analizó la expresión basal en las células HeLa y las MIAPaCa-2 se observó que las células de cáncer de páncreas expresan 2 veces y medio más mRNA de S100A10 que las células HeLa. Este resultado coincide con los obtenidos por [Iacobuzio-Donahue CA y col., 2003], que demuestran la activación del mRNA de S100A10 estudiando la expresión diferencial por *microarrays* en 14 líneas celulares de cáncer de páncreas, 17 muestras de cáncer de páncreas y 5 muestras de páncreas normal.

La distribución intracelular de VMP1 muestra siempre un patrón punteado alrededor del núcleo, polarizada hacia un lado formando una figura que asemeja un cometa. Por otro lado la participación de S100A10 en la distribución de membranas ya ha sido descrita. Diversos estudios describen la participación de S100A10 en la expresión de canales en la membrana plasmática, sin embargo no todos los datos son coincidentes. Algunos trabajos plantean que la unión de S100A10 a un dominio citosólico de proteínas integrales de membrana es necesaria para una eficiente presentación en la membrana plasmática, sin embargo, Renigunta y colaboradores demostraron que la interacción de S100A10 con el canal de potasio TASK1 actúa como un factor de retención en el retículo endoplásmico [Renigunta V y col., 2006]. Al silenciar S100A10

o mutar el sitio de unión de S100A10 en TASK-1 se observa una mayor cantidad de canales en membrana plasmática, modificándose el patrón de distribución celular. Nuestros resultados mostraron que la sobreexpresión de S100A10 modificó el patrón de VMP1 y se observó un mayor porcentaje de distribución reticulada alrededor del núcleo, semejante al retículo endoplásmico, lo que sugiere que S100A10 podría estar reteniendo a VMP1 en el retículo endoplásmico, coincidiendo con lo observado por Renigunta y colaboradores [Renigunta V y col., 2006].

En los resultados anteriores se demostró que ambas proteínas, S100A10 y VMP1 se encuentran sobreexpresadas en las líneas de cáncer de páncreas. Cuando analizamos como afecta la expresión de VMP1 a la expresión de S100A10 se observó que la sobreexpresión de VMP1 producida por la transfección con pEGFP-VMP1 indujo la expresión del mRNA de S100A10, sugiriendo que S100A10 forma parte de la respuesta celular mediada por VMP1. Por el contrario, no se observaron cambios de la expresión del mRNA de VMP1 durante la sobreexpresión de S100A10.

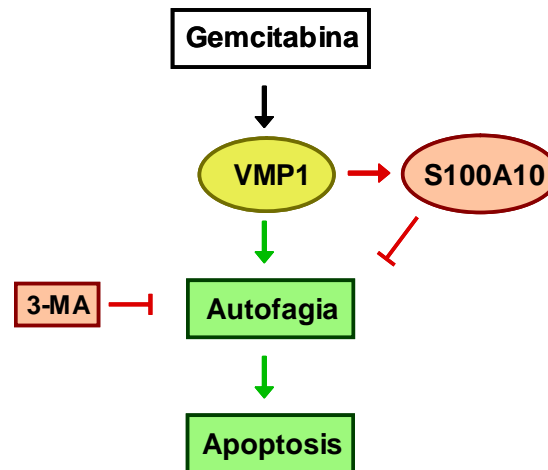
Si VMP1 induce la formación de autofagosomas y S100A10 está involucrada en la respuesta mediada por VMP1, entonces determinar cual es la participación de S100A10 en la formación de autofagosomas nos permite analizar la función de S100A10 en la respuesta mediada por VMP1. Utilizando el marcador de autofagosomas RFP-LC3, observamos que la sobreexpresión de S100A10 disminuyó la formación de autofagosomas inducida por VMP1, sugiriendo que la expresión de S100A10 puede estar regulando la magnitud de la respuesta autofágica. Más aún, los resultados de la formación de autofagosomas en respuesta a la gemcitabina también mostraron que la sobreexpresión de S100A10 disminuyó la autofagia corroborando los resultados obtenidos por la expresión de VMP1, ya que, como fue discutido previamente, la autofagia inducida por gemcitabina está mediada por VMP1.

Aún no se conoce el origen de la membrana del autofagosoma, aunque estudios recientes sugieren que podría derivar del retículo endoplásmico [Axe EL y col., 2008]. Por otro lado, como ya fue discutido, Renigunta y colaboradores demostraron que la interacción de S100A10 con TASK1 actúa como un factor de retención en el retículo endoplásmico. Una explicación posible es que S100A10 se une a VMP1 en el retículo endoplásmico formando un complejo que impide la unión de las proteínas necesarias para la formación de autofagosomas y de esta forma estaría regulando negativamente la autofagia. Esta explicación también es respaldada por nuestros resultados sobre la redistribución intracelular de VMP1 al sobreexpresarse S100A10.

Como previamente se determinó la participación de S100A10 en la autofagia, quisimos analizar la participación de S100A10 en la muerte celular inducida por gemcitabina. Los resultados demostraron que el silenciamiento de S100A10 aumentó la apoptosis en células tratadas con gemcitabina, indicando que la expresión de S100A10 participa en la supervivencia celular en respuesta al quimioterápico. Estos resultados sugieren a S100A10 como un regulador negativo de la autofagia y la apoptosis en las células de cáncer de páncreas que favorece la resistencia al tratamiento.

El análisis en conjunto de los resultados obtenidos demuestra que bajo el tratamiento con gemcitabina se induce la expresión de VMP1 en las células tumorales pancreáticas y esta vía molecular conduce a la autofagia y finalmente a la muerte por apoptosis. Sin embargo, la expresión de VMP1 induce a S100A10, la cual está regulando negativamente la respuesta al disminuir la autofagia y la apoptosis permitiendo la supervivencia de las células de cáncer de páncreas. Esto puede deberse en parte a que la unión de S100A10 con VMP1 permitiría la formación de un complejo que desplaza a las proteínas necesarias para la autofagia. El modelo molecular propuesto, representado en la siguiente figura, esquematiza las vías de sensibilidad y de resistencia al tratamiento con gemcitabina que actuarían en las células tumorales

pancreáticas, y la posible relación entre ambas mediante la interacción de VMP1 con S100A10.



Modelo de respuesta al tratamiento con gemcitabina en las células tumorales pancreáticas

En verde se señalan las vías de sensibilidad a la gemcitabina y en rojo las vías de resistencia

Otros resultados de nuestro laboratorio apoyan el modelo propuesto. En un estudio hecho en muestras humanas de cáncer pancreático se determinó que los pacientes que presentaron mayor expresión de VMP1 en el tejido tumoral tuvieron una mayor supervivencia (datos aún no publicados). Otros resultados, obtenidos por Iacobuzio-Donahue [2003] comprueban la sobreexpresión de S100A10 en cáncer de páncreas, y nos permiten especular sobre el posible rol de la interacción VMP1-S100A10 en la resistencia del cáncer de páncreas al tratamiento.

Aunque los mecanismos precisos de resistencia de la célula de cáncer de páncreas al tratamiento no son bien comprendidos, la promoción de la autofagia puede incrementar la sensibilidad a la quimioterapia. Los resultados obtenidos en esta tesis contribuyen a esclarecer el rol de la autofagia en el cáncer de páncreas, demostrando que la autofagia, a través de la expresión de VMP1, lleva a la muerte celular por

apoptosis. Sin embargo, las células tumorales pancreáticas disparan mecanismos mediados en parte a través de la expresión de S100A10, que permiten la supervivencia de las células tumorales en respuesta al tratamiento. Los hallazgos descritos en este trabajo proponen que la vía de autofagia mediada por VMP1 es un posible blanco de estudio en el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas para el cáncer de páncreas.

Futuros estudios centrados en los mecanismos moleculares que median la resistencia al tratamiento de las células tumorales pancreáticas y en los que posiblemente participe la interacción VMP1-S100A10, así como su relación con los procesos de autofagia y apoptosis, permitirán una mejor comprensión de la biología de la célula tumoral pancreática y tendrán potencial relevancia clínica.

Conclusiones

La evidencia experimental obtenida con el fin de comprobar la hipótesis propuesta puede resumirse en las siguientes conclusiones:

- La sobreexpresión de VMP1 es suficiente para inducir autofagia en células de mamíferos sin la necesidad de otro estímulo.
- Los estímulos inductores de autofagia, como el ayuno o el tratamiento con el inhibidor farmacológico de mTOR (Rapamicina), inducen la expresión de VMP1.
- La expresión de VMP1 es necesaria para el desarrollo de la autofagia inducida por ayuno y rapamicina.
- El tratamiento con gemcitabina induce autofagia en líneas celulares de cáncer de páncreas.
- La autofagia inducida por el tratamiento con gemcitabina conduce a la muerte celular por apoptosis.
- El tratamiento con gemcitabina induce la expresión de VMP1 en las células tumorales pancreáticas.
- La expresión de VMP1 es necesaria para la autofagia inducida por gemcitabina.
- La vía de autofagia mediada por VMP1 lleva a la muerte celular por apoptosis ante el tratamiento con gemcitabina.
- La sobreexpresión de VMP1 lleva a la muerte celular por apoptosis.
- VMP1 interactúa con la proteína S100A10.
- La sobreexpresión de VMP1 induce la expresión del mRNA de S100A10.

- La sobreexpresión de S100A10 disminuye la formación de autofagosomas inducida por gemcitabina y por la sobreexpresión de VMP1.
- S100A10 disminuye la muerte por apoptosis de las células tumorales mediante la inhibición del proceso autofágico mediado por VMP1, aumentando así la resistencia de las células tumorales al tratamiento.

Los resultados obtenidos en este trabajo de tesis ampliaron el conocimiento de la función de VMP1 en el proceso de autofagia. También contribuyeron en el esclarecimiento del rol de la autofagia inducida por gemcitabina en la célula tumoral pancreática y nos permitieron ampliar el conocimiento sobre la participación de las proteínas VMP1 y S100A10 en respuesta a este tratamiento. Finalmente, proponemos a la autofagia mediada por la expresión de VMP1 como candidato de estudio para el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas en cáncer de páncreas.

Referencias

REFERENCIAS

- Abe R, Yamagishi S. 2008. AGE-RAGE system and carcinogenesis. *Curr Pharm Des.* 14:940-945.
- Abedin M, Wang D, McDonnell M, Lehmann U, Kelekar A. 2007. Autophagy delays apoptotic death in breast cancer cells following DNA damage. *Cell Death Differ.* 14:500-510.
- Ahlgren JD. 1996. Epidemiology and risk factors in pancreatic cancer. *Semin Oncol.* 23:241-250.
- Akar U, Ozpolat B, Mehta K, Fok J, Kondo Y, Lopez-Berestein G. 2007. Tissue transglutaminase inhibits autophagy in pancreatic cancer cells. *Mol Cancer Res.* 5(3):241-249.
- Almoguerra C, Shibata D, Forrester K, Martin J, Arnheim N, Perucho M. 1998. Most human carcinomas of the exocrine pancreas contain mutant K-ras genes. *Cell.* 53:549-554.
- Alnemri ES. 1997. Mammalian cell death proteases: a family of highly conserved aspartate specific cysteine proteases. *J Cell Biochem.* 64(1):33-42.
- Alva A, Gultekin S, Baehrecke E. 2004. Autophagy in human tumors: cell survival or death? *Cell Death Differ.* 11:1046-1048.
- Ambudkar IS, Bandyopadhyay BC, Liu X, Lockwich TP, Paria B, Ong HL. 2006. Functional organization of TRPC-Ca²⁺ channels and regulation of calcium microdomains. *Cell Calcium.* 40:495-504.
- American Cancer Society: facts and figures. Atlanta: American Cancer Society; 2002.
- Ankarcrona M, Dypbukt JM, Bonfoco E, Zhivotovsky B, Orrenius S, Lipton SA, Nicotera P. 1995. Glutamate-induced neuronal death: a succession of necrosis or apoptosis depending on mitochondrial function. *Neuron.* 15:961-973.
- Arsham A, Neufeld T. 2006. Thinking globally and acting locally with TOR. *Curr Opin Cell Biol.* 18:589-597.
- Axe EL, Walker SA, Manifava M, Chandra P, Roderick HL, Habermann A, Griffiths G, Ktistakis NT. 2008. Autophagosome formation from membrane compartments enriched in phosphatidylinositol 3-phosphate and dynamically connected to the endoplasmic reticulum. *J Cell Biol.* 182:685-701.
- Baehrecke EH. 2005. Autophagy: dual roles in life and death? *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 6:505-510.
- Baker CH, Banzon J, Bollinger JM, Stubbe J, Samano V, Robins MJ, Lippert B, Jarvi E, Resvick R. 1991. 2'-Deoxy-2'-methylencytidine and 2'-deoxy-2', 2'-difluorocytidine 5'-diphosphates: potent mechanism-based inhibitors of ribonucleotide reductase. *J Med Chem.* 34:1879-1884.
- Beaton AR, Rodriguez J, Reddy YK, Roy P. 2002. The membrane trafficking protein calpactin forms a complex with bluetongue virus protein NS3 and mediates virus release. *Proc Natl Acad Sci USA.* 99:13154-13159.
- Benaud C, Gentil BJ, Assard N, Court M, Garin J, Delphin C, Baudier J. 2004. AHNAK interaction with the annexin 2/ S100A10 complex regulates cell membrane cytoarchitecture. *J Cell Biol.* 164:133-144.
- Bhatia M. 2004. Apoptosis of pancreatic acinar cells in acute pancreatitis: is it good or bad? *J Cell Mol Med.* 8(3):402-409.

- Bilir A, Altinoz M, Erkan M, Ozmen V, Aydiner A. 2001. Autophagy and nuclear changes in FM3A breast tumor cells after epirubicin, medroxyprogesterone and tamoxifen treatment in vitro. *Pathobiology*. 69:120-126.
- Blommaert EF, Luiken JJ, Blommaert PJ, van Woerkom GM, Meijer AJ. 1995. Phosphorylation of ribosomal protein S6 is inhibitory for autophagy in isolated rat hepatocytes. *J Biol Chem*. 270:2320-2326.
- Bommareddy A, Hahm ER, Xiao D, Powolny AA, Fisher AL, Jiang Y, Singh SV 2009. Atg5 regulates phenethyl isothiocyanate-induced autophagic and apoptotic cell death in human prostate cancer cells. *Cancer Res*. 69(8):3704-3712.
- Boone E, Vanden Berghe T, Van Loo G, De Wilde G, De Wael N, Vercammen D, Fiers W, Haegeman G, Vandenabeele P. 2000. Structure/ function analysis of p53 tumor necrosis factor receptor and fas-associated death domain. Effect on necrosis in L929sA cells. *J Biol Chem*. 275:37596-37603.
- Botti J, Djavaheri-Mergny M, Pilatte Y, Codogno P. 2006. Autophagy signalling and the cogwheels of cancer. *Autophagy*. 2:67-73.
- Boya P, González-Polo RA, Casares N, Perfettini JL, Dessen P, Larochette N, Métivier D, Meley D, Souquere S, Yoshimori T, Pierron G, Codogno P, Kroemer G. 2005. Inhibition of macroautophagy triggers apoptosis. *Mol Cell Biol*. 25(3):1025-1040.
- Büchler M, Friess H, Schultheiss KH, Gebhardt C, Kübel R, Muhrer KH, Winkelmann M, Wagener T, Klapdor R, Kaul M, et al. 1991. A randomized controlled trial of adjuvant immunotherapy (murine monoclonal antibody 494/32) in resectable pancreatic cancer. *Cancer*. 68(7):1507-1512.
- Bursch W, Ellinger A, Kienzl H, Török L, Pandey S, Sikorska M, Walker R, Hermann RS. 1996. Active cell death induced by the anti-estrogens tamoxifen and ICI164 384 in human mammary carcinoma cells (MCF-7) in culture: the role of autophagy. *Carcinogenesis*. 17:1595-1607.
- Bursch W, Hochegger K, Torok L, Marian B, Ellinger A, Hermann R. 2000. Autophagic and apoptotic types of programmed cell death exhibit different fates of cytoskeletal filaments. *J Cell Sci*. 113:1189-1198.
- Caldas C, Hahn SA, da Costa LT, Redston MS, Schutte M, Seymour AB, Weinstein CL, Hruban RH, Yeo CJ, Kern SE. 1994. Frequent somatic mutations and homozygous deletions of the p16 (MTS1) gene in pancreatic adenocarcinoma. *Nat Genet*. 8:27-32.
- Chi K, Jones DV, Frazier ML. 1992. Expression of an elongation factor 1 gamma-related sequence in adenocarcinomas of the colon. *Gastroenterology*. 103(1):98-102.
- Codogno P, Meijer AJ. 2005. Autophagy and signaling: their role in cell survival and cell death. *Cell Death Differ*. 12:1509-1518.
- Codogno P, Meijer A. 2006. Atg5: more than an autophagy factor. *Nat Cell Biol*. 8:1045-1047.
- Corradetti MN, Guan KL. 2006. Upstream of the mammalian target of rapamycin: do all roads pass through mTOR? *Oncogene*. 25:6347-6360.
- Crighton D, Wilkinson S, O'Prey J, Syed N, Smith P, Harrison PR, Gasco M, Garrone O, Crook T, Ryan KM. 2006. DRAM, a p53-induced modulator of autophagy, is critical for apoptosis. *Cell*. 126:121-134.
- Criollo A, Maiuri MC, Tasdemir E, Vitale I, Fiebig AA, Andrews D, Molgó J, Díaz J, Lavandro S, Harper F, Pierron G, di Stefano D, Rizzuto R, Szabadkai G, Kroemer G. 2007. Regulation of autophagy by the inositol trisphosphate receptor. *Cell Death Differ*. 14:1029-1039.
- Cui Q, Tashiro S, Onodera S, Minami M, Ikejima T. 2007. Autophagy preceded apoptosis in oridonin-treated human breast cancer MCF-7 cells. *Biol Pharm Bull*. 30:859-864.

- Danial NN, Korsmeyer SJ. 2004. Cell death: critical control points. *Cell*. 116(2):205-219.
- Daniels SM, Melendez-Peña CE, Scarborough RJ, Daher A, Christensen HS, El Far M, Purcell DF, Lainé S, Gagnol A. 2009. Characterization of the TRBP domain required for dicer interaction and function in RNA interference. *BMC Mol Biol.*;10:38.
- De Seranno S, Benaud C, Assard N, Khediri S, Gerke V, Baudier J, Delphin C. 2006. Identification of an AHNAK binding motif specific for the Annexin2/S100A10 tetramer. *J Biol Chem*. 281:35030–35038.
- Degenhardt K, Mathew R, Beaudoin B, Bray K, Anderson D, Chen G, Mukherjee C, Shi Y, Gélinas C, Fan Y, Nelson DA, Jin S, White E. 2006. Autophagy promotes tumor cell survival and restricts necrosis, inflammation, and tumorigenesis. *Cancer Cell*. 10:51-64.
- DeMasters G, Di X, Newsham I, Shiu R, Gewirtz D. 2006. Potentiation of radiation sensitivity in breast tumor cells by vitamin D3 analogue, EB 1089, through promotion of autophagy and interference with proliferative activity. *Mol Cancer Ther*. 5:2786-2797.
- Denecker G, Vercammen D, Declercq W, Vandenaabeele P. 2001. Apoptotic and necrotic cell death induced by death domain receptors. *Cell Mol Life Sci*. 58(3):356-70.
- Deora AB, Kreitzer G, Jacovina AT, Hajjar KA. 2004. An annexin 2 phosphorylation switch mediates p11-dependent translocation of annexin 2 to the cell surface. *J Biol Chem*. 279:43411-43418.
- Devesa S, Blot W, Stone B. 1995. Recent cancer trends in the United States. *J Natl Cancer Inst*. 87:175-182.
- DiMagno EP, Reber HA, Tempero MA. 1999. A technical review on the epidemiology, diagnosis, and treatment of pancreatic ductal adenocarcinoma, *Gastroenterology*. 117:1464-1484.
- Ding WX, Ni HM, Gao W, Hou YF, Melan MA, Chen X, Stolz DB, Shao ZM, Yin XM. 2007. Differential effects of endoplasmic reticulum stress-induced autophagy on cell survival. *J Biol Chem*. 282(7):4702-4710.
- Domoto T, Miyama Y, Suzuki H, Teratani T, Arai K, Sugiyama T, Takayama T, Mugiya S, Ozono S, Nozawa R. 2007. Evaluation of S100A10, annexin II and B-FABP expression as markers for renal cell carcinoma. *Cancer Sci*. 98(1):77-82.
- Donato R. 1986. S-100 proteins. *Cell Calcium*. 7:123-145.
- Donato R. 2001. S100: a multigenic family of calcium-modulated proteins of the EF-hand type with intracellular and extracellular functional roles. *Int. J. Biochem. Cell Biol*. 33:637–668.
- Donier E, Rugiero F, Okuse K, Wood JN. 2005. Annexin II light chain p11 promotes functional expression of acid-sensing ion channel ASIC1a. *J Biol Chem*. 280:38666-38672.
- Dusetti NJ, Tomasini R, Azizi A, Barthet M, Vaccaro MI, Fiedler F, Dagorn JC, Iovanna JL. 2000. Expression profiling in pancreas during the acute phase of pancreatitis using cDNA microarrays. *Biochem Biophys Res Commun*. 277(3):660-667.
- Dusetti NJ, Jiang Y, Vaccaro MI, Tomasini R, Azizi Samir A, Calvo EL, Ropolo A, Fiedler F, Mallo GV, Dagorn JC, Iovanna JL. 2002. Cloning and expression of the rat vacuole membrane protein 1 (VMP1), a new gene activated in pancreas with acute pancreatitis, which promotes vacuole formation. *Biochem Biophys Res Commun*. 290(2):641-649.
- Earnshaw WC, Martins LM, Kaufmann SH. Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. 1999. *Annu Rev Biochem*. 68:383-424.
- Edinger A, Thompson C. 2004. Death by design: apoptosis, necrosis and autophagy. *Curr Opin Cell Biol*. 16:663-669.
- Eguchi Y, Shimizu S, Tsujimoto Y. 1997. Intracellular ATP levels determine cell death fate by apoptosis or necrosis. *Cancer Res* 57:1835-1840.

- Ertmer A, Huber V, Gilch S, Yoshimori T, Erfle V, Duyster J, Elsässer HP, Schätzl HM. 2007. The anticancer drug imatinib induces cellular autophagy. *Leukemia*. 21:936-942.
- Espert L, Denizot M, Grimaldi M, Robert-Hebmann V, Gay B, Varbanov M, Codogno P, Biard-Piechaczyk M. 2006. Autophagy is involved in T cell death after binding of HIV-1 envelope proteins to CXCR4. *J. Clin. Invest.* 116:2161-2172.
- Everhart J, Wright D. 1995. Diabetes mellitus as a risk factor for pancreatic cancer. A meta-analysis. *JAMA*. 273:1605-1609.
- Fazi B, Bursch W, Fimia GM, Nardacci R, Piacentini M, Di Sano F, Piredda L. 2008. Fenretinide induces autophagic cell death in caspase-defective breast cancer cells. *Autophagy*. 4:1-7.
- Festjens N, Vanden Berghe T, Vandenabeele P. 2006. Necrosis, a well-orchestrated form of cell demise: signalling cascades, important mediators and concomitant immune response. *Biochim Biophys Acta*. 1757:1371-1387.
- Friess H, Buchler M, Kruger M, Begler HG. 1992. Treatment of duct carcinoma of the pancreas with the LH-RH analogue buserelin. *Pancreas*. 7: 516-521.
- Fujii S, Mitsunaga S, Yamazaki M, Hasebe T, Ishii G, Kojima M, Kinoshita T, Ueno T, Esumi H, Ochiai A. 2008. Autophagy is activated in pancreatic cancer cells and correlates with poor patient outcome. *Cancer Sci*. 99(9):1813-1819.
- Furuta S, Hidaka E, Ogata A, Yokota S, Kamata T. 2004. Ras is involved in the negative control of autophagy through the class I PI3- kinase. *Oncogene*. 23:3898-3904.
- Gerke V, Creutz CE, Moss SE. 2005. Annexins: linking Ca²⁺ signalling to membrane dynamics. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 6:449-461.
- Gerke V, Weber K. 1984. Identity of p36K phosphorylated upon Rous sarcoma virus transformation with a protein purified from brush borders; calcium-dependent binding to non-erythroid spectrin and F-actin. *EMBO J*. 3:227-233.
- Gerke V, Weber K. 1985. The regulatory chain in the p36-kd substrate complex of viral tyrosine-specific protein kinases is related in sequence to the S-100 protein of glial cells. *EMBO J*. 4:2917-2920.
- Ghadirian P, Liu G, Gallinger S, Schmockler B, Paradis AJ, Lal G, Brunet JS, Foulkes WD, Narod SA. 2002. Risk of pancreatic cancer among individuals with a family history of cancer of the pancreas. *Int J Cancer*. 97:807-810.
- Girard C, Tinel N, Terrenoire C, Romey G, Lazdunski M, Borsotto M. 2002. p11, an annexin II subunit, an auxiliary protein associated with the background K⁺ channel, TASK-1. *EMBO J*. 21:4439-4448.
- Giroux V, Malicet C, Barthelet M, Gironella M, Archange C, Dagorn JC, Vasseur S, Iovanna JL. 2006. p8 Is a New Target of Gemcitabine in Pancreatic Cancer Cells. *Clin Cancer Res*. 12:235-241.
- Glenney JR Jr, Tack BF. 1985. Amino-terminal sequence of p36 and associated p10: identification of the site of tyrosine phosphorylation and homology with S-100. *Proc Natl Acad Sci. USA* 82:7884-7888.
- Goggins M, Schutte M, Lu J, Moskaluk CA, Weinstein CL, Petersen GM, Yeo CJ, Jackson CE, Lynch HT, Hruban RH, Kern SE. 1996. Germline BRCA2 gene mutations in patients with apparently sporadic pancreatic carcinomas. *Cancer Res*. 56:5360-5364.
- Goggins M, Hruban RH, Kern SE. 2000. BRCA2 is inactivated late in the development of pancreatic intraepithelial neoplasia: evidence and implications. *Am J Pathol*. 156:1767-1771.
- Gold EB, Goldin SB. 1998. Epidemiology of and risk factors for pancreatic cancer. *Surg Oncol Clin N Am*. 7:67-91.

- Golstein P, Kroemer G. 2007. Cell death by necrosis: towards a molecular definition. *Trends Biochem Sci.* 32:37-43.
- Gomez TS, Hamann MJ, McCarney S, Savoy DN, Lubking CM, Heldebrant MP, Labno CM, McKean DJ, McNiven MA, Burkhardt JK, Billadeau DD. 2005. Dynamin 2 regulates T cell activation by controlling actin polymerization at the immunological synapse. *Nat. Immunol.* 6:261-270.
- Gonzalez-Polo RA, Boya P, Pauleau AL, Jalil A, Larochette N, Souquere S, Eskelinen EL, Pierron G, Saftig P, Kroemer G. 2005. The apoptosis/ autophagy paradox: autophagic vacuolization before apoptotic death. *J Cell Sci.* 118:3091-3102.
- Goossens V, Grooten J, De Vos K, Fiers W. 1995. Direct evidence for tumor necrosis factor-induced mitochondrial reactive oxygen intermediates and their involvement in cytotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 92:8115-8119.
- Gozuacik A, Kimchi A. 2004. Autophagy as a cell death and tumor suppressor mechanism. *Oncogene.* 23:2891-2906.
- Gozuacik D, Kimchi A. 2007. Autophagy and cell death. *Curr. Top. Dev. Biol.* 78: 217–245.
- Greenlee R, Hill-Harmon MB, Murray T, Thun M. 2001. Cancer statistics, 2001. *CA Cancer J Clin.* 51:15-36.
- Guillon-Munos A, VanBemmelen M, Clarke P. 2006. Autophagy can be a killer even in apoptosis-competent cells. *Autophagy* 2:140-142.
- Hahn SA, Schutte M, Hoque AT, Moskaluk CA, da Costa LT, Rozenblum E, Weinstein CL, Fischer A, Yeo CJ, Hruban RH, Kern SE. 1996. DPC4, a candidate tumor-suppressor gene at human chromosome 18q211. *Science.* 271:350-353.
- Hara T, Nakamura K, Matsui M, Yamamoto A, Nakahara Y, Suzuki-Migishima R, Yokoyama M, Mishima K, Saito I, Okano H, Mizushima N. 2006. Suppression of basal autophagy in neural cells causes neurodegenerative disease in mice. *Nature.* 441(7095):885-889.
- Harder T, Kube E, Gerke V. 1992. Cloning and characterization of the human gene encoding p11: structural similarity to other members of the S-100 gene family. *Gene.* 113:269–274.
- Hayes MJ, Merrifield CJ, Shao D, Ayala-Sanmartin J, Schorey CD, Levine TP, Proust J, Curran J, Bailly M, Moss SE. 2004a. Annexin 2 binding to phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate on endocytic vesicles is regulated by the stress response pathway. *J Biol Chem* 279:14157–14164.
- Hayes MJ, Rescher U, Gerke V, Moss SE. 2004b. Annexin-actin interactions. *Traffic.* 5:571–576.
- Heinemann V, Hertel LW, Grindey GB, Plunkett W. 1988. Comparison of the cellular pharmacokinetics and toxicity of 20, 20-difluorodeoxycytidine and 1-beta-D-arabinofuranosylcytosine. *Cancer Res.* 48:4024–4031.
- Heinemann V, Xu YZ, Chubb S, Sen A, Hertel LW, Grindey GB, Plunkett W. 1990. Inhibition of ribonucleotide reduction in CCRF-CEM cells by 20, 20-difluorodeoxycytidine. *Mol Pharmacol.* 38: 567–572.
- Heinemann V, Xu YZ, Chubb S, Sen A, Hertel LW, Grindey GB, Plunkett W. 1992. Cellular elimination of 20, 20-difluorodeoxycytidine 50-triphosphate: a mechanism of self-potentiation. *Cancer Res.* 52: 533–539.
- Hermeking H, Lengauer C, Polyak K, He TC, Zhang L, Thiagalingam S, Kinzler KW, Vogelstein B. 1997. 14-3-3 sigma is a p53-regulated inhibitor of G2/M progression. *Mol Cell.* 1:3-11.
- Hertel LW, Boder GB, Kroin JS, Rinzel SM, Poore GA, Todd GC, Grindey GB. 1990. Evaluation of the antitumor activity of gemcitabine (20, 20-difluoro-20-deoxycytidine). *Cancer Res.* 50:4417–4422.

- Hoffmeister A, Ropolo A, Vasseur S, Mallo GV, Bodeker H, Ritz-Laser B, Dressler GR, Vaccaro MI, Dagorn JC, Moreno S, Iovanna JL. 2002. The HMG-I/Y-related protein p8 binds to p300 and Pax2 trans-activation domain-interacting protein to regulate the trans-activation activity of the Pax2A and Pax2B transcription factors on the glucagon gene promoter. *J Biol Chem.* 277(25):22314-22319.
- Hofmann K. 1999. The modular nature of apoptotic signaling proteins. *Cell Mol Life Sci.* 55(8-9):1113-1128.
- Horke S, Reumann K, Schweizer M, Will H, Heise T. 2004. Nuclear trafficking of La protein depends on a newly identified nucleolar localization signal and the ability to bind RNA. *J Biol Chem.* 279(25):26563-26570.
- Høyer-Hansen M, Bastholm L, Szyniarowski P, Campanella M, Szabadkai G, Farkas T, Bianchi K, Fehrenbacher N, Elling F, Rizzuto R, Mathiasen IS, Jäättelä M. 2007. Control of macroautophagy by calcium, calmodulin-dependent kinase kinase-beta, and Bcl-2. *Mol Cell.* 25:193-205.
- Hruban RH, van Mansfeld AD, Offerhaus GJ, van Weering DH, Allison DC, Goodman SN, Kensler TW, Bose KK, Cameron JL, Bos JL. K-ras oncogene activation in adenocarcinoma of the human pancreas. 1993. A study of 82 carcinomas using a combination of mutant-enriched polymerase chain reaction analysis and allele-specific oligonucleotide hybridization. *Am J Pathol.* 143:545-554.
- Huang J, Klionsky DJ. 2007. Autophagy and human disease. *Cell Cycle.* 6:1837-1849.
- Huang P, Chubb S, Hertel LW, Grindey GB, Plunkett W. 1991. Action of 20, 20 difluorodeoxycytidine on DNA synthesis. *Cancer Res.* 51: 6110–6117.
- Huang XL, Pawliczak R, Yao XL, Cowan MJ, Gladwin MT, Walter MJ, Holtzman MJ, Madara P, Logun C, Shelhamer JH. 2003. Interferon-gamma induces p11 gene and protein expression in human epithelial cells through interferon-gamma-activated sequences in the p11 promoter. *J Biol Chem.* 278:9298–9308.
- Iacobuzio-Donahue CA, Maitra A, Olsen M, Lowe AW, van Heek NT, Rosty C, Walter K, Sato N, Parker A, Ashfaq R, Jaffee E, Ryu B, Jones J, Eshleman JR, Yeo CJ, Cameron JL, Kern SE, Hruban RH, Brown PO, Goggins M. 2003. Exploration of global gene expression of pancreatic adenocarcinoma by cDNA microarray analysis. *Am J Pathol.* 162(4):1151-1162.
- Inoki K, Zhu T, Guan KL. 2003. TSC2 mediates cellular energy response to control cell growth and survival. *Cell.* 115:577-590.
- Iwata J, Ezaki J, Komatsu M, Yokota S, Ueno T, Tanida I, Chiba T, Tanaka K, Kominami E. 2006. Excess peroxisomes are degraded by autophagic machinery in mammals. *J Biol Chem.* 281:4035-4041.
- Jaeger PA, Wyss-Coray T. 2009. All-you-can-eat: autophagy in neurodegeneration and neuroprotection. *Mol Neurodegener.* 4:16.
- Jaffee EM, Hruban RH, Canto M, Kern SE. 2002. Focus on pancreas cancer. *Cancer Cell* 2:25-28.
- Jiang PH, Motoo Y, Vaccaro MI, Iovanna JL, Okada G, Sawabu N. 2004. Expression of vacuole membrane protein 1 (VMP1) in spontaneous chronic pancreatitis in the WBN/Kob rat. *Pancreas.* 29(3):225-230.
- Jin S, White E. 2007. Role of autophagy in cancer; management of metabolic stress. *Autophagy.* 3:28-31.
- Jin Z, El-Deiry WS. 2005. Overview of cell death signaling pathways. *Cancer Biol Ther.* 4(2):139-163.
- Johnson SW, Alhadeff JA. 1991. Mammalian alpha-L-fucosidases. *Comp Biochem Physiol B.* 99(3):479-488.

- Kabeya Y, Mizushima N, Ueno T, Yamamoto A, Kirisako T, Noda T, Kominami E, Ohsumi Y, Yoshimori T. 2000. LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosomal membranes after processing. *EMBO J.* 19:5720–5728.
- Kadowaki M, Karim MR, Carpi A, Miotto G. 2006. Nutrient control of macroautophagy in mammalian cells. *Mol Aspects Med.* 27:426-443.
- Kang C, Avery L. 2008. To be or not to be, the level of autophagy is the question. *Autophagy.* 4:82-84.
- Kang R, Tang D, Schapiro NE, Livesey KM, Farkas A, Loughran P, Bierhaus A, Lotze MT, Zeh HJ. 2009. The receptor for advanced glycation end products (RAGE) sustains autophagy and limits apoptosis, promoting pancreatic tumor cell survival. *Cell Death Differ.* [Epub ahead of print].
- Kanki T, Klionsky DJ. 2008. Mitophagy in Yeast Occurs through a Selective Mechanism. *J Biol Chem.* 283:32386-32393.
- Kanzawa T, Kondo Y, Ito H, Kondo S, Germano I. 2003. Induction of autophagic cell death in malignant glioma cells by arsenic trioxide. *Cancer Res.* 63:2103-2108.
- Karantza-Wadsworth V, Patel S, Kravchuk O, Chen G, Mathew R, Jin S, White E. 2007. Autophagy mitigates metabolic stress and genome damage in mammary tumorigenesis. *Genes Dev.* 21:1621-1635.
- Karin M, Greten FR. 2005. NF-kappaB: linking inflammation and immunity to cancer development and progression. *Nat Rev Immunol.* 5(10):749-759.
- Kassam G, Le BH, Choi KS, Kang HM, Fitzpatrick SL, Louie P, Waisman DM. 1998. The p11 subunit of the annexin II tetramer plays a key role in the stimulation of t-PA dependent plasminogen activation. *Biochemistry* 37:16958-16966.
- Katayama M, Kawaguchi T, Berger M, Pieper R. 2007. DNA damaging agent-induced autophagy produces a cytoprotective adenosine triphosphate surge in malignant glioma cells. *Cell Death Differ.* 14:548-558.
- Kidd VJ, Lahti JM, Teitz T. 2000. Proteolytic regulation of apoptosis. *Semin Cell Dev Biol.* 11(3):191-201.
- Klionsky DJ. 2004a. Cell biology: regulated self-cannibalism. *Nature.* 431(7004):31-32.
- Klionsky DJ. 2004b. Ed., *Autophagy* (Landes Bioscience, Georgetown, TX, pp1-303
- Klionsky DJ, Cregg JM, Dunn WA Jr, Emr SD, Sakai Y, Sandoval IV, Sibirny A, Subramani S, Thumm M, Veenhuis M, Ohsumi Y. 2003. A unified nomenclature for yeast autophagy-related genes. *Dev Cell.* 5:539-545.
- Klionsky DJ, Cuervo AM, Seglen PO. 2007. Methods for monitoring autophagy from yeast to human. *Autophagy.* 3:181-206.
- Kondo Y, Kanzawa T, Sawaya R, Kondo S. 2005. The role of autophagy in cancer development and response to therapy. *Nat Rev Cancer.* 5:726-734.
- Kondo Y, Kondo S. 2006. Autophagy and cancer therapy. *Autophagy.* 2:85-90.
- Kroemer G, Jaattela M. 2005. Lysosomes and autophagy in cell death control. *Nature Rev. Cancer.* 5:886-897.
- Kuma A, Matsui M, Mizushima N. 2007. LC3, an autophagosomal marker, can be incorporated into protein aggregates independent of autophagy: caution in the interpretation of LC3 localization. *Autophagy* 3(4), 323-328.
- Kundu M, Thompson C. 2005. Macroautophagy versus mitochondrial autophagy: a question of fate? *Cell Death Differ.* 12:1484-1489.

- Kuo P, Hsu Y, Cho C. 2006. Plumbagin induces G2-M arrest and autophagy by inhibiting the AKT/mammalian target of rapamycin pathway in breast cancer cells. *Mol Cancer Ther.* 5:3209-3221.
- Kwon M, MacLeod TJ, Zhang Y, Waisman DM. 2005. S100A10, annexin A2, and annexin a2 heterotetramer as candidate plasminogen receptors. *Front Biosci.* 10:300-325.
- Lavieu G, Scarlatti F, Sala G, Carpentier S, Levade T, Ghidoni R, Botti J, Codogno P. 2006. Regulation of autophagy by sphingosine kinase 1 and its role in cell survival during nutrient starvation. *J Biol Chem.* 281:8518-8527.
- Lavieu G, Scarlatti F, Sala G, Levade T, Ghidoni R, Botti J, Codogno P. 2007. Is autophagy the key mechanism by which the sphingolipid rheostat controls the cell fate decision? *Autophagy.* 3:45-47.
- Legakis JE, Yen WL, Klionsky DJ. 2007. A cycling protein complex required for selective autophagy. *Autophagy.* 3(5):422-432.
- Levine B, Klionsky DJ. 2004. Development by self-digestion: molecular mechanisms and biological functions of autophagy. *Dev Cell.* 6(4):463-477.
- Levine B. 2005. Eating oneself and uninvited guests: autophagy related pathways in cellular defense. *Cell.* 120:159-162.
- Levine B, Yuan J. 2005. Autophagy in cell death: an innocent convict? *J Clin Invest* 115:2679-2688.
- Levine B, Kroemer G. 2008. Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell.* 132:27-42.
- Liang C, Feng P, Ku B, Oh B, Jung J. 2007. UVRAG, a new player in autophagy and tumor cell growth. *Autophagy.* 3:69-71.
- Lindsey JC, Lusher ME, Anderton JA, Gilbertson RJ, Ellison DW, Clifford SC. 2007. Epigenetic deregulation of multiple S100 gene family members by differential hypomethylation and hypermethylation events in medulloblastoma. *Br J Cancer.* 97(2):267-274.
- Liu J, Li X, Dong GL, Zhang HW, Chen DL, Du JJ, Zheng JY, Li JP, Wang WZ. 2008. In silico analysis and verification of S100 gene expression in gastric cancer. *BMC Cancer.* 16;8:261.
- Lockshin RA, Zakeri Z. 2001. Programmed cell death and apoptosis: origins of the theory. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 2:545–550.
- Lowenfels AB, Maisonneuve P, Cavallini G, Ammann RW, Lankisch PG, Andersen JR. 1993. Pancreatitis and the risk of pancreatic cancer. *N Engl J Med.* 328:1433-1437.
- Lum JJ, Bauer DE, Kong M, Harris MH, Li C, Lindsten T, Thompson CB. 2005a. Growth factor regulation of autophagy and cell survival in the absence of apoptosis. *Cell.* 120:237-248.
- Lum JJ, DeBerardinis RJ, Thompson CB. 2005b. Autophagy in metazoans: cell survival in the land of plenty. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 6:439–448.
- Luo S, Rubinsztein D. 2007. Atg5 and Bcl-2 provide novel insights into the interplay between apoptosis and autophagy. *Cell Death Differ.* 14:1247-1250.
- Maiuri MC, Le Toumelin G, Criollo A, Rain JC, Gautier F, Juin P, Tasdemir E, Pierron G, Troulinaki K, Tavernarakis N, Hickman JA, Geneste O, Kroemer G. 2007a. Functional and physical interaction between Bcl-X(L) and a BH-3like domain of Beclin-1. *EMBO J.* 26:2527-2539.
- Maiuri MC, Zalckvar E, Kimchi A, Kroemer G. 2007b. Self-eating and selfkilling: cross talk between autophagy and apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 8:741-752.

- Mammucari C, Milan G, Romanello V, Masiero E, Rudolf R, Del Piccolo P, Burden SJ, Di Lisi R, Sandri C, Zhao J, Goldberg AL, Schiaffino S, Sandri M. 2007. FoxO3 controls autophagy in skeletal muscle in vivo. *Cell Metab.* 6:458-471.
- Marino G, Salvador-Montoliu N, Fueyo A, Knecht E, Mizushima N, Lopez-Otin C. 2007. Tissue-specific autophagy alterations and increased tumorigenesis in mice deficient in Atg4C/autophagin-3. *J Biol Chem.* 282:18573-18583.
- Martens JR, O'Connell K, Tamkun M. 2004. Targeting of ion channels to membrane microdomains: localization of KV channels to lipid rafts. *Trends Pharmacol Sci.* 25:16-21.
- Martin DN, Baehrecke EH. 2004. Caspases function in autophagic programmed cell death in *Drosophila*. *Development.* 131:275-284.
- Mathew R, Karantza-Wadsworth V, White E. 2007a. Role of autophagy in cancer. *Nat Rev Cancer.* 7:961-967.
- Mathew R, Kongara S, Beaudoin B, Karp CM, Bray K, Degenhardt K, Chen G, Jin S, White E. 2007b. Autophagy suppresses tumor progression by limiting chromosomal instability. *Genes Dev.* 21:1367-1381.
- Mathew R, White E. 2007c. Why sick cells produce tumors. *Autophagy.* 3:502-505.
- Mayran N, Parton RG, Gruenberg J. 2003. Annexin II regulates multivesicular endosome biogenesis in the degradation pathway of animal cells. *EMBO J.* 22:3242-3253.
- Meijer AJ, Codogno P. 2006. Signalling and autophagy regulation in health, aging and disease. *Mol Aspects Med.* 27:411-425.
- Meschini S, Condello M, Marra M, Formisano G, Federici E, Arancia G. 2007. Autophagy-mediated chemosensitizing effect of the plant alkaloid voacamine on multidrug resistant cells. *Toxicol In Vitro.* 21:197-203.
- Michaud DS, Giovannucci E, Willett WC, Colditz GA, Stampfer MJ, Fuchs CS. 2001. Physical activity, obesity, height, and the risk of pancreatic cancer. *JAMA.* 286:921-929.
- Mills K, Reginato M, Debnath J, Queenan B, Brugge J. 2004. Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) is required for induction of autophagy during lumen filling in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101:3438-3443.
- Mimori K, Mori M, Tanaka S, Akiyoshi T, Sugimachi K. 1995. The overexpression of elongation factor 1 gamma mRNA in gastric carcinoma. *Cancer.* 75(6 Suppl):1446-1449.
- Mizushima N, Levine B, Cuervo AM, Klionsky DJ. 2008. Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature* 451:1069-1075.
- Mizushima N, Ohsumi Y, Yoshimori T. 2002. Autophagosome formation in mammalian cells. *Cell Struct Funct.* 27:421-429.
- Mizushima N. 2004. Methods for monitoring autophagy. *Int J Biochem Cell Biol.* 36(12):2491-2502.
- Mizushima N, Yamamoto A, Matsui M, Yoshimori T, Ohsumi Y. 2004. In vivo analysis of autophagy in response to nutrient starvation using transgenic mice expressing a fluorescent autophagosome marker. *Mol. Biol. Cell.* 15:1101-1111.
- Moore BW. 1965. A soluble protein characteristic of the nervous system. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 19:739-744.
- Morel E, Gruenberg J. 2007. The p11/S100A10 Light Chain of Annexin A2 Is Dispensable for Annexin A2 Association to Endosomes and Functions in Endosomal Transport. *PLoS ONE* 2(10): e1118.
- Moretti L, Attia A, Kim K, Lu B. 2007a. Cross talk between Bak/Bax and mTOR signaling regulates radiation-induced autophagy. *Autophagy.* 3:142-144.

- Moretti L, Cha Y, Niermann K, Lu B. 2007b. Switch between apoptosis and autophagy: radiation-induced endoplasmic reticulum stress? *Cell Cycle*. 6:793-798.
- National Center for Health Statistics. Health, United States, 2000 with Urban and Rural Chartbook. Hyattsville, MD: Public Health Service, 2001.
- Nelson D, White E. 2004. Exploiting different ways to die. *Genes Dev*. 18:1223-1226.
- Newman RA, Kondo Y, Yokoyama T, Dixon S, Cartwright C, Chan D, Johansen M, Yang P. 2007. Autophagic cell death of human pancreatic tumor cells mediated by oleandrin, a lipid-soluble cardiac glycoside. *Integr Cancer Ther*. 6:354-364.
- Noda T, Ohsumi Y. 1998. Tor, a phosphatidylinositol kinase homologue, controls autophagy in yeast. *J Biol Chem*. 273:3963-3966.
- Nykamp K, Lee MH, Kimble J. 2008. *C. elegans* La-related protein, LARP-1, localizes to germline P bodies and attenuates Ras-MAPK signaling during oogenesis. *RNA*. 14(7):1378-1389.
- Offerhaus GJA, Tersmette AC, Tytgat GNJ, Hoedemaeker PJ, Vandenbroucke JP. 1988. Gastric, pancreatic, and colorectal carcinogenesis following remote peptic ulcer surgery. Review of the literature with the emphasis on risk assessment and underlying mechanism. *Mod Pathol*. 1:352-356.
- Ogier-Denis E, Codogno P. 2003. Autophagy: a barrier or an adaptive response to cancer. *Biochim Biophys Acta*. 1603:113-128.
- Okuse K, Malik-Hall M, Baker MD, Poon WY, Kong H, Chao MV, Wood JN. 2002. Annexin II light chain regulates sensory neuron-specific sodium channel expression. *Nature*. 417:653-656.
- Paglin S, Hollister T, Delohery T, Hackett N, McMahill M, Sphicas E, Domingo D, Yahalom J. 2001. A novel response of cancer cells to radiation involves autophagy and formation of acidic vesicles. *Cancer Res*. 61:439-444.
- Parker SL, Tong T, Bolden S, Wingo PA. 1997. Cancer Statistics 1997. *CA Cancer J Clin*. 47:5-27.
- Pattingre S, Tassa A, Qu X, Garuti R, Liang XH, Mizushima N, Packer M, Schneider MD, Levine B. 2005. Bcl-2 antiapoptotic proteins inhibit Beclin1-dependent autophagy. *Cell*. 122:927-939.
- Pattingre S, Levine B. 2006. Bcl-2 inhibition of autophagy: a new route to cancer? *Cancer Res*. 66:2885-2888.
- Pattingre S, Espert L, Biard-Piechaczyk M, Codogno P. 2008. Regulation of macroautophagy by mTOR and Beclin 1 complexes. *Biochimie*. 90:313-323.
- Petrovski G, Zahuczky G, Katona K, Vereb G, Martinet W, Nemes Z, Bursch W, Fésüs L. 2007. Clearance of dying autophagic cells of different origin by professional and nonprofessional phagocytes. *Cell Death Differ*. 14:1117-1128.
- Plunkett W, Huang P, Xu YZ, Heinemann V, Grunewald R, Gandhi V. 1995. Gemcitabine: metabolism, mechanisms of action, and self-potential. *Semin Oncol*. 22: 3-10.
- Plunkett W, Huang P, Searcy CE, Gandhi V. 1996. Gemcitabine: preclinical pharmacology and mechanisms of action. *Semin Oncol*. 23:3-15.
- Pop C, Salvesen GS. 2009. Human caspases: Activation, specificity and regulation. *J Biol Chem*. 284(33):21777-21781.
- Pouyssegur J, Dayan F, Mazure N. 2006. Hypoxia signaling in cancer and approaches to enforce tumour regression. *Nature*. 44:437-443.
- Puisieux A, Ji J, Ozturk M. 1996. Annexin II up-regulates cellular levels of p11 protein by a post-translational mechanisms. *Biochem J*. 313(Pt 1):51-55.

- Punnonen EL, Autio S, Marjomaki VS, Reunanen H. 1992. Autophagy, cathepsin L transport, and acidification in cultured rat fibroblasts. *J Histochem Cytochem.* 40:1579-1587.
- Pyo JO, Jang MH, Kwon YK, Lee HJ, Jun JI, Woo HN, Cho DH, Choi B, Lee H, Kim JH, Mizushima N, Oshumi Y, Jung YK. 2005. Essential roles of Atg5 and FADD in autophagic cell death. *J Biol Chem.* 280:20722-20229.
- Qadir MA, Kwok B, Dragowska WH, To KH, Le D, Bally MB, Gorski SM. 2008. Macroautophagy inhibition sensitizes tamoxifen-resistant breast cancer cells and enhances mitochondrial depolarization. *Breast Cancer Res Treat.* 112(3):389-403.
- Qian W, Liu J, Jin J, Ni W, Xu W. 2007. Arsenic trioxide induces not only apoptosis but also autophagic cell death in leukemia cell lines via upregulation of Beclin-1. *Leuk Res* 31:329-339.
- Qu X, Yu J, Bhagat G, Furuya N, Hibshoosh H, Troxel A, Rosen J, Eskelinen EL, Mizushima N, Ohsumi Y, Cattoretti G, Levine B. 2003. Promotion of tumorigenesis by heterozygous disruption of the beclin 1 autophagy gene. *J Clin Invest.* 112:1809-1820.
- Qu X, Zou Z, Sun Q, Luby-Phelps K, Cheng P, Hogan RN, Gilpin C, Levine B. 2007. Autophagy gene-dependent clearance of apoptotic cells during embryonic development. *Cell.* 128:931-946.
- Reggiori F, Shintani T, Nair U, Klionsky DJ. 2005. Atg9 cycles between mitochondria and the pre-autophagosomal structure in yeasts. *Autophagy.* 1(2):101-109.
- Rummelink M, Mijatovic T, Gustin A, Mathieu A, Rombaut K, Kiss R, Salmon I, Decaestecker C. 2005. Identification by means of cDNA microarray analyses of gene expression modifications in squamous non-small cell lung cancers as compared to normal bronchial epithelial tissue. *Int J Oncol.* 26(1):247-258.
- Renigunta V, Yuan H, Zuzarte M, Rinne S, Koch A, Wischmeyer E, Schlichthorl G, Gao Y, Karschin A, Jacob R, Schwappach B, Daut J, Preisig-Muller R. 2006. The retention factor p11 confers an endoplasmic reticulum-localization signal to the potassium channel TASK-1. *Traffic.* 7:168–181.
- Rescher U, Gerke V. 2004a. Annexins—unique membrane binding proteins with diverse functions. *J Cell Sci* 117:2631–2639.
- Rescher U, Ruhe D, Ludwig C, Zobiack N, Gerke V. 2004b. Annexin 2 is a phosphatidylinositol (4,5)-bisphosphate binding protein recruited to actin assembly sites at cellular membranes. *J Cell Sci* 117:3473–3480.
- Rescher U, Gerke V. 2008. S100A10/p11: family, friends and functions. *Pflugers Arch - Eur J Physiol.* 455:575–582.
- Rety S, Sopkova J, Renouard M, Osterloh D, Gerke V, Tabaries S, Russo-Marie F, Lewit-Bentley A. 1999. The crystal structure of a complex of p11 with the annexin II N-terminal peptide. *Nat Struct Biol.* 6:89–95.
- Rez G, Toth S, Palfia Z. 1999. Cellular autophagic capacity is highly increased in azaserine-induced premalignant atypical acinar nodule cells. *Carcinogenesis.* 20:1893-1898.
- Rocha Lima CM, Green MR, Rotche R, Miller WH Jr, Jeffrey GM, Cisar LA, Morganti A, Orlando N, Gruia G, Miller LL. 2004. Irinotecan plus gemcitabine results in no survival advantage compared with gemcitabine monotherapy in patients with locally advanced or metastatic pancreatic cancer despite increased tumor response rate. *J Clin Oncol.* 22(18):3776-3783.
- Rodriguez-Enriquez S, He L, Lemasters JJ. 2004. Role of mitochondrial permeability transition pores in mitochondrial autophagy. *Int J Biochem Cell Biol.* 36(12):2463-2472.
- Ropolo A, Tomasini R, Grasso D, Dusetti NJ, Cerquetti MC, Iovanna JL, Vaccaro MI. 2004. Cloning of IP15, a pancreatitis-induced gene whose expression inhibits cell growth. *Biochem Biophys Res Commun.* 319(3):1001-1009.

- Ropolo A, Grasso D, Pardo R, Sacchetti ML, Archange C, Lo Re A, Seux M, Nowak J, Gonzalez CD, Iovanna JL, Vaccaro MI. 2007. The pancreatitis-induced vacuole membrane protein 1 triggers autophagy in mammalian cells. *J Biol Chem.* 282: 37124-37133.
- Rosenbluth JM, Mays DJ, Pino MF, Tang LJ, Pietsenpol JA. 2008. A gene signature- based approach identifies mTOR as a regulator of p73. *Mol Cell Biol.* 28:5951-5964.
- Rosenbluth JM, Pietsenpol JA. 2009. mTOR regulates autophagy-associated genes downstream of p73. *Autophagy.* 5(1):114-116.
- Rubinsztein D, Gestwicki J, Murphy L, Klionsky D. 2006. Potential therapeutic applications of autophagy. *Nat Rev Drug Discov.* 6:312.
- Rust R, Visser L, van der Leij J, Harms G, Blokzijl T, Deloulme JC, van der Vlies P, Kamps W, Kok K, Lim M, Poppema S, van den Berg A. 2005. High expression of calcium-binding proteins, S100A10, S100A11 and CALM2 in anaplastic large cell lymphoma. *Br J Haematol.* 131(5):596-608.
- Safioleas MC, Moulakakis KG. 2004. Pancreatic cancer today. *Hepatogastroenterology.* 51(57):862-868.
- Sakai Y, Oku M, Klei IJ van der, Kiel JA. 2006. Pexophagy: autophagic degradation of peroxisomes. *Biochim Biophys Acta.* 1763:1767-1775.
- Salazar M, Carracedo A, Salanueva IJ, Hernández-Tiedra S, Lorente M, Egia A, Vázquez P, Blázquez C, Torres S, García S, Nowak J, Fimia GM, Piacentini M, Cecconi F, Pandolfi PP, González-Feria L, Iovanna JL, Guzmán M, Boya P, Velasco G. 2009. Cannabinoid action induces autophagy-mediated cell death through stimulation of ER stress in human glioma cells. *J. Clin. Invest.* 119:1359-1372.
- Samir AA, Ropolo A, Grasso D, Tomasini R, Dagorn JC, Dusetti N, Iovanna JL, Vaccaro MI. 2000. Cloning and expression of the mouse PIP49 (Pancreatitis Induced Protein 49) mRNA which encodes a new putative transmembrane protein activated in the pancreas with acute pancreatitis. *Mol Cell Biol Res Commun.* 4(3):188-193.
- Saris CJ, Kristensen T, D'Eustachio P, Hicks LJ, Noonan DJ, Hunter T, Tack BF. 1987. cDNA sequence and tissue distribution of the mRNA for bovine and murine p11, the S100-related light chain of the protein-tyrosine kinase substrate p36 (calpactin I). *J Biol Chem.* 262:10663-10671.
- Sarkar S, Floto RA, Berger Z, Imarisio S, Cordenier A, Pasco M, Cook LJ, Rubinsztein DC. 2005. Lithium induces autophagy by inhibiting inositol monophosphatase. *J Cell Biol.* 170:1101-1111.
- Sauermann M, Sahin O, Sültmann H, Hahne F, Blaszkiewicz S, Majety M, Zatloukal K, Füzesi L, Poustka A, Wiemann S, Arlt D. 2008. Reduced expression of vacuole membrane protein 1 affects the invasion capacity of tumor cells. *Oncogene.* 27(9):1320-1326.
- Scarlatti F, Bauvy C, Ventruti A, Sala G, Cluzeaud F, Vandewalle A, Ghidoni R, Codogno P. 2004. Ceramide-mediated macroautophagy involves inhibition of protein kinase B and up-regulation of Beclin 1. *J Biol Chem.* 279:18384-18391.
- Schafer BW, Heizmann CW. 1996. The S100 family of EF-hand calcium-binding proteins: functions and pathology. *Trends Biochem. Sci.* 21:134-140.
- Schutte M, Hruban RH, Geradts J, Maynard R, Hilgers W, Rabindran SK, Moskaluk CA, Hahn SA, Schwarte-Waldhoff I, Schmiegel W, Baylin SB, Kern SE, Herman JG. 1997. Abrogation of the Rb/p16 tumor-suppressive pathway in virtually all pancreatic carcinomas. *Cancer Res.* 57:3126-3130.
- Schwarze P, Seglen P. 1985. Reduced autophagic activity, improved protein balance and enhanced in vitro survival of hepatocytes isolated from carcinogen-treated rats. *Exp Cell Res.* 157:15-28.
- Schwickart M, Huang X, Lill JR, Liu J, Ferrando R, French DM, Maecker H, O'Rourke K, Bazan F, Eastham-Anderson J, Yue P, Dornan D, Huang DC, Dixit VM. 2010.

- Deubiquitinase USP9X stabilizes MCL1 and promotes tumour cell survival. *Nature*. 7;463(7277):103-107.
- Scott R, Juhasz G, Neufeld T. 2007. Direct induction of autophagy by Atg1 inhibits cell growth and induces apoptotic cell death. *Curr Biol* 17:1-11.
 - Seglen P, Schwarze P, Saeter G. 1986. Changes in cellular ploidy and autophagic responsiveness during rat liver carcinogenesis. *Toxicol Pathol*. 14:342-348.
 - Shimizu S, Kanaseki T, Mizushima N, Arakawa-Kobayashi S, Thompson C, Tsujimoto Y. 2004. Role of Bcl-2 family proteins in a nonapoptotic programmed cell death dependent on autophagy genes. *Nat Cell Biol*. 6:1221-1228.
 - Shintani T, Klionsky D. 2004. Autophagy in health and disease: a doubleedged sword. *Science*. 306:990-995.
 - Silverman DT, Schiffman M, Everhart J, Goldstein A, Lillemoe KD, Swanson GM, Schwartz AG, Brown LM, Greenberg RS, Schoenberg JB, Pottern LM, Hoover RN, Fraumeni JF Jr. 1999. Diabetes mellitus, other medical conditions and familial history of cancer as risk factors for pancreatic cancer. *Br J Cancer*. 80:1830-1837.
 - Soengass MS, Lowe SW. 2003. Apoptosis and melanoma chemoresistance, *Oncogene* 22:3138-3151.
 - Sohn TA, Yeo CJ, Cameron JL, Koniaris L, Kaushal S, Abrams RA, Sauter PK, Coleman J, Hruban RH, Lillemoe KD. 2000. Resected adenocarcinoma of the pancreas—616 patients: results, outcomes, and prognostic indicators. *J Gastrointest Surg*. 4:567-579.
 - Stennicke HR, Salvesen GS. 1988. Properties of the caspases. *Biochim Biophys Acta*. 1387(1-2):17-31.
 - Stephan J, Herman P. 2006. The regulation of autophagy in eukaryotic cells: do all roads pass through Atg1? *Autophagy*. 2:146-148.
 - Svenningsson P, Chergui K, Rachleff I, Flajolet M, Zhang X, El Yacoubi M, Vaugeois JM, Nomikos GG, Greengard P. 2006. Alterations in 5-HT1B receptor function by p11 in depression-like states. *Science* 311:77-80.
 - Talloczy Z, Jiang W, Virgin HWt, Leib DA, Scheuner D, Kaufman RJ, Eskelinen EL, Levine B. 2002. Regulation of starvation- and virusinduced autophagy by the eIF2alpha kinase signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci USA*. 99:190-195.
 - Tanaka Y, Guhde G, Suter A, Eskelinen EL, Hartmann D, Lullmann- Rauch R, Janssen PM, Blanz J, von Figura K, Saftig P. 2000. Accumulation of autophagic vacuoles and cardiomyopathy in LAMP-2-deficient mice. *Nature* 406:902-906.
 - Tanida I, Minematsu-Ikeguchi N, Ueno T, Kominami E. 2005. Lysosomal turnover, but not a cellular level, of endogenous LC3 is a marker for autophagy. *Autophagy* 1:84–91.
 - Tasdemir E, Maiuri MC, Galluzzi L, Vitale I, Djavaheri-Mergny M, D'Amelio M, Criollo A, Morselli E, Zhu C, Harper F, Nannmark U, Samara C, Pinton P, Vicencio JM, Carnuccio R, Moll UM, Madeo F, Paterlini-Brechot P, Rizzuto R, Szabadkai G, Pierron G, Blomgren K, Tavernarakis N, Codogno P, Cecconi F, Kroemer G. 2008. Regulation of autophagy by cytoplasmic p53. *Nat Cell Biol*. 10:676-687.
 - Thorburn A. 2008. Apoptosis and autophagy: regulator connections between two supposedly different processes. *Apoptosis* 13:1-9.
 - Tiscornia OM, Chavin JC. 1965. Cancer of the pancreas. Clinico-surgical evaluation of 208 cases. *Prensa Med Argent*. 52(48):2973-2976.
 - Tiwari M, Bajpai VK, Sahasrabuddhe AA, Kumar A, Sinha RA, Behari S, Godbole MM. 2008. Inhibition of N-(4- hydroxyphenyl)retinamide-induced autophagy at a low doses enhances cell death in malignant glioma cells. *Carcinogenesis* 29:600-609.
 - Tomasini R, Samir AA, Vaccaro MI, Pebusque MJ, Dagorn JC, Iovanna JL, Dusetti NJ. 2001. Molecular and functional characterization of the stress-induced protein (SIP) gene

- and its two transcripts generated by alternative splicing. SIP induced by stress and promotes cell death. *J Biol Chem.* 276(47):44185-44192.
- Tóth S, Nagy K, Pálfi Z, Réz G. 2002. Cellular autophagic capacity changes during azaserine-induced tumour progression in the rat pancreas. Up-regulation in all premalignant stages and down-regulation with loss of cycloheximide sensitivity of segregation along with malignant transformation. *Cell Tissue Res.* 309(3):409-416.
 - Tsang C, Qi H, Liu L, Zheng X. 2007. Targeting mammalian target of rapamycin (mTOR) for health and diseases. *Drug Discov Today.* 12:112-124.
 - Vaccaro MI, Grasso D, Ropolo A, Iovanna JL, Cerquetti MC. 2003. VMP1 expression correlates with acinar cell cytoplasmic vacuolization in arginine-induced acute pancreatitis. *Pancreatology.* 3(1):69-74.
 - van de Graaf SF, Hoenderop JG, Gkika D, Lamers D, Prenen J, Rescher U, Gerke V, Staub O, Nilius B, Bindels RJ. 2003. Functional expression of the epithelial Ca(2+) channels (TRPV5 and TRPV6) requires association of the S100A10-annexin 2 complex. *EMBO J* 22:1478-1487
 - van der Donk WA, Yu G, Pérez L, Sanchez RJ, Stubbe J, Samano V, Robins MJ. 1998. Detection of a new substrate-derived radical during inactivation of ribonucleotide reductase from *Escherichia coli* by gemcitabine 5'-diphosphate. *Biochemistry.* 37:6419-6426.
 - Vedrenne C, Hauri HP. 2006. Morphogenesis of the endoplasmic reticulum: beyond active membrane expansion. *Traffic* 7(6):639-646.
 - Verma R, Cutler DJ, Holmans P, Knowles JA, Crowe RR, Scheftner WA, Weissman MM, Depaulo JR Jr, Levinson DF, Potash JB. 2007. Investigating the role of p11 (S100A10) sequence variation in susceptibility to major depression. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.* 144B(8):1079-1082.
 - Vivanco I, Sawyers CL. 2002. The phosphatidylinositol 3-kinase Akt pathway in human cancer. *Nat Rev Cancer.* 2:489-501.
 - Walczak H, Haas TL. 2008. Biochemical analysis of the native TRAIL death-inducing signaling complex. *Methods Mol Biol.* 414:221-239.
 - Wallach D, Kang TB, Kovalenko A. 2008. The extrinsic cell death pathway and the élan mortel. *Cell Death Differ.* 15(10):1533-1541.
 - Wang CW, Klionsky DJ. 2003. The molecular mechanism of autophagy. *Mol Med* 2003. 9:65-76.
 - Wang J, Lohman GJ, Stubbe J. 2007. Enhanced subunit interactions with gemcitabine-5'-diphosphate inhibit ribonucleotide reductases. *Proc Natl Acad Sci USA.* 104:14324-14329.
 - Wang Y, Singh R, Massey AC, Kane SS, Kaushik S, Grant T, Xiang Y, Cuervo AM, Czaja MJ. 2008. Loss of macroautophagy promotes or prevents fibroblast apoptosis depending on the death stimulus. *J Biol Chem.* 283:4766-4777.
 - Warshaw AL, Fernandez-del Castillo C. 1992. Pancreatic carcinoma. *N Engl J Med.* 326:455-465.
 - Wilentz RE, Goggins M, Redston M, Marcus VA, Adsay NV, Sohn TA, Kadkol SS, Yeo CJ, Choti M, Zahurak M, Johnson K, Tascilar M, Offerhaus GJ, Hruban RH, Kern SE. 2000. Genetic, immunohistochemical, and clinical features of medullary carcinoma of the pancreas: A newly described and characterized entity. *Am J Pathol.* 156:1641-1651.
 - Willemer S, Klöppel G, Kern HF, Adler G. 1989. Immunocytochemical and morphometric analysis of acinar zymogen granules in human acute pancreatitis. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol.* 415(2):115-123.
 - Wilson NS, Dixit V, Ashkenazi A. 2009. Death receptor signal transducers: nodes of coordination in immune signaling networks. *Nat Immunol.* 10(4):348-355.

- Wisniewska M, Karlberg T, Lehtiö L, Johansson I, Kotenyova T, Moche M, Schüler H. 2010. Crystal structures of the ATPase domains of four human Hsp70 isoforms: HSPA1L/Hsp70-hom, HSPA2/Hsp70-2, HSPA6/Hsp70B', and HSPA5/BiP/GRP78. *PLoS One*. 5(1):e8625.
- Wong HH, Lemoine NR. 2008. Biological approaches to therapy of pancreatic cancer. *Pancreatol*. 8(4-5):431-461.
- Wynder E. 1975. An epidemiological evaluation of the causes of cancer of the pancreas. *Cancer Res*. 35:2228-2233.
- Yen WL, Legakis JE, Nair U, Klionsky DJ. 2007. Atg27 is required for autophagy-dependent cycling of Atg9. *Mol Biol Cell* 18(2):581-593.
- Yeo CJ, Cameron JL, Lillemoe KD, Sitzmann JV, Hruban RH, Goodman SN, Dooley WC, Coleman J, Pitt HA. 1995. Pancreaticoduodenectomy for cancer of the head of the pancreas: 201 patients. *Ann Surg*. 221:721-733.
- Yoshimori T. 2004. Autophagy: a regulated bulk degradation process inside cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 313:453-458.
- Yoshimori T. 2007. Autophagy: paying Charon's toll. *Cell*. 128:833-836.
- Young JE, Martinez RA, La Spada AR. 2008. Nutrient deprivation induces neuronal autophagy, and implicates reduced insulin signaling in neuroprotective autophagy activation. *J Biol Chem*. 284:2363-2373.
- Yousefi S, Perozzo R, Schmid I, Ziemiecki A, Schaffner T, Scapozza L, Brunner T, Simon HU. 2006. Calpain-mediated cleavage of Atg5 switches autophagy to apoptosis. *Nat. Cell Biol*. 8:1124-1132.
- Yu J, Zhang L, Hwang PM, Rago C, Kinzler KW, Vogelstein B. 1999. Identification and classification of p53-regulated genes. *Proc Natl Acad Sci USA*. 96:14517-14522.
- Yu L, Alva A, Su H, Dutt P, Freundt E, Welsh S, Baehrecke EH, Lenardo MJ. 2004. Regulation of an ATG7-beclin 1 program of autophagic cell death by caspase-8. *Science* 304:1500-1502.
- Yue Z, Jin S, Yang C, Levine A, Henitz N. 2003. Beclin 1, an autophagy gene essential for early embryonic development, is a haploinsufficient tumor suppressor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 100:15077-15082.
- Zawal L, Dai JL, Buckhaults P, Zhou S, Kinzler KW, Vogelstein B, Kern SE. 1998. Human Smad3 and Smad4 are sequence specific transcription activators. *Mol Cell*. 1:611-617.
- Zhao J, Brault JJ, Schild A, Cao P, Sandri M, Schiaffino S, Lecker SH, Goldberg AL. 2007. FoxO3 coordinately activates protein degradation by the autophagic/lysosomal and proteasomal pathways in atrophying muscle cells. *Cell Metab*. 6:472-483.
- Zheng W, Kollmeyer J, Symolon H, Momin A, Munter E, Wang E, Kelly S, Allegood JC, Liu Y, Peng Q, Ramaraju H, Sullards MC, Cabot M, Merrill AH Jr. 2007. Ceramides and other bioactive sphingolipid backbones in health and disease: lipidomic analysis, metabolism, and roles in membrane structure, dynamics, signaling and autophagy. *Biochim Biophys Acta*. 1758:1864-1884.
- Zhu C, Wang X, Xu F, Bahr BA, Shibata M, Uchiyama Y, Hagberg H, Blomgren K. 2005. The influence of age on apoptotic and other mechanisms of cell death after cerebral hypoxia-ischemia. *Cell Death Differ*. 12:162-176.
- Zobiack N, Rescher U, Ludwig C, Zeuschner D, Gerke V. 2003. The annexin 2/S100A10 complex controls the distribution of transferrin receptor-containing recycling endosomes. *Mol Biol Cell*. 14:4896-4908.
- Zokas L, Glenney JR Jr. 1987. The calpactin light chain is tightly linked to the cytoskeletal form of calpactin I: studies using monoclonal antibodies to calpactin subunits. *J Cell Biol*. 105:2111-2121.