



Memoria del 45º Taller de Actualización Bioquímica, Facultad de Medicina; UNAM

La proteína de mielina y linfocitos y la mucina-1 en un modelo de expresión transgénica.

Myelin and lymphocyte protein and mucin-1 in a transgenic expression model.

Lara-Lemus, Roberto^{1*}; Saldaña-Villa, Ana Karina¹ y Vázquez-Almazán, Bismarck²

1. Departamento de Investigación en Bioquímica, Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias "Ismael Cosío Villegas"

2. Estudiante del Posgrado en Ciencias Biológicas UNAM.

*Correspondencia. Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias "Ismael Cosío Villegas", Calzada de Tlalpan No. 4502, Col. Sección XVI, Tlalpan, Ciudad de México CP 14080 Tel. +52(55)5487-1705, betony44@hotmail.com

Resumen

Las mucinas son glicoproteínas de alto peso molecular cuyos glicanos están unidos mediante enlaces α -O-glicosídicos. Existen mucinas que son secretadas y otras unidas a la región apical de la membrana plasmática. De las mucinas ancladas a la membrana, la mucina 1 ha sido ampliamente estudiada debido a su asociación con procesos neoplásicos. Por otra parte, la proteína de mielina y linfocitos participa en la formación y estabilización de los microdominios ricos en esfingolípidos y colesterol, en el transporte de algunas proteínas a la membrana apical de células polarizadas, y posee actividad antioncogénica en varios tipos de adenocarcinoma. Nosotros generamos líneas celulares con la expresión transgénica estable de cada una de estas proteínas lo que nos permitió establecer que existe una relación entre MAL y MUC1.

Palabras clave: cáncer, MUC1, expresión transgénica, MAL, tráfico de proteínas.

Abstract

Mucins are high molecular weight glycoproteins whose glycans are linked by α -O-glycosidic bounds. There are secreted mucins and that attached to the apical region of plasmatic membrane. Among attached mucins, mucin 1 has been widely studied due to it is implied in neoplastic processes. On the other hand, myelin and lymphocyte protein take part in both formation and stabilization of enriched in sphingolipids and cholesterol microdomains, transport of some proteins into apical membrane of polarized cells, and it displays anti-oncogenic properties in several adenocarcinomas. We have generated transgenic cell lines expressing stably each protein allowing us to determine the existence of a relationship between MAL and MUC1.

Key words: cancer, MUC1, transgenic expression, MAL, protein trafficking.

Mucinas y cáncer

Las mucinas son glicoproteínas de alto peso molecular cuyos glicanos están unidos a residuos de serina (S) y treonina (T) mediante enlaces α -O-glicosídicos, principalmente con moléculas de N-acetil-galactosamina [1]. Existen mucinas que se secretan, las cuales aparecieron primero en la

evolución, y otras unidas a la región apical de la membrana plasmática (MP) en células epiteliales; algunos tipos de estas mucinas están involucradas en la inflamación y el cáncer [2]. En el humano, las mucinas pertenecen a una familia de más de 20 miembros, designadas MUC1 a MUC21. Las principales mucinas secretadas son MUC2, MUC5AC, MUC5B, MUC6 y MUC8; las cuales

forman parte de la capa de moco que protege y lubrica los epitelios respiratorio, genitourinario y gastrointestinal, así como los ductos hepáticos, renales, pancreáticos y de la mama. Dentro de las mucinas ancladas a las membranas, las mejor caracterizadas hasta ahora son MUC1, MUC4 y MUC16, las cuales comparten características estructurales como estar formadas por dos subunidades; una extracelular, de alto peso molecular y extensamente O-glicosilada, en la que se encuentra el extremo N-terminal de la proteína. Ésta se une de forma no covalente a la segunda subunidad que contiene el extremo C-terminal y que consta de tres dominios: uno extracelular que puede tener uno o más N-glicanos, un segmento único transmembranar, y un dominio citoplásmico. En este último se encuentran varios aminoácidos que por fosforilación específica permiten a esta subunidad interactuar con proteínas reguladoras de la proliferación y del metabolismo celular, involucrándose en vías de señalización relacionadas con el crecimiento y la supervivencia celular. En el caso de MUC4, se ha postulado que el papel fisiológico de la subunidad citoplásmica es estimular la diferenciación y crecimiento epitelial [2], en tanto que se piensa que el papel fisiológico de MUC1 pudiera ser el de sensor de daño epitelial y favorecer la reparación estimulando la proliferación de células epiteliales [2]. Esto se lograría debido a que durante el estrés por daño epitelial, la polaridad celular se pierde, por lo que en esta circunstancia MUC1 puede interactuar con cinasas de tirosina asociadas a receptores (RTKs) que se encuentran en la región baso-lateral de la MP (Figura 1).

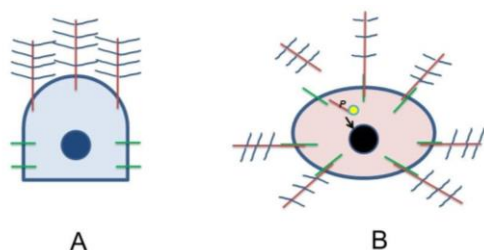


Figura 1. Esquema de la localización de MUC1 (rojo) en la membrana plasmática. (A) es una célula epitelial normal y MUC1 se encuentra en la región apical. Cuando hay transformación neoplásica, la polaridad se pierde. (B) MUC1-C es fosforilada por cinasas de tirosina (verde) y se trasloca al núcleo para favorecer la oncogénesis. El mismo mecanismo ocurre cuando hay daño epitelial, pero el proceso es temporal y se detiene al recuperarse la polaridad e integridad epitelial.

De esta forma aminoácidos específicos localizados en la región citoplásmica de MUC1 pueden ser fosforilados por estas cinasas y entonces algunas proteínas reguladoras podrían unirse a MUC1 y finalmente se activaría la expresión de genes relacionados con la proliferación celular. Este efecto

sería transitorio en tanto se recupera el daño y la polaridad de las células epiteliales.

Sin embargo, en los cánceres de origen epitelial o carcinomas se sobreexpresan mucinas como MUC1, 4 y 16, precisamente aprovechando sus propiedades en el crecimiento y la supervivencia celular [3]. En casi todos los carcinomas, se sobreexpresa MUC1, y se ha demostrado que se encuentra aberrantemente glicosilada, esto es con glicanos menos ramificados y más cortos, generalmente sialilados, lo cual se asocia con una mayor capacidad metastásica y con un pobre pronóstico para el paciente [4]. Por esta razón, MUC1 y los cambios en su patrón de glicosilación han sido estudiados ampliamente desde la perspectiva inmunológica, como candidato al desarrollo de vacunas o de anticuerpos protectores, así como también los mecanismos de glicosilación aberrante que sufre cuando ocurre la transformación celular, y las enzimas implicadas en este proceso [3,5].

Propiedades estructurales de MUC1 y cáncer

En el humano el gen de MUC1 ocupa 4.4 kpb en el locus 1q21, y consta de 8 exones. Aun cuando existen variantes generadas por corte y empalme alternativo, el producto de este gen es una glicoproteína heterodimérica y transmembranar de tipo I (Figura 2), que se localiza en la superficie apical de las células epiteliales en diversos órganos y tejidos glandulares, así como en células hematopoyéticas [6,7].

La subunidad N también llamada α , o MUC1-N se compone de un dominio repetido en tándem de 40 a 90 veces y en algunos grupos étnicos hasta más de 100 veces, con copias perfectas de la secuencia PDTRPAPGSTAPPAHGVTSA, llamada VNTR (*variable numbers of tandem repeats*, por sus siglas en inglés) donde los 5 residuos de S y T se O-glicosilan [6,8]. Flanqueando esta región se encuentran repeticiones imperfectas de la secuencia descrita, con menos sitios para O-glicosilación [9]. Esta subunidad altamente O-glicosilada protruye de la membrana plasmática hasta 200 nm y forma parte de la capa de moco que protege los epitelios. Además, MUC1 tiene cinco sitios consenso para N-glicosilación adyacentes al segmento transmembranar; de los cuales cuatro se encuentran en la subunidad MUC1-N y uno en el dominio extracelular de la subunidad pequeña o MUC1-C [10].

MUC1-C llamado también subunidad β , tiene como ya mencionamos, tres dominios; su dominio extracelular consta de 58 aminoácidos, el segmento transmembranar de 21, y el dominio citoplásmico

(también llamada “cola citoplásmica”, CT por sus siglas en inglés) de 72 aminoácidos. Este último posee aminoácidos importantes. Por ejemplo, los tres primeros aminoácidos (CQC) conforman la secuencia de dimerización, mediante puentes disulfuro, y la dimerización de MUC1-C es indispensable para su unión a la importina β y su traslocación al núcleo.

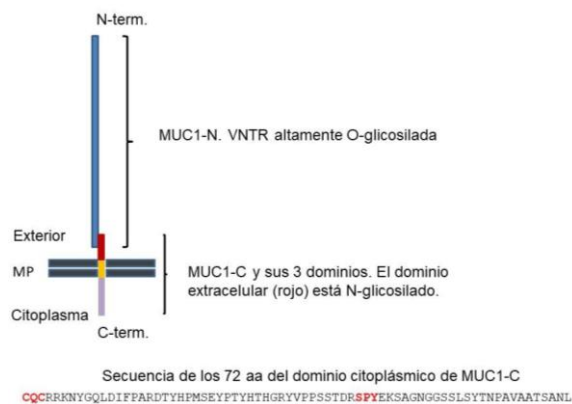


Figura 2. Representación esquemática de MUC1 y secuencia del dominio citoplásmico de MUC1-C. En rojo se muestran algunos aminoácidos importantes.

El segmento CT también tiene siete tirosinas (Y) y la fosforilación de algunas de ellas tiene efectos reguladores: por ejemplo, la fosforilación de Y_{60} y Y_{20} está implicada en la endocitosis de MUC1 en vesículas cubiertas de clatrina (CCV) a través de interacciones con AP-2 y Grb2 [11]. En este sentido MUC1-C participa en vías de señalización ya que Grb2 conecta con la vía del receptor para el factor de crecimiento epidérmico (EGFR), y la activación de Ras y las cinasas ERK1 y 2 [12]. MUC1-C también interactúa con la β -catenina, por lo que es mediador de la vía Wnt que finalmente activa la transcripción de los genes de proliferación celular como ciclina D1 (CD1) y Myc entre otros.

En este caso la regulación de la interacción entre ambas está determinada por fosforilación diferenciada. La unión de MUC1-C con β -catenina es favorecida por la fosforilación de la Y_{46} , la cual forma parte del motivo S_{44} - P_{45} - Y_{46} . La Y_{46} es fosforilada por Src y otras cinasas de esta familia (Lck y Lyn) así como por el EGFR, dando como resultado un aumento en la interacción de MUC1-C con β -catenina. Por el contrario si la S_{44} es fosforilada primero por la glicerol sintasa cinasa 3- β (GSK3 β), Src ya no puede fosforilar a la Y_{46} y la interacción con β -catenina se inhibe [13]. Otro dato importante en este sentido es que la interacción con MUC1-C protege a la β -catenina de la degradación dependiente de su fosforilación por la GSK3 β [14], esto favorece que haya mayor cantidad de β -catenina en el núcleo y su actividad estimuladora

de la expresión de genes que favorecen la proliferación celular, pero por otro lado esa misma interacción bloquea la unión de la β -catenina con la caderina E, disminuyendo la adhesión celular y favoreciendo las metástasis [14]. Aún cuando se ha reportado que MUC1-N puede localizarse en el núcleo [15], MUC1-C es factor suficiente para la activación de genes que aumentan la proliferación celular. De esta manera una pregunta importante es ¿Cómo ocurre la separación de las dos subunidades de MUC1? MUC1 posee un dominio SEA autoproteolítico (siglas en inglés por las primeras tres proteínas en donde se describió: *sea-urich Sperm protein*, *Enterokinase*, *Agrin*), que tiene la secuencia GSVVV. El corte de la cadena peptídica se da precisamente entre G_{1097} y S_{1098} , lo cual implica que desde que MUC1 se sintetiza en el RE la cadena peptídica queda cortada en sus dos subunidades. Sin embargo, éstas se mantienen unidas por fuertes interacciones no covalentes durante su tránsito celular y en la MP [16,17]. Característicamente este dominio siempre se localiza en la región extracelular de las glicoproteínas, justo antes de las secuencias VNTR altamente O-glicosiladas. La liberación de MUC1-N desde la superficie apical epitelial requiere de otras proteínas que la separan de MUC1-C que es su ancla a la MP. Este es un proceso complejo que involucra a la enzima convertidora del factor de necrosis tumoral α , y un par de metaloproteasas de matriz extracelular [18,19]. No obstante en las células neoplásicas cuya polaridad se ha perdido permanentemente, MUC1-N se libera desde la región basolateral y así puede ser detectada en la sangre de pacientes con algunos tipos de cáncer particularmente el de mama, por lo que es considerado un antígeno asociado a tumor [20]. Posterior a la separación de MUC1-N, MUC1-C también es liberada de la membrana plasmática por medio del complejo proteico de membrana γ -secretasa [21], así puede dimerizar y ser transportada al núcleo por la importina β . Para entrar al núcleo primero se separa de su transportador e interactúa con la nucleoporina-62 [22]. MUC1-C no tiene dominios de unión al DNA, sin embargo puede asociarse con β -catenina y otros factores transcripcionales para modular la expresión de algunos genes involucrados con la supervivencia y transformación celular [22,23].

Finalmente, aunque MUC1-C carece también de una secuencia de reconocimiento mitocondrial, esta proteína puede entrar a la mitocondria mediante un proceso en el que participa el complejo HSP70/HSP90 (*heat shock protein 70 y 90*) y el receptor mitocondrial Tom 70 [24]. En efecto, se ha demostrado que MUC1-C forma complejos con HSP70 y también puede unirse a HSP90 pero solamente cuando la Y_{46} ha sido fosforilada por c-Src. Dentro de la mitocondria

MUC1-C bloquea la activación de la vía apoptótica intrínseca inducida por estrés [24], pero también se ha observado que bloquea la vía extrínseca o mediada por receptor, ya que se une a caspasa-8 cerca de la cisteína catalítica C₃₆₀ causando su inactivación [25].

Como hemos visto, la subunidad C-terminal de la glicoproteína MUC1 tiene diferentes actividades que favorecen la proliferación celular, promueven la transformación y en general el desarrollo, la diseminación y la supervivencia de las células tumorales, por ello esta proteína es un potente oncogén.

La proteína de mielina y linfocitos (MAL)

La proteína MAL (*Myelin And Lymphocyte*, por sus siglas en inglés) es un proteolípido no glicosilado que en el humano consta de 153 aminoácidos, una masa molecular de 17 kDa y se localiza principalmente en las membranas de la cadena del trans-Golgi (TGN), endosomas tempranos y en la región apical de la MP, (Figura 3). MAL es un componente importante de un tipo de microdominios ricos en colesterol y esfingolípidos o “balsas lipídicas” (*lipid rafts* en inglés o GEMs), distinto a los encontrados en las caveolas [26].

La historia de esta proteína es interesante ya que inicialmente el gen de MAL se descubrió como parte de un grupo de genes relacionados con la maduración de linfocitos-T en humanos [27]. Posteriormente, la proteína se detectó tanto en oligodendrocitos humanos, como en oligodendrocitos y células de Schwann de rata [28,29]. También se encontró que la expresión de MAL es más alta cuando dichas células productoras de mielina son maduras, tanto en el sistema nervioso central (SNC), como en el periférico (SNP). Aunque inicialmente se denominó MVP17 o VIP/17, fue debido a su expresión en células productoras de mielina y en linfocitos que se adoptó la denominación MAL.

Estructuralmente MAL está formada por cuatro segmentos transmembranales y tanto el N-terminal como el C-terminal se encuentran en el citoplasma. Esta misma estructura se ha encontrado en otras proteínas de membrana y se ha denominado dominio MARVEL (*MAL and related proteins for vesicle trafficking and membrane link*, por sus siglas en inglés). La presencia del dominio MARVEL permitió asignar a un grupo de proteínas como parte de la familia MAL, éstas son MAL-2, BENE, y plasmolipina. Sin embargo, el dominio MARVEL se encuentra también en otras proteínas como fisinas, ocludinas y girinas [30-33].

Actualmente, no se conocen con precisión las funciones del dominio MARVEL en las proteínas que lo tienen. Sin embargo, se piensa que en las ocludinas participaría en la estabilización de las uniones estrechas y en el caso de MAL, girinas y fisinas, en la formación de vesículas de transporte [32].

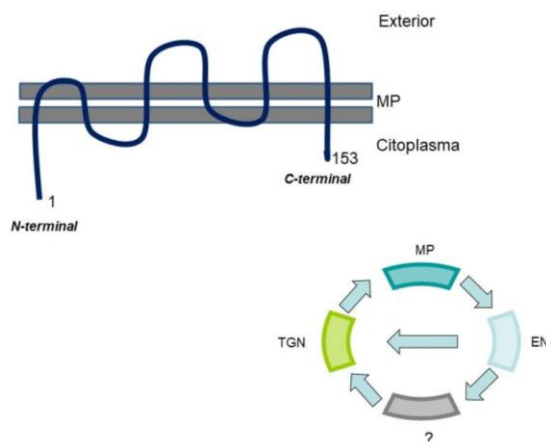


Figura 3. Representación esquemática de MAL y de su tráfico intracelular. Es una proteína itinerante entre la red trans-Golgi (TGN), la MP y los endosomas (EN), aunque se sabe que posiblemente MAL puede encontrarse en otras vesículas intracelulares.

Funciones de MAL

La expresión de MAL en humanos y otros animales es notoriamente variable en diferentes tejidos y órganos [34], más aún dentro de cada órgano o tejido, puede observarse una expresión diferenciada entre tipos celulares, pero es un hecho que existe una tendencia clara de expresión de MAL en células epiteliales y células secretoras (células polarizadas).

Por ejemplo, en el tubo digestivo MAL se expresa en los epitelios desde el esófago hasta el colon, pero no en las células musculares ni en la submucosa, y en páncreas es activa en células acinares, ductales y endócrinas. La distribución de la expresión no aleatoria ni universal de este proteolípido nos puede orientar hacia las funciones que desempeña, pero además indica que la expresión de MAL no se limita a linfocitos y células productoras de mielina.

Como ya mencionamos MAL es constituyente de los llamados GEMs o rafts, por lo que sus funciones están relacionadas con aquellas descritas para estas estructuras lipídicas.

Podemos clasificar las funciones de MAL en:

- 1) Transporte de lípidos y proteínas a la MP.
- 2) Estabilización de GEMs.
- 3) Co-receptor.
- 4) Secreción de exosomas.
- 5) Supresor de tumores u oncoproteína en situaciones específicas.

Analizar y discutir acerca de estas actividades así como la relación de sus funciones con las de los GEMs está más allá de los alcances de la presente revisión, por lo que nos limitaremos a indicar la participación de MAL en esas distintas actividades en el Cuadro 1, y solamente nos enfocaremos en su papel como supresor de tumores ya que de ésta deriva la justificación del presente trabajo.

MAL como anti-oncogén

La metilación de residuos de citosina en el DNA ocurre cuando están unidas en 5' a una guanina (CpG), y es catalizada por diversas enzimas llamadas DNA metiltransferasas (DNMT). Las secuencias CpG se agrupan en ciertas regiones localizadas principalmente en los promotores de genes reguladores del ciclo celular y genes supresores de tumores, y se denominan islas CpG. La metilación del DNA es un mecanismo epigenético para regular para la expresión de dichos genes y está relacionada con el desarrollo de cáncer, enfermedades crónico-degenerativas, y el envejecimiento.

Función	Órgano/tejido/célula	Alteración	Referencias
Transporte	MDCK	Acumulación en Golgi de gp14 HA y proteínas GPI	35
	MDCK	Acumulación en Golgi de Tg recombinante y clusterina	36
	Linfocitos-T	Defectos en sinapsis inmunológica por falta de Lck	37,38
	Hepatoma WIF-B	Redirección apical de GPI y TMD por expresión exógena de MAL	39
	MDCK	Falla en endocitosis del pIgR	40
	SNC/SNP	Inclusiones citoplasmáticas de mielina, alteraciones paranodales	41,42
	FRT/MDCK	Transporte basolateral de dipeptidil transferasa IV	43
Estabilización de GEMs	Riñón	Quistes renales por falla en transporte de gp135	44
	Epitelios gástrico y renal	_____	45
	Tiroides y WIF-B	_____	46
	Linfocitos-T, Cos7 y MDCK	_____	47,48
Secreción de exosomas	Linfocitos-T	Proteínas exosómicas enviadas a autofagosomas	49
Co-receptor	Oligodendrocitos de rumiantes	Daño en la materia blanca y desmielinización multifocal del SNC. ¿Esclerosis múltiple en humanos?	50,51,52

Se sabe que la mayor metilación de CpGs, favorece la unión de las enzimas que desacetilan a las histonas, por lo que la hipermetilación del DNA resulta en condensación de la cromatina, y ambos mecanismos producen silenciamiento génico [53]. El gen MAL tiene dos islas CpG, una, llamada M1 abarca de -626 a -385, tomando como referencia el nucleótido +1 y la isla M2 se localiza en la región intragénica, río abajo del primer exón, abarcando de +390 a +699, y en total posee 116 dinucleótidos CpG. En los tumores escamosos de cabeza y cuello se ha encontrado que ambas islas están altamente metiladas (más del 90%), y la expresión de MAL se encuentra abolida [54]. En estos reportes se demostró también que la expresión exógena de MAL o la desmetilación química del DNA reducen el fenotipo tumorigénico. El silenciamiento epigenético de MAL ha sido descrito en muchos otros adenocarcinomas, entre ellos de esófago [55,57],

cáncer de mama [58,59], colon [60,61], estómago [62], y de cervix [63]. En algunos de estos reportes se ha identificado al silenciamiento de MAL como un factor negativo en el pronóstico de los pacientes. Paradójicamente, la sobreexpresión de MAL, y la hipometilación de su promotor han sido asociadas al desarrollo y mal pronóstico de algunos tipos de linfomas y cánceres de ovario [64-69].

Justificación

Existen genes que son supresores de tumores pero bajo ciertas circunstancias pueden convertirse en oncogenes y promover la carcinogénesis, un ejemplo es la familia del factor nuclear de células T activadas (NFAT, por sus siglas en inglés). Estas proteínas regulan la expresión de varios mediadores proteicos que participan en el control del ciclo celular, así como

otros factores de supervivencia y transformación celular. En la línea celular de fibroblastos NIH 3T3, se encontró que una forma acortada por delección génica de esta proteína, lleva a un aumento en la proliferación y a la transformación celular, mientras que la proteína NFAT regular conserva sus propiedades antiproliferativas [70]. En el caso de la proteína MAL, aunque existen 4 variantes transcripcionales, a la fecha no se ha descrito que alguna de ellas tenga actividad supresora de tumores y otra actúe como oncogén, tampoco que este cambio se asocie a mutaciones como es el caso de proteínas reguladoras como el TGF β (transforming growth factor-beta) [71]. Es importante resaltar que aparentemente la actividad supresora o pro-tumoral de la proteína MAL se debe a sus niveles de expresión, la cual hasta ahora se sabe que está determinada por el grado de metilación del promotor y de una parte del gen, pero seguramente existen otros factores no determinados todavía y que pudieran estar relacionados con el tipo celular en que se sobreexpresa o hipodexpresa. Por esta razón nos parece importante investigar mediante qué mecanismos puede actuar MAL como antioncogén y un blanco potencial es la proteína MUC1. Esta hipótesis deriva del hecho de que se ha demostrado por el sistema de doble híbrido que MUC1 interactúa con MAL-2, e incluso con MAL, pero no se ha estudiado el papel que pudiera tener su interacción con esta última [72]. Existen además otras asociaciones que pudieran relacionar estas dos proteínas, por ejemplo MUC1 se transporta a la MP en rafts empacados con flotilina 1, y se palmitoíla [73], lo cual es determinante para su reciclamiento y a su vez la mantiene a MUC1 asociada a los GEMs. Por tales motivos pensamos que MAL puede tener implicaciones en el tráfico, reciclamiento o traslocación de MUC1 al núcleo.

Importancia del modelo transgénico para estudiar MUC1 y MAL.

MUC1 se sobreexpresa en muchas líneas celulares, la mayoría derivadas de adenocarcinomas. Sin embargo, en nuestro laboratorio hemos encontrado que existen variaciones importantes en su expresión debido a diferencias en las condiciones y en el número de pases en cultivo, por esa razón decidimos generar líneas celulares más estables usando células HEK293 que no expresan endógenamente MUC1 ni MAL, y además son fáciles de transfectar con plásmidos por métodos convencionales por lo que tienen alta eficiencia de transfección. Por otra parte, estas células nos ofrecen la ventaja de tener la vía Wnt y como mencionamos antes MUC1 interactúa con un efector de la vía, la β -catenina, para coactivar la expresión de genes de proliferación celular. De esta forma generamos dos líneas celulares: HEK293-

hMUC1-22r, mediante la transfección estable y selección de las células con un cDNA que tiene el gen de la proteína MUC1 humana con 22 repeticiones de la secuencia VNTR, es decir, es más corta que la proteína nativa, pero se ha usado ampliamente como modelo para el estudio del transporte y reciclamiento de MUC1 “*in vitro*” [73]. La segunda línea generada fue HEK293-GFP-MAL, la cual tiene la ventaja que MAL está fusionada por su extremo amino a la proteína verde fluorescente (GFP) [74]. Esto nos permite mayor flexibilidad metodológica para el seguimiento de la expresión de ésta proteína.

¿Qué relación hemos encontrado entre MUC1 y MAL?

Hasta el momento no se ha publicado algún resultado que implique alguna relación funcional o relacionada a patologías entre estas dos proteínas, solamente como mencionamos, Fanayan y cols. reportaron que MUC1 es ligando de MAL y MAL-2, pero en su publicación sólo analizan la interacción de MUC1 con MAL-2 y proponen que esta última podría encargarse de enviar a MUC1 a la región basolateral de la MP. En nuestro laboratorio hemos encontrado una relación funcional entre MUC1 y MAL. A partir de experimentos con transfecciones transitorias observamos que la cantidad y distribución de MUC1-C en las células HEK293-hMUC1-22r resulta modificada cuando se sobreexpresa la proteína MAL. En la Figura 4 podemos ver que a partir del fraccionamiento de células HEK293-hMUC1-22r no transfectadas y transfectadas con MAL, este proteolípido afecta la cantidad de MUC1-C en las diferentes fracciones subcelulares.

En general, se observa una disminución en la cantidad de MUC1 cuando se expresa MAL. Sin embargo, es de notar que la cantidad de MUC1-C en la fracción nuclear soluble disminuye en un 40% cuando las células expresan MAL y por otro lado MUC1-C aumenta en la fracción citoplásmica de las células transfectadas con MAL. Esto quiere decir que de alguna manera, la expresión de MAL afecta el transporte de MUC1-C al núcleo y ésta se acumula en el citoplasma. El significado de este fenotipo aunque no es claro todavía, podría indicar la primera evidencia experimental directa de MAL como antioncogén, ya que su sobreexpresión estaría evitando que MUC1-C llegue al núcleo y pueda activar la proliferación celular y eventualmente promover la oncogénesis. ¿Qué mecanismos podrían estar detrás del fenotipo encontrado? Una posibilidad que hemos explorado en el laboratorio es que la expresión de MAL pueda interferir con la unión de MUC1-C y β -catenina. Como mencionamos antes, la

fosforilación de la tirosina del motivo SPY en el dominio citoplásmico de MUC1-C es necesario para que se dé dicha interacción. Mediante experimentos de co-inmunoprecipitación encontramos que la expresión de MAL afecta la unión de MUC1-C y β -catenina, principalmente en la fracción nuclear. Estos resultados

permiten establecer interrelaciones entre MUC 1 y MAL a nivel molecular que muy probablemente afectan las propiedades oncogénicas de MUC1-C. Estos y otros resultados nos permiten señalar que el modelo celular que hemos generado es adecuado para el estudio de la interrelación de MUC1 y MAL.

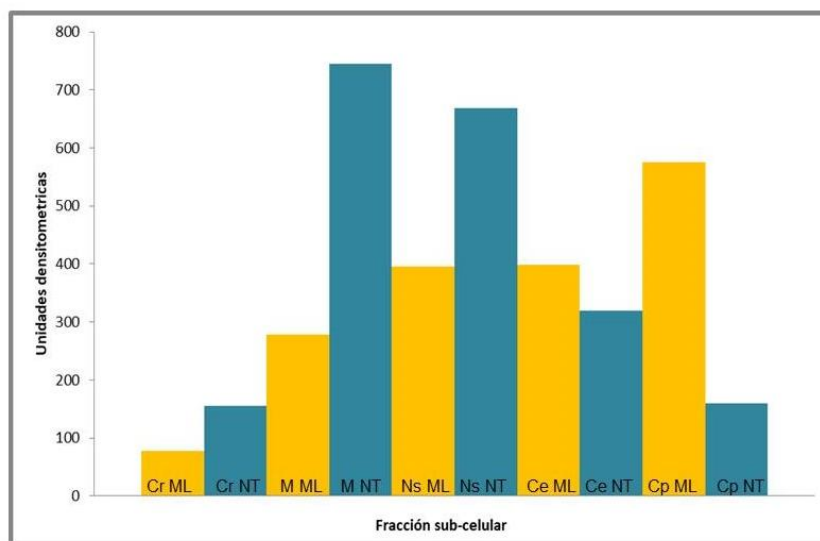


Figura 4. Análisis densitométrico de la banda de MUC1 obtenida por inmunotransferencia de las fracciones subcelulares. Cr, proteína unida a cromatina, M, proteína de membrana, Ns, proteína nuclear soluble, Ce, proteína unida a citoesqueleto, y Cp, proteína citoplásmica, de células HEK293-hMUC1-22r no transfectadas (NT) y transfectadas con MAL (ML).

Perspectivas

Es evidente que la actividad antioncogénica de MAL no puede separarse del contexto de los rafts o GEMs, y de la relación de éstos con diferentes enfermedades. Por ello consideramos importante resaltar que nuestro modelo basado en células HEK293 es una herramienta valiosa para utilizarse en el estudio de esos procesos. Todavía falta más trabajo experimental para establecer con precisión el o los mecanismos por los cuales MAL afecta la actividad oncogénica de MUC1-C, y que en este sentido, pudiéramos atribuir un comportamiento de MAL como antioncogén. Es claro que el presente modelo es

solamente la etapa inicial de un estudio más amplio en el que se puedan establecer dichos mecanismos en células tumorales y no tumorales obtenidas de pacientes. Esto se abordaría mediante la expresión transgénica de MAL a través de la transducción de su cDNA usando como vehículo a los lentivirus. Por otra parte, estamos generando líneas basadas en células HCC827 de adenocarcinoma pulmonar, que endógenamente no expresan MAL, para observar los efectos de la expresión de esta proteína sobre la actividad oncogénica de MUC1-C. De esta forma, este nuevo conocimiento podría ayudar a comprender mejor la manera en que los GEMs están relacionados con enfermedades, particularmente con el cáncer.

Referencias

- Irimura, T., Denda, K., Lida, S., Takeuchi, H., and Kato, K. (1999) *J. Biochem.* **126**, 975-985.
- Carraway, K.L., Ramsauer, V., Haq, B., and Carothers Carraway, C.A. (2002) *BioEssays* **25**, 66-71.
- Kufe, D. (2009) *Nat. Rev. Cancer.* **9**, 874-885.
- Hollingsworth, M. A., and Swanson, B. J. (2004) *Nat. Rev. Cancer.* **4**, 45-60.
- Park, J-H., Nishidate, T., Kijima, K., Ohashi, T., Takegawa, K., Fujikane, T., Hirata, K., Nakamura, Y., and Katagiri, T. (2010) *Cancer Res.* **70**, 2759-2768.
- Sousa, A.M., Grandgenett, P.M., David, L., Almeida, R., Hollingsworth, A.M., and Santos-Silva, F. (2016) *APMIS.* **124**, 913-924.
- Nath, S., and Mukherjee, P. (2014) *Trends Mol. Med.* **20**, 332-342.
- Gendler, S., Spicer, A.P., Lalani, E-N., Duhig, T., Peat, N., Burchell, J., Pemberton, L., Boshell, M., and Taylor-Papadimitriou, J. (1991) *Am. Rev. Respir. Dis.* **144**, S42-S47.
- Hilkens, J., Ligtenberg, M.J.L., Vox, H.L., Vos, H.L., and Litvinov, S.V. (1992) *Trends Biochem. Sci.* **17**, 359-363.
- Parry, S., Hanisch, F.G., Leir, S-H., Sutton-Smith, M., Morris, H.R., Dell, A., and Harris, A. (2006) *Glycobiology.* **16**, 623-634.

11. Kinlough, C.L., Poland, P.A., Burns, J.B., Harkleroad, K.L., and Hughey, R.P. (2004) *J. Biol. Chem.* **279**, 53071-53077.
12. Chardin, P., Camonis, J.H., Gale, N.W., van Aelst, L., Schlessinger, J., Wigler, M.H., and Bar-Sagi, D. (1993) *Science*. **260**, 1338-1343.
13. Li, Y., Bharti, A., Chen, D., Gong, J., and Kufe, D. (1998) *Mol. Cell. Biol.* **18**, 7216-7224.
14. Huang, L., Chen, D., Liu, D., Yin, L., Kharbanda, S., and Kufe, D. (2005) *Cancer Res.* **65**, 10413-10422.
15. Kumar, P., Lindberg, L., Thirkill, T.L., Ji, J.W., Martsching, L., and Douglas, G.C. (2012) *PLoS ONE*. **7**, e42712.
16. Levitin, F., Stern, O., Weiss, M., Gil-Henn, C., Ziv, R., Prokocimer, Z., Smorodinsky, N.I., Rubinstein, D.B., and Wreschner, D.H. (2005), *J. Biol. Chem.* **280**, 33374-33386.
17. Lillehoj, E.P., Han, F., and Kim, K. C. (2003) *Biochem. Biophys. Res. Com.* **307**, 743-749.
18. Thathiah, A., Blobel, C.P., and Crason, D. D. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 3386-3394.
19. Thathiah, A., and Crason, D.D. (2004) *Biochem. J.* **382**, 363-373.
20. Albercht, H., and Carraway, L.III. (2011) *Cancer Biother. Radiopharm.* **26**, 261-271.
21. Julian, J., Dharmaraj, N., Carson, D.D. (2009) *J. Cell. Biochem.* **108**, 802-815.
22. Leng, Y., Cao, Ch., Ren, J., Huang, L., Chen, D., Ito, M., and Kufe, D. (2007) *J. Biol. Chem.* **282**, 19321-19330.
23. Wen, Y., Caffrey, T.C., Wheelock, M.J., Johnson, K.R., and Hollingsworth, M.A. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 38029-38039.
24. Ren J, Baharti A, Raina D., Chen, W., Ahmad, R., and Kufe, D. (2006) *Oncogene*. **25**, 20-31.
25. Agata, N., Ahmad, R., Kawano, T., Raina, D., Kharbanda, S., and Kufe, D. (2008) *Cancer Res.* **68**, 6136-6144.
26. Puertollano, R., and Alonso, M. A. (1999) *Mol. Biol. Cell.* **10**, 3435-3447.
27. Alonso, M.A., and Weissman S.M., (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **84**, 1997-2001.
28. Kim, T., Fiedler, K., Madison, D.L., Krueger, W.H., and Pfeiffer, S.E., (1995) *J. Neurosci. Res.* **42**, 413-422.
29. Schaaeren-Wiemers, N., Valenzuela, D.M., Frank, M., and Schwab, M.E., (1995) *J. Neurosci.* **15**, 247-252.
30. Perez, P., Puertollano, R., and Alonso, M.A., (1997) *Biochem. Biophys. Res. Com.* **232**, 618-621.
31. de Marco, M.C., Martín-Belmonte, F., Kremer, L., Albar, J.P., Correas, I., Vaerman, J.P., Marazuela, M., Byrne, J.A., Alonso, M.A. (2002) *J. Cell. Biol.* **159**, 37-44.
32. Sánchez-Pulido, L., Martín-Belmonte, F., Valencia, A., and Alonso, M.A. (2002) *Trends Biochem. Sci.* **27**, 597-601.
33. Feldman, G.J., Mullin, J.M., and Ryan, M.P. (2005) *Adv. Drug. Deliv. Rev.* **57**, 883-917.
34. Marazuela, M, and Alonso, M.A. (2004) *Histol. Histopathol.* **19**, 925-933.
35. Cheong, K.H., Zacchetti, D., Schneeberger, E.E., and Simons, K. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **96**, 6241-6248
36. Martín-Belmonte, F., Arvan, P., and Alonso, M.A. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 49337-49342.
37. Anton, O., Batista, A., Millan, J., Andres-Delgado, L., Puertollano, R., Correas, I., and Alonso, M.A. (2008) *J. Exp. Med.* **205**, 3201-3213.
38. Andres-Delgado, L., Anton, O.M., Madrid, R., Byrne, J.A., and Alonso, M.A. (2010) *Blood*. **116**, 5919-5929.
39. Ramnarayanan, S.P., Cheng, C.A., Bastaki, M., and Tuma, P.L. (2007) *Mol. Biol. Cell.* **18**, 2707-2715.
40. Martín-Belmonte, F., Martínez-Menarguez, J.A., Aranda, J.F., Ballesta, J., de Marco, M.C., and Alonso, M.A. (2003) *J. Cell Biol.* **163**, 155-164.
41. Kim, T., Fiedler, K., Madison, D.L., Krueger, W.H., Pfeiffer, S.E. (1995) *J. Neurosci. Res.* **42**, 413-422.
42. Schaaeren-Wiemers, N., Bonnet, A., Erb, M., Erne, B., Bartsch, U., Kern, F., Mantei, N., Sherman, D., and Suter, U., *J. Cell Biol.* **166**, 731-742.
43. Martin-Belmonte, F., Puertollano, R., Millan, J., and Alonso, M.A. (2000) *Mol. Biol. Cell.* **11**, 2033-2045.
44. Takiar, V., Mistry, K., Carmosino, M., Schaaeren-Wiemers, N. and Caplan, M.J., (2012) *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **303**, C862-C871.
45. Ramnarayanan, S.P., and Tuma, P.L., (2011) *Biochem. J.* **439**, 497-504.
46. Martin-Belmonte, F., Kremer, L., Albar, J.P., Marazuela, M., and Alonso, M.A., (1998) *Endocrinology*. **139**, 2077-2084.
47. Millan, J., Puertollano, R., Fan, L., Rancaño, C., and Alonso, M.A., (1997) *Biochem. J.* **321**, 247-252.
48. Magal,L.G., Yaffe, Y., Shepshelovich, J., Aranda, J. F., de Marco, M.C., Gaus, K., Alonso, M.A., and Hirschberg, K., (2009) *Mol. Biol. Cell.* **20**, 3751-3762.
49. Ventimiglia, L.N., Fernandez-Martin, L., Martinez-Alonso, R., Anton, O.M., Guerra, M., Martinez-Menarguez, J.A., Andres, G., and Alonso, M.A., (2015) *J. Immunol.* **195**, 810-814.
50. Rumah, K.R., Ma, Y., Linden, J.R., Oo, M.L., Anrather, J., Schaaeren-Wiemers, N., Alonso, M.A., Fischetti, V.A., McClain, M.S., and Vartanian, T. (2015) *PLOS Pathogens*. **11**, e1004896.
51. Linden, J.R., Ma, Y., Zhao, B., Harris, J.M., Rumah, K.R., Schaaeren-Wiemers, N., and Vartanian, T. (2015) *mBio.* **6**, e02513-14.
52. Khalili, S., Jahangiri, A., Hashemi, Z.S., Khalesi, B., Mard-Soltani, M., and Amani, J., (2017) *Toxicol.* **127**, 90-99.
53. Momparler, R.L., (2003) *Oncogene*. **22**, 6479-6483.
54. Cao,W, Zhang, Z-Y., Xu, Q., Sun, Q., Yan, M., Zhang, J., Zhang, P., Han, Z., and Chen, W., (2010) *Mol. Cancer.* **9**, 296-309.
55. Mimori, K., Shiraiishi, T., Mashino, K., Sonoda, H., Yamashita, K., Yoshinaga, K., Masuda, T., Utsunomiya, T., Alonso, M.A., Inoue, H., and Mori, M., (2003) *Oncogene*, **22**,3463-3471.
56. Kazemi-Noureini, S., Colonna-Romano, S., Ziaee, Malboobi, M-A,Yazdanbod, M., Setayeshgar, P., and Maresca, B., (2004) *W.J.Gastroenterol.* **10**, 1716-1721.
57. Jin, Z., Wang, L., Zhang, Y., Cheng, Y., Gao, Y., Feng, X., Dong, M., Cao, Z., Chen, S., Yu, H., Zhao, Z., Zhang, X., Liu, J., Mori, Y., Fan, X., and Meltzer, S., (2013) *Sci. Rep.* **3**, 2838-2842.
58. Horne, H.N. Lee, P.S., Murphy, S.K., Alonso, M.A., Olson, J.A., Jr., and Marks, J.R., (2009) *Mol. Cancer Res.* **7**, 199-209.
59. Guerrero-preston, R., Hadar, T., Ostrow, K.L. Soudry, E., Echenique, M., Ili-Gangas, C., Pérez, G., Pérez, J., Brebi-Mieville, P., Deschamps, J., Morales, L., Bayona, M., Sidransky, D., and Matta, J., (2014) *Oncol. Rep.* **32**, 505-512.
60. Lind, G.E., Ahlquist, T., Kolberg, M., Berg, M., Eknæs, M., Alonso, M.A., Kallioniemi, A., Meling, G.I., Skotheim, R.I., Rognum, T.O., Thiis-Evensen, E., and Lothe, R.A., (2008) *J. Transl. Med.* **6**, 13-24.
61. Kalmár, A., Péterfia, B., Hollósi, P., Galamb, O., Spisák, S., Wichmann, B.,Bodor, A., Tóth, K., Patai, A.V., Valcz, G., Brigitta-Nagy, Z., Kubák, V., Tulassay, Z., Kovalszky, I., and Molnár, B., (2015) *BMC Cancer.* **15**, 736-750.
62. Buffart, T.E., Overmeer, R.M., Steenberg, R.D.M. Tijssen, M., van Grieken, N.C.T., Snijders, P.J.F., Grabsch, H.I., van de Velde, C.J.H., Carvalho, B., and Meijer, G.A. (2008) *Br. J. Cancer.* **99**, 1802-1807.
63. Hatta, M., Nagai, H., Okino, K., Onda, M., Yoneyama, M., Ohta, Y., Nakayama, H., Araki, T., and Emi, M., (2004) *J. Obstet. Gynecol. Res.* **30**, 53-58.
64. Kohno, T., Moriuchi,R., Katamine, S., Yamada, Y., Tomonaga, M., and Matsuyama, T., (2000) *Jpn. J. Cancer Res.* **91**, 1103-1110.
65. Hsi, E.D.,I Sup, S.J., Alemany, C., Tso, E., Skacel, M., Elson, P., Alonso, M.A., and Pohlman, B., (2006) *Am. J. Clin. Pathol.* **125**, 776-782.

66. Copie-Bergman, C., Gaulard, P., Maouche-Chretien, L., Briere, J., Haioun, C., Alonso, M.A., Romeo, P.H., and Leroy, K., (1999) *Blood*. 94, 3567-3575.
67. Tracey, L., Villuendas, R., Ortiz, P., Dopazo, A., Spiteri, I., Lombardia, L., Rodriguez-Peralto, J.L., Fernandez-Herrera, J., Hernandez, A., Fraga, J., Dominguez, O., Herrero, J., Alonso, M.A., Dopazo, J., and Piris, M.A., (2002) *Am. J. Pathol.* **161**, 1825-1837.
68. Berchuck, A., Iversen, E.S., Lancaster, J.M., Pittman, J., Luo, J., Lee, P., Murphy, P., Dressman, H.K., Febbo, P.G., West, M., Nevins, J.R. and Marks, J.R., (2005) *Clin. Cancer Res.* **11**, 3686-3696.
69. Lee, P.S., Teaberry, V.S., Bland, A.E., Huang, Z., Whitaker, R.S., Baba, T., Fujii, S., Alvarez Secord, A., Berchuck, A., and Murphy, S.K., (2010) *Int. J. Cancer.* **126**, 1378-1389.
70. Robbs, B.K., Cruz, A.L.S., Werneck, M.B.F., Mognol, G.P., and Viola, J.P.B., (2008) *Mol. Cell. Biol.* **28**, 7168-7181.
71. Lebrun, J-J., (2012) *ISRN Mol. Biol.* **2102**, 1-28.
72. Fanayan, S., Shehata, M., Agterof, A.P., McGuckin, M.A., Alonso, M.A., and Byrne, J.A., (2009) *BMC Cell Biology.* **10**, 7-22.
73. Kinlough, C.L., McMahan, R.J., Poland, P.A., Bruns, J.B., Harkleroad, K.L., Stremple, R.J., Kashlan, O.B., Weixel, K.M., Weisz, O.A., and Hughey, R.P. (2006) *J. Biol. Chem.* **281**, 12112-12122.
74. Kinlough, C.L., Poland, P.A., Gendler, S.J., Mattila, P.E. Mo, D., Weisz, O.A., and Hughey, R.P., (2011) *J. Biol. Chem.* **286**, 39072-39081.
75. Caduff, J., Sansano, S., Bonnet, A., Suter, U., and Schaeren-Wiemers, N., (2001) *Microsc. Res. Tech.* **52**, 645-655.



DR. ROBERTO LARA LEMUS

Es Médico Cirujano, Maestro y Doctor en Ciencias Biomédicas por la Facultad de Medicina de la UNAM. Realizó un posdoctorado en el Albert

Einstein College of Medicine, y en la Universidad de Michigan, Estados Unidos.

Es miembro de Sistema Nacional de Investigadores Nivel I. Además, es profesor de la asignatura de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Medicina, UNAM desde hace más de 25 años, así como tutor de pre y posgrado. A la fecha, sus publicaciones tiene más de 600 citas.

Actualmente, es Investigador en Ciencias Médicas en el Departamento de Investigación en Bioquímica del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias “Ismael Cosío Villegas”.

Sus áreas de interés son la regulación del tráfico intracelular de proteínas, el estrés del retículo endoplásmico y su relación con el cáncer.