



ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE MUC1 Y MUC4 EN LINEAS CELULARES EPITELIALES

Hernández Ortiz Abraham, Hernández Barrales Marisa, Reyes López Adrián, López Saucedo Adrián y Ayala Luján Jorge Luis.

Laboratorio de Patología y Diagnóstico Molecular
Unidad Académica de Ciencias Químicas
Universidad Autónoma de Zacatecas

INTRODUCCIÓN

Las mucinas (MUC's) son una familia de proteínas glicosiladas que se expresan en diferentes tipos de tejidos de tipo epitelial¹; estas glicoproteínas se clasifican en dos tipos, mucinas secretadas y mucinas transmembrana. Las MUC's transmembrana son glicoproteínas de alto peso molecular debido a que en el dominio extracelular existen de 20-125 repeticiones en tándem de 20 aminoácidos ricos en residuos de Serina, Treonina Prolina (dominio PTS); este dominio funciona como sitio de O- y N-glicosilación lo cual conlleva al incremento en el peso molecular de estas glicoproteínas²⁻⁶.

Las MUC's transmembrana han sido relacionadas con funciones celulares tales como la diferenciación y la señalización celular; las MUCs 1 y 4 han sido muy estudiadas y se ha demostrado que su participación es importante en rutas de señalización y proliferación celular^{5, 7-9}, esto debido a que tanto MUC1 como MUC4 son ligandos de diversos factores de crecimiento y pro-inflamatorios.

En estado normal, las MUCs 1 y 4 se localizan en la superficie apical de las células epiteliales y las cantidades de expresión difieren entre los distintos tipos de tejidos^{6, 10}. Sin embargo, la expresión de estas proteínas puede ser regulada por citoquinas de tipo inflamatorio como son el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), interferón gamma (IFN- γ) e interleucina-6 (IL-6)⁴. Por lo anterior, es posible que en procesos inflamatorios crónicos la expresión de las MUCs pudiera verse incrementada ocasionando de alguna manera una expresión "aberrante". De hecho, la expresión de las Mucinas es anormal en procesos cancerosos, ya que se ha observado la sobreexpresión y la pérdida de la polaridad^{5, 8, 11, 12}, es decir, ya no solo se localizan en la superficie apical de las células sino en todos los sitios; esta sobreexpresión podría incrementar la actividad de proliferación en las células cancerosas.

Estas características fisiológicas de las mucinas y su participación en procesos neoplásicos nos permiten proponer nuevas formas de tratamientos anti-proliferativos dirigidos hacia la modificación de la expresión de mucinas. Sin embargo, es necesario usar modelos de estudios de las mucinas *in vitro*; varios de esos métodos han sido descritos con anterioridad^{3, 13, 14}; sin embargo, carecen de información en cuanto a la comparación de expresión de MUC1 y MUC4 respectivamente, por lo que consideramos necesario desarrollar y estandarizar un método que sea factible para estudiar a las mucinas y sus relaciones con diversas sustancias. Para ello, evaluamos la expresión de las mucinas en tres tipos de líneas celulares como modelo experimental.



UAZ

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE
ZACATECAS
"Francisco García Salinas"

USCQ



UNIDAD ACADÉMICA DE CIENCIAS QUÍMICAS

FORMANDO
PROFESIONALES
DE LA QUÍMICAJORNADAS DE CIENCIAS
QUÍMICAS
FECHAS 2017
29 al 31 de Agosto

METODOLOGÍA

Líneas celulares. Células de las líneas Caco-2, origen de colon, SiHa y CasKi, de origen epitelial de cérvix, fueron cultivadas en cajas p100 en medio de cultivo DMEM 1X (Dulbecco's Modification Eagle's Medium with 4.5 g/L glucose, L-glutamine & sodium pyruvate) suplementado con 10% de Suero Fetal Bovino y penicilina/estreptomicina 1X (Gibco); adicionalmente, el medio de la línea Caco-2 se le añadió aminoácidos no esenciales (Non-Essential Amino Acids, Gibco 1X). Los cultivos fueron incubados a 37 °C y una atmósfera de CO₂ al 5% hasta que se observara confluencia superior al 85%.

Determinación de proteínas MUC1 y MUC4

Las mucinas 1 y 4 fueron detectadas aplicando las técnicas de inmunocitoquímica e inmunofluorescencia. Para el primer caso, las células fueron cosechadas de las cajas p100, lavadas y resuspendidas en D-PBS 1X, posteriormente se fijaron con la solución citofix. La solución celular fue homogenizada, 20 µL fueron transferidos y extendidos sobre un portaobjetos. Los portaobjetos se colocaron a 60°C por 10 min, pasado el tiempo se colocaron en Acetona a 4 °C por 10 min. Enseguida, las muestras fueron tratadas de acuerdo con las hojas técnicas de los respectivos anticuerpos para la determinación de MUC1 y MUC4. MUC1 fue detectado con los anticuerpos de ratón anti-MUC1 (BIOCARE®, cat. 901-319-020111); mientras que para MUC4, el anticuerpo MUC4 de ratón fue Clon 1G8 (INVITROGEN Lot No. 1574527 A). Para el revelado de la inmunocitoquímica se utilizó el KIT Starr Trek Universal HRP Detection System, Sodium Azide and Thimerosal Free, Detection Kit, Cat. 901-STUHRP700-090314. Las muestras fueron contrateñidas con el colorante de Hematoxilina, después fueron montadas con resina epoxica, finalmente se observaron en un microscopio recto Nikon 80i.

Para el caso de la inmunofluorescencia, las células de la línea Caco-2 se trataron de la misma manera que en la inmunocitoquímica, excepto que antes de agregar el anticuerpo primario, los portaobjetos que contenían las muestras se secaron a temperatura ambiente y fueron hidratados con Tween PBS (TPBS) al 0.1%. El anticuerpo primario se incubó en cámara húmeda por 1 h. Posteriormente, las muestras fueron lavadas dos veces con TPBS 0.1%; el anticuerpo secundario FITC-GOAT ANTI-MOUSE IgG, ZYMED® fue incubado en cámara húmeda en obscuridad por 30 min. Pasado el tiempo, las muestras fueron lavadas dos veces con TPBS 0.1% y las muestras fueron contrateñidas con DAPI para marcar el núcleo.

Por su parte, la inmunofluorescencia de las células de las líneas SiHa y CasKi, primeramente las células fueron cultivadas en lamilla Millicell de 8 pozos tratados previamente con poly-L-lisina al 0.01% para una mejor adherencia. Después de 48 horas de cultivo se les retiró el medio de cultivo, se lavaron con PBS y se fijaron con formaldehído-PBS al 3.7% por 5 minutos, después lavadas con PBS y tratadas con Acetona fría durante 10 minutos. Posteriormente se continuó con el mismo método que las células Caco-2.

FORMANDO
PROFESIONALES
DE LA QUÍMICA"UN PILAR DE CIENCIA Y
TECNOLOGÍA EN ZACATECAS"FECHAS 2017
29 al 31 de Agosto

Extracción de ARN y generación del ADN complementario

El ARN total fue extraído de las líneas celulares usando el kit Quick-RNA™ MiniPrep de ZYMO RESEARCH (cat. R1054S). Para ello, se utilizaron 600 µL de Buffer de Lisis, este fue agregado a las células de cada uno los cultivos, la mezcla fue homogenizada y transferida a los filtros como se indica en el protocolo de la hoja técnica indicados. Después de realizar el protocolo de extracción, la cantidad de ARN y la relación 280/260 fueron determinados mediante espectrofotometría utilizando el equipo Quawell UV spectrophotometer Q5000. Además, los extractos fueron sometidos a electroforesis en gel de agarosa al 0.9% en buffer TAE 1X y teñidos con Bromuro de Etidio.

El ADN complementario fue obtenido por medio de la reacción de Retrotranscriptasa reversa (RT) a partir del ARN extraído utilizando el kit AffinityScript™ Multi Temperature cDNA Synthesis de Agilent. En la primera etapa de alineamiento, para la reacción se utilizaron random primers y 1 µg de ARN en un volumen final de 15.7 µL la mezcla de reacción se incubó a 65 °C por 5 minutos seguido de 25 °C por 10 minutos. Para la etapa de la reacción con la RT, se agregó a la mezcla 2 µL de 10X Buffer Affinity Script, 0.8 µL de mix de dNTPs, 0.5 µL de RNasa Block Inhibit y 1 µL de enzima RT ajustando a un volumen fina de 20 µL. La RT se llevó a cabo en un termociclador Eppendorf Mastercycler gradient®, las condiciones de la reacción fueron: a) un ciclo a 25 °C por 10 min, 60 minutos a 55 °C y 15 minutos a 70°C por 15.

El ADN complementario de cada muestra fueron analizados mediante una PCR del gen de B-Actina; la amplificación se llevó a cabo mediante PCR punto final, los primers que se utilizaron fueron F 5'-CCTCGCCTTTGCCGATCC-3' y R 5'-GGATCTTCATGAGGTAGTCAGTC-3'. El volumen de la reacción fue de 25 µL, las condiciones fueron: i) desnaturalización a 95 °C 30 segundos; ii) Alineación a 60 °C 30 segundos y iii) extensión 72 °C 45 s. Los productos de las reacciones fueron sometidos a electroforesis en un gel de agarosa al 1% en TBE 1X y teñido con Bromuro de Etidio.

Cuantificación de transcritos de MUC1 y MUC4

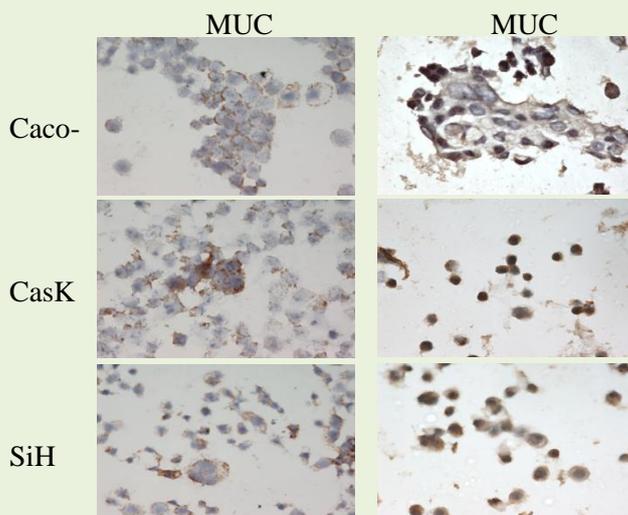
Los productos de la reacción de la RT fueron utilizados para realizar la cuantificación por qPCR para analizar los niveles de expresión de los transcritos de MUC1 y MUC4. Para ello se realizaron las siguientes reacciones utilizando 0.5 uL de Primers, 2 uL de solución ROX, 10 uL de Platinum SYBR Green qPCR Super Mix-UDG, 6.5 uL de H2O y 1 uL de producto de reacción de la RT. Se utilizaron diferentes juegos de primers, para realizar la normalización y como gene constitutivo se utilizó el gen GAPDH con los primers L 5'-AAGGTGAAGGTCGGAGTCAA-3' y R 5'-AATGAAGGGGTCATTGATGG-3', Los primers usados para MUC1 fueron L 5'-CAGTGCCCAGCTCTACTGAG-3' y R 5'-TGGGAATCTTCCAGAGAGGAA-3'. Los primers para MUC4 fueron L 5'-CTGTGTCTCTGCCTCCTTCC-3' y R 5'-AATGATGGTCTGGGAGGTTG-3'. El Termociclador de Tiempo Real Applied Biosystems® 7500 fast fue usado para llevar a cabo la qPCR, los parámetros de amplificación fueron: a) Holding 1, 50 °C; b) holding 2, 95 °C; c) ciclación 1, 95 °C y d) ciclación 2, 60 °C. La expresión de las mucinas fue normalizada de acuerdo con la ecuación $Exp.rel. MUCX = 2^{(CT(GAPDH) - CT(MUCx))}$;

además, las razones de expresiones de las mucinas fueron determinadas con la ecuación: $Fold \Delta CT MUC1 = \frac{Exp.rel.MUC1}{Exp.rel.MUC4}$.

RESULTADOS

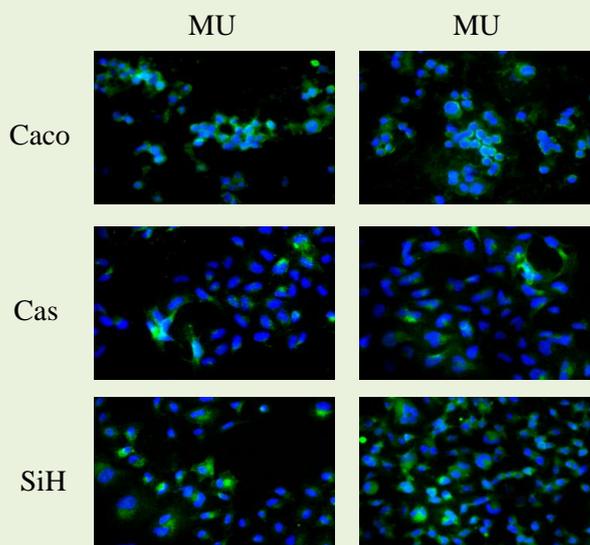
Las mucinas se expresan en diversos tejidos epiteliales, entre ellos epitelio de mama, colon y cérvix. Nuestros resultados nos indican que las MUC1 y MUC4 están expresadas en las células Caco-2, Caski y SiHa (figura 1). MUC1 se localiza en la membrana de las células mientras que MUC4 se observa tanto en citoplasma como en membrana. La expresión de Muc1 es mayor en la línea celular Caco-2 que en líneas celulares Caski y SiHa de acuerdo al análisis de las imágenes observadas en el microscopio; mientras que referente a MUC4, en las células CasKi se observa mayor señal de expresión que las células Caco-2. En la figura 2 se muestra la inmunofluorescencia método alternativo para la detección de las mucinas; el patrón de expresión de este método coincide con el resultado de la inmunocitoquímica de las tres líneas celular.

Figura 1



Inmunocitoquímica para la detección de MUC1 y MUC4 en las líneas celulares. La figura muestra fotografías tomadas de los ensayos de inmunocitoquímica de las células Caco-2, CasKi y SiHa utilizando anticuerpos específicos para MUC1 y MUC4. La señal de inmunodetección fue revelada con un kit de peroxidasa.

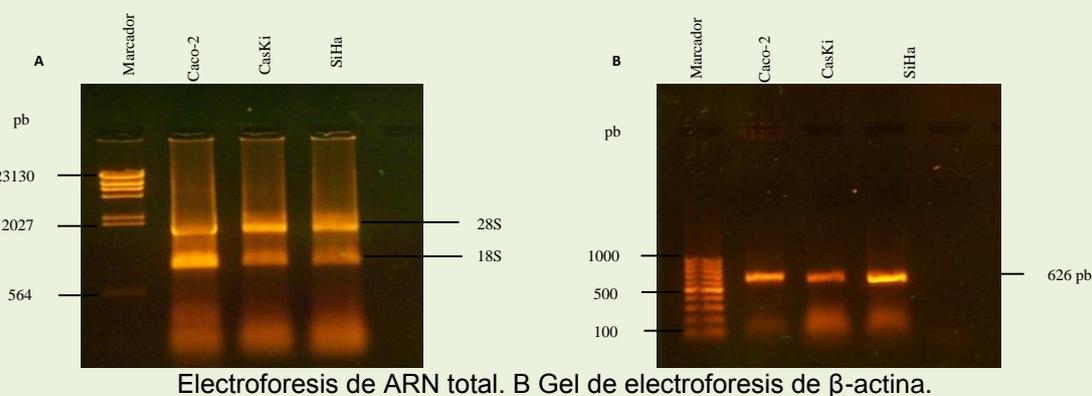
Figura 2



Inmunofluorescencia para detección de MUC1 y MUC4 en las líneas Caco-2, CasKi y SiHa. Las imágenes que se muestran son la combinación de las imágenes de FITC (color verde) y DAPI (color azul); el software imagej (<https://imagej.nih.gov/ij/index.html>) fue usado para hacer la combinación imágenes. Las fotos fueron tomadas con el Objetivo de 40X. Las fotografías corresponden a imágenes de microscopio tomadas a 60X.

La extracción de ARN total se logró en las tres líneas celulares con rendimientos de 371.13, 147.7 y 163.5 ng/mL para Caco-2, CasKi y SiHa. En la figura 3A se muestra el gel de ARN total, se pueden distinguir adecuadamente las bandas características del ARN ribosomal. En la figura 3B se muestra el gel de la amplificación del ADN complementario de β -globina. Por lo tanto, el ADN complementario cumple las características para ser amplificado por qPCR.

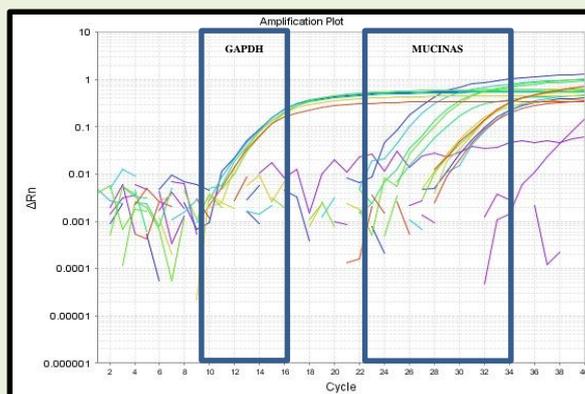
Figura 3

Electroforesis de ARN total. B Gel de electroforesis de β -actina.

El análisis por qPCR para la amplificación de las mucinas 1 y 4 mostro que en las tres líneas celulares analizadas son positivas (figura 4). Sin embargo, la relación de

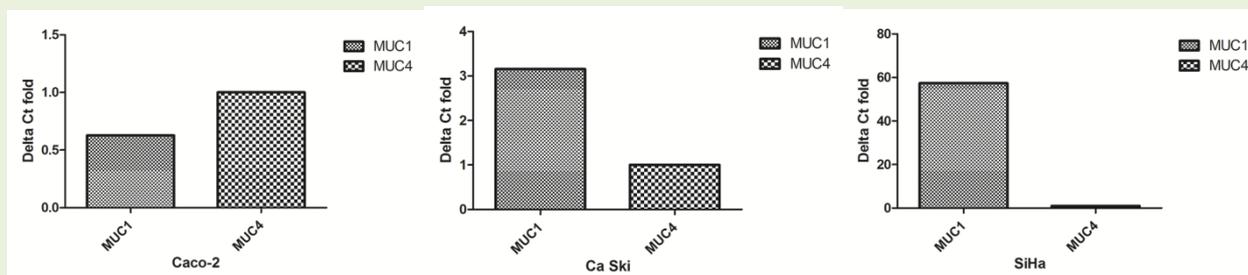
expresión de las mucinas entre las líneas celulares es diferente (figura 5); En la línea celular de Caco-2 las diferencias en los niveles de MUC1 y MUC4 son pequeñas en comparación con las líneas celulares Caski y SiHa, en las cuales, MUC1 presenta mayor expresión del transcriptoma que MUC4.

Figura 4



Curva de amplificación de los genes GAPDH, MUC1 y MUC4 en las distintas líneas celulares.

Figura 5



Niveles de expresión de MUC1 con respecto a MUC4. Niveles de expresión de MUC1 con respecto a MUC4 en cada una de las líneas celulares.

CONCLUSIONES

La expresión de las mucinas 1 y 4 es positiva en las tres líneas celulares analizadas, sin embargo, mediante inmucitoquímica e inmunofluorescencia se observó que MUC4 presenta mayor intensidad que MUC1 en todos los cultivos celulares. Por otro lado, los datos de expresión relativa nos sugiere que hay mayor producción de MUC1 que MUC4 en las líneas celulares de CaSki y SiHa; por lo anterior, consideramos que las líneas analizadas pueden servirnos como un buen modelo de investigación para las MUC's 1 y 4.



REFERENCIAS

1. Rakha, E. A.; Boyce, R. W.; Abd El-Rehim, D.; Kurien, T.; Green, A. R.; Paish, E. C.; Robertson, J. F.; Ellis, I. O., Expression of mucins (MUC1, MUC2, MUC3, MUC4, MUC5AC and MUC6) and their prognostic significance in human breast cancer. *Mod Pathol* 2005, 18 (10), 1295-304.
2. Gendler, S.; Taylor-Papadimitriou, J.; Duhig, T.; Rothbard, J.; Burchell, J., A highly immunogenic region of a human polymorphic epithelial mucin expressed by carcinomas is made up of tandem repeats. *Journal of Biological Chemistry* 1988, 263 (26), 12820-12823.
3. van Klinken, B. J.-W.; Oussoren, E.; Weenink, J.-J.; Strous, G. J.; Büller, H. A.; Dekker, J.; Einerhand, A. W. C., The human intestinal cell lines Caco-2 and LS174T as models to study cell-type specific mucin expression. *Glycoconjugate journal* 1996, 13 (5), 757-768.
4. Kufe, D. W., Mucins in cancer: function, prognosis and therapy. *Nature Reviews Cancer* 2009, 9 (12), 874-885.
5. Nath, S.; Mukherjee, P., MUC1: a multifaceted oncoprotein with a key role in cancer progression. *Trends in Molecular Medicine* 2014, 20 (6), 332-342.
6. Jonckheere, N.; Skrypek, N.; Frénois, F.; Van Seuningen, I., Membrane-bound mucin modular domains: From structure to function. *Biochimie* 2013, 95 (6), 1077-1086.
7. Bafna, S.; Kaur, S.; Batra, S. K., Membrane-bound mucins: the mechanistic basis for alterations in the growth and survival of cancer cells. *Oncogene* 2010, 29 (20), 2893-2904.
8. Chaturvedi, P.; Singh, A. P.; Batra, S. K., Structure, evolution, and biology of the MUC4 mucin. *The FASEB Journal* 2008, 22 (4), 966-981.
9. Carraway, K. L.; Theodoropoulos, G.; Kozloski, G. A.; Carothers Carraway, C. A., Muc4/MUC4 functions and regulation in cancer. *Future oncology* 2009, 5 (10), 1631-1640.
10. Andrianifahanana, M.; Moniaux, N.; Batra, S. K., Regulation of mucin expression: mechanistic aspects and implications for cancer and inflammatory diseases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer* 2006, 1765 (2), 189-222.
11. Horm, T. M.; Schroeder, J. A., MUC1 and metastatic cancer: expression, function and therapeutic targeting. *Cell adhesion & migration* 2013, 7 (2), 187-198.
12. Togami, S.; Nomoto, M.; Higashi, M.; Goto, M.; Yonezawa, S.; Tsuji, T.; Batra, S. K.; Douchi, T., Expression of mucin antigens (MUC1 and MUC16) as a prognostic factor for mucinous adenocarcinoma of the uterine cervix. *Journal of Obstetrics and Gynaecology Research* 2010, 36 (3), 588-597.
13. Tréhoux, S.; Lahdaoui, F.; Delpu, Y.; Renaud, F.; Leteurtre, E.; Torrisani, J.; Jonckheere, N.; Van Seuningen, I., Micro-RNAs miR-29a and miR-330-5p function as tumor suppressors by targeting the MUC1 mucin in pancreatic cancer cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 2015, 1853 (10, Part A), 2392-2403.
14. Liao, G.; Wang, M.; Ou, Y.; Zhao, Y., IGF-1-induced epithelial-mesenchymal transition in MCF-7 cells is mediated by MUC1. *Cellular signalling* 2014, 26 (10), 2131-2137.



UAZ

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE
ZACATECAS
Francisco García Salinas

USCQ



UNIDAD ACADÉMICA DE CIENCIAS QUÍMICAS



FORMANDO
PROFESIONALES
DE
LA QUÍMICA

"UN PILAR DE CIENCIA Y
TECNOLOGÍA EN ZACATECAS"



X
JORNADAS DE CIENCIAS
QUÍMICAS

FECHAS 2017
29 al 31 de Agosto