39. s. V 3



Universidad \mathfrak{N} acional de \mathfrak{L} a \mathcal{P} lata

FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS



TESIS DOCTORAL



STUDIO DEL ROL FUNCIONAL DELGENRHBDD2ENLÍNEASCELULARES DE CÁNCER DE MAMA

LIC. ROMINA CANZONERI

Director: Dr. Martín Carlos *P*BBA

Co-directora: Dra. María Virginia Croce

Centro de Investigaciones Inmunológicas Básicas y Aplicadas Facultad de Ciencias Médicas – UNLP

LA **P**LATA, **2016**



A mis padres por su esfuerzo y su apoyo incondicional y a mi hermano por su aliento constante. Gracias.

- A las instituciones que me brindaron el espacio de trabajo para el desarrollo de esta tesis doctoral, la Facultad de Ciencias Médicas y el Centro de Investigaciones Inmunológicas Básicas y Aplicadas de la Universidad Nacional de La Plata.
- Muy especialmente a mi director el Dr. Martín Carlos Abba por su confianza al momento de tomarme bajo su tutela, por su dedicación y su guía constante durante el desarrollo de esta tesis doctoral y mi formación como profesional de la ciencia.
- C3 A mi co-directora la Dra. María Virginia Croce por sus enseñanzas y su acompañamiento en el desarrollo de este trabajo.
- A mis compañeros de laboratorio el Dr. Ezequiel Lacunza, la Dra. Marina Isla Larrain y el Dr. Martín Rabassa por su paciencia al momento de enseñarme y aconsejarme en las actividades de laboratorio incluidas en este trabajo de tesis.
- Y a todos aquellos que de un modo u otro me acompañaron en el transcurso de estos años escuchándome hablar de "Rombo", técnicas y problemas de laboratorio, sobre resultados, hipótesis y conclusiones (entendieran o no de lo que estaba hablando) y así y todo me tuvieron paciencia: familia, amigos y compañeros de trabajo.



Resumen	1
Øbstract	2
Abreviaturas	3
Capítulo 1. Introducción	4
1.1 Anatomía y fisiología de la glándula mamaria humana normal	5
1.2 Epidemiología del cáncer de mama	7
1.3 Etiología del cáncer de mama	9
1.4 Factores de riesgo asociados al desarrollo y la evolución del cáncer de mama	11
1.5 Progresión y clasificación histológica del cáncer de mama	14
1.6 Clasificación genómica de los carcinomas ductales infiltrantes	15
1.7 Genes de la superfamilia Romboide	17
1.8 El gen <i>RHBDD2</i> en el cáncer de mama	22
1.9 Objetivos	25
Capítulo 2. Materiales y métodos	26
2.1 Muestras de tejidos mamarios humanos normales y neoplásicos	27
2.2 Cultivo de líneas celulares humanas y de ratón	27
2.2.1 Líneas celulares humanas de cáncer de mama	27
2.2.2 Modelo de diferenciación celular de glándula mamaria "normal" de ratón	28
2.3 Análisis de la expresión del ARNm de RHBDD2 y genes asociados	30
2.3.1 Aislamiento de ARN a partir de líneas celulares y muestras tisulares	30
2.3.2 Determinación de la cantidad y calidad del ARN total aislado	31
2.3.3 Retrotranscripción del ARNm	31
2.3.4 Reacción en cadena de la polimerasa Cuantitativa en Tiempo Real	32
2.3.5 Estudio de las variantes de empalme de RHBDD2	34
2.3.6 Visualización de los productos de RT-PCR mediante electroforesis en geles	36
de agarosa y de pollacrilamida	27
2.7 Ansiannento, purificación y anansis de proteínas	57

2.4.1 Aislamiento de proteínas a partir de líneas celulares y muestras tisulares	37
2.4.2 Análisis de la expresión proteica de RHBDD2 mediante Western-blot	37
2.4.3 Inmunohistoquímica sobre muestras de tejidos mamarios humanos	38
2.5 Localización subcelular de RHBDD2 mediante microscopía confocal de	20
fluorescencia	39
2.6 Silenciamiento de la expresión de RHBDD2 en líneas celulares de cáncer de	41
mama	41
2.6.1 Estrategia de silenciamiento post-transcripcional de RHBDD2	41
2.6.2 Análisis de los perfiles de expresión asociados a RHBDD2 mediante	40
microarreglos de oligonucleótidos	42
2.6.3 Ensayos de proliferación celular y cierre de la herida	45
2.6.4 Ensayo de adhesión celular a la matriz extracelular	45
2.7 Ensayo de privación nutricional	46
2.8 Análisis bioinformático de la expresión de RHBDD2	47
Capítulo 3 Resultados	49
	77
3.1 Expresión de los genes de la superfamilia Romboide en muestras tisulares	T)
 3.1 Expresión de los genes de la superfamilia Romboide en muestras tisulares normales y de carcinomas mamarios 	50
 3.1 Expresión de los genes de la superfamilia Romboide en muestras tisulares normales y de carcinomas mamarios 3.2 Análisis de las variantes de empalme alternativo de <i>RHBDD2</i> 	50 55
 3.1 Expresión de los genes de la superfamilia Romboide en muestras tisulares normales y de carcinomas mamarios 3.2 Análisis de las variantes de empalme alternativo de <i>RHBDD2</i> 3.3 Análisis de las isoformas proteicas de RHBDD2 	50 55 61
 3.1 Expresión de los genes de la superfamilia Romboide en muestras tisulares normales y de carcinomas mamarios 3.2 Análisis de las variantes de empalme alternativo de <i>RHBDD2</i> 3.3 Análisis de las isoformas proteicas de RHBDD2 3.4 Localización subcelular de RHBDD2 mediante inmunocitoquímica 	50 55 61 64
 3.1 Expresión de los genes de la superfamilia Romboide en muestras tisulares normales y de carcinomas mamarios 3.2 Análisis de las variantes de empalme alternativo de <i>RHBDD2</i> 3.3 Análisis de las isoformas proteicas de RHBDD2 3.4 Localización subcelular de RHBDD2 mediante inmunocitoquímica 3.5 Análisis de la expresión proteica de RHBDD2 mediante inmunohistoquímica 	50 55 61 64 66
 3.1 Expresión de los genes de la superfamilia Romboide en muestras tisulares normales y de carcinomas mamarios 3.2 Análisis de las variantes de empalme alternativo de <i>RHBDD2</i> 3.3 Análisis de las isoformas proteicas de RHBDD2 3.4 Localización subcelular de RHBDD2 mediante inmunocitoquímica 3.5 Análisis de la expresión proteica de RHBDD2 mediante inmunohistoquímica 3.6 Silenciamiento de la expresión de <i>RHBDD2</i> en líneas celulares de cáncer de 	50 55 61 64 66
 3.1 Expresión de los genes de la superfamilia Romboide en muestras tisulares normales y de carcinomas mamarios 3.2 Análisis de las variantes de empalme alternativo de <i>RHBDD2</i> 3.3 Análisis de las isoformas proteicas de RHBDD2 3.4 Localización subcelular de RHBDD2 mediante inmunocitoquímica 3.5 Análisis de la expresión proteica de RHBDD2 mediante inmunohistoquímica 3.6 Silenciamiento de la expresión de <i>RHBDD2</i> en líneas celulares de cáncer de mama 	50 55 61 64 66 69
 3.1 Expresión de los genes de la superfamilia Romboide en muestras tisulares normales y de carcinomas mamarios 3.2 Análisis de las variantes de empalme alternativo de <i>RHBDD2</i> 3.3 Análisis de las isoformas proteicas de RHBDD2 3.4 Localización subcelular de RHBDD2 mediante inmunocitoquímica 3.5 Análisis de la expresión proteica de RHBDD2 mediante inmunohistoquímica 3.6 Silenciamiento de la expresión de <i>RHBDD2</i> en líneas celulares de cáncer de mama 3.6.1 Análisis del transcriptoma de líneas celulares de cáncer de mama en 	50 55 61 64 66 69
 3.1 Expresión de los genes de la superfamilia Romboide en muestras tisulares normales y de carcinomas mamarios 3.2 Análisis de las variantes de empalme alternativo de <i>RHBDD2</i> 3.3 Análisis de las isoformas proteicas de RHBDD2 3.4 Localización subcelular de RHBDD2 mediante inmunocitoquímica 3.5 Análisis de la expresión proteica de RHBDD2 mediante inmunohistoquímica 3.6 Silenciamiento de la expresión de <i>RHBDD2</i> en líneas celulares de cáncer de mama 3.6.1 Análisis del transcriptoma de líneas celulares de cáncer de mama en relación al silenciamiento de <i>RHBDD2</i> 	50 55 61 64 66 69 70
 3.1 Expresión de los genes de la superfamilia Romboide en muestras tisulares normales y de carcinomas mamarios 3.2 Análisis de las variantes de empalme alternativo de <i>RHBDD2</i> 3.3 Análisis de las isoformas proteicas de RHBDD2 3.4 Localización subcelular de RHBDD2 mediante inmunocitoquímica 3.5 Análisis de la expresión proteica de RHBDD2 mediante inmunohistoquímica 3.6 Silenciamiento de la expresión de <i>RHBDD2</i> en líneas celulares de cáncer de mama 3.6.1 Análisis del transcriptoma de líneas celulares de cáncer de mama en relación al silenciamiento de <i>RHBDD2</i> 3.6.2 Ensayos de proliferación y adhesión celular 	50 55 61 64 66 69 70 73
 3.1 Expresión de los genes de la superfamilia Romboide en muestras tisulares normales y de carcinomas mamarios 3.2 Análisis de las variantes de empalme alternativo de <i>RHBDD2</i> 3.3 Análisis de las isoformas proteicas de RHBDD2 3.4 Localización subcelular de RHBDD2 mediante inmunocitoquímica 3.5 Análisis de la expresión proteica de RHBDD2 mediante inmunohistoquímica 3.6 Silenciamiento de la expresión de <i>RHBDD2</i> en líneas celulares de cáncer de mama 3.6.1 Análisis del transcriptoma de líneas celulares de cáncer de mama 3.6.2 Ensayos de proliferación y adhesión celular 3.7 Ensayo de privación nutricional de glucosa 	50 55 61 64 66 69 70 73 75
 3.1 Expresión de los genes de la superfamilia Romboide en muestras tisulares normales y de carcinomas mamarios 3.2 Análisis de las variantes de empalme alternativo de <i>RHBDD2</i> 3.3 Análisis de las isoformas proteicas de RHBDD2 3.4 Localización subcelular de RHBDD2 mediante inmunocitoquímica 3.5 Análisis de la expresión proteica de RHBDD2 mediante inmunohistoquímica 3.6 Silenciamiento de la expresión de <i>RHBDD2</i> en líneas celulares de cáncer de mama 3.6.1 Análisis del transcriptoma de líneas celulares de cáncer de mama en relación al silenciamiento de <i>RHBDD2</i> 3.6.2 Ensayos de proliferación y adhesión celular 3.7 Ensayo de privación nutricional de glucosa 3.8 Análisis de la expresión de <i>Rhbdd2</i> en un modelo mamario murino de 	50 55 61 64 66 69 70 73 75

Capítulo 4. Discusión	80
4.1 <i>RHBDD2</i> se sobreexpresa en carcinomas ductales infiltrantes de mama del subtipo Luminal B	81
4.2 <i>RHBDD2</i> posee dos variantes transcripcionales diferencialmente expresadas entre los carcinomas infiltrantes y los tejidos mamarios normales	84
4.3 <i>RHBDD2</i> está involucrado en los procesos de proliferación y diferenciación celular	93
Conclusiones	96
Bibliografía	97

Resumen

La superfamilia Romboide reúne un conjunto de genes que codifican para proteínas de transmembrana multipaso que se encuentran conservadas evolutivamente en todas las ramas del árbol filogenético. Estas proteínas se agrupan según su función en: serina-proteasas y pseudoproteasas. En los seres humanos se reconocen 14 genes romboides, los cuales se encuentran involucrados en diversos procesos biológicos tales como: respuesta al estrés del retículo endoplasmático, apoptosis, proliferación y migración celular. Además, han sido asociados con diversas patologías humanas como la enfermedad de Parkinson, la artritis reumatoidea y las neoplasias malignas.

El presente trabajo se centró en el estudio de *Rhomboid domain containing 2 (RHBDD2)* a nivel génico, transcripcional y proteico, y su rol en el cáncer de mama. Para ello, se analizó su expresión a nivel transcripcional/proteica y se realizaron ensayos de silenciamiento post-transcripcional de *RHBDD2* para determinar su rol funcional. Se emplearon líneas celulares de cáncer de mama, muestras de tejidos mamarios normales y neoplásicos malignos, así como un modelo de diferenciación celular de la glándula mamaria de ratón.

Se demostró que *RHBDD2* se sobreexpresa en carcinomas ductales infiltrantes humanos, tanto a nivel transcripcional como proteico (p<0,05), principalmente en el subtipo Luminal B de cáncer de mama (p=0,007). Su alta expresión se encontró asociada con estadíos avanzados de la enfermedad (p<0,05) y con la ausencia del receptor de progesterona (p=0,002). Además, se determinó que RHBDD2 se localiza en el aparato de Golgi en líneas celulares de cáncer de mama (Coef. de Pearson > 0,7).

Por otra parte, se comprobó que el gen *RHBDD2* codifica para dos variantes transcripcionales: la variante 1 (exones: I, III, IV, V) y la variante 2 (exones: I, II, III, IV, V) así como sus respectivos productos proteicos. Por su parte la variante 2 se expresa con mayor frecuencia y cantidad en los carcinomas mamarios respecto a los tejidos mamarios normales (p<0,05), encontrándose asociado a un pronóstico desfavorable de la enfermedad.

Finalmente, el análisis de los datos de microarreglos de expresión génica diferencial en respuesta al silenciamiento de *RHBDD2* así como los ensayos *in vitro* sobre líneas celulares humanas y murinas, sugirieron que *RHBDD2* se encontraría involucrado en los procesos de proliferación y diferenciación celular.

P BSTRACT

The Rhomboid superfamily comprises genes which codify for multipass transmembrane proteins that can be classified as serine-proteases and pseudoproteasas. These proteins have been evolutionarily conserved and spread in all branches of the phylogenetic tree, from bacteria to mammals. In humans, 14 Rhomboid genes are recognized, which are involved in diverse biological processes such as response to endoplasmic reticulum stress, apoptosis, cell proliferation and migration, among others. Besides, the rhomboids have been related to the pathogenesis of Parkinson's disease, rheumatoid arthritis and cancer.

This study focused on the characterization of *Rhomboid domain containing 2* (*RHBDD2*) at transcriptional and protein levels in breast cancer. For the understanding of *RHBDD2* biology, several assays were performed involving analysis of gene organization, assessment of mRNA and protein expression, post-transcriptional *RHBDD2* silencing and cell function tests in response to silencing, among others. This research was performed in human breast cancer cell lines, malignant neoplastic and normal mammary human tissue samples, and a normal mouse mammary gland-cell differentiation model.

The results showed that *RHBDD2* is overexpressed in breast invasive ductal carcinomas at mRNA and protein level (p<0.05). Its overexpression was associated to the Luminal B breast cancer intrinsic subtype (p=0.007), in relation to advanced disease (stage III) (p<0.05) and associated to negative progesterone receptor status (p=0.002). RHBDD2 was found to be main located in the Golgi apparatus (coef. Pearson>0.7).

Moreover, it was demonstrated that *RHBDD2* encodes two transcriptional splicing variants: variant 1 (exons: I, III, IV, V) and variant 2 (exons: I, II, IV, V), and their respective protein isoforms. The transcriptional variant 2 is overexpressed in breast carcinomas regarding to normal tissues (p<0.05). Breast cancer patients who express high levels of this splicing variant showed poor overall survival (p<0.05).

Gene expression profiling analysis of breast cancer cells under *RHBDD2* abrogation demonstrated that this gene could be involved with the modulation of proliferation and differentiation processes. Therefore, this study proved that *RHBDD2* contributes to breast cancer malignancy promoting cell proliferation. Moreover, it settled the subcellular localization of RHBDD2 in human mammary cells, and the occurrence and differential expression of *RHBDD2* splicing variants (and their protein isoforms) in human malignant and normal mammary tissues.



- aa: aminoácidos
- ADNc: ADN copia
- **ARNm**: ARN mensajero
- ARNr: ARN ribosómico
- ARNsi: ARN pequeño de interferencia
- BSA: bovine serum albumin, en español: albúmina sérica bovina
- CANX: Calnexina
- CDI: carcinoma ductal infiltrante; (CDIs: carcinomas ductales infiltrantes)
- EGF: epidermal growth factor, en español: factor de crecimiento epidérmico
- EGFR: epidermal growth factor receptor, en español: receptor del factor de crecimiento epidérmico
- GalNacT3: N-acetilgalactosamina transferasa 3
- Golgi: aparato de Golgi
- GPCR: G protein-coupled receptor; en español: receptor acoplado a proteína G.
- HER2/ERBB2: receptor tirosina quinasa 2 (erb-b2) del EGF.
- IHQ: inumohistoquímica
- IRES: sitios internos de acceso para ribosomas, en inglés: internal ribosomes entry sites
- MEC: matriz extracelular
- M-MEC: moléculas de la matriz extracelular
- nt: nucleótidos
- ORFs: open reading frames, en español: marcos de lectura abiertos
- **pb**: pares de bases
- PBS: phosphate buffer solution, en español: solución tampón fosfato
- PCR: polymerase chain reaction, en español: reacción en cadena de la polimerasa
- **PRL**: prolactina
- **RE**: receptor de estrógeno
- ret. end.: retículo endoplasmático
- **RHBDD2:** romboid domain containing 2
- **RNasas**: ribonucleasas
- **RP**: receptor de progesterona
- RT-PCR: real time polymerase chain reaction, en español: reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real
- **Tn**: antígeno Tn
- uORFs: upstream open reading frames, en español: marcos de lectura abiertos corriente arriba



ରେ 4 ୧୦୫

1.1 Anatomía y fisiología de la glándula mamaria humana normal

Las mamas son glándulas sudoríparas modificadas que producen leche. Cada glándula mamaria está compuesta por 15 a 20 lóbulos irregulares de glándulas túbulo-alveolares ramificadas, separados por tejido conjuntivo fibroso y una cantidad variable de tejido adiposo. Cada lóbulo, a su vez, está dividido en múltiples lobulillos localizados en el extremo más profundo del sistema de ductos. Estos lobulillos están conformados por agrupaciones de ductos terminales de extremos ciegos, llamados acinos, que están incluidas en tejido conectivo laxo rico en capilares¹ (Figura 1).

La mayoría de los carcinomas de mama se originan en lo que se conoce como unidad

ductal-lobular terminal (UDLT)^{2, 3}. La unidad ductal-lobular terminal presenta dos tipos celulares epiteliales: 1- las internas o células luminales, potenciales células secretoras de leche, rodeadas por 2- una capa externa basal de células mioepiteliales contráctiles^{2, 3} (Figura 1). Las células luminales se caracterizan por la expresión de las citoqueratinas específicas KRT8 y KRT18, mientras que las células mioepiteliales expresan las citoqueratinas basales KRT5 y KRT14, junto con la caderina P y las proteínas contráctiles del músculo liso⁴. Además de las células luminales y mioepiteliales, se ha hallado evidencia que sustenta la presencia de células basales (presuntas progenitoras de las células mioepiteliales) y de células madre en la $UDLT^2$.

Los principales conductos colectores (los



Figura 1. Estructura e histología de la glándula mamaria.

conductos galactóforos) están cubiertos por un epitelio estratificado plano, cerca de la abertura en el pezón. Cada conducto galactóforo presenta una porción dilatada conocida como seno galactóforo, a una corta distancia desde la superfície del pezón, donde el recubrimiento epitelial muestra una transición de dos capas a un epitelio cúbico¹. En el resto del sistema de ductos y acinos el epitelio consiste en una capa de células luminales cúbicas y una capa basal de células mioepiteliales¹.

Las funciones de la glándula mamaria son la síntesis y secreción de leche. Estas funciones conocidas como "lactancia" se asocian al embarazo y al parto. La secreción de leche es estimulada por la hormona prolactina, la cual es secretada por la adenohipófisis, conjuntamente con la progesterona y los estrógenos. La liberación de la leche es estimulada por la oxitocina, liberada a su vez por la neurohipófisis, en respuesta a la succión del pezón de la madre por parte del lactante (amamantamiento)⁵.

La glándula mamaria sufre una serie de cambios durante el desarrollo, los más importantes ocurren al iniciar la etapa reproductiva y durante cada ciclo menstrual. En la primera mitad de la fase folicular los lóbulos se encuentran relativamente quiescentes. Luego de la ovulación en respuesta al aumento de los niveles de estrógeno y progesterona, se incrementa la proliferación celular y, por lo tanto, el número de acinos por lóbulo. Acompaña a la proliferación celular, la vacuolización de las células epiteliales basales y un marcado edema del estroma lobular. La disminución de los niveles de estrógeno y progesterona durante la menstruación provocan una respuesta a nivel de las mamas que comprende: apoptosis de las células epiteliales en los lóbulos, desaparición del edema en el estroma lobular, infiltración linfocitaria y una completa regresión del tamaño de los lóbulos¹.

Durante el embarazo las mamas alcanzan su maduración total a nivel morfológico y funcional. De cada conducto terminal surgen numerosas glándulas secretoras formando estructuras como un racimo de uvas y el estroma entre lóbulos se reduce al punto de que la mama está compuesta casi completamente de lóbulos. Hacia el tercer trimestre del embarazo las células cúbicas en los acinos comienzan a generar vacuolas secretoras de lípidos, e inmediatamente luego de dar a luz comienza la secreción de leche¹.

Al finalizar la lactancia los lóbulos sufren un proceso de regresión y atrofia, observándose una reducción considerable del tamaño total de la mama. Sin embargo, la regresión de la glándula mamaria no es completa ya que durante el proceso de regresión quedan lóbulos residuales¹.

Luego de la tercera década de vida los ductos y lóbulos sufren una mayor atrofia caracterizada por la reducción del espacio intralobular y del estroma circundante, al punto de que los acinos pueden desaparecer por completo quedando solo los ductos. A pesar de ello se ha observado, incluso en mujeres de edad avanzada, que existe suficiente estrógeno (de origen adrenal o de la grasa corporal) para mantener lóbulos remanentes¹.

Durante las etapas de diferenciación y regresión de la glándula mamaria pueden ocurrir alteraciones en la proliferación y apoptosis celular. Esto puede resultar en la aparición de lesiones benignas tales como: la hiperplasia, la adenosis esclerosante y los pequeños papilomas ductales; en algunos casos podría ocurrir la progresión al cáncer de mama⁶.

1.2 Epidemiología del cáncer de mama

El cáncer de mama es un problema de salud a nivel mundial, ya que es la principal causa de muerte por cáncer en las mujeres. Se estima que se producen alrededor de 1.200.000 casos nuevos por año y más de 500.000 muertes en ese mismo período de tiempo⁷. La incidencia y la mortalidad por cáncer de mama varían ampliamente según la región, tanto a nivel mundial como dentro del continente americano.

Según el reporte de la IARC 2012 (Agencia Internacional de Investigación en Cáncer, Organización Mundial de la Salud, <u>www.globocan.iarc.fr</u>), la tasa de incidencia del cáncer de mama (nuevos casos por cada 100.000 mujeres) varió entre 11,9 y 98,9 en el continente americano (para los países de Guatemala y Bahamas, respectivamente)⁸. En la República Argentina se registró una tasa de incidencia de cáncer de mama estimada en 71,2 lo que la ubicaba en 5^{to} lugar entre los países americanos, seguida en 6^{to} lugar por Uruguay cuya tasa de incidencia de cáncer de mama fue del 69,8.

En cuanto a la mortalidad, la Argentina presentó una tasa estimada en 19,9, ubicándose en 6^{to} lugar por debajo de Uruguay que se situó en el tercero con una tasa de mortalidad estimada en 22,7 (Figura 2)⁸.

Las tasas de prevalencia de cáncer de mama (a 5 años, cada 100.000 mujeres) ubicaron en el 1^{er} lugar a los Estados Unidos con una tasa de 753,6, en 2^{do} lugar a Canadá con una tasa de prevalencia estimada en 666,8, a Uruguay en el 3^{er} puesto cuya tasa fue de 461,4; y muy cercano a éste último, en 4^{ta} posición, a la Argentina con una tasa de prevalencia de cáncer de mama que fue estimada en 426,5 (Figura 2)⁸.



Figura 2. Tasas estimadas de incidencia, mortalidad y prevalencia de cáncer de mama en mujeres en Sudamérica para el año 2012. Datos extraídos de GLOBOCAN 2012, IARC, OMS. Los valores se presentan como el número de casos cada 100.000 mujeres.

Acorde a los datos oficiales presentados por el Instituto Nacional del Cáncer de nuestro país, en la Argentina la tasa de mortalidad por cáncer de mama es similar a la de enfermedades altamente prevalentes como la diabetes. Además, entre las muertes de mujeres por neoplasias malignas, el cáncer de mama ocupa el primer lugar con un 20,3%, seguido en segundo lugar por el cáncer colorectal (11,2%) y en tercer lugar por el cáncer de pulmón (8,6%)⁹.

Según el informe de final de julio del 2010 "Cáncer de mama en la Argentina: organización, cobertura y calidad de las acciones de prevención y control", se registran anualmente unos 5.400 casos de muertes de mujeres por cáncer de mama y se diagnostican 17.000 casos nuevos cada año. La mortalidad se distribuye de forma heterogénea en nuestro país, calculándose para el período de los años 2003-2007, una tasa de mortalidad total para el país de 22,4 (casos cada 100.000 mujeres). En este período de tiempo, la Ciudad de Buenos Aires y la región de Cuyo fueron las que presentaron las tasas de mortalidad más altas del país, correspondientes al 28 y 24,1, respectivamente⁹ (Figura 3).

En cuanto a la distribución de la mortalidad por rangos de edad; el 52% de las defunciones ocurrieron en mujeres entre los 50 y 74 años, observándose que los valores ascendieron marcadamente a partir de los 40 años (>15% de muertes), siendo la mortalidad a los 60 años mayor al 70%.

Debido a que el cáncer de mama es una enfermedad difícilmente prevenible, los esfuerzos para lograr el control de la enfermedad deben centrarse en la detección precoz, el correcto

diagnóstico y la implementación de tratamientos adecuados, a fin de disminuir la incidencia y mortalidad de esta enfermedad en nuestra población.



Figura 3. Tasa de mortalidad en mujeres en la Argentina según regiones, período 2003-2007 (casos/100.000 mujeres). Extraído y modificado de Viniegra *el al.*, 2010⁹.

1.3 Etiología del cáncer de mama

El cáncer es una enfermedad que comprende eventos de microevolución a nivel celular. Una célula normal evoluciona a un estado neoplásico adquiriendo progresivamente determinadas características que le permiten volverse tumorigénica y finalmente maligna.

Según Hanahan y Weinberg (2011)¹⁰ existen ocho características distintivas del cáncer que permitirían definir el desarrollo de las neoplasias, su crecimiento y diseminación en el organismo, las cuales se presentan a continuación en la Tabla1.

Tabla 1. Características de las células tumorales que promueven el desarrollo del cáncer. Extraído de Hanahan y Weinberg, 2011¹⁰.

- **1.** *Capacidad proliferativa ilimitada.* Desregulación de las señales promotoras del crecimiento, la proliferación y el ciclo celular.
- 2. *Resistencia a la muerte celular*. Promoción de la supervivencia celular por inhibición de la apoptosis y/o estimulación de la autofagia y la senescencia celular.
- 3. *Evasión de los mecanismos supresores de la proliferación celular*. Pérdida de función de los genes supresores de tumores que controlan el crecimiento sostenido y la proliferación celular.
- **4.** *Capacidad replicativa ilimitada.* Las células se vuelven inmortales adquiriendo la capacidad de replicarse ilimitadamente por desregulación de la actividad de la telomerasa y el mantenimiento de la longitud de los telómeros.
- **5.** *Reprogramación del metabolismo energético celular*. La célula tumoral genera energía mediante la glicólisis anaeróbica, caracterizada por glicólisis sin procesamiento del piruvato en el ciclo de Krebs (efecto Warburg). Los intermediarios glicolíticos son utilizados para la generación de nucleósidos y aminoácidos necesarios para la proliferación celular.
- *6. Angiogénesis.* Neovascularización que permite el acceso a nutrientes, oxígeno y la evacuación de residuos metabólicos y dióxido de carbono de las células tumorales, permitiendo su supervivencia y proliferación.
- 7. *Evasión del sistema inmune*. Las células tumorales desarrollan estrategias para evadir su detección y destrucción por parte del sistema inmune. Además, reclutan células inmunosupresoras que limitan la acción de los linfocitos citotóxicos y/o aprovechan las señales de proliferación celular generadas por las células del infiltrado inmune.
- **8.** *Capacidad de invasión tisular y metastásica*. La célula activa los programas celulares relacionados con la transición epitelial-mesenquimal. Dicho proceso facilitaría la diseminación regional y distal de las células del tumor primario. Luego, la reversión del proceso permitiría la colonización de nuevos sitios para la proliferación y crecimiento del tumor secundario.

Debe tenerse en cuenta que los tumores no están compuestos únicamente por células tumorales, sino que incluyen varios tipos celulares que participan activamente en la progresión del tumor interactuando entre sí y con las células neoplásicas. Entre ellos se pueden mencionar a las *células madre tumorales* (inician los tumores y dirigen la progresión tumoral, confieren resistencia a quimioterápicos), las *células endoteliales y* los *pericitos* (angiogénesis y mantenimiento de los tumores), las *células del sistema inmunitario* (actúan tanto frenando como promoviendo el desarrollo tumoral), los *fibroblastos asociados al cáncer* (células similares a fibroblastos y miofibroblastos que contribuyen en la proliferación, angiogénesis, invasión y metástasis) y las *células madre y progenitoras del estroma tumoral* (reclutadas desde el tejido normal adyacente al tumor y la médula ósea)¹⁰.

La combinación de células normales y neoplásicas malignas crea un microambiente crucial para la evolución del tumor. Se generan regiones dentro de los tumores con distintos grados de diferenciación, proliferación, vascularización, inflamación y/o capacidad invasora. A su vez, la hiperproliferación y la inestabilidad genómica permiten la diferenciación de las células tumorales en subpoblaciones con características propias. De este modo, debe considerarse a los tumores como una masa heterogénea de células diversas, con complejas interacciones entre sí y con una matriz extracelular dinámica¹⁰.

El hecho de que las poblaciones celulares, y sus interacciones, cambien progresivamente durante la transformación tumoral, da como resultado una enfermedad compleja, dinámica y adaptable a su medio natural y a las estrategias terapéuticas que existen para combatirla.

1.4. Factores de riesgo asociados al desarrollo y la evolución del cáncer de mama

El cáncer de mama es una enfermedad multifactorial que puede desarrollarse como resultado de las interacciones entre factores genéticos, hormonales y ambientales. Estudios epidemiológicos han permitido identificar los diversos factores de riesgo asociados con el desarrollo del cáncer de mama^{11, 12, 13}.

En la Tabla 2 se presentan los factores de riesgo y sus valores relativos de contribución al desarrollo de cáncer de mama en las mujeres.

Así como existen factores de riesgo, se pueden mencionar factores que protegen a las mujeres de desarrollar esta enfermedad.

Entre estos factores se pueden contar aquellos de tipo exógeno como: las dietas ricas en frutas/verduras, el ejercicio físico moderado entre los 12 y 24 años, y el no consumo/abandono de los anticonceptivos orales (≥ 10 años), los cuales reducen el riesgo de desarrollar cáncer de mama. Además, aquellas mujeres que son sometidas a terapias hormonales anti-estrogénicas (ej.: tamoxifeno) tienen un riesgo menor de reincidencia de cáncer de mama^{12, 13, 14,}.

Además existen factores endógenos que protegen del desarrollo de cáncer de mama entre los que se destacan: el embarazo a edad temprana (<25 años), la multiparidad y el amamantamiento prolongado (>12 meses). Las mujeres con menopausia temprana por efecto de la ovariectomía y/o histerectomía antes de los 35 años, e incluso aquellas sometidas a ovariectomía unilateral después de los 45 años, tienen un riesgo menor de padecer cáncer de mama que las mujeres que atraviesan una menopausia natural^{12, 13, 14}.

En cuanto a los factores genéticos, la ausencia de cáncer de mama y/o de ovario en la historia familiar reduce el riesgo de padecer esta enfermedad^{12, 13, 14}.

La variabilidad genética de las poblaciones humanas explicaría, en parte, por qué ciertos individuos desarrollan cáncer mientras que otros no lo hacen, incluso cuando son expuestos durante el mismo intervalo de tiempo a los mismos factores de riesgo no genéticos. La interacción entre la constitución genética de los individuos y la influencia de los factores endógenos y exógenos, determinará el riesgo específico total de cada mujer a desarrollar cáncer de mama.

Factores de riesgo	Riesgo relativo	
Genéticos		
Mutaciones en la línea germinal en genes susceptibles	>4	
Historia familiar de cáncer de mama (familiar en 1 ^{er} grado)	2-4	
Polimorfismos en genes de baja penetrancia	2-4	
Endógenos		
Estilo de vida reproductiva		
Menarca temprana (<11 años)	3	
Menopausia tardía (>54 años)	2	
Nuliparidad	<2	
Edad madura en el primer embarazo (~40 años)	3	
Ausencia de amamantamiento	>2	
Condiciones físicas		
Edad avanzada (>55 años)	>10	
Lesiones benignas previas de la mama	4-5	
Cáncer en otra mama	>4	
Alta densidad mamaria	2-4	
Exógenos		
Dieta y factores relacionados		
Obesidad en mujer post-menopáusica	2	
Obesidad en mujeres pre-menopáusicas	0,7	
Alta ingesta de grasas insaturadas	1,5	
Consumo elevado de alcohol	1,3	
Hormonas exógenas		
Anticonceptivos orales (uso actual)	1,4	
Terapia hormonal de reemplazo (uso por ≥10 años)	1,35	
Factores ambientales		
Exposición a la radiación ionizante (durante la niñez)	3	
Exposición a xeno-estrógenos	2	
Factores demográficos		
Regiones geográficas (países desarrollados)	5	
Estatus socio-económico alto	2	

Tabla 2. Riesgo relativo de los factores que contribuyen al desarrollo del cáncer de mama en las mujeres. Extraído y adaptado de McPherson *et al.*, 2000¹¹.

1.5. Progresión y clasificación histológica del cáncer de

MAMA

Existen varios tipos de lesiones precursoras del cáncer de mama, y sólo unas pocas parecen tener un potencial premaligno significativo. Las lesiones premalignas mejor caracterizadas son: la hiperplasia ductal atípica (HDA), la hiperplasia lobular atípica (HLA), el carcinoma ductal *in situ* (CDIS) y el carcinoma lobular *in situ* (CLIS)^{15, 16}.

La HDA puede progresar para convertirse en CDIS, seguido por una posible progresión a carcinoma ductal infiltrante (CDI) y la culminación con la enfermedad metastásica^{15, 16}. La HLA y el CLIS son lesiones precursoras de los carcinomas infiltrantes de tipo ductal y lobular¹⁶. En la Figura 4 se presentan los distintos estadíos de la progresión del cáncer de mama, desde las lesiones premalignas al desarrollo de metástasis.

El cáncer de mama puede ser dividido en dos grupos: carcinoma *in situ* y carcinoma infiltrante. El carcinoma de mama *in situ* puede ser de tipo: ductal o lobular, siendo los patrones de crecimiento y las características citológicas los que conforman la base para distinguir entre los dos tipos¹⁷.

El CDIS, es más frecuente que el CLIS, y comprende un grupo heterogéneo de tumores. El CDIS ha sido subclasificado basándose en características cito/histológicas del tumor, que han dado lugar a 5 subtipos bien definidos: Comedo, Cribiforme, Micropapilar, Papilar y Sólido¹⁷.

De manera similar a los carcinomas *in situ*, los carcinomas infiltrantes son un grupo heterogéneo de tumores diferenciados en subtipos histológicos. Los principales tipos de tumores infiltrantes incluyen carcinomas: ductal infiltrante, lobular infiltrante, ductal/lobular, mucinoso, tubular medular y papilar. De los arriba mencionados, el CDI es el subtipo más frecuente, constituyendo el 70-80% de todas las lesiones invasivas. El CDI es subclasificado como: bien diferenciado (grado 1), moderadamente diferenciado (grado 2) o pobremente diferenciado (grado 3), en función del pleomorfismo nuclear, la formación de glándulas/túbulos y el índice mitótico¹⁷.



Figura 4. Modelo histopatológico de la progresión del cáncer de mama y riesgo de progresión a cáncer de mama estimado para cada tipo de lesión. Extraído y adaptado de Allred et al. (2001)¹⁵, Page y Dupont (1992)¹⁸.

1.6. Clasificación genómica de los carcinomas ductales infiltrantes

El cáncer de mama es una enfermedad heterogénea con diversas alteraciones genómicas, transcriptómicas y epigenómicas¹⁹, producto de la diversidad celular y la variabilidad del microambiente tumoral. Esta diversidad, que se observa tanto a nivel histológico como molecular, repercute sobre la supervivencia y la capacidad proliferativa de los grupos celulares clonales que conforman el tumor.

Dicha heterogeneidad intra-tumoral se convierte en heterogeneidad inter-tumoral, manifestándose a nivel clínico y patológico. Los carcinomas mamarios pueden clasificarse a nivel histopatológico, como se describió anteriormente, así como también a nivel molecular²⁰.

La clasificación molecular en los "subtipos intrínsecos del cáncer de mama" se realiza en función de la expresión génica, brindando información detallada de los genes y las vías moleculares que se encuentran alteradas. Esta surgió de un estudio llevado a cabo por Perou *et*

al. (2000)²¹, quienes identificaron un conjunto de genes diferencialmente expresados entre los carcinomas ductales infiltrantes (CDIs) humanos. Actualmente se reconocen y definen 5 subtipos intrínsecos del cáncer de mama: Luminal A, Luminal B, Basal, HER2 y Normal²².

- Subtipo Normal, su existencia real es controvertida, debido a que presenta un perfil de expresión génica similar a los tejidos normales de la mama (principalmente al de las células del epitelio basal y del tejido adiposo). Pero, se sospecha que puede ser un fenotipo resultante de contaminación con células de tejido normal adyacente al tumor. Por otro lado, hay quienes proponen que puede tratarse de un fenotipo representante de tumores *Basales* con crecimiento lento, que no expresan genes de proliferación celular.
- 2. Subtipo Luminal A, caracteriza a neoplasias con alta expresión del receptor de estrógeno (RE), el receptor de progesterona (RP) y genes asociados (ej.: GATA3, XBP1 y TFF1), así como baja expresión de genes asociados a la región cromosómica de HER2/ERBB2 (receptor tirosina quinasa 2 del EGF). Además, presentan baja expresión de genes asociados a proliferación (como Ki67), bajo grado nuclear y, en general, no presenta mutaciones en el gen TP53. Se asocia con una evolución clínica favorable, respondiendo bien a la terapia hormonal antiestrogénica.
- **3. Subtipo** *Luminal B*, exhibe bajos niveles del *RE*, el *RP* y genes relacionados; y muestra variabilidad en la expresión de genes asociados a la región cromosómica de *HER2/ERBB2*. Exhibe una mayor tasa de proliferación de las células tumorales, mutaciones en el gen *TP53* y alto grado nuclear. Presenta una evolución clínica no muy favorable; y su respuesta a terapia endócrina no es completa.
- 4. Subtipo HER2/ERBB2 enriquecido, está principalmente caracterizado por una alta expresión de los genes presentes en la región cromosómica 17q12; la cual incluye a HER2/ERBB2 y GRB7. Además, muestra baja expresión de genes asociados a los subtipos Luminales y Basal, alta expresión de genes asociados a proliferación celular y alto grado nuclear. Son neoplasias agresivas cuya evolución clínica es mala, sin embargo responden bien a la terapia anti-HER2.
- 5. Subtipo *Basal*, comprende neoplasias con alta expresión de citoqueratinas basales (CK5/6/14/17) y del *EGFR* (receptor del factor de crecimiento epidérmico), pero baja expresión de genes relacionados a los subtipos Luminales y de la región cromosómica de

HER2/ERBB2. A su vez, se observa alta frecuencia de mutación en los genes *BRCA1*, *TP53* y *Rb1*, alta tasa de proliferación celular y alto grado nuclear. Presenta una muy pobre evolución clínica, siendo neoplasias muy agresivas que responderían mejor a la quimioterapia.

Estos subtipos fueron originalmente definidos en función de los perfiles transcripcionales y han proporcionado información relevante sobre la biología del cáncer de mama. Estudios posteriores han demostrado que estos subtipos también se pueden distinguir a nivel genético, epigenético y proteico. Estos estudios se realizaron considerando el estado de metilación del ADN, la variación en el número de copias de los genes en el genoma, las mutaciones en secuencias codificantes, el perfil de expresión de ARN no codificante y el perfil proteico de los carcinomas²².

1.7 Genes de la superfamilia romboide

Los genes romboides codifican proteínas politópicas de membrana que se encuentran conservadas evolutivamente. Se extienden por todas las ramas del árbol filogenético desde bacterias y arqueas, hasta plantas y mamíferos²³.

Rhomboid-1 (Rho1) fue el primer miembro de la superfamilia Romboide descubierto y reconocido como el principal modulador del EGFR (receptor del EGF) en *D. melanogaster*²⁴. Esta proteína, localizada en el aparato de Golgi, se compone de 7 dominios transmembrana que se organizan de forma anular, creando una cavidad hidrofílica intramembrana donde se ubica el sitio catalítico²⁵. La actividad proteasa de Rho-1 fue establecida observando su capacidad de clivar a Spitz que es el precursor transmembrana del EGF. De este modo se libera el dominio EGF al lumen del Golgi para actuar como el ligando activo del EGFR (Figura 5)²⁶.

Rho-1 es considerada la primera serina-proteasa intramembrana descripta en la literatura científica²⁴. Desde entonces se describieron numerosas proteínas romboides que comparten una alta similitud de secuencia en sus regiones transmembrana, las cuales constituyen el 'dominio romboide' característico de la superfamilia. Esta alta similitud de secuencia determina que la estructura secundaria y la disposición en la membrana sean compartidas por todas las proteínas romboides. Pero, a lo largo de la evolución las proteínas romboides han ganado y perdido dominios transmembrana (hacia N- y C-terminal) y han sufrido mutaciones puntuales que provocaron la divergencia de sus secuencias. Algunas de estas mutaciones afectaron a los

aminoácidos clave que le brindan la actividad catalítica a las proteínas de esta superfamilia. De este modo, las proteínas romboides pueden agruparse según su capacidad de clivar sustratos en proteasas (con actividad catalítica) y pseudoproteasas (sin actividad catalítica). Éstas últimas, si bien perdieron su capacidad catalítica aún conservan el mecanismo de interacción con otras proteínas, característico de las proteínas romboides^{27, 28, 29, 30}.



Figura 5. Representación esquemática de Rho-1, Spitz y su modo de acción. Spitz se desplaza hacia el sitio catalítico localizado en un bolsillo hidrofóbico de Rho-1, donde la serina (S) provoca su clivaje a nivel yuxtamembrana y así la liberación del dominio EGF en el lumen del Golgi. Adaptado de Urban $(2006)^{25}$ y Lemberg $(2013)^{31}$.

RHBDL1 fue el primer gen romboide mamífero en ser identificado³², desde entonces se han descripto 14 genes romboides humanos. Estos son clasificados actualmente según su actividad funcional en: *a*- Proteasas (*RHBDL1/2/3*, *RHBDD1* y *PARL*), *b*- Pseudoproteasas con funciones conocidas (*RHBDF1* también conocido como *iRhom1*, *RHBDF2* llamado también *iRhom2* y *Derlinas1/2/3*) y *c*- Pseudoproteasas sin funciones conocidas (*RHBDD2/3*, *UBAC2* y *TMEM115*)²⁷ (Figura 6 A).

Los análisis filogenéticos sugieren que las pseudoproteasas evolucionaron por sucesivas duplicaciones génicas independientes, seguidas de diversificación con pérdida de función²⁷. En la Figura 6 B se muestra un árbol filogenético que incluye a todos los genes romboides humanos.





Figura 6. Clasificación funcional de los genes de la superfamilia Romboide en humanos. A. Los 14 genes integrantes de esta superfamilia se organizan en dos grandes grupos según la actividad catalítica de las proteínas que codifican: proteasas y pseudoproteasas. B. Árbol filogenético de los genes romboides humanos v sus distancias filogenéticas. Extraído y adaptado de Bergbold v Lemberg $(2013)^{27}$.

Las proteínas codificadas por esta superfamilia se encuentran involucradas en diversos procesos celulares que comprenden desde la modulación de la vía del EGFR³³ y la fusión de la membrana mitocondrial³⁴, hasta la degradación de proteínas asociada al retículo endoplasmático (ret. end.)³⁵. Si bien sus funciones son diversas, varios de los genes de esta superfamilia se encuentran involucrados en la regulación de un mismo proceso biológico por diferentes vías celulares. Ejemplo de ello sería el caso de *RHBDF1*³⁶, *RHBDD1*^{37, 38}, *RHBDD3*^{39, 40} y *PARL*^{41, 42}, los cuales participan en la regulación de la apoptosis.

Cabe destacar que varios miembros romboides han sido asociados a enfermedades neoplásicas humanas como la leucemia mieloide crónica⁴³, el cáncer esofágico⁴⁴, de ovario⁴⁵, colorectal⁴⁶ y de mama⁴⁷. Las proteínas *RHBDL2*⁴⁸, *iRhom1*⁴⁹ e *iRhom2*⁵⁰ modularían la

proliferación y la supervivencia celular mediante la activación o transactivación del EGFR. La actividad de este receptor ha sido bien documentada por su importancia en el desarrollo y la progresión de las neoplasias malignas humanas⁵¹. En particular, se ha demostrado que *RHBDD2* está sobreexpresado en estadíos avanzados de carcinomas mamarios⁴⁷ y colorectales⁴⁶.

En la Tabla 3 se resume la localización celular, los roles biológicos y las patologías humanas con las que fueron asociados los miembros de la superfamilia Romboide humana.

Tabla 3. Función, localización subcelular y enfermedades asociadas a los integrantes de la superfamilia Romboide en humanos.

		Proteasas
PARL	•	Se localiza en la membrana interna de la mitocondria ⁵² . Participa en el mantenimiento de la
		morfología de la membrana interna de la mitocondria ³⁴ y en la apoptosis mediante la
		regulación de la liberación del citocromo-c (es considerado anti-apoptótico) ⁵³ .
	•	Se encontraría implicado en la patogénesis de la enfermedad de Parkinson ⁵⁴ .
RHBDL1	٠	Estaría localizada en la membrana del Golgi. Se predice que posee actividad proteasa pues
		conserva el sitio catalítico característico de la superfamilia ³² .
RHBDL2	٠	Se localiza en la membrana plasmática celular. Participa en el clivaje del EGF justo por
		fuera del dominio transmembrana liberando el ligando para la activación del EGFR ⁴⁸ .
		Además, presenta actividad catalítica sobre la trombomodulina favoreciendo la proliferación
		y migración de queratinocitos durante el proceso de cierre de la herida ⁵⁵ .
	٠	Involucrado en el desarrollo del cáncer de mama y cérvico-uterino. Promueve la
		proliferación celular y la resistencia a la muerte celular por anoikis de las células epiteliales
		malignas ⁵⁶ .
RHBDL3/4	٠	Se localiza en la membrana plasmática del ret. end. Participa en la vía del ERAD
		(endoplasmic-reticulum-associated protein degradation, en español, degradación de
		proteínas asociada el ret. end.) reconociendo proteínas mal plegadas, clivándolas y
		facilitando su degradación mediante proteosoma ³⁵ .
RHBDD1	٠	Se localiza en la membrana del ret. end. y/o de la mitocondria. Regula la actividad
		apoptótica mediante su capacidad de clivar BIK (proapoptótico) ³⁷ y la inducción de la
		expresión de Bcl3 (antiapoptotico) ³⁸ . Además, participa en el control de la secreción de
		exosomas cargados principalmente con FasL y Trail, inductores de la apoptosis en células
		Jurkat ⁵⁷ .

Superfamilia Romboide

• Involucrado en la patogénesis de la leucemia mieloide crónica⁴³, del carcinoma hepatocelular⁵⁸, el glioblastoma⁵⁹ y el cáncer colorectal⁶⁰.

Continúa en la página siguiente.

Continuación de la Tabla 3.

		Pseudoproteasas con función conocida
RHBDF1/	٠	Se localiza principalmente en la membrana del ret. end. y también del Golgi. Interactúa con
iRhom1		$TNF\alpha^{61}$ (tumor necrosis factor, en español, factor de necrosis tumoral) promoviendo su
		secreción. Participa en la transactivación del EGFR mediante GPCR, siendo necesario para la
		proliferación, la supervivencia y la invasión celular (en células de cáncer de cabeza y
		cuello) ⁴⁹ . Interactúa con RACK1 previniendo la degradación de HIF1a (estabilizándolo
		durante el estado de hipoxia) y promoviendo la resistencia de la célula a la muerte celular ⁶² .
	٠	Involucrado en la patogenia del cáncer de mama, donde se sobreexpresa y correlaciona con
		estadíos avanzados de la enfermedad, metástasis, mal pronóstico y pobre respuesta a la
		quimioterapia ⁶² . Además, promueve la proliferación y la supervivencia celular en células
		epiteliales malignas (de cáncer de mama y cabeza y cuello) ⁴⁹ .
RHBDF2/	٠	Se localiza en la membrana del ret. end. y, principalmente, en el Golgi. Interactúa con TACE
iRhom2		promoviendo su translocación desde el ret. end. al Golgi y de allí a la membrana plasmática
		para que clive a TNF y libere su ligando activo (TNF α) activando el EGFR ³³ .
	٠	Participa en la patogénesis de la artritis reumatoidea ⁶³ , la artropatía hemofílica ⁶⁴ , el cáncer de
		ovario ⁴⁵ y el cáncer de esófago asociado a tilosis ^{44, 65} .
Derlinas	٠	Se localizan en la membrana del ret. end. Participan en el sistema del ERAD para mantener
-1, -2, -3		la homeostasis proteica celular ^{66, 67} .
	٠	Derlina-1 se sobreexpresa en el cáncer de mama humano y correlaciona con un alto grado
		tumoral y metástasis ganglionar. Otorga resistencia a la apoptosis por estrés del ret. end. ⁶⁸ . Se
		expresa en la superficie de las células tumorales y se ha demostrado que el uso de
		anticuerpos específicos dirigidos contra Derlina-1 suprime el crecimiento tumoral ⁶⁹ .
	٠	Derlina-2 está asociado a la patogenia del carcinoma hepatocelular, en el cual su
		sobreexpresión favorece la proliferación celular ⁷⁰ .
	٠	Derlina-3 exhibe características supresoras tumorales. La pérdida de su expresión resulta en
		una mayor capacidad de proliferación e invasión metastásica de las células de cáncer
		colorectal. Además, promueve el cambio del metabolismo energético de las células a una
		glicólisis anaeróbica (efecto Warburg) ⁷¹

Pseudoproteasas sin función conocida

RHBDD2	٠	Se localizaría en el ret. end. ⁴⁷ y/o el Golgi ^{72, 73} . Promueve la proliferación y la migración

celular y la respuesta al estrés del ret. end. 46, 74.

Involucrado en la patogenia del cáncer de mama y el cáncer colorectal, donde se lo encuentra sobreexpresado en estadíos tumorales avanzados y se asocia a mal pronóstico de evolución de la enfermedad, así como con la resistencia a quimioterapéuticos^{46, 47}. También está involucrado en la patogenia de la retinitis pigmentaria familiar⁷².

Continúa en la página siguiente.

Continuación de la Tabla 3.

RHBDD3/	٠	Favorece la apoptosis celular ³⁹ y regula la respuesta inflamatoria aguda atenuando la
PTGA		activación de las células natural killer en el hígado, protegiéndolo del daño por inflamación
		aguda ⁷⁵ . Además, controla la respuesta autoinmune suprimiendo la síntesis de la IL-6 ⁷⁶ .
	٠	Involucrado en la patogenia de varios tumores humanos. La reducción o pérdida de su
		expresión favorece la transformación oncogénica en tumores de la glándula pituitaria ^{39, 77} y el
		cáncer colorrectal ⁴⁰ .
UBAC2	٠	Se localiza en la membrana del ret. end. Participa en el sistema del ERAD, en la
		ubiquitinación de proteínas ⁷⁸ , y en el control del almacenamiento de lípidos en la célula ⁷⁹ .
	•	Involucrado en la patogenia de la enfermedad de Behçet ^{80, 81} .
TMEM115	٠	Se localiza en la membrana del Golgi. Participa en el control del trasporte retrógrado de
		proteínas (Golgi→ ret. end.) y en su O-glicosilación ⁸² .

1.8 El gen *Rhbdd2* en el cáncer de mama

El gen *RHBDD2* se localiza en la región cromosómica 7q11.23, en el genoma humano. Se organiza en 5 exones de los cuales el exón II (de 122 pb) está involucrado en un proceso de corte y empalme alternativo. Por este proceso se generan dos variantes de ARNm que codificarían para dos isoformas proteicas (Figura 7 A)⁴⁷:

- *Variante 1*: 1756 nucleótidos (nt), no incluye al exón II, codificaría una proteína de 364 aminoácidos (aa).
- S Variante 2: 1878 nt, incluye al exón II, codificaría una proteína de 233 aa.

Como fue previamente expuesto, *RHBDD2* ha sido clasificado como una pseudoproteasa con función desconocida. Esto se debe a que las proteínas de RHBDD2 no conservan los aminoácidos clave del sitio catalítico, los cuales se encuentran en los miembros proteolíticamente activos de esta superfamilia²⁵ (Figura 7 B). Asimismo, se desconoce no solo su localización, sino también su estructura secundaria en humanos. Se presume que las

proteínas de RHBDD2 poseen dominios hélice alfa que atraviesan las membranas celulares, los cuales se organizan conformando el 'dominio romboide' característico de la superfamilia²⁵. La localización subcelular de RHBDD2 en células humanas no ha sido claramente establecida, pero en rata y en ratón se localizaría en el Aparato de Golgi^{72, 73}.



ନ୍ଦେ 24 ଭ

programa Unipro UGENE, de donde se extrajo y modificó la imagen.

Hasta el momento, los estudios realizados sobre *RHBDD2* en mamíferos son muy pocos y variados, limitándose a trabajos en ratón (*M. musculus*), rata (*R. norvegicus*) y humanos (*H. sapiens*).

En el ratón se estudió su expresión en los tejidos embrionarios y adultos, particularmente en el desarrollo de la retina. Se observó que, a nivel transcripcional, *Rhbdd2* se expresa en diversos tejidos del ratón tales como: cerebro, riñón, corazón, ovarios, entre otros. A nivel proteico Rhbdd2 se encontraría como monómero en todas las células del organismo adulto y embrionario. Pero, en la retina Rhbdd2 se encuentra como homotrímero en los segmentos externos de los conos del adulto. Asimismo, se determinó que Rhbdd2 se localiza en la región *cis* del aparato de Golgi. Además, se estableció una asociación de co-segregación entre una mutación sin sentido en el exón II de *Rhbdd2* y la retinitis pigmentaria familiar⁷².

En la rata se estudió la expresión de *Rhbdd2* durante el desarrollo embrionario y en los tejidos adultos. En los estadíos embrionarios, los niveles de *Rhbdd2* son variables, se detectan a partir del día 16 y se van incrementando hasta el día 20, manteniendo elevada su expresión en diversos tejidos del adulto⁷³

El primer estudio sobre *RHBDD2* en humanos fue realizado por Abba *et al.* (2007) mediante análisis de SAGE (Serial Analysis of Gene Expression) de CDIs humanos. En dicho estudio se describió por primera vez a *RHBDD2* como sobreexpresado en CDIs, en pacientes con metástasis ganglionar y con recurrencia de la enfermedad⁸³. Posteriormente, se determinó que la sobreexpresión de *RHBDD2* en CDIs sería resultado de eventos de amplificación génica de la región 7q11.23⁴⁷.

Recientemente, se demostró que *RHBDD2* se encontraría sobreexpresado en estadíos avanzados del cáncer colorectal y que estaría involucrado en la respuesta celular al estrés del ret. end., mediante la regulación de la expresión de los genes involucrados en este proceso (ej.: *BiP*, *IRE1*, *ATF6*)⁴⁶.

Estas observaciones permiten inferir que RHBDD2 tendría un papel importante en la patogenia del cáncer de mama, pudiendo ser considerado un biomarcador con relevancia para el pronóstico de la enfermedad, así como un posible blanco terapéutico.

Es por ello que en este trabajo de tesis doctoral se estudia la biología de RHBDD2 y su relevancia en el cáncer de mama humano.

O_{BJETIVOS}

1.9 Овјетичоз

Objetivo general

C3 Determinar la relevancia y el rol funcional de *RHBDD2* en las células epiteliales normales y de cáncer de mama.

Objetivos particulares

- Analizar la expresión de los genes de la superfamilia Romboide en líneas celulares de cáncer de mama, en muestras de tejidos normales y de carcinomas ductales infiltrantes humanos.
- Caracterizar la expresión de *RHBDD2* a nivel transcripcional y proteico en células epiteliales de cáncer de mama.
 - So Analizar las variantes de empalme alternativo de *RHBDD2*.
 - 80 Determinar la localización subcelular de RHBDD2.
- Analizar las consecuencias del silenciamiento *in vitro* de *RHBDD2* en líneas celulares de cáncer de mama, sobre la respuesta genómica, la proliferación celular y la capacidad de adhesión de las células a la matriz extracelular.
- Evaluar la respuesta transcripcional de *RHBDD2* ante estímulos de estrés celular en líneas celulares de cáncer de mama.
- Caracterizar la expresión de *Rhbdd2* en un modelo de diferenciación celular normal mamario murino.



ରେ 27 ରଃ

2.1 Muestras de tejidos mamarios humanos normales y neoplásicos

Se estudiaron 126 muestras de mama humanas (14 tejidos normales y 112 carcinomas ductales infiltrantes) obtenidas del Hospital Provincial Neuquén Dr. Eduardo Castro Rendón (Neuquén Capital, Provincia de Neuquén). En todos los casos se obtuvo el consentimiento informado de las pacientes y los procedimientos para la obtención de las muestras se realizaron siguiendo las directrices de la Declaración de la Asociación Médica Mundial de Helsinki (Finlandia, 1964). Además, el uso de muestras de origen humano fue aprobado por el Comité de Bioética de la Facultad de Ciencias Médicas de la UNLP (protocolo de referencia N°0800-017399/13-000).

Los carcinomas primarios, incluidos en el estudio, provinieron de mujeres de entre 29 y 86 años de edad. Los datos clínicos e histopatológicos se obtuvieron de los registros clínicopatológicos de las pacientes. El estadío tumoral fue establecido al momento del diagnóstico (estadíos I, II, III), así como el grado histológico tumoral (bajo, intermedio, alto) y el grado nuclear (grado I, II, III). La definición del estadío se realizó siguiendo la clasificación establecida por The American Joint Committe on Cancer Staging System for Breast Cancer⁸⁴. También se consideró el estatus de los receptores: RE, RP y HER2.

2.2 Cultivo de líneas celulares humanas y de ratón

2.2.1 Líneas celulares humanas de cáncer de mama

Para los estudios *in vitro* se trabajó con células del tipo epitelial, correspondientes a las líneas celulares de cáncer de mama humanas: MCF7, T47D, ZR75 y MDA-MB-231. Estos modelos celulares expresan los receptores RE, RP y HER2, excepto la línea celular MDA-MB-231 que es considerada un modelo de cáncer de mama triple negativo, pues no expresa ninguno de los receptores antes mencionados.

Respecto a la clasificación de los subtipos intrínsecos del cáncer de mama, las líneas celulares MCF7, T47D y ZR75 presentan características del subtipo Luminal, mientras que la línea MDA-MB-231 se caracteriza como subtipo Basal.

Las células fueron cultivadas en placas de vidrio de 10 mm³, en placas de 6 pocillos y/o en laminillas de vidrio de 1 cm², con medio de cultivo RPMI 1640 (Sigma, USA) suplementado con 10% (v/v) de suero fetal bovino (FBS, Gibco, USA), 100 U/ml de penicilina y 100 μ g/ml de estreptomicina, en estufa de cultivo a 37 °C y 5% de CO₂.

Según el ensayo al que estuvieran destinadas, las células se cosecharon para la extracción y purificación del ARN total y proteínas. Por otra parte, las células cultivadas en laminillas se fijaron con formol al 4% o acetona, para su posterior utilización.

2.2.2 Modelo de diferenciación celular de glándula mamaria "normal" de ratón

La línea celular HC11 deriva de la línea celular epitelial COMMA-1D y exhibe un fenotipo normal de mama de ratón BALB/c. Mantiene funciones específicas de diferenciación de la glándula mamaria bajo la dependencia de hormonas lactogénicas como la prolactina (PRL) y la dexametasona. En respuesta al estímulo de estas hormonas, las células expresan una diversidad de proteínas tales como la β -caseína, la cual es utilizada como indicador de diferenciación del modelo celular. Entre las hormonas lactogénicas, la PRL es la que estimula la expresión de β caseína de manera inmediata y fuerte, tanto a nivel de ARNm como de proteína^{85, 86}.

Debido a que la glándula mamaria sufre un proceso de crecimiento y diferenciación complejo, éste modelo celular resulta muy útil y adecuado para estudiar dichos procesos en un contexto celular normal y con un sistema controlado.

Las condiciones de cultivo fueron las siguientes: se utilizó medio RPMI-1640 (GIBCO, USA), con 10% de suero fetal bovino (GIBCO), 1% de penicilina/estreptomicina (Invitrogen, USA) y 5 μ g/ml de insulina (Sigma, USA). Las células se cultivaron en placas de plástico de 100 mm (Nunc), en estufa a 37 °C y 5% de CO₂. Se mantuvieron durante 3 días al 100% de confluencia hasta alcanzar el estado de competencia. Se indujo el proceso de diferenciación celular por tratamiento con la hormona PRL durante 3 días. Las células se recolectaron por tripsinización en las fases de proliferación, competencia y diferenciación. Se purificó el ARN total y fue almacenado a -20 °C (Figura 8).

También, se cultivó la línea celular HC11 en su estadío de proliferación, sobre laminillas de vidrio de 1 cm², usando medio de cultivo DMEM D7777 (Sigma, USA) suplementado con 10%

(v/v) de suero fetal bovino (FBS, Gibco, USA), 100 U/ml de penicilina y 100 μ g/ml de estreptomicina, en estufa de cultivo a 37 °C y 5% de CO₂. Las células fueron fijadas con formol al 4%.



Figura 8. Esquema del procedimiento de trabajo para el análisis de la expresión génica de *Rhbdd2* en el modelo celular de mama de ratón 'normal', HC11. Las células se cultivaron y cosecharon en distintos estadíos para el aislamiento de ARNm y proteínas. Para que las células alcancen el estadío de diferenciación deben ser inicialmente cultivadas hasta el 100% de su confluencia y mantenidas en este estado por tres días, a fin de que alcancen el estadío de competencia. Luego se cultivan con un medio suplementado con la hormona PRL por 3 días. La PRL actúa como estímulo de diferenciación. Al cabo de esos 3 días se obtienen células diferenciadas, secretoras de proteínas de la leche como β -caseína.
2.3 CINÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DEL ARNM DE *RHBDD2* Y GENES ASOCIADOS

2.3.1 **A**islamiento de ARN a partir de líneas celulares y muestras tisulares

A partir de los cultivos celulares y de las muestras tisulares, se aisló el ARN total usando TRI Reagent® (Ambion, USA) siguiendo el protocolo propuesto por el fabricante, con algunas modificaciones según Cox *et al.* (2006)⁸⁷. El protocolo de extracción y aislamiento de ARN total se describe a continuación:

• *A partir de células de cultivo*. Se quitó el medio de cultivo de las células, se agregó entre 500 a 1000 µl de TRI Reagent y se homogeneizó hasta levantar completamente las células de la placa. El homogenado se trasvasó a un tubo Eppendorf de 1,5 ml libre de RNasas. Se agregó cloroformo y se centrifugó para la separación de fases. La fase acuosa superior, que contiene el ARN total, fue separada en un nuevo tubo donde se precipitó el ARN total con isopropanol. Luego se lavó el ARN con etanol al 75% y se dejó secar en estufa a 37 °C. Finalmente, el ARN fue resuspendido con agua libre de RNasas y se almacenó a -70 °C.

• *A partir de muestras de tejidos almacenados en RNAlater (Life Technologies, USA).* Se retiró el RNAlater de los tubos Eppendorf de 1,5 ml libres de RNasas y se agregaron 800 µl de TRI Reagent. Se disgregó la muestra de forma mecánica con el equipo Polytron PT 1200 CL (Kinematica, Switzerland). Luego se agregó cloroformo y se continuó con el centrifugado para la separación de fases. La fase acuosa se separó en un tubo nuevo y se continuó con la técnica como en el punto anterior.

A partir de muestras de tejidos incluidos en parafina. Se obtuvieron láminas de 10 μm de espesor a partir de muestras tisulares incluidas en parafina. Las láminas se colocaron en tubos Eppendorf de 1,5 ml libre de RNasas, donde se digirieron con 800 μl de TRI Reagent y 100 μl de Proteinasa K (10 mg/ml). La digestión fue realizada en baño térmico incubando a 55 °C por 1 h. Luego se elevó la temperatura a 70 °C por 10 min (para inactivar la enzima). Se agregó cloroformo y se centrifugó para la separación de fases. Se continuó con la técnica según lo descripto anteriormente.

2.3.2 Determinación de la cantidad y calidad del ARN total aislado

Se determinó para cada muestra la concentración del ARN total aislado y su pureza (según la relación A260/280). Para ello se utilizaron los equipos: QubitTM 2.0 Fluorometer (Life Technologies, USA) y NanoDrop Lite Spectrophotometer (Thermo Scientific, USA).

Posteriormente, se evaluó la integridad del ARN total aislado mediante el método de electroforesis en gel de agarosa desnaturalizante de ARN. Este método permite la visualización de las bandas correspondientes al ARNr 28S y 18S, cuando el ARN no ha sufrido degradación (Figura 9). La corrida electroforética se realizó en un gel de agarosa al 1,2% con solución MOPS al 1%. Previo a la siembra, el ARN se mezcló con solución MOPS 5X, formaldehido y formamida; y se incubó a 65 °C por 10 min en calor seco. La corrida electroforética se realizó a un voltaje de 5 v por centímetro de longitud del gel, en la cuba de electroforesis HoeferTM HE 33 Mini Horizontal Submarine Unit (Amersham Biosciences, Reino Unido). Posteriormente, el gel se sumergió en bromuro de etidio por 20 min y la visualización de las bandas se realizó con un transiluminador de luz UV.



2.3.3 Retrotranscripción del ARNm

Se obtuvo ADN copia (ADNc) a partir del ARN total utilizando la retrotranscriptasa SuperScriptTMII First-strand Synthesis System (Life Technologies, USA), de acuerdo al protocolo propuesto por el fabricante.

Inicialmente, el ARN total se trató con la enzima DNase I (Life Technologies, USA) para la digestión del ADN que pudiera encontrarse contaminando el ARN. Luego, se detuvo la actividad de la enzima agregando EDTA (25 mM) y se procedió a la síntesis de la primera hebra de ADNc agregando, en primera instancia, Oligo dT_{12-18} (100 pmol/µl) y dNTPs (10 mM) al ARN total (tratado con DNase I) e incubando a 65 °C por 5 min. Luego, se agregó la enzima

retrotranscriptasa Super Script II, su solución de reacción 5X First Strand Buffer y DTT (0,1 M), incubándose a 42 °C por 2 h. Finalmente, se inactivó la retrotranscriptasa elevando la temperatura a 70 °C por 15 min. El ADNc se almacenó a -20 °C.

2.3.4 Reacción en cadena de la polimerasa Cuantitativa en Tiempo Real

La cuantificación de los niveles de expresión del ARNm se realizó mediante RT-PCR cuantitativa en tiempo real. Para ello se utilizó ADN Taq polimerasa (Life Technologies, USA) y el fluorocromo EvaGreen Dye (Biotium, USA). Se emplearon tiras de 8 tubos de PCR Strips Tubes and Caps (Axygen, Corning Life Sciences, USA). Las mediciones se llevaron a cabo con el equipo Stratagene MX3000PTM Real-Time PCR System y los datos fueron recogidos por el programa Stratagene MX3000PTM Real-Time PCR Software (Stratagene, Agilent Technologies, USA).

La solución de reacción se realizó a un volumen final de 25 μ l, según se describe a continuación: 2,5 μ l de Reaction Buffer 10X (Life Technologies, USA), 2,5 μ l de dNTPs (2 mM), 1 μ l de MgCl₂ (50 mM), 0,6 μ l de cebadores (12,5 pmol/ μ l), 0,8 μ l del fluorocromo EvaGreen, 0,5 μ l de la enzima Taq polimerasa, 5 a 10 μ l de ADNc y H₂O hasta alcanzar el volumen final.

Los perfiles térmicos de ciclado fueron programados de la siguiente manera:

1°- una desnaturalización inicial de 5 min a 95°C,

2°- 40 ciclos de: 40 s a 95 °C, 30 s a la temperatura de hibridación descripta en la Tabla 4 (específica para cada par de cebadores) y 30 s a 72 °C,

3°- un ciclo final de 95 °C por 1 min, 55 °C por 30 s y 96 °C por 30 s.

Los cebadores utilizados en este trabajo de tesis (ver tabla 4) fueron diseñados de modo que se localicen en exones colindantes. El diseño de los cebadores se llevó a cabo con los programas Primer-blast (NCBI-NIH, USA, <u>www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/</u>) y Unipro UGENE 1.14.1 (<u>www.ugene.unipro.ru/</u>)⁸⁸.

Las reacciones de RT-PCR cuantitativa fueron realizadas por triplicado para cada gen y muestra estudiada. Se utilizó al transcripto del *ARNr18S* como ARNm de referencia (normalizador) para el cálculo de la expresión relativa de los productos de interés. Los valores de expresión relativa de los genes fueron obtenidos mediante las ecuaciones que se presentan a continuación⁸⁹.

Primero se calculó la diferencia de Ct usando la fórmula:

dCt = Ct (gen de estudio) – Ct (gen de referencia)

Posteriormente se calculó la expresión relativa para cada gen mediante la fórmula:

 $R = 2^{(-dCt)}$

Los valores obtenidos para cada gen y cada muestra fueron cargados a una planilla de datos en el programa SPSS Statistics 17.0, con el cual se realizó el análisis estadístico teniendo en cuenta las características histopatológicas de las pacientes incluidas en el estudio.

Tabla 4. Lista de cebadores humanos y murinos, utilizados en el estudio.

Gen	Cebador Sentido (5'- 3')	Cebador Antisentido (5'- 3')	Amplicón	T° Hibridación
RHBDD1	GCACCCAGGAACTATGACACG	TCTGGTGAGAGATGAAACCCG	137 pb	55°C
RHBDD2	GGTGTTTGGCATGGTTGTG	CGATGGAATAGCAGTAGGTGA	146 pb	56°C
RHBDD3	GCACCATGGCTGTCCAAGT	AACCAACAGTGACACGGCAC	135 pb	55°C
RHBDF1	CAGGCTGGCACCGCATAGCC	GCCGAACTGGGAGCCAGCAG	116 pb	55°C
RHBDF2	GGCAACCTCGCCAGTGCCAT	GGCCTTCCAGGGCCTCTCCA	135 pb	55°C
RHBDL1	ACCGTCTCCATCACCGACA	GCACCATCCTCAGCAACTTGT	139 pb	55°C
RHBDL2	TGTTGGACATGGGATTTGCTC	CACCGTGTAGCCAATGGACA	119 pb	50°C
RHBDL3	ATTGGGCTTGTCTACGTGGC	GATAGGCCGACGGGTGGAA	250 pb	60°C
PARL	CGCCATGGATACAGCAGGA	CACTAGCGGCTCCCTGTTCTT	136 pb	52°C
PAGE5	TTCCCAGCCAGTTGGACCT	CCATCTCCAGGTGCATCCTC	201 pb	63°C
CALCA	CCCAGAAGAGAGGCCTGTGACA	CTTCACCACACCCCCTGATC	83 pb	57°C
NEURL	CATCACGCAGATCCGCATC	CAGGCTCACTGGCGAATTG	199 pb	55°C
СНОР	AGCCAAAATCAGAGCTGGAA	TGGATCAGTCTGGAAAAGCA	104 pb	55°C
	Cebadore	s para transcriptos murinos		
Rhbdd2	TGGTGTTCGGTGTGGTGGT	GCCATAGGACAGGCCAATCA	125 pb	53°C
Csn2	ACTCTCAAATCCCCAGCCTTG	GAAGGAAGGGTGCTACTTGCT	180 pb	64°C
	Cebadores para el tran	scripto de referencia (humano	y murino)	
ARNr18S	GTAACCCGTTGAACCCCATT	CCATCCAATCGGTAGTAGCG	151 pb	50°C

Cebadores para transcriptos humanos

2.3.5 Estudio de las variantes de empalme de RHBDD2

Se analizaron *in silico* las secuencias de ARNm de las variantes de empalme alternativo de *RHBDD2*. Las secuencias fueron obtenidas de la base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI - <u>www.ncbi.nlm.nih.gov/</u>) donde se identifican con los códigos: <u>NM 001040456.1</u> para la variante 1 y <u>NM 001040457.1</u> para la variante 2.

Las secuencias de ARNm fueron alineadas entre sí a fin de identificar al exón II en el ARNm de la variante 2. Además, se analizaron en búsqueda de marcos de lectura abiertos (ORFs - Open Reading Frames, en inglés) para detectar los sitios de inicio de la traducción de las isoformas proteicas de RHBDD2. Las secuencias de los ORFs se tradujeron a sus aminoácidos codificantes para obtener las secuencias proteicas, las cuales se compararon con las anotadas en el NCBI. El análisis se realizó con el programa CLC Main Workbench 7.0 (CLC Bio-Qiagen, Dinamarca).

Luego, se estudiaron las variantes de empalme del gen *RHBDD2* mediante RT-PCR a punto final. Para ello se emplearon los cebadores sentido (5'-TGAAGTCCGAGGCCCTT-3') y antisentido (5'-CAAAGCGCCAGATGATGATGATA-3'), diseñados con el programa Primer-blast (NCBI-NIH, USA). El cebador sentido es complementario al extremo 3' del exón I y el cebador antisentido es complementario al extremo 5' del exón III, de modo que flanquean al exón II (Figura 10). La RT-PCR se realizó a un volumen final de 25 µl, usando Taq DNA polymerase (Life Technologies, USA), en el equipo SPRT001 (Thermo Electron Corporation, USA). La mezcla de reacción fue la misma que para la RT-PCR cuantitativa, pero sin incluir el fluorocromo. El perfil térmico de ciclado fue el siguiente:

1°- una desnaturalización inicial de 5 min a 95 °C,

- 2°- 40 ciclos de 40 s a 95 °C, 20 s a 64 °C y 30 s a 72 °C,
- *3°-* una etapa final de polimerización a 72 °C por 3 min.

RHBDD2 - v	variante 2
------------	------------

100 exon (2)	200	300 ex	400 on 2	500	600	700	800	900 exon 4	1k	1.1k	1.2k	1.3k	1.4k	1.5k	1.6k	1.7k	A8k 1 878
e	xon 1	⇒			exon	3			exon 5								
primer_bind	1 (2)	Ď		Ø													1

Figura 10. Sitios de mapeo de los cebadores diseñados para la amplificación de las variantes de empalme de *RHBDD2*. Los productos de amplificación que se obtendrían con los cebadores serían de 111 pb para la variante 1 (no incluye el exón II) y de 233 pb para la variante 2 (incluye el exón II de 122 pb). En rosado se indican los exones y en verde los cebadores. Imagen generada con el programa Unipro UGENE 1.14.1.

Se trabajó con muestras de ADNc obtenidas a partir de: líneas celulares de cáncer de mama (MCF7, T47D, ZR75 y MDA-MB-231) y muestras de tejidos humanos mamarios normales (n=11) y CDIs (n=19). Inicialmente, se amplificaron las variantes de empalme en las líneas celulares de cáncer de mama. Los amplicones de *RHBDD2*, obtenidos a partir de la línea celular T47D, fueron secuenciados con la finalidad de corroborar su identidad.

Para ello se realizó una RT-PCR a volumen final de 50 µl (para obtener abundante producto de amplificación). Los productos de amplificación se separaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 3% y su visualización se realizó en transiluminador de luz azul, donde se extrajeron las bandas correspondientes a las variantes de empalme. Entonces, se procedió a la purificación de los amplicones mediante el sistema NucleoSpin Gel and PCR Clean-Up (Machery-Nagel, Germany) (Figura 11). El ADN aislado fue secuenciado por Macrogen Latinoamérica (<u>www.macrogenlatam.com.ar</u>) y los datos de la secuenciación fueron procesados y analizados con el programa Unipro UGENE 1.14.1.



Figura 11. Esquema del procedimiento de trabajo del aislamiento de los amplicones de las variantes de empalme de *RHBDD2*. Se amplificaron las variantes de empalme mediante RT-PCR a partir de ARNm de la línea celular T47D. Los amplicones se separaron por electroforesis en gel de agarosa. Los segmentos de gel conteniendo los amplicones se aislaron y procesaron para la purificación del ADN, la cual se confirmó mediante electroforesis en gel de agarosa y visualización en transiluminador de luz azul. El ADN aislado fue almacenado para su posterior secuenciación. V1: variante 1, V2: variante 2.

Confirmada la identidad de los amplicones, se analizó la expresión de las variantes de empalme de *RHBDD2* sobre las líneas celulares de cáncer de mama, los tejidos mamarios normales y los CDIs de mama. Se determinó la presencia/ausencia de los transcriptos en las muestras y se estimó la expresión relativa de ambas variantes de empalme, en función de la expresión total de *RHBDD2*. Para ello, los productos de amplificación de las variantes de empalme se separaron por electroforesis en geles de poliacrilamida y se visualizaron mediante

tinción con nitrato de plata. Los geles fueron escaneados y las imágenes se procesaron y analizaron en el programa ImageJ (<u>www.imagej.nih.gov/ij/</u>). Se midió la densidad de las bandas de las variantes de empalme de *RHBDD2* en cada muestra, se sumaron entre sí (para determinar el valor de expresión total de *RHBDD2*) y luego se relativizó la densidad de cada variante de empalme respecto del valor de expresión total. Se interpretó la densidad de las bandas como el nivel de expresión del ARNm.

2.3.6 Uisualización de los productos de RT-PCR mediante electroforesis en geles de

agarosa y de poliacrilamida

La visualización de los productos de amplificación por RT-PCR se realizó mediante electroforesis en geles de agarosa al 2% y poliacrilamida al 6%.

Para los geles de agarosa se preparó una solución con 2g de Agarosa D1-LE (Genebiotech, Argentina), 5 ml de TBE 5X, 0,2 µl de GelGreenTM Nucleic Acid Gel Stain 10000X (Biotium, Canadá) y agua destilada hasta alcanzar el volumen final de 100 ml. La electroforesis se realizó en la cuba HoeferTM HE 33 Mini Horizontal Submarine Unit (Amersham Biosciences, Reino Unido). Para la visualización de los productos de amplificación se utilizó el equipo Safe ImagerTM Blue-Light Transilluminator (Invitrogene, USA).

Los geles de poliacrilamida se prepararon a volumen final de 10 ml utilizando: 6 ml de H₂O, 2 ml de TBE 5X, 2 ml de Acrilamida 19:1, 100 μ l de APS 10% y 10 μ l de TEMED. La corrida electroforética se llevó a cabo en la cuba de electroforesis miniVE Vertical Electrophoresis System (Amersham Biosciences, Reino Unido). La visualización de las bandas se realizó mediante el protocolo de tinción rápida con nitrato de plata, adaptado de Creste *et al.* (2001)⁹⁰, según se describe a continuación. Brevemente, los geles fueron fijados con etanol al 10% por 10 minutos y luego se trataron con ácido nítrico al 1% por 3 min. Posteriormente, se sumergió el gel en una solución acuosa de AgNO₃ al 0,2% por 20 minutos, manteniéndolo en condiciones de oscuridad. Finalmente, se preparó una solución de carbonato de sodio al 3% en H₂O destilada, con 54 μ l de formaldehído (40%) en la cual se sumergió el gel y se mantuvo en agitación hasta la aparición de las bandas. La reacción se cortó con ácido acético glacial al 10%. Los geles se lavaron con H₂O destilada y fueron almacenados a posteridad entre láminas de papel celofán transparente.

2.4 **P**ISLAMIENTO, PURIFICACIÓN Y ANÁLISIS DE PROTEÍNAS

2.4.1 *C*islamiento de proteínas a partir de líneas celulares y muestras tisulares

Las proteínas se aislaron usando TRI Reagent® (Ambion, USA) siguiendo el protocolo propuesto por el fabricante, a partir de los cultivos celulares y de las muestras tisulares normales y neoplásicas.

Se inició con el protocolo de extracción y aislamiento del ARN (como se describió anteriormente). Luego de quitar la fase superior (con ARN), a las fases intermedia e inferior se les agregó etanol (100%) para separar las proteínas del ADN mediante centrifugación. El sobrenadante, que contiene las proteínas, fue colocado en un tubo Eppendorf de 1,5 ml, al cual se le agregó acetona y se centrifugó para la precipitación de las mismas. El precipitado fue lavado inicialmente con una solución de clorhidrato de guanidina 0,3 M en etanol 95% + glicerol 2,5% (v:v), y posteriormente con una solución de etanol 100% + glicerol 2,5% (V:V); centrifugando entre lavados. Finalmente, se dejó secar el precipitado a 37 °C.

Las proteínas se resuspendieron en una solución de PBS (phosphate buffered saline, en español, tampón fosfato salino) con inhibidor de proteasas y se almacenaron a -20 °C.

2.4.2 *C*hálisis de la expresión proteica de RHBDD2 mediante Western-blot

Se evaluó la expresión proteica de RHBDD2 mediante western-blot, utilizando el anticuerpo primario policional anti-RHBDD2 (TA306891, Origene, USA) y el anticuerpo secundario anti-IgG de conejo (Dako, Dinmarca). La secuencia antigénica reconocida por el anticuerpo anti-RHBDD2 es: SLMRRISVFKYVSGSSAERRAAQSRKLNPVPGSYPTQSCHPHLSPSHPVS, la cual se encuentra localizada en la región carboxilo terminal de ambas isoformas proteicas de RHBDD2.

Los purificados proteicos se sembraron en geles de SDS-PAGE de dos fases y se sometieron a electroforesis en condiciones reductoras. Se utilizó una mezcla de siembra de SDS, 2mercaptoetanol, glicerol y Tris-HCl. Las proteínas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa Protran®BA (Whatman GmbH, Alemania). Se incubó con el anticuerpo primario anti-RHBDD2 (diluido 1:1000 en PBS), durante 12 h a temperatura ambiente y luego con el anticuerpo secundario anti-IgG de conejo (diluido 1:1000 en PBS), durante 3 h a temperatura ambiente. En la misma membrana se detectó β -actina, que se utilizó como referencia de carga para determinar la expresión relativa de las isoformas de RHBDD2. Previamente a la incubación con el anticuerpo anti- β -actina (ab8226, Abcam, Brasil), la membrana fue lavada para eliminar los anticuerpos utilizados para detectar a RHBDD2. Para ello, se incubó la membrana durante 30 min a 50 °C con una solución de lavado (100 mM de 2-mercaptoetanol, 2% de SDS y 62,5 mM de Tris-HCl). Luego, se enjuagó la membrana varias veces con PBS/Tween al 1%, para seguidamente ser incubada con el anticuerpo primario anti- β -actina durante 3 h a temperatura ambiente (dilución 1:10.000). Se utilizó el anticuerpo secundario anti-IgG de ratón a una dilución 1:1000 (Dako, Dinamarca) incubando durante 1 h a temperatura ambiente.

La visualización de las bandas proteicas se realizó en placas radiográficas por revelado mediante quimioluminiscencia. La membrana de nitrocelulosa fue cubierta con una solución acuosa con ácido p-cumárico, luminol y TRIS, que se volcó sobre la membrana. Se expuso una placa radiográfica a la reacción quimioluminiscente durante 3 a 15 min. Luego, la placa se sumergió en una solución de revelado hasta la aparición de las bandas proteicas, y finalmente en una solución de fijación. Se lavó con agua y se dejó secar.

2.4.3 **Gnmunohistoquímica sobre muestras de tejidos mamarios humanos**

La expresión de RHBDD2 a nivel proteico fue analizada mediante inmunohistoquímica (IHQ) en muestras tisulares mamarias normales y neoplásicas malignas.

Las muestras tisulares incluidas en parafina se cortaron con micrótomo a un espesor de entre 2 a 5 μ m y se fijaron a portaobjetos de vidrio. Para iniciar con la técnica de inmunomarcación las muestras fueron desparafinadas y rehidratadas, sumergiéndolas por períodos de 5 minutos en una serie de alcoholes: xilol 100%, etanol 100%, etanol 95%, etanol 70% y etanol 50%. Luego se colocaron en PBS pH 7,4.

Previo a la inmunomarcación se procedió al bloqueo de la actividad de la peroxidasa endógena con H_2O_2 en metanol al 3% por 10 min. Seguidamente, se realizó la recuperación antigénica colocando los portaobjetos en una solución de citrato de sodio 10 mM (pH 6,0) en horno de microondas durante 10 min. Luego de llegar a temperatura ambiente, las muestras se incubaron con suero equino al 10% en PBS por 30 min, a fin de bloquear uniones no específicas del anticuerpo primario. Luego, las muestras fueron incubadas con el anticuerpo primario policlonal anti-RHBDD2 (TA306891, Origene, USA), en una dilución de 1:150, durante 12 h en heladera a 4 °C. Posteriormente, se utilizó el kit Dako Cytomation LSAB+System-HRP (Dako, Dinamarca) para la detección del anticuerpo primario. La

inmunomarcación se realizó con diaminobenzidina utilizando el kit Dako Liquid DAB+ Substrate Chromogen System (Dako, Dinamarca). Se realizó una contra tinción de los tejidos usando hematoxilina (Sigma, USA). Se montaron con bálsamo de Canadá y cubreobjetos para su posterior observación al microscopio óptico de luz.

La reacción fue considerada positiva cuando se detectó tinción en más del 5% de las células epiteliales mamarias. Asimismo, se consideró el patrón de expresión (nuclear, citoplásmico, de membrana o mixto) y su intensidad (leve, moderada, fuerte).

2.5 Localización subcelular de Rhbdd2 mediante microscopía confocal de fluorescencia

La colocalización por inmunofluorescencia es una técnica utilizada para definir la localización subcelular de la proteína de interés, cuando se observa al microscopio de fluorescencia conjuntamente con marcadores conocidos de las estructuras celulares⁹¹.

El análisis cuantitativo de la colocalización es el método utilizado para la estimación del grado de colocalización de antígenos en imágenes de microscopía confocal de inmunofluorescencia de varios colores. La colocalización se observa cuando la señal fluorescente de dos o más antígenos se superponen en una misma sección del preparado⁹². El grado de colocalización es determinado mediante el cálculo de los coeficientes de colocalización, los cuales describen el grado de superposición y/o la intensidad entre píxeles provenientes de 2 canales distintos (señales fluorescentes) sobre una misma imagen de microscopía confocal⁹² (Tabla 5).

La localización subcelular de RHBDD2 fue estudiada en las líneas celulares de cáncer de mama MCF7, T47D, ZR75 y MDA-MB-231; y en la línea celular de mama normal de ratón HC11.

Se utilizaron los anticuerpos primarios: anti-RHBDD2 en una dilución 1:400 (Origene, USA), anti-CANX (Calnexina), anti-GalNacT3 (N-acetilgalactosamina transferasa 3) y anti-Tn (Affinity BioReagents, USA) en una dilución 1:100. La incubación se realizó durante 12 h a 4 °C. Luego se incubó 30 min a temperatura ambiente con los anticuerpos secundarios: anti-IgG de conejo unido a Cy3, dilución 1:400 (Jackson ImmunoResearch, USA) y anti-IgG de

ratón unido a biotina, dilución 1:50 (Dako, Dinamarca) (Figura 12). Los anticuerpos fueron diluidos con PBS-BSA al 10%.

Se utilizó Estrepatavidina-FITC (1:1000) para el marcado fluorescente (verde) del anticuerpo unido a biotina. La Cy3 brinda una señal fluorescente roja. Finalmente, los preparados fueron montados con medio de montaje Mounting Medium (508001, INOVA Diagnostics, San Diego, USA) y observados en el microscopio confocal de fluorescencia LSM410 (Zeiss).



El anticuerpo anti-CANX se utilizó para la identificación del ret. end., mientras que los anticuerpos anti-GalNacT3 y anti-Tn se

Figura 12. Esquema de la estrategia de detección y visualización, por medio de la inmunocitoquímica de fluorescencia, de algunos de los epítopes analizados.

utilizaron para la identificación del aparato de Golgi. Finalmente, para la marcación del núcleo se utilizó el colorante fluorescente Hoechst, que es afín al ADN.

Con el microscopio confocal de fluorescencia se obtuvieron imágenes de las células de cada preparado en ambas señales fluorescentes (verde y rojo). Las imágenes fueron procesadas y analizadas con el programa ImageJ. Se utilizó la aplicación JaCoP⁹¹, que permitió el cálculo de los Coeficientes de Colocalización, para determinar el grado de colocalización entre los antígenos estudiados y de ese modo determinar la localización subcelular de RHBDD2.

Cabe destacar que es importante la utilización de programas especializados que permitan la determinación de los coeficientes de colocalización en una misma sesión de análisis de imágenes, pues hace que los resultados sean comparables y reproducibles⁹².

Tabla 5. Descripción de los coeficientes de colocalización utilizados. Extraído de Bolte y Cordelieres, 2006⁹¹.

Coeficiente	Significado	Valores
Coeficiente de	Describe la correlación de la	Rango: -1 a 1.
Correlación de	distribución de intensidad entre los	Donde 1 indica correlación positiva, -1 negativa
Pearson (R)	canales de señal fluorescente.	y 0 no correlación.
Coeficiente de	Indica superposición real de señales,	Rango: 0 a 1.
Superposición (r)	se considera que representa el	Donde 0,4 implicaría que el 40% de ambos

Coeficientes de Colocalización

	verdadero grado de colocalización.	señales colocalizan.
		Continúa en la página siguiente
Continuación de la Ta	ıbla 5	
Coeficientes de	Describe la contribución de la señal	Rango: 0 a 1
Colocalización de	de cada uno de los canales	M1 y M2: 1 y 0,3 (respectivamente) implica que
Mander M1 y M2	seleccionados a los píxeles de interés.	todos los píxeles en el primer canal colocalizan
		con los píxeles en el segundo, pero solo el 30%
		de los píxeles en el segundo canal colocalizan
		con los píxeles del primero.

2.6 Silenciamiento de la expresión de *rhbdd2* en líneas celulares de cáncer de mama

2.6.1 Estrategia de silenciamiento post-transcripcional de RHBDD2

Para el silenciamiento de la expresión post-transcripcional de *RHBDD2* se utilizó el sistema de ARNsi (small interfering, en español, pequeños de interferencia). Para ello, se utilizaron tres ARNsi de 19 nucleótidos con secuencias complementarias al ARNm de *RHBDD2*:

- ∞ ARNsi-1 (5'-CUGUGUUGGGUACUUUGAUdTdT-3')
- ∞ ARNsi-2 (5'-GUCUACGAGAAUCCCAUCUdTdT-3')
- ARNsi-3 (5'-GCAGAACCACUUUGGUCCAdTdT-3')

y un ARNsi como control negativo de silenciamiento (con una secuencia que no presenta homología con ninguna región del genoma o transcriptoma humano): ARNsi-scr (5'-CCUACGCCACCAAUUUCGUdTdT-3'), los cuales fueron sintetizados por Bioneer Inc, Corea (Figura 13).

RHBDD2 – v	variante 2		
exon (2)	exonli		exonIV
exonl		exon III	exon V
			RHBDD2
misc_RNA (3)	ARNsi-2 р		ARNsi-3 ARNsi-1

Figura 13. Esquema de la variante 2 de *RHBDD2* donde se muestran los sitios de reconocimiento de los ARNsi sobre la molécula de ARNm. Los ARNsi son complementarios a los exones III y V, presentes en ambas variantes de empalme alternativo de *RHBDD2*, por lo que el efecto de silenciamiento se lograría sobre ambas formas transcripcionales.

El protocolo de transfección de los ARNsi se realizó mediante el empleo de Lipofectamina® 2000 (Life Technolgies, USA), siguiendo el protocolo propuesto por el fabricante. El silenciamiento se llevó a cabo en placas de 6 pocillos, donde en cada pocillo se sembraron: 0,2 pmol/µl de ARNsi y 6 µl de Lipofectamina® 2000, en 1000 µl de medio DMEM completo. Se incubó por 24 h en estufa de cultivo a 37 °C y 5% de CO₂, luego se cambió el medio (manteniendo las células con DMEM completo) y se procedió con diversos ensayos a partir de las 48 h post-transfección.

El silenciamiento se llevó a cabo sobre células MCF7 y T47D. La eficiencia del silenciamiento de *RHBDD2* se confirmó mediante RT-PCR a tiempo final, utilizando los cebadores descriptos anteriormente en la Tabla 4.

También se confirmó la eficiencia del silenciamiento mediante inmunofluorescencia. Para ello las células se cultivaron en laminillas de vidrio y luego se procedió con el protocolo de transfección. A las 48 h post-transfección, se procedió a la fijación de las células con acetona. Se utilizó el anticuerpo anti-RHBDD2 en conejo (Origene, USA) a dilución 1:400, junto con el sistema de detección Dako LSAB2 System-HRP (K0675, Dako, USA) y Estreptavidina-FITC (1:1000), para la visualización fluorescente de la proteína de interés. Los núcleos se marcaron con bromuro de etidio. Se visualizó con microscopio de fluorescencia Nikon ECLIPSE E200MV y se tomaron fotografías con el programa asociado NIS Elements F 4.0.

2.6.2 **Análisis de los perfiles de expresión asociados a** *RHBDD2* mediante microarreglos de oligonucleótidos

Se estudió la respuesta genómica transcripcional asociada al silenciamiento de *RHBDD2* en las líneas celulares de cáncer de mama MCF7 y T47D.

Para ello, se recurrió al modelo de silenciamiento post-transcripcional transitorio previamente descripto. Se extrajo el ARN total con TRI Reagent (MCR Inc., USA) acorde al protocolo del fabricante y se purificó utilizando el sistema NucleoSpin RNA Clean-up Kit (Macherey-Nagel, Alemania). La concentración y la integridad del ARN fue medida mediante el sistema Agilent Bioanalyzer RNA 6000 Nanokit (Agilent Technologies).

Posteriormente, se sintetizó ARNa (ARN aminoallil) a partir de 1 µg de ARN total con el sistema Amino Allyl MessageAmpTM II aRNA Amplification Kit (Ambion) y se marcó con el fluorocromo Cy5 Mono-ReactiveDyePack (GE Healthcare Bioscience). Se hibridó 1 µg del

ARNa marcado con el microarreglo de oligonucleótidos para genoma total 3D-Gene Human Oligo chip 25k V2.1 (GPL13915, Toray Industries, Japón). La marcación de los ARN y la hibridación se llevó a cabo en el centro Genomics Core Facility de Toray Inc. (Japón). Los datos normalizados fueron depositados en la base de datos del NCBI GEO con el número de entrada GSE43015 (www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE43015). Los experimentos se realizaron por duplicado.

Para identificar los genes diferencialmente expresados, entre las células con silenciamiento de *RHBDD2* y las células controles, se utilizó la prueba de Rank Products⁹³. El análisis estadístico y la visualización de los resultados se realizó con el programa MultiExperiment Viewer (MeV 4.9). Se determinó el número y la identidad de los genes cuya expresión se vio afectada en ambas líneas celulares con un nivel de significancia estadística de p<0,05.

Se utilizó el programa DAVID (Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery, <u>www.david.niaid.nih.gov</u>) para definir la función de los genes diferencialmente expresados en ambas líneas celulares. El programa determina los procesos celulares en que están involucrados los genes de interés mediante anotación automática funcional y análisis de enriquecimiento de ontología génica.

Además se utilizó el programa REViGO (Reduce and Visualize Gene Ontology, <u>www.revigo.irb.hr</u>) para resumir y visualizar en un gráfico interactivo de ontología génica los resultados obtenidos con DAVID, en función de los valores de *p* asignados a cada proceso celular por este último programa. De este modo se pueden identificar más fácilmente las vías celulares asociadas a *RHBDD2*.

En la figura 14 se muestra un esquema del procedimiento de trabajo desde la obtención del ARNm hasta la visualización de los procesos celulares en que están involucrados los genes que modifican su expresión en respuesta al silenciamiento de *RHBDD2*.

Se validó un set de transcriptos diferencialmente expresados, mediante RT-PCR cuantitativa. Los genes validados y sus respectivos cebadores se describen en la Tabla 4.



Figura 14. Esquema de trabajo para el estudio del efecto del silenciamiento de *RHBDD2* sobre la expresión génica global. Se representa el flujo de trabajo: inicialmente se obtuvo el ARNm de las muestras, el cual se marcó con fluorocromos y se hibridó en los microarreglos. Luego los datos del microarreglo se interpretaron y analizaron con el programa MultiExperiment Viewer, que permitió ordenar los genes según sus niveles de expresión. Se seleccionaron los genes cuya expresión se encontró desregulada con un nivel de significancia p<0,05 y el listado de genes se volcó en una hoja de Excel. Con el programa DAVID se determinó la función biológica de dichos genes. Para una visualización más cómoda de los procesos biológicos en que participan dichos genes se utilizó el programa REViGO.

2.6.3 Ensayos de proliferación celular y cierre de la herida

Se cultivaron células de la línea MCF7 en placas de 12 pocillos, para luego ser transfectadas con los ARNsi-1, -2 y -3 (para el silenciamiento de *RHBDD2*) y el ARNsi-scr (control negativo de silenciamiento), siguiendo el procedimiento descripto anteriormente. La evaluación de la proliferación celular se llevó a cabo a las 48 h post-transfección, usando el sistema colorimétrico CellTiter 96 ® Aqueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay (Promega, USA). Para la determinación del número de células en proliferación se midió la absorbancia de la luz a 492 nm en lector de placas de ELISA DTX 880 Multimode Detector (Beckman Coulter Inc.). Los valores de absorbancia se registraron utilizando el programa Multimode Detection Software (2.0.0.12).

Se estudió el efecto del silenciamiento de *RHBDD2* sobre las células mediante el ensayo de cierre de la herida. Este ensayo permite evaluar la migración y la proliferación celular *in vitro*⁹⁴. Para ello, se sembraron células en placas de 6 pocillos, se transfectaron con los ARNsi dirigidos contra *RHBDD2* y el ARNsi control negativo (scr). A las 72 h post-transfección se procedió a realizar las heridas en la monocapa celular utilizando una punta estéril para micropipeta de 200 μ l. Se realizaron 6 heridas en cada pocillo, en condiciones de esterilidad, y se observaron utilizando el microscopio de luz invertido Olympus IX71, equipado con una cámara digital (Olympus). Se tomaron fotografías a las 0 h y cada 24 horas durante 7 días, con una magnificación de 100X.

Las imágenes se procesaron con el programa ImageJ, con el cual se midió el ancho de las heridas durante el proceso de cierre (3 mediciones por herida para cada tiempo y tratamiento). Los datos obtenidos se procesaron en el programa estadístico SPSS Statistics 17.0.

2.6.4 Ensayo de adhesión celular a la matriz extracelular

Se evaluó la capacidad de adhesión de las células MCF7 a la MEC, con y sin silenciamiento post-transcripcional de *RHBDD2*. Para ello se utilizó el kit CytoSelectTM 48-Well Cell Adhesion Assay (Cell Biolabs INC., USA) que consiste en una placa de 48 pocillos cuyas superfícies del fondo están recubiertas con moléculas de la matriz extracelular (M-MEC). Las moléculas incluidas en el kit y su disposición se muestran en la Figura 15.

A									В
	1	2	3	4	5	6	7	8	Placa ELISA
A	Fibronectina								
B	Colágeno I								
C	Colágeno IV								
D	Laminina I	$\overline{00000}$							
Ε	Abrinógeno	Abrinógeno	Abrinógeno	Abrinógeno	Abrinógeno	Flbrinógeno	Abrinógeno	Abrinógeno	
F	BSA	$\bigcirc \bigcirc $							

Figura 15. A. Moléculas de la MEC del kit CytoSelect[™] 48-Well Cell Adhesion Assay (Cell Biolabs INC., USA) y su distribución en la placa de 48 pocillos. Las moléculas son: Fibronectina, Colágeno I, Colágeno IV, Laminina I, Fibrinógeno; y BSA (albúmina sérica bovina) como control negativo. **B.** Placa de ELISA con las soluciones de extracción, listo para la medición de la absorbancia.

Se resuspendieron entre $1 \cdot 10^6$ células de la línea MCF7, con y sin silenciamiento de *RHBDD2*, en medio de cultivo incompleto (sin suero fetal bovino, sin antibióticos) adicionado con BSA (0,5%), CaCl₂ (2 mM) y MgCl₂ (2 mM). Se sembraron 150 µl de las suspensiones celulares en los pocillos de la placa del kit (por duplicado) y se incubó por 60 min en estufa de cultivo a 37 °C y 5% de CO₂. Posteriormente, se retiró el medio y se lavó con PBS con CaCl₂ (2 mM) y MgCl₂ (2 mM). Luego, se agregó la solución de coloración celular incluida en el kit y se incubó durante 10 min a temperatura ambiente. Se lavó con agua ultrapura y se dejó secar a temperatura ambiente. Finalmente, se agregó una solución de extracción del colorante y se incubó durante 10 min en mezclador orbital. Al cabo de los 10 min se transfirieron 150 µl de la solución de extracción de cada pocillo a una placa de ELISA. Se midió la absorbancia de luz de cada pocillo con un filtro de 560 nm, con el equipo DTX 880 Multimode Detector (Beckman Coulter Inc.) utilizando el programa Multimode Detection Software (2.0.0.12). Los datos obtenidos fueron analizados con el programa estadístico SPSS Statistic 17.0.

2.7 Ensayo de privación nutricional

Para el estudio de la respuesta transcripcional de *RHBDD2* ante el estímulo de privación nutricional de glucosa se trabajó con la línea celular MCF7. Las células fueron cultivadas con medio DMEM 5030 incompleto (sin glucosa, L-glutamina, piruvato de sodio) (Sigma, EEUU)

y se usó medio DMEM 7777 completo (con glucosa, L-glutamina, piruvato de sodio) (Sigma, EEUU) para el grupo control.

Inicialmente, las células fueron cultivadas hasta una confluencia del 70% con medio DMEM completo suplementado con 10% (v/v) de suero fetal bovino (FBS, Gibco, USA), 100 U/ml de penicilina y 100 μ g/ml de estreptomicina, en estufa de cultivo a 37 °C y 5% de CO₂. Luego el medio completo fue reemplazado por medio incompleto, el cual solo se suplementó con 100 U/ml de penicilina y 100 μ g/ml de estreptomicina, cultivando las células en estufa a 37 °C y 5% de CO₂ por entre 3 a 12 h.

Las células fueron recolectadas con TRI Reagent (MCR Inc., USA) para la extracción y aislamiento del ARN total y proteínas. Se midieron los niveles de expresión de los transcriptos de *RHBDD2, CHOP* y *ARNr18S* mediante RT-PCR cuantitativa. Los cebadores utilizados se describen en la Tabla 4. Asimismo, se evaluó la expresión de las variantes de empalme de *RHBDD2*.

Por otra parte, se determinó la viabilidad celular de las células cultivadas con medio DMEM incompleto y con medio DMEM completo (a las 3, 6 y 12 h de tratamiento) mediante el conteo de células en cámara de Neubauer, utilizando el colorante vital azul tripán.

2.8 Prálisis bioinformático de la expresión de *RHBDD2*

Para el análisis comparativo (*in silico*) de la expresión de los genes de la superfamilia Romboide en los tejidos mamarios, se analizaron un total de 409 tejidos mamarios (normales y neoplásicos malignos). Se combinaron los datos de 143 tejidos normales de mama y 266 carcinomas mamarios primarios, derivados de dos estudios independientes: GSE10780 y GSE21653, descargados de inSilicoDb usando inSilicoMerging R/Bioconductor⁹⁵. Los perfíles de expresión génica fueron obtenidos usando la plataforma Affymetrix HG U133 Plus2 (GPL570). Luego de ser descargados los perfíles de expresión se combinaron utilizando el algoritmo COMBAT (para la corrección por efectos de grupos). Posteriormente, el análisis estadístico y la visualización en mapa de calor de los perfíles de expresión génica se realizaron con el programa MultiExperiment Viewer (<u>www. tm4.org/mev.html</u>).

También se analizaron datos de RNA-Seq del proyecto TCGA-BRCA (The Cancer Genome Atlas – Breast Invasive Carcinomas, <u>www.cancergenome.nih.gov/</u>)²², obtenidos utilizando el programa UCSC Xena (<u>www.xena.ucsc.edu/</u>). Este programa permite visualizar y analizar

datos de interés, en el contexto de grandes conjuntos de datos de expresión génica e información clínico-patológica de los individuos incluidos en el estudio. Se analizaron 133 muestras de tejidos normales y 1070 CDIs humanos. Para ello, se consideraron los niveles de expresión de cada exón, de ambas variantes de ARNm de *RHBDD2*, que se codificaron como expresión positiva o negativa. A su vez, se tuvieron en cuenta los datos de supervivencia global de las pacientes muestreadas y la clasificación de los tumores según los subtipos intrínsecos del cáncer de mama.

Las muestras se agruparon según la expresión de las variantes de empalme de *RHBDD2* y se evaluó la supervivencia global de las pacientes de cada grupo mediante un análisis de Kaplan-Meier. Del mismo modo, se consideró el patrón de expresión de las variantes de empalme de *RHBDD2* en función de los subtipos intrínsecos del cáncer de mama.



3.1 Expresión de los genes de la superfamilia romboide en muestras tisulares normales y de carcinomas mamarios

En primer lugar se procedió al análisis *in silico* de los genes de la superfamilia Romboide sobre un conjunto de datos de expresión génica de tejidos mamarios normales (n=143) y CDIs humanos (n=266), teniendo en cuenta los subtipos intrínsecos del cáncer de mama (Figura 16 A).

El análisis permitió identificar a *RHBDD2* como sobreexpresado en el subtipo Luminal B (p=0,007) con respecto de los tejidos mamarios normales (Figura 16 B).

En cambio, los genes *RHBDF2/iRhom2* (p=2,9·10⁻⁹), *RHBDL2* (p=1,8·10⁻⁷) (Figura 16 C), *PARL* (p=5,4·10⁻⁷), *DERL3* (p=1,3·10⁻⁴) y *DERL1* (p=0,002) se detectaron sobreexpresados en los carcinomas mamarios del subtipo Basal.

Por otra parte, se detectó un incremento significativo de la expresión de *RHBDF1/iRhom1* ($p=3,67\cdot10^{-4}$) (Figura 16 D), *TMEM115* ($p=3,76\cdot10^{-4}$), *RHBDD1* (p=0,013) y *RHBDL1* (p=0,014) en los carcinomas mamarios del subtipo Luminal A.

También se realizó un análisis de correlación para determinar la existencia de co-expresión entre los genes romboides. De este modo, se pudo identificar una correlación positiva entre *RHBDD2* y *TMEM115* (r=0,64, p<2, $2\cdot10^{-16}$) (Figura 16 E y F).



Figura 16. Expressión de los 14 genes romboides en tejidos normales y CDIs mamarios. **A.** Niveles de expressión de los genes romboides en las muestras tisulares agrupadas según los subtipos intrínsecos del cáncer de mama. La escala de color representa el nivel de expressión del ARNm: baja expressión (azul), alta expressión (amarillo).**B-D.** Gráficos de caja de la expressión de los genes romboides sobreexpresados en carcinomas del subtipo Luminal B (*RHBDD2*, p=0,007), Basal (*RHBDL2*, p=1,8·10⁻⁷) y Luminal A (*RHBDF1*, p=3,67·10⁻⁴), respecto de los tejidos normales. **E-F.** Co-expressión entre los genes romboides. Se detectó correlación de expressión positiva entre *TMEM115* y *RHBDD2* (r=0,64, p<2,2·10⁻¹⁶). La escala de color representa el coeficiente de correlación: azul (positivo), naranja (negativo).

Asimismo, se analizó la expresión de los genes romboides en muestras de tejidos normales (n=14) y de CDIs humanos (n=24) mediante RT-PCR cuantitativa en tiempo real. El análisis de los resultados obtenidos permitió detectar patrones de expresión específicos para cada uno de los genes estudiados (Figura 17 A).

Se observó que *RHBDD2* se encuentra sobreexpresado en los CDIs en comparación con los tejidos normales (p=0,012). Su expresión en los carcinomas fue moderada o alta (82% y 18% de los casos, respectivamente), mientras que en las muestras normales dicha expresión fue baja o negativa (30% y 62% de los casos, respectivamente) (Figura 17 B). Además, se identificó una asociación estadísticamente significativa entre los altos niveles de expresión de *RHBDD2* y estadíos tumorales avanzados de cáncer de mama (p=0,011). Al respecto, el 94% de los carcinomas mamarios de estadíos I y II mostraron bajos niveles de expresión de *RHBDD2*, mientras que el 60% de los carcinomas mamarios de estadío III presentaron alta expresión del mismo (Figura 17 C).

No se observaron asociaciones estadísticamente significativas entre los niveles de expresión del resto de los genes de la superfamilia Romboide y el estadío tumoral (p>0,05).

Por otra parte, se detectó una mayor expresión de *RHBDL2* en los carcinomas de grado histológico bajo/intermedio respecto de los carcinomas de grado histológico alto (p=0,024) (Figura 17 D). A su vez, su expresión fue significativamente más alta respecto de los tejidos normales. El 60% de los carcinomas de grado histológico bajo/intermedio expresaron altos niveles de *RHBDL2*, en contraste al 12% de los tejidos normales (p=0,01).

De modo similar, *PARL* se encontró sobreexpresado en los carcinomas de grado histológico bajo/intermedio respecto de los de grado histológico alto (p=0,015) (Figura 17 E). Sin embargo, no se observaron diferencias estadísticamente significativas en sus niveles de expresión entre los carcinomas de grado histológico bajo/intermedio y los tejidos normales (p>0,05).

La expresión de *RHBDL1* fue constitutiva y baja en todas las muestras de tejidos estudiadas; mientras que *RHBDD3* se detectó en solo una de las muestras de carcinomas mamarios analizadas (Figura 17 A).



Figura 17. Expresión relativa de genes de la superfamilia Romboide. **A.** Electroforesis en geles de agarosa de los productos de amplificación obtenidos mediante RT-PCR cuantitativa. Se estudiaron nueve genes humanos de la superfamilia Romboide en tejidos normales y carcinomas mamarios. Se tomó como gen de referencia al *ARNr18S.* **B-E.** Niveles de expresión del ARNm de los genes romboides *RHBDD2*, *RHBDL2* y *PARL*, en función del diagnóstico (normal vs. carcinoma), el estadío tumoral (estadíos I/II vs. estadío III) y el grado histológico (bajo/intermedio vs. alto).

Cuando se estudió la expresión de los genes romboides en las líneas celulares MCF7, T47D, ZR75 y MDA-MB-231, se pudo detectar expresión de los genes *RHBDD1, RHBDD2, RHBDF1/iRhom1, RHBDL1* y *PARL* en las cuatro líneas celulares. Sin embargo, *RHBDD3* se expresó solamente en las líneas celulares del subtipo Luminal (MCF7, T47D y ZR75), mientras que la expresión de *RHBDF2* se detectó en las líneas MCF7 y T47D. En cuanto a *RHBDL2,* se expresó en las líneas de subtipo Luminal T47D y ZR75; y en la línea celular de subtipo Basal MDA-MB-231. Finalmente, el gen *RHBDL3* se detectó principalmente en la línea celular ZR75 (Figura 18).



Figura 18. Expresión de los genes romboides en líneas celulares de cáncer de mama. **A.** Electroforesis en geles de agarosa de los productos de amplificación obtenidos mediante RT-PCR a punto final. **B.** Expresión relativa de los genes de la superfamilia Romboide, calculados por RT-PCR cuantitativa, tomando como transcripto de referencia al *ARNr18S*.

3.2 ANÁLISIS DE LAS VARIANTES DE EMPALME ALTERNATIVO DE *RHBDD2*

El proceso de maduración del transcripto primario de *RHBDD2* consiste en eventos de corte y empalme alternativos que resultan en la generación de dos variantes de ARNm⁴⁷. El análisis *in silico* de la secuencia de *RHBDD2* permitió reconocer 5 exones en este gen, de los cuales el exón II (de 122 pb) es el que estaría involucrado en el proceso de empalme alternativo. La inclusión del exón II en el ARNm generaría una molécula de 1878 nt (variante 2), mientras que cuando es excluido se obtendría una molécula de ARNm de 1756 nt (variante 1) (Figura 19).



Figura 19. Secuencia de ARNm de la variante 1 de *RHBDD2*. En rosado se marca la extensión del ORF codificado por esta variante de empalme, la cual codificaría una proteína de 364 aa. La barra celeste marca el sitio de empalme del exón II (aquí ausente). La cinta amarilla marca la extensión del ORF de la variante de empalme 2, el cual codificaría una proteína de 223 aa. Las M en verde indican los codones de inicio de la traducción y los asteriscos en rojo indican los codones de terminación. Imagen generada con el programa CLC Main Workbench.

Teniendo en consideración el análisis *in silico* de *RHBDD2*, se procedió a estudiar el patrón de expresión de ambas variantes de empalme alternativo en líneas celulares y en muestras tisulares normales y neoplásicas (CDIs).

Se diseñaron cebadores que permitieron distinguir ambas variantes de empalme de *RHBDD2* (Figura 20 A). Inicialmente la amplificación se realizó en las líneas celulares previamente descriptas, las cuales sobreexpresan *RHBDD2*. Los productos de amplificación obtenidos a partir de la línea T47D se visualizaron por electroforesis en gel de agarosa y se aislaron para su posterior secuenciación, con la finalidad de corroborar la identidad de los productos amplificados. Las secuencias obtenidas de los amplicones coincidieron con las secuencias predichas *in silico* de la región amplificada para cada variante de empalme (Figura 20 B).



Figura 20. Diseño del procedimiento para el análisis de la expresión de las variantes de empalme de *RHBDD2*. **A.** Esquema de las variantes de empalme de *RHBDD2*. Se destaca el exón II en rosado. Se representan los productos de amplificación con los cebadores (flechas) ubicados a la altura de sus sitios de unión al ARNm. Se indica la longitud del amplicón en pb. **B.** Secuenciación de los productos de RT-PCR de las variantes de empalme de *RHBDD2*. Se aislaron y secuenciaron los amplicones. Se muestran los cromatogramas que ayudan a la visualización y el análisis de los resultados de la secuenciación. Se presenta la secuencia correspondiente al sitio de empalme alternativo donde el exón I se une con el exón II o el exón III según se trate de la variante 2 o la variante 1, respectivamente. Se indica el número de nucleótido en la secuencia en los

ARNm.

Una vez validada la metodología de estudio, se procedió al análisis de la expresión de las variantes de empalme en las líneas celulares y en los tejidos mamarios (normales y carcinomas), observándose que su expresión fue variable tanto a nivel de presencia/ausencia como a nivel de su expresión relativa.

Las cuatro líneas celulares estudiadas mostraron expresión de ambos ARNm de *RHBDD2*, siendo siempre menor la expresión de la variante 2 respecto de la variante 1. En la línea celular ZR75 el nivel de expresión de la variante 2 fue significativamente menor (p<0,001) que en las otras líneas celulares estudiadas (Figura 21).



Figura 21. Expresión de las variantes de empalme de RHBDD2 en las líneas celulares de cáncer de mama MCF7, T47D, ZR75 y MDA-MB-231. Electroforesis A. en gel de poliacrilamida para ambas variantes de empalme. La banda superior de 233 pb corresponde a la variante 2 (que incluye al exón II), mientras que la banda inferior de 111 pb corresponde a la variante 1. B. Expresión relativa de ambas variantes de empalme, en función de la expresión total de RHBDD2. La expresión de la variante 2 fue significativamente menor en la línea celular ZR75 respecto de su expresión en las otras líneas celulares estudiadas (p<0,001).

El estudio de la expresión de las variantes de empalme de *RHBDD2* en los tejidos mamarios normales y en los CDIs, se efectuó sobre las muestras previamente identificadas como

RHBDD2 positivas. La expresión de las variantes de empalme de *RHBDD2* fue variable (Figura 22 A).

Se detectó que el 73% de los carcinomas (14 de 19 casos) expresaron la variante 2 de *RHBDD2*, mientras que solo el 36% de los tejidos normales (4 de 11 casos) expresaron dicha variante de empalme (p=0,05) (Figura 22 B). Esto indicaría que la variante 2 se expresaría más frecuentemente en los carcinomas que en los tejidos mamarios normales (Figura 22 C). Además, los niveles de expresión de la variante 2 en los tejidos normales fueron significativamente menores a los detectados en los carcinomas (p=0,037) (Figura 22 D).





Figura 22. Variantes de empalme de *RHBDD2* en tejidos normales y carcinomas. **A.** Electroforesis en gel de poliacrilamida donde se observan amplicones de las variantes de empalme (V1 y V2), en muestras de carcinomas y tejidos normales de mama. **B.** Frecuencia de expresión de las variantes de empalme en las muestras normales y carcinomas mamarios. La variante 2 se expresó en el 73% de los carcinomas y solo en el 36% de los tejidos normales (p<0,05). **C.** Expresión relativa de cada variante de empalme en cada una de las muestras analizadas. **D.** Expresión relativa de la variante 2 en tejidos normales y carcinomas mamarios (valores expresados en veces de cambio). Los carcinomas mostraron altos niveles de expresión relativa de la variante 2, respecto de los tejidos normales (p<0,037).

Con el propósito de determinar la relevancia de las variantes de empalme de *RHBDD2* en el cáncer de mama, se procedió a analizar datos de RNASeq de tejidos mamarios normales y neoplásicos del proyecto TCGA-BRCA (The Cancer Genome Atlas – Breast Cancer).

Se analizó la frecuencia de expresión de *RHBDD2* en133 muestras de tejidos normales y 1070 CDIs humanos. El 62% (663 de 1070 casos) de los tumores mamarios expresaron *RHBDD2*, mientras que solo el 8% (11 de 133 casos) de los tejidos normales expresaron este gen (p<0,05) (Figura 23 A).

Además, con los datos del TCGA-BRCA se realizó un análisis de supervivencia para 464 pacientes con carcinomas mamarios en función de la expresión de las variantes de empalme de *RHBDD2* (Figura 23 B y C). Se observó que las pacientes que expresan la variante 2 exhiben una supervivencia global significativamente menor que aquellas que solo expresan la variante 1 (p<0,05) (Figura 23 C).

Finalmente se consideró el patrón de expresión de ambas variantes de empalme en relación a los subtipos intrínsecos del cáncer de mama. No se observaron diferencias significativas entre la expresión de las variantes de *RHBDD2* y su asociación con los subtipos de cáncer de mama. Se determinó que más del 80% de las muestras que sobreexpresaron ambas variantes de empalme de *RHBDD2* correspondieron a carcinomas mamarios del subtipo Luminal.

Entre los carcinomas que expresaron ambas variantes de empalme (V1+/V2+): el 86% (207 de 240 casos) correspondieron al subtipo Luminal, el 8% (19 de 240 casos) al subtipo Basal, el 4% (10 de 240 casos) al subtipo HER2/ERBB2 y el 2% (4 de 240 casos) al subtipo Normal.

De modo similar, entre los carcinomas que no expresan la variante de empalme 2 (V1+/V2-): el 83% (84 de 101 casos) fueron clasificados como subtipo Luminal, el 10% (10 de 101 casos) como subtipo Basal y el 7% (7 de 101 casos) como subtipo HER2/ERBB2 (Figura 23 D).



Figura 23. Expressión de *RHBDD2* en tejidos mamarios normales y tumorales del proyecto TCGA-BRCA. **A.** El 62% de los carcinomas expresaron *RHBDD2*, mientras que éste se expresó solo en el 8% de los tejidos normales (p<0,05). **B.** Gráfico de Kaplan-Meier de la supervivencia global de las 464 pacientes incluidas en el análisis. En amarillo: IC=95%. **C.** Gráfico de Kaplan-Meier de la supervivencia global de las pacientes en función de la expresión de las variantes de empalme de *RHBDD2*. Las pacientes que expresan la variante 2 (rojo) muestran una menor supervivencia que las que no la expresan (verde). La asociación es estadísticamente significativa (p<0,05). **D.** Clasificación de las muestras que expresaron ambas variantes de empalme de *RHBDD2* (V1+/V2+) o solo la variante 1 (V1+/V2-), según el subtipo intrínseco de cáncer de mama. No se observó asociación entre el patrón de expresión de las variantes de empalme y un subtipo intrínseco de cáncer de mama. No se observó asociación entre el patrón de expresión global de *RHBDD2* se asoció con carcinomas del subtipo Luminal (>80% de los casos).

3.3 ANÁLISIS DE LAS ISOFORMAS PROTEICAS DE RHBDD2

El análisis *in silico* del ARNm de *RHBDD2* predice la generación de un péptido de 79 aa y una proteína de 223 aa, a partir de la variante 2 (Figura 24 A y B); mientras que la variante 1 codificaría una proteína de 364 aa (Figura 24 C). El peso molecular estimado para cada isoforma proteica de RHBDD2 sería de 39,21 kDa (isoforma a codificada por la variante 1) y 23,64 kDa (isoforma b codificada por la variante 2). Para la estimación del peso de las proteínas se utilizó el programa Sequence Manipulation Suite – Protein Molecular Weight (www.ualberta.ca/~stothard/javascript/protein_mw.html)⁹⁶.



Figura 24. Secuencia de aminoácidos de las proteínas generadas a partir de las variantes de empalme de *RHBDD2*. **A.** Péptido putativo de 79 aa codificado por el primer ORF detectado en la variante 2. **B.** Isoforma b de 223 aa, codificada por el segundo ORF en la variante 2. **C.** Isoforma a de 364 aa, codificada por la variante 1. Se indica subrayado con rojo la secuencia de aminoácidos que no se incluye en la isoforma b. El asterisco en negro representa el codón de terminación.

Se utilizó el programa Protter⁹⁶ para determinar la estructura secundaria y la disposición en la membrana de las isoformas proteicas de RHBDD2. La isoforma a presentaría 5 DTM con sus extremos amino- y carboxilo-terminal orientados en direcciones opuestas respecto de la membrana (Figura 25 A). La isoforma b se organizaría en 2 DTM cuyos extremos amino- y carboxilo-terminal se orientarían hacia el mismo lado respecto de la membrana (Figura 25 B).

La secuencia antigénica reconocida por el anticuerpo anti-RHBDD2 utilizado es: SLMRRISVFKYVSGSSAERRAAQSRKLNPVPGSYPTQSCHPHLSPSHPVS.

Dicha secuencia se localizaría en la región carboxilo-terminal de ambas isoformas proteicas. En la isoforma a se extendería desde la posición 221 a la 270 (Figura 25 A), mientras que en la isoforma b se extendería desde la posición 80 a la 129 (Figura 25 B), de modo que el anticuerpo sería capaz de reconocer las dos isoformas de RHBDD2.



Figura 25. Predicción de la estructura secundaria de las isoformas proteicas de RHBDD2 y su disposición en la membrana celular, utilizando el programa Protter⁹⁶. **A.** Isoforma a (larga) con 5 DTM, las regiones amino- y carboxilo-terminal orientados hacia lados opuestos de la membrana. **B.** Isoforma b (corta) con 2 DTM, las regiones amino- y carboxilo-terminal presentarían la misma orientación respecto de la membrana. En rojo se indican los aminoácidos que corresponden al péptido señal, identificados utilizando el programa MemPype⁹⁷. En azul los aminoácidos que son reconocidos por anticuerpo anti-RHBDD2.

Posteriormente, se analizó la expresión de las isoformas proteicas de RHBDD2 mediante western-blot en las líneas celulares de cáncer de mama y en muestras de CDIs humanos.

Las dos isoformas proteicas se observaron en las líneas celulares de cáncer de mama así como en las muestras de tumores mamarios (para los cuales se había establecido previamente que expresaban ambas formas transcripcionales de *RHBDD2*).

Se visualizaron bandas a las alturas esperadas de acuerdo al peso estimado de ambas isoformas proteicas: una banda cerca de los 24 kDa para la isoforma b (codificada por la variante 2) y otra cercana a los 39 kDa para la isoforma a (codificada por la variante 1) (Figura 26 A).

Asimismo, se determinó la expresión relativa de las isoformas proteicas para cada muestra, tomando como referencia de carga a β -actina. En la línea celular MCF7 la expresión relativa de la isoforma a fue significativamente mayor que la de la isoforma b (p<0,01). Contrariamente en la línea celular MDA-MB-231 y en los CDIs la relación se invierte, siendo la expresión de la isoforma b significativamente mayor que la isoforma a (p<0,01) (Figura 26 B y C).





Figura 26. Expressión proteica de las isoformas de RHBDD2 en CDIs (T) y líneas celulares de cáncer de mama (MCF7 y MDA-MB-231). **A.** Western-blot donde se observan bandas correspondientes a la isoforma a (39,21 kDa) y a la isoforma b (23,64 kDa). Se utilizó β -actina como referencia de carga (42 kDa). **B.** Expressión relativa de las isoformas en las líneas celulares y los CDIs. **C.** Media de la expressión relativa de las isoformas proteicas. La relación de expressión se invierte cuando se comparó la línea MCF7 con los tumores y la línea MDA-MB-231. La diferencia de expressión entre las isoformas a y b fue estadísticamente significativa (p<0,01), dentro de cada grupo y entre grupos. Barras de error +/- 2 SE.

3.4 Localización subcelular de rhbdd2 mediante inmunocitoquímica

A fin de determinar la localización subcelular de RHBDD2 total, se procedió a realizar un análisis de colocalización por inmunofluorescencia confocal en las líneas celulares de cáncer de mama. Se identificaron por inmunofluorescencia el retículo endoplasmático y el aparato de Golgi (utilizando anticuerpos asociados a un fluorocromo verde) y se marcaron ambas isoformas proteicas de RHBDD2 utilizando un anticuerpo anti-RHBDD2 (asociado a un fluorocromo rojo). Se determinó el grado de colocalización de las señales fluorescentes mediante el análisis de las imágenes obtenidas con el microscopio confocal de fluorescencia.

Para ello, las imágenes se procesaron con el programa ImageJ, con el cual se calcularon los coeficientes de colocalización utilizando la aplicación JaCoP⁹¹ (Figura 27). Los valores obtenidos indicaron existencia de colocalización parcial entre los anticuerpos que se usaron para identificar al Golgi y el anticuerpo anti-RHBDD2. Esto permitió establecer que RHBDD2 se localiza en el aparato de Golgi (Tabla 6).

Los valores de colocalización obtenidos entre las señales del marcador del ret. end y RHBDD2 indicaron ausencia de colocalización (R < 0.4).

Tabla 6. Coeficientes de Pearson, de Superposición y de Mander. Los valores indicaron colocalización parcial de las señales, lo cual demuestra que RHBDD2 se localiza en el Golgi. M1=fracción de RHBDD2 superpuesta con marcador del Golgi. M2= fracción del marcador del Golgi superpuesta con RHBDD2.

Línea celular	Coeficiente de Pearson (R)	Coeficiente de Superposición (r)	Coeficientes de Mander (M1, M2)		
MCF7	0,72	0,961	M1=0,787 M2=0,552		
T47D	0,811	0,968	M1=0,607 M2=0,853		
ZR75	0,71	0,909	M1=0,592 M2=0,923		
MDA-MB-231	0,837	0,961	M1=0,677 M2=0,792		



Figura 27. Imágenes obtenidas por microscopia confocal de fluorescencia. Se muestran células de las líneas celulares de cáncer de mama MCF7 (**A-D**), MDA-MB-231 (**E-H**), T47D (**I-L**) y ZR75 (**M-O**). Los colores corresponden a: RHBDD2 (rojo), GalNacT3 y Tn, indicadores del Golgi (verde), CANX marcador del ret. end. (verde). En amarillo: las regiones de colocalización de ambas señales fluorescentes. R=Coeficiente de Pearson. n=núcleo. Las flechas blancas gruesas indican colocalización, las flechas blancas delgadas indican exclusión de señal fluorescente (no colocalización).
3.5 Análisis de la expresión proteica de rhbdd2 mediante inmunohistoquímica

La expresión proteica total de RHBDD2 fue analizada mediante IHQ sobre 126 muestras de tejidos mamarios (14 normales y 112 CDIs).

La tinción de IHQ mostró una reacción citoplasmática, siendo en algunos casos granular (Figura 28, Tumor 2) mientras que en otros difusa (Figura 28, Tumor 4), localizada principalmente en la región perinuclear. También se observó tinción nuclear en algunos CDIs (6,55%, 8 de 112 casos) (Figura 28, Tumores 3 y 4).

RHBDD2 se detectó en el 80% de los CDIs (90 de 112 casos) y en el 36% de los tejidos normales (5 de 14 casos). Esta diferencia de expresión fue estadísticamente significativa: p<0,05.

Al igual que en el análisis de la expresión del ARNm, se evaluó estadísticamente la relación entre el estadío tumoral y la expresión proteica de RHBDD2. Se observó una asociación significativa entre la expresión de RHBDD2 y el estadío avanzado de la enfermedad (estadío III, p=0,024). Al respecto, el 40% de los tumores de estadío I (12 de 30 casos) y el 58% de los tumores de estadío II (26 de 45 casos) fueron positivos para RHBDD2 en comparación al 76% (28 de 37 casos) de casos positivos en los tumores de estadío III (Figura 29 A).

Además, cuando se comparó la expresión de RHBDD2 en función del estatus de los marcadores RE, RP y HER2/ERBB2 se observó una asociación significativa con la ausencia del RP (p=0,015). El 83% de los tumores RP negativos expresaron RHBDD2 (40 de 48 casos), en contraste con el 44% de los tumores RP positivos (28 de 64 casos) (Figura 29 B y C). No se encontró asociación estadísticamente significativa entre la expresión del RE y RHBDD2 (p>0,05), ni entre la expresión de HER2 y RHBDD2 (p>0,05).



Figura 28. Expresión proteica de RHBDD2 en muestras de CDIs humanos. Inmunohistoquímica para RHBDD2 mostrando reacción negativa (Tumor 1) y positiva (Tumores 2-4). Las imágenes se tomaron con aumento de 400X. Detalle a 1000X en la esquina superior derecha. La coloración marrón corresponde a reacción positiva en la región citoplasmática perinuclear (Tumores 2-4) y en algunos núcleos (Tumores 3 y 4, se indica con flechas). Los núcleos se observan coloreados en azul-violeta. En la esquina inferior derecha se encuentra la barra de escala (μm).



Figura 29. Expresión proteica de RHBDD2 en muestras de CDIs. **A.** Porcentaje de muestras negativas y positivas para la expresión de RHBDD2 respecto de los estadíos tumorales; y **B.** el estatus del receptor de progesterona. La expresión de RHBDD2 se asoció a los estadíos tumorales avanzados (estadío III, p=0,024) y a la ausencia de expresión del RP (p=0,015).C. Inmunohistoquímica de RHBDD2, RE y RP para cortes del mismo CDI. El tumor es positivo para RHBDD2 y RE, pero negativo para RP. La coloración marrón corresponde a marcación positiva. Los núcleos se colorean en azul-violeta. Se muestran las barras de escala en la esquina inferior derecha

3.6 Silenciamiento de la expresión de *rhbdd2* en líneas celulares de cáncer de mama

El silenciamiento post-transcripcional de *RHBDD2* se llevó a cabo utilizando tres ARNsi alternativos. Los ARNsi-1 y -3 silenciaron efectivamente la expresión de *RHBDD2*, mientras que esto no ocurrió con el ARNsi-2 y el ARNsi-scr (control negativo) (Figura 30 A). La caída de la expresión de *RHBDD2* total por efecto de los ARNsi-1 y -3 fue estadísticamente significativa (p<0,001) (Figura 30 B).

El efecto del silenciamiento también se evaluó a nivel proteico por inmunofluorescencia (Figura 30 C) y por western-blot (Figura 30 D). Se pudo determinar que la expresión de ambas isoformas proteicas se vio afectada negativamente ante el silenciamiento de la expresión de *RHBDD2* (p<0,001). Se utilizó como referencia de carga a β -actina. (Figura 30 D).



Figura 30. Ensayo de silenciamiento post-transcripcional de *RHBDD2* en la línea celular MCF7. **A-B.** Amplicones y niveles de expresión de *RHBDD2* total. El silenciamiento fue efectivo con los ARNsi-1 y -3 (p<0,001), pero no con los ARNsi-2 y el ARNsi-scr (control negativo). Barras de error: +/- 2 SE. **C.** Inmunocitoquímica de fluorescencia en células con y sin silenciamiento de *RHBDD2* (verde: RHBDD2, rojo: núcleos). **D.** Western-blot de las isoformas proteicas de RHBDD2. El silenciamiento fue efectivo también a nivel proteico, afectando significativamente la expresión de ambas isoformas proteicas (p<0,001). Se utilizó β-actina como referencia de carga.

3.6.1 Análisis del transcriptoma de líneas celulares de cáncer de mama en relación al

silenciamiento de RHBDD2

A partir de células MCF7 y T47D con y sin silenciamiento de *RHBDD2*, se aisló ARN total y se determinó su integridad (Figura 31). Posteriormente, se hibridó al microarreglo Toray 3D-Gene Human Oligochip 25K V2.1 para determinar el patrón de expresión génica en las células silenciadas (ARNsi-1) y las células controles (ARNsi-scr).



Figura 31. Determinación de la integridad del ARN total aislado a partir de células MCF7 y T47D silenciadas (ARNsi-1) y no silenciadas (ARNsi-scr). Electrofenogramas de ARN total donde se observan los picos correspondientes a los ARNr 18S y 28S, para cada muestra estudiada (por duplicado).

Los resultados obtenidos a partir de los microarreglos de oligonucleótidos fueron analizados comparando los perfiles de expresión entre las células controles (ARNsi-scr) y las silenciadas (ARNsi-1), de cada línea celular.

Inicialmente, se identificaron los genes que cambiaron su patrón de expresión en respuesta al silenciamiento de *RHBDD2*:

- C3 En la línea celular MCF7: 1255 genes se encontraron desregulados positivamente (aumento de la expresión) y 1296 desregulados negativamente (disminución de la expresión), en respuesta al silenciamiento de *RHBDD2* (p<0,05).</p>
- C3 En la línea celular T47D: 1249 fueron los genes que aumentaron su expresión y 927 los que la disminuyeron (p<0,05), ante la pérdida de expresión de *RHBDD2*.

Luego se compararon entre sí las listas de genes positiva y negativamente desregulados en ambas líneas celulares, con la finalidad de identificar los cambios transcripcionales comunes entre líneas celulares. Se identificaron 541 genes comúnmente desregulados en ambas líneas celulares (p<0,05), de los cuales 281 aumentaron sus niveles de expresión y 260 la disminuyeron en respuesta al silenciamiento de *RHBDD2* (Figura 32 A y B).

Con la lista de genes comúnmente desregulados en las líneas celulares se realizó un análisis de enriquecimiento funcional con los programas DAVID 6.7 y ReViGO, mediante el cual los genes son asignados a una categoría biológica determinada acorde a su ontología génica (según su función molecular, su rol en los procesos biológicos y su localización subcelular). Dicho análisis permitió identificar los principales procesos biológicos en los cuales se encuentran involucrados los genes que modificaron su expresión ante el silenciamiento de *RHBDD2*. Las principales funciones biológicas de estos genes se asociaron a: la fosforilación oxidativa (p<0,005), el ciclo celular (p<0,01), el metabolismo del ARNm (p<0,001), la biogénesis de ribosomas (p<0,0001), la respuesta al daño del ADN (p<0,02), la homeostasis del estado óxidoreductor de la célula (p<0,001), la apoptosis (p<0,005) y el metabolismo proteico (p<0,05) (Figura 32 C).

Posteriormente, mediante RT-PCR cuantitativa se validó el cambio de la expresión transcripcional de algunos de los genes identificados como significativamente desregulados en el análisis de los microarreglos (p<0,0001). Los genes seleccionados fueron: *PAGE5* (PAGE family member 5), *NEURL1* (neuralized E3 ubiquitin protein ligase 1) y *CALCA* (calcitonin-related polypeptide alpha). Estos genes fueron escogidos ya que están involucrados en procesos celulares importantes para la supervivencia celular y asociados a varios tipos de cáncer.

En concordancia a lo previamente detectado en los microarreglos *NEURL1* aumentó significativamente su expresión en respuesta al silenciamiento de *RHBDD2* (p<0,05) (Figura 32 D). Por el contrario, los genes *PAGE5* y *CALCA* disminuyeron significativamente su expresión en las células donde se silenció a *RHBDD2* (Figura 32 D).



Figura 32. Análisis de la modificación de la expresión génica en las líneas celulares MCF7 y T47D en respuesta al silenciamiento de *RHBDD2*. **A.** Mapa de calor de la expresión de los genes en las muestras tratadas con ARNsi-1 y ARNsi-scr, para ambas líneas celulares. **B.** Diagrama de Venn de los genes desregulados transcripcionalmente en respuesta al silenciamiento de *RHBDD2* (p<0,05). En la intersección de los conjuntos se indica el número de genes que aumentaron o disminuyeron su expresión en ambas líneas celulares. **C.** Diagrama de dispersión de los genes comúnmente desregulados entre las líneas celulares, agrupados por ontología génica. **D.** Expresión relativa de los genes *NEURL1*, *PAGE5* y *CALCA*, medida por RT-PCR cuantitativa en las líneas celulares con o sin silenciamiento de *RHBDD2* (para validar los datos del microarreglo).

3.6.2 Ensayos de proliferación y adhesión celular

Debido a que se identificaron al ciclo celular (p<0,01) y la motilidad celular (p<0,05) como bioprocesos enriquecidos en el análisis de ontología génica, se decidió estudiar el efecto del silenciamiento de *RHBDD2* en la proliferación, la migración y la adhesión celular, en la línea celular MCF7.

El efecto del silenciamiento de *RHBDD2* sobre la proliferación celular se evaluó utilizando el sistema CellTiter 96® Aqueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay. Este método colorimétrico permitió evaluar la capacidad proliferativa de las células silenciadas (ARNsi-1 y-3) y no silenciadas (ARNsi-scr), mediante la medición de la absorbancia lumínica a 490 nm en placa de ELISA.

Los resultados mostraron que la ausencia de la expresión de *RHBDD2* provocó una disminución significativa de la proliferación celular (p<0,001) (Figura 33 A).

Además, se evaluó la capacidad de proliferación y migración celular mediante el ensayo de cierre de la herida. Se observó que la velocidad de cierre de la herida fue significativamente mayor en las células donde no se silenció la expresión de *RHBDD2* (p<0,05) (Figura 33 B). Las células que expresaron *RHBDD2* lograron completar el cierre de la herida a las 144 h (6 días después de provocada la herida) (Figura 33 C). En cambio, las células que no expresaron *RHBDD2* luego de transcurridas 168 h (7 días) aún no habían cerrado completamente la herida (Figura 33 D).

Debe tenerse en cuenta que el ensayo de cierre de la herida evalúa integralmente los procesos de proliferación y migración celular; y que este último proceso depende de la unión de las células a la MEC. Por ello, se decidió estudiar la capacidad de las células MCF7 de adherirse a las M-MEC a fin de determinar si la diferencia observada de velocidad de cierre de la herida estuvo influenciada por dicha capacidad.

Se utilizó un kit de adhesión celular que incluía las M-MEC: fibronectina, colágeno I, colágeno IV, laminina I y fibrinógeno. No se observaron diferencias significativas (p>0,05) en la capacidad de las células MCF7 de adherirse a las M-MEC en función del estado de expresión de *RHBDD2* (Figura 34). Estos resultados indicarían que el proceso de cierre de la herida no se vio afectado por la capacidad de las células de unirse a la MEC, sino que estuvo determinado por una mayor capacidad de proliferación de las células que sí expresaron *RHBDD2*.



Figura 33. Ensayos de proliferación y cierre de la herida en células de la línea MCF7, con (ARNsi-1) y sin (ARNsi-scr) silenciamiento de *RHBDD2*. **A.** Efecto del silenciamiento sobre la proliferación celular. La proliferación celular fue significativamente menor en las células que no expresaron *RHBDD2* (p<0,001). Los valores de absorbancia representan la cantidad de células. **B.** Ensayo de cierre de la herida. Gráfico de líneas donde se representa la distancia entre los márgenes de la herida a las 0, 24, 48 y 72 h. La diferencia en el ancho de la herida entre tratamientos fue significativo para todos los tiempos (p<0,05). La herida se cerró más rápidamente en las células que expresaban *RHBDD2*. Barras de error: +/- 2 SE. **C-D.** Serie fotográfica del proceso de cierre de la herida. El completo cierre de la herida en las células no silenciadas se observó a las 144 h, mientras que en las células silenciadas se observó que a las 168 h aún no se había cerrado completamente la herida. En amarillo-punteado se marcan los bordes de la herida.



Figura 34. Cantidad de células adheridas a las distintas M-MEC: fibronectina, colágeno I, colágeno IV, laminina, fibrinógeno; y a un control negativo (BSA). Los valores de absorbancia representan el total de células adheridas a las M-MEC. No se observó diferencia significativa (p>0,05) de la capacidad de adhesión celular, entre células silenciadas y no silenciadas post-transcripcionalmente para la expresión de RHBDD2. Barras de error: +/- 2 SE.

3.7 Ensayo de privación nutricional de glucosa

Para continuar estudiando la relación entre la proliferación celular y la expresión de *RHBDD2*, se analizó el efecto de la privación nutricional de glucosa sobre la expresión de este gen, pues se sabe que la privación de glucosa produce arresto del ciclo celular, lo cual pude finalmente desencadenar autofagia y/o apoptosis⁹⁸.

Para ello se cultivaron células de la línea MCF7 con DMEM incompleto (sin glucosa, Lglutamina, piruvato de sodio ni suero fetal bovino). Se trabajó a distintos tiempos: 3, 6, 9 y 12 h, a los cuales las células fueron recolectadas y procesadas para medir el nivel de expresión de *RHBDD2* (total), *CHOP* y *ARNr18S*. Se usó medio DMEM completo (con glucosa, Lglutamina, piruvato de sodio y suero fetal bovino) para cultivar las células que se utilizaron como control negativo del estrés nutricional. *CHOP* se utilizó como indicador de respuesta celular al estímulo de privación de glucosa.

También se evaluó la expresión de las variantes de empalme de *RHBDD2* en las células tratadas y controles, en cada tiempo experimental.

Las células cultivadas bajo privación nutricional de glucosa mostraron una disminución estadísticamente significativa en la expresión de *RHBDD2* total (p<0,02) respecto de las células que se cultivaron con medio DMEM completo (con glucosa). La expresión de *RHBDD2* total fue disminuyendo progresivamente con el paso del tiempo de exposición de las células a las condiciones de privación de glucosa (Figura 34 A).

Lo contrario se observó cuando se analizó la expresión de *CHOP*, el cual evidenció un aumento estadísticamente significativo (p<0,01) de su expresión, en respuesta a la privación nutricional de glucosa (Figura 34 B).

En cuanto a la expresión de las variantes de empalme, se observó que la variante 2 aumentó su expresión relativa (en detrimento de la expresión de la variante 1) en las células que fueron sometidas a privación de glucosa, a partir de las 6 h de tratamiento. Dicho aumento de expresión fue estadísticamente significativo (p<0,0001). Esto no se observa en las células que no sufren privación de glucosa, en las cuales los niveles de expresión relativa de la variante 2 se mantienen constantes a lo largo del tiempo en relación a la variante 1 (p>0,05) (Figura 35).

La privación de glucosa no afectó la viabilidad celular (p>0,05), la cual se evaluó utilizando azul tripán.





Figura 34. Expresión relativa de RHBDD2 y CHOP en células MCF7 sometidas (tratamiento) o no (control) a privación de glucosa por diferentes tiempos (3 a 12 h). A. La expresión de RHBDD2 disminuyó significativamente con el tiempo (p<0,02) cuando las células fueron sometidas a privación de glucosa con DMEM incompleto (rojo). No se observó diferencia estadísticamente significativa de la expresión de RHBDD2 en las células cultivadas con DMEM completo (gris) entre los distintos tiempos (p>0,05). B. expresión de CHOP aumentó La significativamente (p<0,01) cuando las células fueron sometidas a privación de glucosa (verde). No se observó diferencia estadísticamente significativa de la expresión de CHOP en las células del grupo control (gris) entre los distintos tiempos (p>0,05). Barras de error: +/- 2 SE.



Figura 35. A. Expressión relativa de las variantes de empalme de *RHBDD2* en células cultivadas en medio con (+) o sin (-) glucosa por distintos tiempos (3 a 12 h). Se observó aumento de la expresión de la variante 2 de *RHBDD2* en detrimento de la variante 1 a partir de las 6 h de tratamiento. El eje y se presenta en escala logarítmica (log₂). **B.** Expresión relativa de la variante 2. Su expresión aumenta significativamente en las células sometidas a privación de glucosa (rojo) a partir de las 6 h (p<0,0001) alcanzando un pico máximo a las 9 h (p<0,0001), respecto de las células control (gris).

3.8 Análisis de la expresión de *rhbdd2* en un modelo mamario murino de proliferación y diferenciación celular

Se trabajó con la línea celular HC11 como modelo de célula epitelial normal de glándula mamaria y se evaluó la expresión de *Rhbdd2* en distintos estadíos de diferenciación celular. Se utilizó la hormona Prolactina para estimular la diferenciación de las células en estadío de competencia. Se extrajo el ARN total de las células en sus distintos estadíos y se analizó la expresión del ARNm de *Rhbdd2*, *Caseína 2* (marcador de diferenciación) y *ARNr18S* (transcripto de referencia). El análisis de los niveles de expresión de *Caseína 2* permitió confirmar que el protocolo de diferenciación fue exitoso, observándose que la expresión de *Caseína 2* aumentó significativamente en las células en estado diferenciado, respecto de los estados de proliferación y competencia celular (p<0,0001) (Figura 36 A).

Se observó que la expresión del ARNm de *Rhbdd2* en la línea celular HC11 fue significativamente más alta en las células que se encuentran en el estadío de proliferación

respecto de aquellas células en los estadíos de competencia (p=0,00002) y diferenciación (p=0,0004). Por otro lado, la expresión de *Rhbdd2* fue mayor en las células diferenciadas que en las competentes (p=0,0001) (Figura 36 B).

Cabe mencionar que el gen murino de *Rhbdd2* está conformado por 4 exones y codifica para una única forma transcripcional. Los cebadores diseñados para el estudio de su expresión son complementarios a los exones II y III; y generan un amplicón de 125 pb (ver tabla 4).



Figura 36. Niveles de expresión (veces de aumento) del ARNm de *Caseína 2* y *Rhbdd2* en diferentes estadíos de diferenciación celular de las células HC11. **A.** La expresión relativa del transcripto de *Caseína2* fue significativamente mayor en las células Diferenciadas (p<0,0001). **B.** La expresión del transcripto de *Rhbdd2* fue significativamente mayor en las células en proliferación respecto de las competentes (p=0,0002) y respecto de las diferenciadas (p=0,0004). Barras de error 95% CI.

Finalmente, se procedió a determinar la localización subcelular de Rhbdd2 en las células HC11. Para ello se realizó un análisis de colocalización por inmunofluorescencia confocal utilizando un anticuerpo anti-Rhbdd2 y un anticuerpo que permitieran determinar la localización del Golgi (anti-Tn). Se determinó el grado de colocalización entre el marcador del Golgi y el anticuerpo anti-RHBDD2, mediante el análisis de las imágenes obtenidas por microscopía confocal de fluorescencia en el programa ImageJ.

Se procedió al cálculo de los coeficientes de colocalización con la aplicación JaCoP⁹¹, y se determinó que Rhbdd2 se localiza en el Golgi (Figura 38). Los valores de los coeficientes de colocalización para las señales de Rhbdd2 y Golgi fueron: R=0,956; r=0,957 y M1=0,97 y M2=0,996.



Figura 38. Imágenes obtenidas por microscopia confocal de fluorescencia y procesadas con el programa ImageJ. Se muestran células de la línea celular murina de mama normal HC11. Los colores corresponden a los marcadores de Rhbdd2 (rojo), Tn (verde), ADN (azul) y en amarillo las regiones de colocalización de las señales roja y verde. Se observa colocalización (amarillo) del marcador del Golgi con el anticuerpo de Rhbdd2.



ନ୍ଦେ 81 ରହ

4.1 *Rhbdd2* se sobreexpresa en carcinomas ductales infiltrantes de mama del subtipo luminal b

El conocimiento que actualmente existe sobre la expresión de los genes romboides en el cáncer de mama es muy limitado, por ello se procedió al estudio de sus patrones de expresión en carcinomas mamarios humanos.

Inicialmente, se realizó un análisis *in silico* que permitió definir los perfiles de expresión de los genes de la superfamilia Romboide en tejidos mamarios normales y CDIs. El análisis permitió identificar a los miembros de esta superfamilia cuya sobreexpresión se encuentra asociada preferencialmente a un subtipo intrínseco de cáncer de mama en particular.

Se determinó que la sobreexpresión de los genes *RHBDF2/iRhom2*, *RHBDL2*, *PARL*, *DERL1* y *DERL3* se asocia significativamente con los CDIs del subtipo Basal. Por el contrario, la sobreexpresión de los genes *RHBDF1/iRhom1*, *TMEM115*, *RHBDD1* y *RHBDL1* se asocia principalmente al subtipo Luminal A.

En este análisis se destacó el gen *RHBDD2* como el único de los genes romboides cuya sobreexpresión se asocia con el subtipo Luminal B.

Posteriormente se procedió a evaluar la expresión de algunos de los genes de la superfamilia Romboide en tejidos mamarios normales y en CDIs humanos, mediante RT-PCR cuantitativa. Los resultados obtenidos fueron analizados teniendo en cuenta las características histopatológicas de las muestras estudiadas.

Se identificó que la expresión elevada de *RHBDL2* y *PARL* se asocia con carcinomas de grado histológico bajo/intermedio. En particular, la expresión de *RHBDL2* se encontró incrementada significativamente en los CDIs de grado histológico bajo/intermedio respecto de los tejidos normales. Contrariamente, los niveles de expresión de *PARL* no mostraron diferencias estadísticamente significativas entre los tejidos normales y los carcinomas de grado histológico bajo/intermedio.

Actualmente se sabe que RHBDL2 es capaz de clivar el EGF justo por fuera de su dominio transmembrana, liberando el ligando que activa el EGFR y promoviendo la proliferación

celular⁴⁸. Este mecanismo favorecería la resistencia al proceso de anoikis (apoptosis inducida por desprendimiento celular) en células tumorales epiteliales malignas. La sobreexpresión de *RHBDL2* promovería el proceso de diseminación tumoral, facilitando la supervivencia celular y disminuyendo la adhesión intercelular⁵⁶. Asimismo, la función anti-apoptótica de la proteína PARL es bien conocida y contribuiría a la supervivencia de las células malignas durante los estadíos tempranos de la progresión tumoral^{34, 99, 54}. La expresión de estos genes (y sus productos proteicos) en los tumores de estadíos tempranos ayudaría al mantenimiento del tumor y promovería la progresión del cáncer de mama.

En cuanto a *RHBDD2*, su expresión en los carcinomas fue de moderada a alta (82% y 18% de los casos, respectivamente), en contraste con los tejidos normales donde su expresión fue baja o negativa (64% y 30% de los casos, respectivamente). Además, se identificó una correlación significativa entre los altos niveles de expresión de *RHBDD2* y estadíos avanzados del cáncer de mama (estadío tumoral III). Solo el 6% de los tumores en estadíos tempranos (I y II) presentaron alta expresión de *RHBDD2*, en comparación con el 60% de los carcinomas mamarios de estadío tumoral III.

Estas observaciones confirman aquellas realizadas por Abba *et al.* (2009) quienes inicialmente propusieron que *RHBDD2* se sobreexpresaría en CDIs de estadíos avanzados, en pacientes con metástasis ganglionares y recurrencia de la enfermedad⁴⁷.

De manera similar, cuando se analizó por IHQ la expresión proteica de RHBDD2 en muestras tisulares se identificó un incremento significativo de su expresión en CDIs respecto de los tejidos normales. Esta sobreexpresión se asoció significativamente con carcinomas de estadío tumoral III, corroborando los hallazgos a nivel de ARNm. Estos resultados están en concordancia con la reciente observación de que el aumento de la expresión de RHBDD2 se asocia con estadíos avanzados de carcinomas colorectales⁴⁶.

Cuando se consideró el estatus del RE, RP y HER2/ERBB2, se detectó una asociación negativa entre RHBDD2 y el RP. En este sentido, el 83% de los casos con expresión de RHBDD2 correspondieron a carcinomas RP negativos en comparación al 44% de los carcinomas RP positivos. Es importante mencionar que no se detectó asociación con el RE y HER2/ERBB2 en el grupo de muestras estudiadas.

En este contexto, recientemente se ha demostrado que los niveles de expresión del RP son más bajos en el subtipo tumoral Luminal B con respecto al subtipo Luminal A y que esta diferencia no se observa cuando se estudia la expresión del RE¹⁰⁰. El subtipo Luminal B es considerado un grupo heterogéneo que incluye tumores tanto RP+ como RP-, donde la ausencia de este

receptor sería un importante factor pronóstico de evolución de la enfermedad. Dentro de este subtipo los tumores RE+/RP- representan un subgrupo distintivo con características agresivas y mal pronóstico. Las pacientes con tumores que no expresan el RP tendrían una menor supervivencia global que aquellas con expresión del RP^{101, 102}. Debido a esto, resulta interesante la asociación entre la elevada expresión de RHBDD2 y la ausencia del RP, donde ambas situaciones se asocian a malignidad tumoral y mal pronóstico para las pacientes.

Los resultados de los análisis de expresión tanto a nivel de ARNm como de la proteína sugieren que RHBDD2 podría llegar a tener un rol importante en el desarrollo y/o progresión de los carcinomas ductales del subtipo Luminal B.

El análisis por IHQ de la expresión proteica de RHBDD2 en las líneas celulares y en los tejidos normales permitió detectar un patrón de tinción citoplasmático y muy frecuentemente perinuclear, aunque con menor frecuencia se pudieron detectar algunos casos con tinción nuclear. A fin de establecer la localización celular de RHBDD2, se realizó un análisis de colocalización por inmunofluorescencia confocal en las líneas celulares de cáncer de mama; y en células HC11 de mama normal de ratón.

Los ensayos de colocalización demostraron que RHBDD2 se localiza principalmente en el aparato de Golgi de las células mamarias normales y tumorales. Esta observación concuerda con lo previamente reportado por Ahmedli *et al.* $(2013)^{72}$ en células HEK-293 y células de la retina del ratón. El resto de la señal de RHBDD2 se observó en la región nuclear y en la región citoplasmática extendiéndose más allá del Golgi con un patrón frecuentemente granular/vesicular. RHBDD2 podría estar asociada a alguna vesícula originada en el Golgi, como aquellas de la vía secretora de la célula que se distribuyen en el citoplasma. En este sentido, resulta interesante la correlación positiva entre la expresión de los genes *RHBDD2* y *TMEM115* (Figura 16 E y F). Este último codifica una proteína de transmembrana localizada en la región media y trans del Golgi, involucrada en la glicosilación y el transporte retrógrado de las proteínas desde el Golgi al ret. end.¹⁰³.

Estos datos sugieren que RHBDD2 podría estar involucrado en la vía biosintética secretora de las células, interactuando con otras proteínas para determinar su destino celular y/o formando parte de las membranas de las vesículas que se originan en el Golgi.

4.2 *Rhbdd2* posee dos variantes transcripcionales diferencialmente expresadas entre los carcinomas infiltrantes y los tejidos mamarios normales

Se estudiaron las variantes de empalme alternativo de *RHBDD2* y sus isoformas proteicas en líneas celulares de cáncer de mama, muestras tisulares normales y CDIs. De este modo se confirmó experimentalmente la existencia de las variantes transcripcionales de *RHBDD2* y de sus isoformas proteicas: la variante de empalme 1 codifica para una proteína de 364 aa y la variante de empalme 2 para una proteína de 223 aa.

Ambas variantes de empalme fueron detectadas en las líneas celulares: MCF7, T47D, ZR75 y MDA-MB-231, observándose que la variante 2 siempre se expresó en menor cantidad que la variante 1.

Cuando se comparó la expresión de las variantes de empalme de los tejidos normales (n=11) con los tumorales (n=19), se observó que la variante 2 se expresó más frecuentemente en los tumores que en los tejidos normales. Asimismo, el nivel de expresión de la variante 2 fue más alto en los tejidos tumorales que en los normales.

Estas observaciones fueron respaldadas por los resultados que se obtuvieron del análisis *in silico* de la expresión de las variantes de empalme de *RHBDD2*, realizado sobre datos de RNASeq del proyecto TCGA-BRCA. Mediante este análisis se confirmó que la variante 2 se expresa más frecuentemente en los carcinomas que en los tejidos normales mamarios.

Lo anteriormente expuesto condujo a indagar los efectos de la expresión de cada variante de empalme sobre la supervivencia global de las pacientes con cáncer de mama. El análisis de los datos permitió determinar que las pacientes que expresan la variante 2 de *RHBDD2* tienen un tiempo de supervivencia global más corto que aquellas que solo expresan la variante 1.

Por lo tanto, queda establecido el impacto negativo que tiene la expresión de la variante 2 de *RHBDD2* sobre la supervivencia de las pacientes con cáncer de mama y que esta variante podría considerarse como un indicador de mal pronóstico de evolución de la enfermedad.

Cuando se analiza la expresión de las isoformas proteicas de RHBDD2 resulta interesante la observación de que la isoforma b es más abundante que la isoforma a en los carcinomas estudiados y en la línea celular MDA-MB-231 (Figura 39 A). Esto es llamativo debido a que en todos los casos estudiados, a nivel de ARNm, la variante 1 (la cual codifica la isoforma a) se expresó en mayor cantidad que la variante 2 (la cual codifica la isoforma *b*) (Figura 39 B).

Cabe preguntarse entonces si existe algún mecanismo de regulación de la traducción que favorezca la expresión de la isoforma b de RHBDD2 en las células tumorales por sobre la expresión de la isoforma a. Del mismo modo, es posible suponer que la isoforma b otorgue ventajas adaptativas a las células neoplásicas, respecto de la isoforma a.



Figura 39. Expressión transcripcional y proteica de *RHBDD2* (sobre un mismo grupo de muestras). La relación de expresión de las dos formas de *RHBDD2* se invierte cuando se compara entre las variantes de empalme (**A**) y las proteínas que codifican (**B**).

Al estudiar los transcriptos de *RHBDD2* y las proteínas codificadas por estos, resulta muy curioso que la isoforma proteica más pequeña (isoforma b) sea codificada por el ARNm más largo (variante transcripcional 2). Una posible explicación se desprende del análisis de la secuencia de la variante 2 de *RHBDD2* que indica que la inclusión del exón II en el ARNm introduce 4 codones de terminación en la secuencia del transcripto. Un par de estos codones de terminación son codificados por el exón II y el otro par son codificados por el exón III. Es importante mencionar que los codones de terminación en el exón III pueden leerse solo cuando está presente el exón II (Figura 40).

Hasta el momento, no ha sido determinado el mecanismo por el cual se estaría generando la proteína de 223 aa, a partir de la variante 2 del ARNm de *RHBDD2*. Pero, se podrían sugerir dos posibles escenarios para la generación de la isoforma b:

1- Que el ribosoma inicie la lectura del ARNm en el codón de inicio (localizado en el exón I) y finalice la traducción al encontrarse con el primer codón de terminación (localizado en el exón II), sintetizándose un péptido de 79 aa. Luego, el ribosoma retomaría la

lectura del ARNm en el siguiente codón de inicio (localizado en el exón III) generando la isoforma proteica b.

2- Por otro lado, podría no traducirse el péptido de 79 aa de tal forma que el ribosoma reconoce y comienza a leer el mensajero directamente a partir del codón de inicio en el exón III, sintetizándose la isoforma b.



Figura 40. Secuencia de la variante 2 de ARNm de *RHBDD2*. En rosado se indican los dos posibles ORFs codificados por el transcripto. El primer ORF codificaría para un péptido de 79 aa. El segundo ORF codificaría una proteína de 223 aa. Se marca subrayado en celeste y entre corchetes el segmento correspondiente al exón II. Se indican con asteriscos en rojo los codones de terminación y con una M color verde los codones de inicio de la traducción.

En la actualidad se reconoce la existencia de mecanismos alternativos de inicio de la traducción del ARNm en eucariotas, que podrían explicar la generación de la isoforma b de

RHBDD2 a partir del codón de inicio en el exón III. Estos mecanismos involucrarían elementos génicos ubicados en el extremo 5' del transcripto y que cumplirían funciones reguladoras de la traducción: los uORFs (upstream open reading frames, en español, marcos de lectura abiertos corriente arriba) y los IRES (internal ribosome entry sites, en español, sitios de acceso internos para ribosomas)¹⁰⁴.

Los uORFs son importantes elementos reguladores de la expresión génica. Corresponden a secuencias definidas por un codón de inicio uAUG (upstream AUG, en español, AUG corriente arriba) asociado a un codón de terminación ubicado corriente arriba o corriente abajo del AUG principal (que codifica el producto proteico principal de dicho ARNm). Los uORFs pueden actuar: *1*- reduciendo la eficiencia de la traducción del ORF principal en condiciones fisiológicas normales; *2*- provocando la degradación de los ARNm que los codifican; o bien *3*- promoviendo la traducción del ORF principal en condiciones de estrés celular^{105, 106} (Figura 41).



Figura 41. Esquema del modo de acción de los uORF. **1.** El ribosoma se detiene y permanece unido al ARNm, bloqueando la traducción del ORF principal corriente abajo. **2.** El ribosoma se libera y no continúa la traducción, no se traduce el ORF principal. **3.** El ribosoma permanece unido al ARNm y continúa su lectura hasta encontrarse con el ORF principal, reiniciando la traducción. **4.** La traducción del uORF afecta la estabilidad del transcripto que lo codifica. Se indican los sitios de inicio de la traducción del uORF (uAUG) y del ORF principal (AUG) con flechas negras. La estrella indica la posición del codón de finalización. Adaptado de Morris *et al.*, 2000¹⁰⁵.

Recientemente se han descripto varios genes cuyos ARNm sufren cambios en la secuencia líder 5' que resultan en la pérdida o generación de uORFs. Estos cambios han demostrado ser de relevancia en el desarrollo y/o la susceptibilidad a diversas enfermedades humanas¹⁰⁶. Aproximadamente el 49% del transcriptoma humano contiene uORFs evolutivamente conservados, pero hasta el momento solo ha sido demostrada su actividad funcional para un

limitado número de genes (ejemplos: *CD36*, *MDM2*, *ERBB2*, *SOC1*, *RARB*). Dos tercios de oncogenes y otros genes que codifican proteínas involucradas en procesos celulares importantes (como la proliferación, el ciclo celular y la respuesta al estrés) contienen uORFs. Los uORFs están involucrados en la etiología de enfermedades malignas, desórdenes metabólicos y síndromes hereditarios (ej.: leucemia mieloide crónica, cáncer de mama, pancreatitis hereditaria, hipercolesterolemia familiar, enfermedad de Alzheimer)¹⁰⁶.

Se ha demostrado que los transcriptos de varios genes asociados a respuesta al estrés celular poseen uno o múltiples uORF (ejemplo: *CHOP, ATF4, ATF5, CPT1C, GADD34, BACE*). En estos casos los uORFs actúan favoreciendo el aumento de la traducción de las proteínas codificadas por los ORF principales¹⁰⁶.

En el caso de *RHBDD2*, si consideramos que la inclusión del exón II origina un uORF, este elemento podría estar favoreciendo la expresión de la proteína codificada por el ORF principal (que se traduce en la isoforma b). Esto se observa en las células tumorales que expresan la variante transcripcional 2 donde la isoforma b de RHBDD2 se detectó en niveles casi iguales o mayores que la isoforma a (codificada por la variante 1).

Para que un ORF principal se traduzca, el uORF debería:

a) No traducirse, lo cual ocurre si la secuencia colindante al codón de inicio del uORF no propicia la actividad del ribosoma y por lo tanto su traducción. Entonces la subunidad menor del ribosoma (40S) se desplazaría sobre el ARNm hasta encontrar un codón de inicio asociado a un contexto favorable (secuencia Kozak), que promueva la traducción del ORF principal^{105, 106}

b) Traducirse el uORF, generándose un péptido que se libera cuando el ribosoma encuentra el codón de finalización de la traducción. Entonces la subunidad ribosómica 40S debería permanecer unida al ARNm y desplazarse sobre el transcripto hasta encontrar el AUG del ORF principal, reiniciando la traducción y sintetizando la proteína principal de dicho mensajero^{105, 106}.

Como el uAUG en la variante 2 del ARNm de *RHBDD2* está rodeado de una secuencia Kozak, es de esperarse que se traduzca el péptido codificado por el uORF. Una vez sintetizado el péptido se liberaría y la subunidad ribosómica menor permaneciera unida al ARNm. La traducción se reiniciaría en el AUG del ORF principal, sintetizándose la isoforma b. Sin embargo, nuestros estudios no han podido poner en evidencia la existencia del péptido de 79 aa. En la Figura 42 se propone un modelo de acción del sistema uORF en *RHBDD2*.



Figura 42. Modelo de traducción de las isoformas proteicas de RHBDD2. **A.** Traducción de la variante 1 de ARNm de *RHBDD2* y síntesis de la isoforma a. La traducción se inicia en el AUG en el exón I y se extiende hasta un codón de terminación en el exón V. **B.** Traducción de la variante 2 de ARNm de *RHBDD2*. Se propone la existencia de un uORF el cual se traduce generando un péptido de 79 aa a partir del AUG en el exón I hasta un codón de terminación en el exón II. Al finalizar la traducción del uORF la subunidad mayor del ribosoma (60S) se desprende del ARNm, pero la subunidad menor (40S) permanece unida y progresa sobre el transcripto hasta encontrarse con el AUG (en el exón III) del ORF principal. Se reinicia la traducción que se extiende hasta un codón de terminación en el exón V, sintetizándose la isoforma b de RHBDD2.

Por lo general, la traducción de los ARNm ocurre por un mecanismo dependiente del reconocimiento del capuchón en el extremo 5' del ARNm. Este proceso se encuentra mediado por factores de inicio de la traducción (eIFs) y por la subunidad menor del ribosoma. Este complejo de pre-inicio de la traducción lee al ARNm en busca de un codón de inicio con un contexto apropiado. Bajo determinadas condiciones celulares (ej.: estrés celular) el inicio de la traducción de en el extremo 5' se ve afectado, dando paso a otros mecanismos de inicio de la traducción como el que requiere de los sitios IRES. Los IRES son elementos estructurales del ARN que dirigen la unión de los ribosomas al ARNm para el inicio de la traducción a partir de AUG internos¹⁰⁷.

El estudio de los IRES es complejo debido a que: *1*- varían en su expresión y actividad en función del tipo y del contexto celular en que ocurre la traducción; *2*- algunos IRES dependen de factores celulares llamados ITAF (IRES-*trans* activating factors, en español, factores de activación de IRES en *trans*) para iniciar la traducción y *3*- los IRES son secuencias evolutivamente poco conservadas lo cual dificulta su identificación *in silico*^{104, 107}.

Entre los genes que contienen IRES conocidos se encuentran aquellos involucrados en procesos celulares como la diferenciación y proliferación celular (ej.: *cMyc LEF-1*, *PDGF2*, *CDK1*, *PITSLREp58*, *VEGF*), la apoptosis (ej.: *APAF1*, *XIAP*, *BCL2*, *DAP5*, *HIAP2*), el estrés celular por hipoxia (ej.: *HIF1A*) y la respuesta al daño celular (ej.: *P53*, *SHMT1*). Muchos de estos genes son relevantes para la supervivencia celular y el proceso de oncogénesis^{104, 107}.

Considerando la posibilidad de que la traducción de la variante 2 de *RHBDD2* estuviera dirigida por un IRES, se utilizó la base de datos IRESites para examinar el exón II de la variante de empalme 2 de *RHBDD2*. Este análisis permitió identificar por identidad de secuencia (>80%) y por similitud de estructura secundaria del ARNm dos IRES en dicho exón (Figura 43).

RHBDD2 – variante 2 – exón II

5´ - CCACTATGGAAGGAGGGGTCAGGAT**TACAGCAGAG**GAGACTGGCACACAGAGTGTTAAGTGA +263 CACCCACTCAATCCACCCCGAAGCTG**TTACACTTAATT**AACCCTCAAACTGCCCAGTGAG **3**´

+384

Figura 43. Secuencia del exón II del ARNm (+263 a +384 nt) de la variante transcripcional 2 de *RHBDD2*. Se destacan en negrita las secuencias correspondientes a IRES conocidos.

Así como la región 5'UTR del ARNm largo de *RHBDD2* podría tener un papel regulador de la expresión de la isoforma proteica b mediante el sistema de uORF, esta región podría dar lugar a la formación de un IRES. En tal caso, se deberían llevar a cabo estudios *in vitro* para determinar exactamente cómo y cuál sería la secuencia exacta en el ARNm de *RHBDD2* que participaría en la conformación de un IRES.

Si bien los IRES y los uORFs son mecanismos muy diferentes de regulación de la traducción, ambos podrían llegar a cooperar en la regulación traduccional de *RHBDD2*. Este fenómeno ha sido previamente descripto para el transcripto de *CAT-1* donde ambos mecanismos (un uORF y un IRES) actúan en forma conjunta regulando la traducción del ORF principal. Cuando el uORF se traduce el ARNm se pliega dando paso a un IRES y así se sintetiza la proteína *CAT-1*^{108, 109}.

Resulta interesante que en el extremo 5' del transcripto de la variante 2 de *RHBDD2* pueden identificarse tanto un uORF así como secuencias de IRES conocidos. Considerando estos mecanismos de regulación de la traducción, y contemplando que pueden actuar en forma conjunta, podríamos imaginar dos posibles situaciones para la traducción de la isoforma b:

1- La región 5' del mensajero largo de *RHBDD2* se pliega sobre sí misma dando paso a un IRES, de modo que la isoforma proteica b se traduzca directamente a partir del AUG interno sin traducción del uORF.

2- La traducción del uORF es necesaria para que se constituya un IRES activo y así se exprese la isoforma b codificada en el ORF principal. En este caso el péptido de 79 aa codificado por el uORF no cumpliría función alguna y su destino final sería la degradación.

En la Figura 44 se propone un modelo de acción de IRES para la regulación de la traducción de la isoforma b de RHBDD2, según la primera de las situaciones antes descriptas.



Figura 44. Modelo propuesto para la conformación y acción de IRES en *RHBDD2*. **A.** Plegamiento putativo de la región 5' de la variante transcripcional 2 de *RHBDD2* que daría paso a la conformación de un IRES (obtenido con el programa RNAfold Web Server). En verde se indican los nucleótidos cercanos al extremo 5' y en rojo los cercanos al extremo 3'. **B.** Esquema de la disposición del IRES sobre el transcripto de *RHBDD2*. Al plegarse la región 5' del transcripto el uORF queda contenido en el IRES de modo que no se traduce. De este modo, el ribosoma es atraído al AUG del ORF principal que codifica para la isoforma proteica b.

Se sabe que numerosos IRES están asociados a la regulación de la traducción de proteínas claves para la supervivencia celular bajo condiciones de estrés. La estructura de los IRES es dinámica y en algunos casos depende de otros factores para actuar. Entre estos factores se encuentran los ITAFs, el estado de fosforilación de eIF2, la traducción de uORFs, la unión al ribosoma, etc. Estos factores están supeditados al estado fisiológico de la célula, principalmente a los estados de estrés celular por privación nutricional/hipoxia, al arresto del ciclo celular y a la apoptosis^{107, 108}.

Por todo lo expuesto, se podría decir que la expresión de la isoforma b de RHBDD2 estaría regulada a nivel transcripcional y traduccional. Posiblemente su expresión se vería favorecida a fin de promover la supervivencia de las células tumorales en contextos fisiológicos desfavorables.

4.3 *Rhbdd2* está involucrado en los procesos de proliferación y diferenciación celular

Con la finalidad de identificar los procesos biológicos potencialmente modulados por *RHBDD2*, se procedió a evaluar el efecto del silenciamiento post-transcripcional de *RHBDD2* sobre el transcriptoma de las líneas celulares MCF7 y T47D.

Los principales procesos biológicos que se vieron afectados por el silenciamiento de *RHBDD2* fueron: la fosforilación oxidativa, el ciclo celular, la biogénesis de ribosomas/metabolismo de proteínas, la respuesta al daño del ADN, la apoptosis celular y procesos asociados a la vía biosintética secretora (ej.: estrés del retículo endoplasmático).

La validación de los resultados del microarreglo demostró una asociación negativa entre la expresión de *RHBDD2* y *NEURL1*; y una asociación positiva entre *RHBDD2* y *PAGE5*. Estos genes están involucrados en procesos celulares importantes como la apoptosis y la proliferación celular, y en la progresión de diversas neoplasias malignas.

NEURL1 se considera un gen supresor tumoral en meduloblastomas, donde su expresión se ha encontrado reducida respecto del tejido cerebral normal. Actúa como un gen pro-apoptótico, observándose que cuando se lo expresa en líneas celulares de meduloblastoma provoca reducción de la proliferación celular y de la formación de colonias¹¹⁰.

Por otro lado, *PAGE5* se encuentra sobreexpresado en melanomas, cáncer renal, pulmonar y de mama. Es considerado un antígeno de cáncer de testículo y un marcador de progresión de la enfermedad (crecimiento tumoral y respuesta a terapia)^{111, 112, 113}.

Se desconoce el mecanismo funcional por el cual *RHBDD2* podría llegar a modular la expresión de *NEURL1* y *PAGE5*. Sin embargo, dichos genes son candidatos interesantes para estudios futuros que permitan clarificar el rol biológico de *RHBDD2* sobre la proliferación y la progresión tumoral.

Entre los procesos biológicos arriba mencionados se destacan los relacionados con el estrés del ret. end. y la degradación proteica pues, recientemente, Lacunza *et al.* (2014) demostraron que *RHBDD2* estaría involucrado en la modulación de varios genes involucrados en la respuesta celular al estrés del retículo endoplasmático⁷⁴.

Tomando como referencia los resultados del análisis de enriquecimiento funcional, se evaluó cómo el silenciamiento de la expresión de *RHBDD2* influye sobre la proliferación celular y la capacidad de anclaje de las células a la MEC. De este modo, se observó que el

silenciamiento de *RHBDD2* provoca una marcada disminución de la proliferación celular, pero no afecta la capacidad de adhesión de las células a la MEC.

A fin de continuar con el análisis de la relación de *RHBDD2* con la proliferación y el estrés celular, se estudió el efecto de la privación de glucosa sobre la expresión de *RHBDD2*.

La fisiología del microambiente tumoral está caracterizada por bajo nivel de oxígeno (hipoxia), alto nivel de lactato, acidosis extracelular y privación de glucosa¹¹⁴. Estas características ambientales varían ampliamente en diferentes áreas de un mismo tumor, reflejando la heterogeneidad de las células que lo constituyen. Diversos estudios evaluaron el efecto de estos factores fisiológicos sobre la expresión génica, el metabolismo y la respuesta a las terapias anti-tumorales. Se ha comprobado que la carencia de glucosa provoca disminución de la proliferación celular mediante el arresto del ciclo celular en células linfoides humanas, carcinomas de pulmón¹¹⁵ y carcinoma renal¹¹⁶. Además, afecta la expresión de numerosos genes de respuesta al estrés celular como por ejemplo *CHOP*^{117, 118}. Este gen participa en el arresto del ciclo celular en la fase G1 promoviendo la supervivencia de la célula en condiciones de estrés metabólico¹¹⁹.

Ante el estrés metabólico las células responden modificando sus perfiles de expresión génica con el fin de cambiar sus programas celulares para la supervivencia celular. Ante la privación de glucosa, el aumento de la expresión de *CHOP* contribuiría a la supervivencia de las células de MCF7 favoreciendo el arresto del ciclo celular. Mientras que la disminución de la expresión de *RHBDD2* detectada respondería a la necesidad de impedir el avance del ciclo celular en un contexto metabólico desfavorable.

Finalmente, se empleó un modelo de células epiteliales normales de mama de ratón (línea celular HC11) con el objetivo de evaluar el rol de Rhbdd2 en la proliferación y la diferenciación celular. Las células HC11 presentan características de células madre en su estado no diferenciado tales como la pluripotencia y la auto-renovación, teniendo el potencial de reconstituir el epitelio ductal de una glándula mamaria completa con células mioepiteliales, alveolares y ductales, *in vivo*. Además, conservan la capacidad de diferenciarse funcionalmente y producir proteínas de la leche *in vitro*¹²⁰.

La expresión de β -caseína es el marcador de diferenciación celular por excelencia en la línea celular HC11, y responde a la exposición de la célula a hormonas como la PRL. Esta hormona tiene un fuerte efecto en la expresión de proteínas de la leche en la glándula mamaria. La PRL tiene la capacidad de activar la cascada de transducción de señales JAK/STAT que finaliza en

la fosforilación de STAT5, el cual se transloca al núcleo e induce la expresión de β -caseína^{121,} ¹²²

Sobre este modelo biológico, se pudo estudiar no solo la asociación de *Rhbdd2* con la proliferación celular, sino también con la diferenciación de las células de la glándula mamaria.

En el contexto del cáncer de mama, Williams *et al.* $(2008)^{120}$ estudiaron los perfiles de expresión génica de los estadíos de diferenciación de las células HC11 y los compararon con los perfiles de expresión génica de los subtipos intrínsecos del cáncer de mama humano. En este estudio se determinó que el 75% de los genes que caracterizan al estadío de proliferación de las células HC11 también se expresan en los carcinomas mamarios del subtipo Luminal.

Resulta interesante que se haya encontrado alta expresión de *Rhbdd2* en el estadío proliferativo de las células HC11 y que este estadío celular muestre un perfil génico muy similar al subtipo tumoral humano Luminal, caracterizado por una alta expresión de genes de proliferación celular. Cabe recordar que la sobreexpresión de *RHBDD2* se asocia particularmente al subtipo Luminal B, que agrupa neoplasias malignas agresivas con mal pronóstico de evolución de la enfermedad^{46, 47}.

Es más, se ha demostrado que el silenciamiento de *RHBDD2* en la línea celular MCF7 y T47D resulta en una disminución de la proliferación celular^{47, 74}, lo cual acompaña la observación de que *Rhbdd2* se expresa en menor medida en los estadíos celulares competente y diferenciado de las células HC11. En estos estadíos no proliferativos, el programa celular se modifica orientándose a la diferenciación de las células en epitelio secretor mamario (con síntesis de proteínas de la leche como β -caseína)¹²⁰.

En el mismo sentido, las observaciones realizadas en esta línea celular (HC11) concuerdan con las que fueron realizadas por Ferreti *et al.* (2015)⁷³, quienes estudiaron la expresión de Rhbdd2 en la glándula mamaria de ratas adultas, en distintos estadíos de desarrollo. Los niveles de expresión de Rhbdd2 fueron elevados en mamas de ratas gestantes, moderados en lactantes, bajos en mamas de ratas vírgenes y negativos durante la involución de la glándula mamaria. Rhbdd2 se expresaría en la mama adulta, alcanzando altos niveles durante la preñez, cuando la mama se encuentra en estadío proliferativo preparándose para la lactancia. En los demás estadíos de las glándulas mamarias la expresión de Rhbdd2 es muy baja o bien está ausente⁷³.

Estos resultados sugieren que RHBDD2 podría llegar a jugar un rol de importancia en la modulación de los procesos de proliferación y diferenciación de las células epiteliales mamarias.

La sobreexpresión de RHBDD2 en la glándula mamaria por podría favorecer el desarrollo del cáncer de mama facilitando la supervivencia y/o proliferación celular bajo condiciones de estrés celular características del microambiente tumoral.

- CS Los genes de la superfamilia Romboide se expresan diferencialmente en las líneas celulares de cáncer de mama y en los tejidos mamarios neoplásicos, siendo posible asociar su patrón de expresión a los subtipos tumorales del cáncer de mama.
- C3 La sobreexpresión de *RHBDD2* caracteriza a los carcinomas mamarios del subtipo Luminal B.
- La alta expresión de *RHBDD2* correlaciona con estadíos tumorales avanzados y la ausencia del receptor de progesterona.
- C3 RHBDD2 presenta dos variantes de empalme de ARNm que se traducen en sus respectivas isoformas proteicas.
- C3 La frecuencia y el nivel de expresión de la variante transcripcional 2, y su respectiva isoforma proteica b, es mayor en los tejidos neoplásicos en comparación con los tejidos normales y se asocia a mal pronóstico de la enfermedad.
- *RHBDD2* se encuentra asociado a los procesos de proliferación y diferenciación celular.
- CS RHBDD2 codifica para proteínas de transmembrana que se encuentran localizadas en el aparato de Golgi y probablemente también en vesículas de la red del Golgi.

B IBLIOGRAFÍA

- ¹ Lester SC, Cotran RS. The Breast. En: Robbins pathologic basis of desease. 6^{ta} edición. Pennsylvania, EEUU: W.B. Saunders Company. 1999, 1425p.
- ² Dimri G, Band H, Band V. Mammary epithelial cell transformation: insights from cell culture and mouse models. Breast Cancer Res. 2005, 7(4): 171-179.
- ³ Morrison BJ, Schmidt CW, Lakhani SR, Reynolds BA, Lopez JA. Breast cancer stem cells: implications for therapy of breast cancer. Breast Cancer Res. 2008, 10(4): 210.
- ⁴ Deugnier MA, Teulière J, Faraldo MM, Thiery JP, Glukhova MA. The importance of being a myoepithelial cell. Breast Cancer Res. 2002, 4(6): 224-230.
- ⁵ Tortora GJ, Derrickson BH. The endocrine system. En: Principles of Anatomy and Physiology. 11^{va} edición. Nueva Jersey, EEUU: John Wiley & Sons, Inc. 2006, 1264p.
- ⁶ Putti TC, Pinder SE, Elston CW, Lee AH, Ellis IO. Breast pathology practice: most common problems in a consultation service. Histopathology. 2005, 47(5): 445-457.
- ⁷ Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. Int J Cancer. 2010, 127(12): 2893-2917.
- ⁸ GLOBOCAN. Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer. Organización Mundial de la Salud (http://globocan.iarc.fr). 2012.
- ⁹ Viniegra M, Paolino M, Arrossi S. Cáncer de mama en Argentina: organización, cobertura y calidad de las acciones de prevención y control: Informe final julio 2010: diagnóstico de situación del Programa Nacional y Programas Provinciales. Buenos Aires, Argentina: Organización Panamericana de la Salud. 2010, 141p.
- ¹⁰ Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. Cell 2011, 144: 646-674.
- ¹¹ McPherson K, Steel CM, Dixon JM. ABC of breast diseases. Breast cancer-epidemiology, risk factors, and genetics. BMJ. 2000, 321(7261):624-628.
- ¹² Hulka BS, Moorman PG. Breast cancer: hormones and other risk factors. Maturitas 2001, 38(1): 103-116.
- ¹³ Key TJ, Verkasalo PK, Banks E. Epidemiology of breast cancer. Lancet Oncol. 2001, 2(3):
 133-140.
- ¹⁴ Dumitrescu RG, Cotarla I. Understanding breast cancer risk where do we stand in 2005?. J Cell Mol Med. 2005, 9(1): 208-221.

- ¹⁵ Allred DC, Mohsin SK, Fuqua SA. Histological and biological evolution of human premalignant breast disease. Endocr Relat Cancer. 2001, 8(1): 47-61.
- ¹⁶ Rennstam K, Hedenfalk I. High-throughput genomic technology in research and clinical management of breast cancer. Molecular signatures of progression from benign epithelium to metastatic breast cancer. Breast Cancer Res. 2006, 8(4): 213.
- ¹⁷ Malhotra GK, Zhao X, Band H, Band V. Histological, molecular and functional subtypes of breast cancers. Cancer Biol Ther. 2010, 10(10): 955-960.
- ¹⁸ Page DL, Dupont WD. Benign breast disease: indicators of increased breast cancer risk. Cancer Detect Prev. 1992, 16(2): 93-97.
- ¹⁹ Morrow PKH, Hortobagyi GN. Management of breast cancer in the genome era. Annu Rev Med. 2009, 60: 153-165.
- ²⁰ Almendro V, Fuster G. Heterogeneity of breast cancer: etiology and clinical relevance. Clin Transl Oncol. 2011, 13(11): 767-773.
- ²¹ Perou CM, Sørlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, Pollack JR, Ross DT, Johnsen H, Akslen LA, Fluge Ø, Pergamenschikov, Williams C, Zhu SX, Lønning PE, Bøorrensen-Dale AL, Brown PO, Botstein D. Molecular portraits of human breast tumors. Nature 2000, 406(6797): 747-752.
- ²² Cancer Genome Atlas Network. Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. Nature 2012, 490(7418): 61-70.
- ²³ Freeman M. Proteolysis within the membrane: rhomboids revealed. Nature 2004, 5(3): 188-197.
- ²⁴ Sturtevant M.A., Roark M., Bier E. The Drosophila rhomboid gene mediates the localized formation of wing veins and interacts genetically with components of the EGF-R signaling pathway. Genes Dev. 1993, 7(6): 961-973.
- ²⁵ Urban S. Rhomboid proteins: conserved membrane proteases with divergent biological functions. Genes Dev. 2006, 20(22): 3054-3068.
- ²⁶ Urban S, Lee JR, Freeman M. A family of Rhomboid intramembrane proteases activates all Drosophila membrane-tethered EGF ligands. EMBO J. 2002, 21(16): 4277-4286.
- ²⁷ Bergbold N, Lemberg MK. Emerging role of rhomboid family proteins in mammalian biology and disease. Biochim Biophys Acta. 2013, 1828(12): 2840-2848.
- ²⁸ Urban S, Lee JR, Freeman M. Drosophila rhomboid-1 defines a family of putative intramembrane serine proteases. Cell. 2001, 107(2): 173-182.

- ²⁹ Urban S, Schlieper D, Freeman M. Conservation of intramembrane proteolytic activity and substrate specificity in prokaryotic and eukaryotic rhomboids. Curr Biol. 2002, 12(17): 1507-1512.
- ³⁰ Koonin EV, Makarova KS, Rogozin IB, Davidovic L, Letellier MC, Pellegrini L. The rhomboids: a nearly ubiquitous family of intramembrane serine proteases that probably evolved by multiple ancient horizontal gene transfers. Genome Biol. 2003, 4(3): R19.
- ³¹ Lemberg MK. Sampling the membrane: function of rhomboid-family proteins. Trends Cell Biol. 2013, 23(5): 210-217.
- ³² Pascall JC, Brown KD. Characterization of a mammalian cDNA encoding a protein with high sequence similarity to the Drosophila regulatory protein Rhomboid. FEBS Lett. 1998; 429(3): 337-340.
- ³³ Adrain C, Zettl M, Christova Y, Taylor N, Freeman M. Tumor necrosis factor signaling requires iRhom2 to promote trafficking and activation of TACE. Science 2012, 335(6065): 225-228.
- ³⁴ Jeyaraju DV, Xu L, Letellier MC, Bandaru S, Zunino R, Berg EA, McBride HM, Pellegrini L. Phosphorylation and cleavage of presenilin-associated rhomboid-like protein (PARL) promotes changes in mitochondrial morphology. PNAS. 2006, 103(49): 18562-18567.
- ³⁵ Fleig L, Bergbold N, Sahasrabudhe P, Geiger B, Lemberg MK. Ubiquitin-dependent intramembrane rhomboid protease promotes ERAD of membrane proteins. Mol Cell. 2012, 47(4): 558-569.
- ³⁶ Yan Z, Zou H, Tian F, Grandis JR, Mixson AJ, Lu PY, Li LY. Human rhomboid family-1 gene silencing causes apoptosis or autophagy to epithelial cancer cells and inhibits xenograft tumor growth. Mol Cancer Ther. 2008, 7(6): 1355-1364.
- ³⁷ Wang Y, Guan X, Fok KL, Li S, Zhang X, Miao S, Zong S, Koide SS, Chan HC, Wang L. A novel member of the Rhomboid family, RHBDD1, regulates BIK-mediated apoptosis. Cell Mol Life Sci. 2008, 65(23): 3822-3829.
- ³⁸ Ren X, Song W, Liu W, Guan X, Miao F, Miao S, Wang L. Rhomboid domain containing 1 inhibits cell apoptosis by upregulating AP-1 activity and its downstream target Bcl-3. FEBS Lett. 2013, 587(12): 1793-1798.
- ³⁹ Bahar A, Simpson DJ, Cutty SJ, Bicknell JE, Hoban PR, Holley S, Mourtada-Maarabouni M, Williams GT, Clayton RN, Farrell WE. Isolation and characterization of a novel pituitary tumor apoptosis gene. Mol Endocrinol. 2004, 19(7): 1827-1839.

- ⁴⁰ Bahar A, Whitby P, Holley S, Hoban PR, Elder JB, Deakin M, Hall C, Clayton RN, Williams GT, Farrell WE. Primary colorectal tumors fail to express the proapoptotic mediator PTAG and its reexpression augments drug-induced apoptosis. Genes Chromosomes Cancer. 2007, 46(2): 202-212.
- ⁴¹ Pellegrini L, Scorrano L. A cut short to death: Parl and Opa1 in the regulation of mitochondrial morphology and apoptosis. Cell Death Differ. 2007, 14(7): 1275-1284.
- ⁴² Sanjuán Szklarz LK, Scorrano L. The antiapoptotic OPA1/Parl couple participates in mitochondrial adaptation to heat shock. Biochim Biophys Acta. 2012, 1817(10): 1886-1893.
- ⁴³ Lin YN, Gui FM, Shen H, Wang F, Cao Z, Li QH, Wang JX, Pang TX. Expression of RHBDD1 gene in patients with chronic myeloid leukemia and its clinical significance. Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi. 2013, 21(1): 12-15.
- ⁴⁴ Blaydon DC, Etheridge SL, Risk JM, Hennies HC, Gay LJ, Carroll R, Plagnol V, McRonald FE, Stevens HP, Spurr NK, Bishop DT, Ellis A, Jankowski J, Field JK, Leigh IM, South AP, Kelsell DP. RHBDF2 mutations are associated with tylosis, a familial esophageal cancer syndrome. Am J Hum Genet. 2012, 90(2): 340-346.
- ⁴⁵ Wojnarowicz PM, Provencher DM, Mes-Masson AM, Tonin PN. Chromosome 17q25 genes, RHBDF2 and CYGB, in ovarian cancer. Int J Oncol. 2012, 40(6): 1865-1880.
- ⁴⁶ Lacunza E, Canzoneri R, Rabassa ME, Zwenger A, Segal-Eiras A, Croce MV, Abba MC. RHBDD2: a 5-fluorouracil responsive gene overexpressed in the advanced stages of colorectal cancer. Tumor Biol. 2012, 33(6): 2393-2399.
- ⁴⁷ Abba MC, Lacunza E, Nunez MI, Colussi A, Isla-Larrain M, Segail-Eiras A, Croce MV, Aldaz CM. Rhomboid domain containing 2 (RHBDD2): a novel cancer-related gene over-expressed in breast cancer. Biochim Biophys Acta. 2009, 1792(10): 988-997.
- ⁴⁸ Adrain C, Strisovsky K, Zettl M, Hu L, Lemberg MK, Freeman M. Mammalian EGF receptor activation by the rhomboid protease RHBDL2. EMBO Rep. 2011, 5(12): 421-427.
- ⁴⁹ Zou H, Thomas SM, Yan ZW, Grandis JR, Vogt A, Li LY. Human rhomboid family-1 genes RHBDF1 participates in GPCR-mediated transactivation of growth signals in head and neck squamous cancer cells. FASEB J. 2009, 23(2): 425-432.
- ⁵⁰ Etheridge SL, Brooke MA, Kelsell DP, Blaydon DC. Rhomboid proteins: a role in keratinocyte proliferation and cancer. Cell Tissue Res. 2013, 351(2): 301-307.
- ⁵¹ Fernández Molina JC, Pérez Pérez V. El receptor de EGF (EGRF): una diana terapéutica para el tratamiento del cáncer y sus inhibidores. Biocáncer 2006, 3.
- ⁵² Hill RB, Pellegrini L. The PARL family of mitochondrial rhomboid proteases. Semin Cell Dev Biol. 2010, 21(6): 582-592.
- ⁵³ Cipolat S, Rudka T, Hartmann D, Costa V, Serneels L, Craessaerts K, Metzger K, Frezza C, Annaert W, D'Adamio L, Derks C, Dejaegere T, Pellegrini L, D'Hooge R, Scorrano L, De Strooper B. Mitochondrial rhomboid PARL regulates cytochrome c release during apoptosis via OPA1-dependent cristae remodeling. Cell 2006, 126(1): 163–175.
- ⁵⁴ Shi G, Lee JR, Grimes DA, Racacho L, Ye D, Yang H, Ross OA, Farrer M, McQuibban GA, Bulman DE. Functional alteration of PARL contributes to mitochondrial dysregulation in Parkinson's disease. Hum Mol Genet. 2011, 20(10): 1966-1974.
- ⁵⁵ Cheng TL, Wu YT, Lin HY, Hsu FC, Liu SK, Chang BI, Chen WS, Lai CH, Shi GY, Wu HL. Functions of rhomboid family protease RHBDL2 and thrombomodulin in wound healing. J Invest Dermatol. 2011, 131(12): 2486–2494
- ⁵⁶ Cheng TL, Lai CH, Jiang SJ, Hung JH, Liu SK, Chang BI, Shi GY, Wu HL. RHBDL2 is a critical membrane protease for anoikis resistance in human malignant epithelial cells. ScientificWorldJournal. 2014, 28: 902987.
- ⁵⁷ Wan C, Fu J, Wang Y, Miao S, Song W, Wang L. Exosome-related multi-pass transmembrane protein TSAP6 is a target of rhomboid protease RHBDD1-induced proteolysis. PLoS One. 2012, 7(5): e37452.
- ⁵⁸ Liu XN, Tang ZH, Zhang Y, Pan QC, Chen XH, Yu YS, Zang GQ. Lentivirus-mediated silencing of rhomboid domain containing 1 suppresses tumor growth and induces apoptosis in hepatoma HepG2 cells. Asian Pac J Cancer Prev. 2013, 14(1): 5-9.
- ⁵⁹ Wei X, Lv T, Chen D, Guan J. Lentiviral vector mediated delivery of RHBDD1 shRNA down regulated the proliferation of human glioblastoma cells. Technol Cancer Res Treat. 2014, 13(1): 87-93.
- ⁶⁰ Han J, Bai J, Yang Y, Yin H, Gao W, Lu A, Liu F, Ge H, Liu Z, Wang J, Zhong L. Lentivirus-mediated knockdown of rhomboid domain containing 1 inhibits colorectal cancer cell growth. Mol Med Rep. 2015, 12(1): 377-381.
- ⁶¹ Nakagawa T, Guichard A, Castro CP, Xiao Y, Rizen M, Zhang HZ, Hu D, Bang A, Helms J, Bier E, Derynck R. Characterization of a human rhomboid homolog, p100hRho/RHBDF1, which interacts with TGF-alpha family ligands. Dev Dyn. 2005, 233(4): 1315-1331.

- ⁶² Zhou Z, Liu F, Zhang ZS, Shu F, Zheng Y, Fu L, Li LY. Human rhomboid family-1 suppresses oxygen-independent degradation of hypoxia-inducible factor-1α in breast cancer. Cancer Res. 2014, 74(10): 2719-2730.
- ⁶³ Issuree PD, Maretzky T, McIlwain DR, Monette S, Qing X, Lang PA, Swendeman SL, Park-Min KH, Binder N, Kalliolias GD, Yarilina A, Horiuchi K, Ivashkiv LB, Mak TW, Salmon JE, Blobel CP. iRHOM2 is a critical pathogenic mediator of inflammatory arthritis. J Clin Invest. 2013, 123(2): 928-932.
- ⁶⁴ Hosur V, Johnson KR, Burzenski LM, Stearns TM, Maser RS, Shultz LD. Rhbdf2 mutations increase its protein stability and drive EGFR hyperactivation through enhanced secretion of amphiregulin. Proc Natl Acad Sci EEUU. 2014, 111(21): E2200-2209.
- ⁶⁵ Brooke MA, Etheridge SL, Kaplan N, Simpson C, O'Toole EA, Ishida-Yamamoto A, Marches O, Getsios S, Kelsell DP. iRHOM2-dependent regulation of ADAM17 in cutaneous disease and epidermal barrier function. Hum Mol Genet. 2014, 23(15): 4064-4076.
- ⁶⁶ Lilley BN, Ploegh HL. A membrane protein required for dislocation of misfolded proteins from the ER. Nature. 2004, 429(6994): 834-840.
- ⁶⁷ Oda Y, Okada T, Yoshida H, Kaufman RJ, Nagata K, Mori K. Derlin-2 and Derlin-3 are regulated by the mammalian unfolded protein response and are required for ERassociated degradation. J Cell Biol. 2006, 172(3): 383-393.
- ⁶⁸ Wang J, Hua H, Ran Y, Zhang H, Liu W, Yang Z, Jiang Y. Derlin-1 is overexpressed in human breast carcinoma and protects cancer cells from endoplasmic reticulum stressinduced apoptosis. Breast Cancer Res. 2008, 10(1): R7.
- ⁶⁹ Ran Y, Hu H, Hu D, Zhou Z, Sun Y, Yu L, Sun L, Pan J, Liu J, Liu T, Yang Z. Derlin-1 is overexpressed on the tumor cell surface and enables antibody-mediated tumor targeting therapy. Clin Cancer Res. 2008, 14(20): 6538-6545.
- ⁷⁰ Ying H, Yu Y, Xu Y. Cloning and characterization of F-LANa, upregulated in human liver cancer. Biochem Biophys Res Commun. 2001, 286(2): 394-400.
- ⁷¹ Lopez-Serra P, Marcilla M, Villanueva A, Ramos-Fernandez A, Palau A, Leal L, Wahi JE, Setien-Baranda F, Szczesna K, Moutinho C, Martinez-Cardus A, Heyn H, Sandoval J, Puertas S, Vidal A, Sanjuan X, Martinez-Balibrea E, Viñals F, Perales JC, Bramsem JB, Ørntoft TF, Andersen CL, Tabernero J, McDermott U, Boxer MB, Vander Heiden MG, Albar JP, Esteller M. A DERL3-associated defect in the degradation of SLC2A1 mediates the Warburg effect. Nat Commun. 2014, 5: 3608.

- ⁷² Ahmedli NB, Gribanova Y, Njoku CC, Naidu A, Young A, Mendoza E, Yamashita CK, Ozgül RK, Johnson JE, Fox DA, Farber DB. Dynamics of the rhomboid-like protein RHBDD2 expression in mouse retina and involvement of its human ortholog in retinitis pigmentosa. J Biol Chem. 2013, 288(14): 9742-9754.
- ⁷³ Ferretti VA, Canzoneri R, Barbeito CG, Croce MV, Abba MC, Lacunza E. Spatiotemporal expression of Rhomboid domain containing 2 (Rhbdd2) during rat development. Acta Histochem. 2015, 117(7): 635-641.
- ⁷⁴ Lacunza E, Rabassa ME, Canzoneri R, Pellon-Maison M, Croce MV, Aldaz CM, Abba MC. Identification of signaling pathways modulated by RHBDD2 in breast cancer cells: a link to the unfolded protein response. Cell Stress Chaperones. 2014, 19(3): 379-388.
- ⁷⁵ Liu J, Liu S, Xia M, Xu S, Wang C, Bao Y, Jiang M, Wu Y, Xu T, Cao X. Rhomboid domain-containing protein 3 is a negative regulator of TLR3-triggered natural killer cell activation. Proc Natl Acad Sci EEUU. 2013, 110(19): 7814-7819.
- ⁷⁶ Liu J, Han C, Xie B, Wu Y, Liu S, Chen K, Xia M, Zhang Y, Song L, Li Z, Zhang T, Ma F, Wang Q, Wang J, Deng K, Zhuang Y, Wu X, Yu Y, Xu T, Cao X. Rhbdd3 controls autoimmunity by suppressing the production of IL-6 by dendritic cells via K27-linked ubiquitination of the regulator NEMO. Nat Immunol. 2014, 15(7): 612-622.
- ⁷⁷ Farrell WE. A novel apoptosis gene identified in the pituitary gland. Neuroendocrinology 2006, 84(4): 217-221.
- ⁷⁸ Christianson JC, Olzmann JA, Shaler TA, Sowa ME, Bennett EJ, Richter CM, Tyler RE, Greenblatt EJ, Harper JW, Kopito RR. Defining human ERAD networks through an integrative mapping strategy. Nat Cell Biol. 2011, 14(1): 93-105.
- ⁷⁹ Olzmann JA, Richter CM, Kopito RR. Spatial regulation of UBXD8 and p97/VCP controls ATGL-mediated lipid droplet turnover. Proc Natl Acad Sci USA. 2013, 110(4): 1345-1350.
- ⁸⁰ Sawalha AH, Hughes T, Nadig A, Yılmaz V, Aksu K, Keser G, Cefle A, Yazıcı A, Ergen A, Alarcón-Riquelme ME, Salvarani C, Casali B, Direskeneli H, Saruhan-Direskeneli G. A putative functional variant within the UBAC2 gene is associated with increased risk of Behçet's disease. Arthritis Rheum. 2011, 63(11): 3607-3612.
- ⁸¹ Hou S, Shu Q, Jiang Z, Chen Y, Li F, Chen F, Kijlstra A, Yang P. Replication study confirms the association between UBAC2 and Behçet's disease in two independent Chinese sets of patients and controls. Arthritis Res Ther. 2012, 14(2): R70.

- ⁸² Ong YS, Tran TH, Gounko NV, Hong W. TMEM115 is an integral membrane protein of the Golgi complex involved in retrograde transport. J Cell Sci. 2014, 127(Pt 13): 2825-2839.
- ⁸³ Abba MC, Sun H, Hawkins KA, Drake JA, Hu Y, Nunez MI, Gaddis S, Shi T, Horvath S, Sahin A, Aldaz CM. Breast cancer molecular signatures as determined by SAGE: correlation with lymph node status. Mol Cancer Res. 2007, 5(9): 881-890.
- ⁸⁴ Edge SB, Byrd DR, Compton CC, Fritz AG, Greene FL, Trotti A. AJCC cancer staging manual. 7^{ma} edición. New York, EEUU: Springer. 2010, 648p.
- ⁸⁵ Ball RK, Friis RR, Schoenenberger CA, Doppler W, Groner B. Prolactin regulation of betacasein gene expression and of a cytosolic 120-kd protein in a cloned mouse mammary epithelial cell line. EMBO J. 1988, 7(7): 2089-2095.
- ⁸⁶ Taverna D, Groner B, Hynes NE. Epidermal growth factor receptor, platelet-derived growth factor receptor, and c-erbB-2 receptor activation all promote growth but have distinctive effects upon mouse mammary epithelial cell differentiation. Cell Growth Differ. 1991, 2(3):145-154.
- ⁸⁷ Cox ML, Schray CL, Luster CN, Stewart ZS, Korytko PJ, Khan KNM, JD Paulauskis, RW Dunstan. Assessment of fixatives, fixation, and tissue processing on morphology and RNA integrity. Exp Mol Pathol. 2006, 80(2): 183-191.
- ⁸⁸ Okonechnikov K, Golosova O, Fursov M, the UGENE team. Unipro UGENE: a unified bioinformatics toolkit. Bioinformatics 2012, 28: 1166-1167.
- ⁸⁹ Pfaffl MW. Quantification strategies in real-time PCR. En: A-Z of quantitative PCR. La Jolla, California, EEUU: International University Line. 2004, 912p.
- ⁹⁰ Creste S, Neto AT, Figueira A. Detection of single sequence repeat polymorphisms in denaturing polyacrylamide sequencing gels by silver staining. Plant Mol Biol Rep. 2001, 19: 299-306.
- ⁹¹ Bolte S, Cordelieres FP. A guide tour into subcelular colocalization analysis in light micrscopy. J Microsc. 2006, 224(Pt 3): 213-232.
- ⁹² Zinchuk V, Zinchuk O. Quantitative colocalization analysis of confocal fluorescence microscopy images. Curr Protoc Cell Biol. 2008, 39: 4.19.1-4.19.16.
- ⁹³ Breitling R, Armengaud P, Amtmann A, Herzyk P. Rank products: a simple, yet powerful, new method to detect differentially regulated genes in replicated microarray experiments. FEBS Lett. 2004, 573(1-3): 83-92.
- ⁹⁴ Gottrup F, Agren MS, Karlsmark T. Models for use in wound healing research: a survey focusingon in vitro and in vivo adult soft tissue. Wound Rep Reg. 2000, 8(2): 83-96.

- ⁹⁵ Taminau J, Meganck S, Lazar C, Steenhoff D, Coletta A, Molter C, Duque R, de Schaetzen V, Weiss Solís DY, Bersini H, Nowé A. Unlocking the potential of publicly available microarray data using inSilicoDb and inSilicoMerging R/Bioconductor packages. BMC Bioinforma. 2012, 13: 335.
- ⁹⁶ Stothard P. The Sequence Manipulation Suite: JavaScript programs for analyzing and formatting protein and DNA sequences. Biotechniques 2000, 28 (6): 1102-1104
- ⁹⁷ Pierleoni A, Indio V, Savojardo C, Fariselli P, Martelli PL, Casadio R. MemPype: a pipeline for the annotation of eukaryotic membrane proteins. Nucleic Acids Res. 2011, 39: W375-380.
- ⁹⁸ Altman BJ, Rathmell JC. Metabolic stress in autophagy and cell death pathways. Cold Spring Harb Perspect Biol. 2012, 4(9): a008763.
- ⁹⁹ Frezza C, Cipolat S, Martins de Brito O, Micaroni M, Beznoussenko GV, Rudka T, Bartoli D, Polishuck RS, Danial NN, De Strooper B, Scorrano L. OPA1 controls apoptotic cristae remodelling independently from mitochondrial fusion. Cell. 2006, 126(1): 177–189.
- ¹⁰⁰ Prat A, Cheang MC, Martín M, Parker JS, Carrasco E, Caballero R, Tyldesley S, Gelmon K, Bernard PS, Nielsen TO, Perou CM. Prognostic significance of progesterone receptorpositive tumor cells within immunohistochemically defined luminal A breast cancer. J Clin Oncol. 2013, 31(2): 203-209.
- ¹⁰¹ Cancello G, Maisonneuve P, Rotmensz N, Viale G, Mastropasqua MG, Pruneri G, Montagna E, Iorfida M, Mazza M, Balduzzi A, Veronesi P, Luini A, Intra M, Goldhirsch A, Colleoni M. Progesterone receptor loss identifies luminal B breast cancer subgroups at higher risk of relapse. Ann Oncol. 2013, 24(3): 661-668.
- ¹⁰² Cui X, Schiff R, Arpino G, Osborne CK, Lee AV. Biology of progesterone receptor loss in breast cancer and its implications for endocrine therapy. J Clin Oncol. 2005, 23(30): 7721-7735.
- ¹⁰³ Ong YS, Tran TH, Gounko NV, Hong W. TMEM115 is an integral membrane protein of the Golgi complex involved in retrograde transport. J Cell Sci. 2014, 127(Pt 13):2825-2839.
- ¹⁰⁴ Martínez-Salas E, Piñeiro D, Fernández N. Alternative mechanisms to initiate translation in eukaryotic mRNAs. Comp Func Genomics. 2012, 2012: 391546.
- ¹⁰⁵ Morris DR, Geballe AP. Upstream open reading frames as regulators of mRNA translation.
 Mol Cell Biol. 2000, 20(23): 8635-8642.

- ¹⁰⁶ Barbosa C, Peixeiro I, Romão L. Gene expression regulation by upstream open reading frames and human disease. PLoS Genet. 2013, 9(8): e1003529.
- ¹⁰⁷ Fitzgerald KD, Semler BL. Bridging IRES elements in mRNAs to the eukaryotic translation apparatus. Biochim Biophys Acta. 2009, 1789(9-10): 518-528.
- ¹⁰⁸ Yaman I, Fernandez J, Liu H, Caprara M, Komar AA, Koromilas AE, Zhou L, Snider MD, Scheuner D, Kaufman RJ, Hatzoglou1 M. The zipper model of translational control: a small upstream ORF is the switch that controls structural remodeling of an mRNA leader. Cell 2003, 113(4): 519–531.
- ¹⁰⁹ Fernandez J, Yaman I, Huang C, Liu H, Lopez AB, Komar AA, Caprara MG, Merrick WC, Snider MD, Kaufman RJ, Lamers WH, Hatzoglou M. Ribosome stalling regulates IRESmediated translation in eukaryotes, a parallel to prokaryotic attenuation. Molecular Cell 2005, 17(3): 405–416.
- ¹¹⁰ Teider N, Scott DK, Neiss A, Weeraratne SD, Amani VM, Wang Y, Marquez VE, Cho YJ, Pomeroy SL. Neuralized-1 causes apoptosis and downregulates Notch target genes in medulloblastoma. Neuro-Oncology 2010, 12(12): 1244–1256.
- ¹¹¹ Hellman M, Tossavainen H, Rappu P, Heino J, Permi P. Characterization of intrinsically disordered prostate associated gene (PAGE5) at single residue resolution by NMR spectroscopy. PlosONE 2011, 6(11): 1-11.
- ¹¹² Scanlan MJ, Gorgon CM, Williamson B, Lee SY, Chen YT, Stockert E, Jungbluth A, Ritter G, J^{*}ager D, J^{*}ager E, Knuth A, Old LJ. Identification of cancer/testis gene by database mining mRNA expression and mRNA expression analysis. Int. J. Cancer 2002, 98: 485-492.
- ¹¹³ Rappu P, Nylund C, Ristiniemi N, Kulpakko J, Vihinen P, Hernberg M, Mirtti T, Alanen K, Kallajoki M, Vuoristo MS, Pyrhönen S, Heino J. Detection of melanoma-derived cancertestis antigen CT16 in patient sera by a novel immunoassay. Int J Cancer 2011, 128(10): 2382-2392.
- ¹¹⁴ Chen JLY. Cellular responses to lactic acidosis in human cancers (Tesis doctoral). Department of Molecular Genetics and Microbiology, Duke University. 2010.
- ¹¹⁵ Shim H, Chun YS, Lewis BC, Dang CV. A unique glucose-dependent apoptotic pathway induced by c-Myc. Proc Natl Acad Sci U S A. 1998, 95(4): 1511-1516.
- ¹¹⁶ Isono T, Chano T, Kitamura A, Yuasa T. Glucose deprivation induces G2/M transitionarrest and cell death in N-GlcNAc2-modified protein-producing renal carcinoma cells. PLoS One. 2014, 9(5): e96168.

- ¹¹⁷ Clarke SD, Abraham S. Gene expression: nutrient control of pre- and posttranscriptional events. FASEB J. 1992, 6(13): 3146-3152.
- ¹¹⁸ Jousse C, Bruhat A, Harding HP, Ferrara M, Ron D, Fafournoux P. Amino acid limitation regulates CHOP expression through a specific pathway independent of the unfolded protein response. FEBS Lett. 1999, 448(2-3): 211-216.
- ¹¹⁹ Jauhiainen A, Thomsen C, Strömbom L, Grundevik P, Andersson C, Danielsson A, Andersson MK, Nerman O, Rörkvist L, Ståhlberg A, Åman P. Distinct cytoplasmic and nuclear functions of the stress induced protein DDIT3/CHOP/GADD153. PLoS One. 2012, 7(4): e33208.
- ¹²⁰ Williams C, Helguero L, Edvardsson K, Haldosén LA, Gustafsson JA. Gene expression in murine mammary epithelial stem cell-like cells shows similarities to human breast cancer gene expression. Breast Cancer Res. 2009, 11(3): R26.
- ¹²¹ Rosen JM, Wyszomieski SL, Hadsell D. Regulation of milk protein gene expression. Annu Rev Nutr. 1999, 19: 407-436.
- ¹²² Wang W, Jose C, Kenney N, Morrison B, Culter ML. Global expression profiling reveals regulation of CTGF/CCN2 during lactogenic differentiation. J Cell Commun Signal. 2009, 3(1): 43-55.