



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

UNIDAD IZTAPALAPA

Regulación transcripcional de *cyba* ($p22^{\text{phox}}$), inducida por el factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) acoplado a su receptor c-Met en hepatocitos de ratón.

T E S I S

Que para obtener el grado de Maestría en Biología Experimental

Presenta:

Biol. Exp. Arturo Simoni Nieves

COMITÉ:

Directora: Dra. Roxana U. Miranda Labra (UAM-I)

Asesor: Dr. Francisco R. M. Laurindo (Universidade de São Paulo)

Asesor: Dr. Luis Vaca Domínguez (IFC, UNAM)

Ciudad de México, 20 de Julio del 2016

Este trabajo fue realizado en el Laboratorio de Fisiología Celular, en el departamento de Ciencias de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa.

El Programa de Maestría en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACYT, registro 001481, en el Nivel Consolidado y cuenta con apoyo del mismo Consejo, clave DAFCYT-2003IMPTNNN0020". Número de registro de la beca otorgada por CONACYT: 570373

Este trabajo estuvo apoyado por el proyecto CONACYT 222578 bajo la responsabilidad de la Doctora Roxana Uri Miranda Labra y por el proyecto CONACYT 252942 bajo la responsabilidad del Doctor Luis Enrique Gómez Quiroz.

COMITÉ TUTORAL

DIRECTORA

Dra. Roxana U. Miranda Labra

Investigador Nacional Nivel I

Laboratorio de Fisiología Celular

Departamento de Ciencias de la Salud

Universidad Autónoma Metropolitana

ASESOR EXTERNO

Dr. Francisco R. M. Laurindo

Vascular Biology Laboratory

Instituto do Coração (InCor)

Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

ASESOR EXTERNO:

Dr. Luis Vaca Domínguez

Investigador Nacional Nivel III

Instituto de Fisiología Celular

Universidad Nacional Autónoma de México

Los miembros del jurado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana, abajo Firmantes, aprobando la tesis titulada: "Regulación transcripcional de cyba (p22^{phox}), inducida por el factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) acoplado a su receptor c-Met en hepatocitos de ratón", con fecha 20 de Julio del 2016



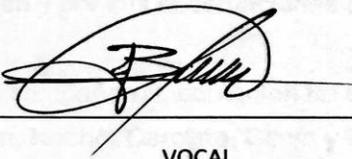
PRESIDENTE

Dra. María Concepción Gutiérrez Ruiz
Departamento de Ciencias de la Salud
División de Ciencias Biológicas y de la Salud
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa



SECRETARIO

Dra. M. del R. Denise Clavijo Cornejo
Laboratorio de Líquido Sinovial
Instituto Nacional de Rehabilitación
"Luis Guillermo Ibarra Ibarra"



VOCAL

Dr. Javier Barrios Gonzáles
Departamento de Biotecnología
División de Ciencias Biológicas y de la Salud
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa



VOCAL

Dr. Francisco José Fernández Perrino
Departamento de Biotecnología
División de Ciencias Biológicas y de la Salud
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mis directores de tesis los cuales son de las personas que más admiro por su gran inteligencia la Dra. Roxana Uri Miranda Labra y Dr. Luis Enrique Gómez Quiroz (Director no oficial) a quiénes les debo el hecho de que esta tesis esté terminada, gracias por su tiempo y apoyo.

A la Dra. Concepción Gutiérrez Ruiz por haber permitido entrar a este gran laboratorio y darme la oportunidad de crecer tanto como persona como investigador.

A la Dra. Leticia Bucio y a la Dra. Verónica Souza, por su ayuda y consejos dentro del laboratorio.

Al Dr. Javier Barrios, Dr. Francisco Fernández por formar parte de mi jurado de examen y por sus observaciones al trabajo.

A mis compañeros, con quien he convivido dentro del laboratorio a Mayra, Ismerai, Monse, Nacho, Carolina, Benja y Paty, gracias por sus aportaciones.

A mis dos primeros alumnos Diego y Alejandro por su ayuda y gracias a sus preguntas me han obligado a leer y aprender más para poder dar el ancho.

A Denise que fue mi maestra y me has enseñado mucho y lo seguirás haciendo.

A Soraya que más que una amiga ya forma parte de mi familia, gracias por todo lo que has vivido conmigo, gracias por todo el apoyo y perdón si no he correspondido a todo eso.

Dedicatoria

La presente tesis se la dedico a mi familia que gracias a su apoyo pude concluir este gran paso. A mis padres y hermana por su apoyo y confianza. Gracias por ayudarme a cumplir mis objetivos como persona y estudiante. A mi madre por hacer de mí una mejor persona a través de sus consejos, enseñanzas y amor. A mi padre por brindarme apoyarme y aconsejarme. A mi hermana por estar siempre presente. Gracias por su apoyo y amor.

RESUMEN

La señalización mediada por el factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) y su receptor c-Met está implicada en el control de estado redox celular y el estrés oxidante, en particular a través de su capacidad para inducir la expresión de genes hepatoprotectores mediante la activación de las vías de supervivencia en el hepatocito. Recientemente, nuestro grupo de trabajo ha reportado que el HGF regula la expresión de subunidades que forman parte del complejo multiproteico de la enzima NADPH oxidasa en hepatocitos de ratón, especialmente las subunidades catalíticas Nox2 y Nox4 y la reguladora p22^{phox}. En el presente trabajo nos centramos en investigar el mecanismo mediado por HGF/c-Met en la regulación de la expresión del gen *cyba* que codifica para la proteína p22^{phox} en cultivo primario de hepatocitos de ratón. El análisis de la expresión de *cyba* por qRT-PCR en hepatocitos tratados con HGF, reveló la represión de este mensajero de manera dependiente del tiempo. Para identificar los elementos *cis* más relevantes del promotor de *cyba* se clonaron diferentes regiones en un vector para medir la actividad promotora, la región más relevante fue -662/-1362 (B-C). Y mediante el análisis *in silico* de este promotor se logró identificar regiones consenso para NF-κB. Posteriormente se evaluó el contenido proteico de p22^{phox} mediante inmunodetecciones y se pudo observar el mismo efecto que en el mRNA. Con el fin de averiguar si el proteosoma 26S está involucrado en la degradación de p22^{phox} inducido por el HGF, se pre-trataron las células con epoxomicina (200 nM) durante 30 minutos e inmediatamente después se trataron con HGF (50 ng/ml) durante 12 h. El resultado mostró que la degradación de p22^{phox} fue abrogada. Para obtener más pruebas con respecto a este mecanismo, se utilizó wortmanina (2 mM) para inhibir PI3K/Akt/MDM2, y también encontramos que la degradación de p22^{phox} fue revocada. Por último, hemos encontrado una interacción entre p22^{phox} y c-Met, lo que sugiere un mecanismo post-traducciona adicional de regulación de la NADPH oxidasa y HGF/c-Met. En conclusión, nuestros datos muestran claramente que HGF/c-Met ejerce una amplia gama de mecanismos moleculares que tienden a controlar la expresión y la actividad de las NADPH oxidasas que utiliza a p22^{phox} como un componente clave.

ABSTRACT

It is well known that signaling mediated by the hepatocyte growth factor (HGF) and its receptor c-Met is involved in the control of cellular redox status and oxidative stress, particularly through its ability to induce hepatoprotective gene expression by activating survival pathways in the hepatocyte. We recently showed that HGF can regulate the expression of many members of the NADPH oxidase family in liver cells, particularly the catalytic subunits and p22^{phox}. In the present work we were focused to figure out the mechanism mediated by HGF/c-Met in the expression and protein content of p22^{phox} in primary mouse hepatocytes. The analysis of the expression of *cyba* by qRT-PCR under HGF treatment revealed the repression of this messenger in a time dependent manner. To identify the most relevant cis elements in the *cyba* promoter, different regions were cloned into a vector to measure the promoter activity, the most relevant region was -662 / -1362 (B-C). While this effect was related with p22^{phox} protein content, the timing of the effect suggested an independent process that could be involved in p22^{phox} levels. In order to figure out the possible p22^{phox} degradation by 26S proteasome induced by HGF, we treated cells with epoxomicin (200 nM) for 30 min before HGF (50 ng/ml) treatment for 12h. Result showed that p22^{phox} degradation was abrogated. To gain more evidence regarding this mechanism, we used wortmannin (2 mM) to inhibit PI3K/Akt, due to some reports linking PI3K/Akt to the mdm2 ubiquitin ligase. We found that also p22^{phox} degradation was revoked. Finally, as we previously found we confirmed the interaction of p22^{phox} and c-Met by immunoprecipitation, suggesting an additional post-translational mechanism of regulation of NADPH oxidase and HGF/c-Met. In conclusion, our data clearly show that HGF/c-Met exerts a wide-range of molecular mechanisms tending to control the expression and activity of those NADPH oxidases that use p22^{phox} as a key component.

Índice

1. INTRODUCCIÓN	11
1.1. Generalidades del hígado.	11
1.2. Componentes celulares del hígado.	11
1.3. Factor de Crecimiento de Hepatocitos.....	12
1.4 c-Met, receptor de HGF.	13
1.5 Especies Reactivas de Oxígeno.	14
1.6. Propiedades generales de la NADPH oxidasa.	15
2. ANTECEDENTES	17
3. JUSTIFICACIÓN	17
4. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	18
5. HIPÓTESIS	18
6. OBJETIVO GENERAL	18
7. OBJETIVOS PARTICULARES	19
8. MATERIAL Y MÉTODOS	19
8.1. Materiales	19
8.2. Análisis in silico	19
8.3. Cultivo primario de hepatocitos de ratón.....	21
8.4. Extracción de proteínas.....	22
8.5. Análisis de proteínas por Inmunoblot	22
8.6. qRT-PCR	23
8.7. Determinación de la producción de radical superóxido por medio de la oxidación de dihidro etidio (DHE).....	25
8.8. Amplificación del promotor de <i>cyba</i>	25
8.9. Transformación.....	26
8.10. Lisis Alcalina: Técnica para obtener ADN plasmídico.....	28
8.11. Transfección	29
8.12. Inmunofluorescencia	29
8.13. Inmunoprecipitación	¡Error! Marcador no definido.
8.14. Cuantificación de proteína	30
8.15. Análisis estadístico	30
9. RESULTADOS	31
9.1. Características de p22phox.....	31
9.2. Interacciones proteicas de p22phox.	31
9.3. Subunidades expresadas en el hepatocito de ratón.....	33
9.4. Expresión de p22phox en hepatocitos de ratón tratados con HGF.	33
9.5. Análisis in silico del promotor de <i>cyba</i> (p22phox).	34
9.6. Actividad promotora basal.	35
9.7. Factores de transcripción involucrados en la regulación transcripcional de p22phox.	36
9.8. Contenido proteico de p22phox en hepatocitos de ratón tratados con HGF..	36

9.9. Producción de anión superóxido.....	38
9.10. Control post-traducional de c-Met sobre p22 ^{phox}	39
9.11. Interacción entre c-Met/p22phox	42
10. DISCUSIÓN	44
11. CONCLUSIÓN	48
12. REFERENCIAS	50

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Generalidades del hígado.

La localización anatómica del hígado es en el cuadrante superior derecho de la cavidad abdominal y se divide en dos lóbulos, los cuales se logran identificar dependiendo su localización ya sea izquierdo o derecho. Histológicamente, muestra una estructura parenquimatosa con espacios porta, venas o vénulas centro lobulillares, eferentes o terminales. El parénquima se ha dividido en varias partes según el concepto del lobulillo clásico, porción periférica, zonal media y centro lobulillar o el ácino de Rappaport (zona 1, 2 y 3 respectivamente) (1).

A nivel fisiológico el hígado lleva a cabo aproximadamente 500 funciones, participa en la biotransformación de xenobióticos, lleva a cabo la captura y degradación de bacterias, virus, parásitos, partículas, entre otras. Además, está involucrado en el metabolismo de carbohidratos, participa en el metabolismo de lípidos, teniendo como funciones principales la captación, oxidación y transformación de los ácidos grasos, la síntesis de lipoproteínas del plasma, la transformación de lipoproteínas, el catabolismo de LDL, VDL, entre otras (1).

1.2. Componentes celulares del hígado.

El 20% de los tipos celulares en el hígado está compuesto por células no parenquimatosas, que incluyen a las células endoteliales, las células de Kupffer, linfocitos y células estelares, mientras que el 80% de la población celular está conformada por hepatocitos que se distinguen por presentar forma poliédrica, con tamaño aproximado de 30 μm de largo y 20 μm de ancho (1).

Los hepatocitos son las únicas células que inactivan al amoníaco tóxico por medio del ciclo de la urea. Llevan a cabo la síntesis de una amplia variedad de proteínas del suero, además tienen un papel en el metabolismo de lípidos tanto endógeno como exógeno a través de la síntesis de lipoproteínas y el catabolismo de las proteínas enriquecidas con colesterol derivado de la sangre, están bien equipadas con mecanismos antioxidantes para la defensa contra el estrés oxidante y son responsables de la desintoxicación de numerosas sustancias tanto exógenas como endógenas (1).

En los hepatocitos las funciones celulares son coordinadas por moléculas que participan en vías de señalización compuestas principalmente por citocinas (TNF- α , TGF- β), factores de transcripción (Nrf2, NF- κ B, AP-1), radicales libres (H₂O₂, O⁻), entre otras. De particular importancia es el factor de crecimiento de hepatocitos (HGF, por sus siglas en ingles), que se ha demostrado impacta en prácticamente todas las funciones del hígado.

1.3. Factor de Crecimiento de Hepatocitos.

En los hepatocitos el HGF fue identificado originalmente como un potente mitógeno, es una proteína dimérica de 84 kDa de peso molecular, está compuesto por una subunidad α de 69 kDa y una subunidad β de 34 kDa, unida por un puente disulfuro y es producido en las células del estroma (2). Fue descrito en 1989 cuando el HGF humano fue clonado por Miyazawa lo que revelo que este factor de crecimiento es sintetizado como pro-HGF de 728 aminoácidos (3) y después

madura en HGF por medio de una escisión proteolítica. En etapas fetales, la neutralización de HGF o el silenciamiento de c-Met llevan a hipoplasia de varios órganos lo que indica que la señalización mediada por este factor de crecimiento es esencial en el desarrollo de los órganos. El HGF es requerido para la reparación en el daño del hígado (4), riñones (5), pulmón entre otros, además de tener efectos protectores en órganos epiteliales y no epiteliales como el corazón y el cerebro. Se ha demostrado que estas funciones son mediadas por vías de señalización anti-apoptóticas (Bcl2) y anti-inflamatorias (IL-4) (2).

Es importante resaltar la función que tiene el HGF como modulador del sistema del glutatión (GSH), el cual es un determinante fundamental del estado redox celular (6, 7). Esto es evidencia de que la señalización de c-Met es un factor crítico en la protección contra la generación excesiva de especies reactivas de oxígeno (ERO) ya que se ha demostrado que regula la activación de vías implicadas en la regulación del estado redox celular, tales como Nrf2, NF- κ B (en especial a p50 y p65), entre otras. (6).

1.4 c-Met, receptor de HGF.

El HGF actúa a través de su receptor de membrana con actividad tirosina cinasa llamado factor de transición epitelio-mesénquima (c-Met, por sus siglas en inglés) que fue descrito originalmente en 1984 y relacionado con HGF en 1991. Se ha demostrado que c-Met es procesado en las células epiteliales por medio de una proteólisis intermembranal dependiente de presenilina, lo cual es independiente de la estimulación del ligando. El proceso proteolítico involucra escisiones secuenciales por metaloproteasas, lo que permite la generación de fragmentos lábiles (8). Met es sintetizado de una cadena precursora simple que es glicosilada

post-traduccionamente, seguida por una escisión endoproteolítica para producir la forma madura heterodimérica. El Met maduro es una proteína transmembranal compuesta por una subunidad extracelular α de 45-kDa que está unida por medio de puente disulfuro a una subunidad compuesta por dominios extracelulares e intracelulares que contienen el dominio catalítico (9). Una vez que se une el ligando se lleva a cabo una dimerización de c-Met y varios residuos de tirosinas (Tyr 1230, 1234 y 1235) son fosforiladas en la región intracelular de la subunidad β . Dentro del dominio de la tirosina cinasa, dos de las tirosinas son los principales sitios de autofosforilación y la mutación de estos residuos abaten su actividad biológica (10). Fuera del dominio de la cinasa, dos sitios de autofosforilación en la región C-terminal son responsables del reclutamiento de varias proteínas involucradas en la iniciación de la señalización intracelular, tales como Src, Grb2 entre otras (10).

1.5 Especies Reactivas de Oxígeno.

Si bien se había considerado a las especies reactivas de oxígeno (EROs) como entidades generadas como productos secundarios del metabolismo y que su efecto era solo tóxico, ahora se reconoce que tienen una importancia en la conducción de señales relacionadas con varios procesos fisiológicos de la célula (11), como son la defensa antioxidante, apoptosis o proliferación (12). Así mismo se ha postulado que el tiempo de generación, concentración y localización de las EROs es lo que marca el límite entre moléculas de señalización vital y molécula tóxica.

Entre las principales EROs encontramos al superóxido ($O_2^{\cdot-}$), el cual es producido

fisiológicamente por medio de la reducción de un electrón en el oxígeno molecular y el peróxido de hidrogeno (H_2O_2). Entre los blancos principales en la señalización mediada por ERO se encuentran la activación de rutas como la del factor nuclear kapa B (NF- κ B), cinasa de Jun (JNK), o de la proteína activadora 1 (AP1, por sus siglas en ingles) (12). Sin embargo, recientemente ha tomado particular relevancia el factor 2 asociado con el factor nuclear eritroide 2 (Nrf2, por siglas en ingles), presentándose como el prototipo de factor de transcripción que requiere obligadamente de un estado oxidante para su activación. (11, 12).

1.6. Propiedades generales de la NADPH oxidasa.

La NADPH oxidasa es una enzima multiproteica que se encuentra anclada a las membranas, donde cataliza la reducción de oxígeno en anión superóxido como donador de electrones, este complejo fue descrito por primera vez en células fagocíticas como productor importante de EROs para matar a las bacterias, ahora es bien conocido que están presentes en muchos tipos celulares incluyendo las células hepáticas. Aún no está completamente clara su función en las células no fagocíticas, pero la evidencia muestra que la actividad de la enzima está relacionada con eventos de transducción de señales (11, 13). Así mismo, la sobre-expresión o sobre-activación conllevan al desarrollo de estrés oxidante, tal y como se ha reportado en el hígado (6, 14) en el sistema cardiovascular, el pulmón (14) y el páncreas, entre otros. En particular en el hígado, la sobre-activación de la NADPH oxidasa está relacionada con la fibrosis hepática (15), daño al hígado inducido por la infección de la hepatitis C (16, 17) y desarrollo de cáncer (18). La NADPH oxidasa es una familia de enzimas compuesta por 7 homólogos catalíticos unidos a la membrana, tales como; Nox1, Nox2, Nox3, Nox4 y Nox5 además de

DUOX1 y 2 (12), en la activación de la NADPH oxidasa están involucradas varias subunidades reguladoras que en condiciones basales están localizados en el citoplasma como p67^{phox}, p47^{phox}, p40^{phox}, NOXO1, NOXA1, Rac 1 y 2. La excepción de las subunidades reguladoras es p22^{phox}, el cual reside en la membrana y se cree que también participa en el plegamiento de las Nox o está participando en el transporte de electrones (19). p22^{phox} (el cual está codificado en el gen *cyba*) es fundamental para la actividad de la NADPH oxidasa lo cual quedó evidenciado por la inhibición de la expresión de p22^{phox}, lo cual provoca la abrogación de la producción del anión superóxido producido por la NADPH oxidasa cuando existe un estímulo con angiotensina II (2). En el hígado sano, los hepatocitos producen pequeñas cantidades de EROs además de que el sistema antioxidante como la superóxido dismutasa y la catalasa remueven eficientemente el exceso de EROs, para así mantener la homeostasis de las células (13). En las enfermedades crónicas del hígado como el abuso del alcohol, infección del virus de la hepatitis C, se ha observado un incremento de la producción de las EROs así como una disminución en los sistemas antioxidantes, lo que resulta en un estrés oxidante (16). Se ha reportado en la literatura que las diferentes isoformas de la NADPH oxidasa presentes en el hepatocito son Nox2, Nox1, y Nox4, mientras que no se detectó Nox 5 en los hepatocitos de ratón en cultivo primario, lo que nos sugiere que esta enzima multiproteica presenta funciones tejido-especifico (15). También se ha reportado la presencia de los homólogos Duox 1 y 2. No obstante aún no se ha establecido por completo su participación en este tipo celular.

2. ANTECEDENTES

Nuestro grupo de trabajo previamente ha reportado que HGF/c-Met puede regular el estado redox celular (20). Los ratones knock out para c-Met (c-MetKO) en el hígado muestran una desregulación profunda en los genes involucrados en la respuesta antioxidante y el metabolismo de glutatión (GSH) (6), también se reportó que los hepatocitos c-MetKO tienen estrés oxidante debido a una sobre activación de NADPH oxidasa (6). Se ha reportado que el incremento en la producción de las EROs puede someter a la célula a un estrés oxidante, que puede incrementar la sensibilidad de los hepatocitos a la apoptosis inducida por agonistas de Fas(21).

Los datos que nuestro grupo ha obtenido previamente sugieren que el HGF y c-Met regulan a la NADPH oxidasa, por lo que en el presente trabajo nos enfocamos al estudio y caracterización de este sistema por el HGF/c-Met y su relevancia en la supervivencia celular(22).

3. JUSTIFICACIÓN

Las enfermedades hepáticas ocupan la quinta causa de muerte en nuestro país, tales como las hepatitis virales, la enfermedad hepática alcohólica (EHA), la esteatohepatitis no alcohólica y la cirrosis incluso la obesidad, son hepatopatías donde el daño por radicales libres es la principal causa de la progresión del daño hepatocelular (6). Nuestro grupo de trabajo ha reportado que existe una estrecha regulación del estado redox celular y del estrés oxidante por el HGF y su receptor c-Met, debido a que este factor regula a la NADPH oxidasa, que es una

generadora de ERO con fines de señalización, ya se ha reportado que HGF/c-Met están involucrados en la disminución de la expresión de las subunidades de esta oxidasa, aún falta determinar cual es el mecanismo involucrado en su represión, lo cual es indispensable para mantener el sistema de generación de radicales libres bajo control, como una medida de protección ante el estrés oxidante celular (22). Y así identificar el mecanismo por el cual HGF induce una respuesta de protección ante la progresión del daño que generan los radicales libres.

4. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Cuáles son los niveles de regulación que ejerce el HGF/c-Met sobre p22^{phox}?

5. HIPÓTESIS

El HGF a través de su receptor c-Met regulará a la NADPH oxidasa, específicamente a través de su subunidad reguladora p22^{phox}, de manera diferencial, induciendo tempranamente una respuesta de supervivencia que permitirá la activación de los factores de transcripción y posteriormente mediante su represión transcripcional y post-traducciona que mantendrá la supervivencia en el hepatocito.

6. OBJETIVO GENERAL

Determinar los mecanismo moleculares mediados por HGF/c-Met en la regulación de p22^{phox} en las células hepáticas.

7. OBJETIVOS PARTICULARES.

- Evaluar de manera *in silico* al promotor de *cyba* e identificar regiones reguladoras consenso.
- Determinar la cinética de represión de *cyba* ejercida por HGF/c-Met en hepatocitos.
- Identificar las regiones reguladoras dentro del promotor de *cyba* y distinguir a sus represores transcripcionales.
- Establecer la regulación post-traducciona inducida por HGF/c-Met sobre p22^{phox}.
- Caracterizar la interacción física entre c-Met/p22^{phox}.

8. MATERIAL Y MÉTODOS

8.1. Materiales

Todos los reactivos fueron adquiridos de Sigma-Aldrich excepto cuando se indique lo contrario. El factor de crecimiento de hepatocitos recombinante humano (hHGF) y el factor de crecimiento transformante beta (TGF- β) fueron obtenidos de PeproTech (Rocky Hill, NJ).

8.2. Vectores plasmídicos

Los plásmidos peYFP/p22 y pmCherry/c-Met fueron obtenidos de el Dr. Luis Vaca Domínguez, IFC, UNAM y Life technologies respectivamente. Ambos vectores contienen el promotor del citomegalovirus (CMV) y un gen reportero; la proteína amarilla fluorescente y la proteína Cherry. El gen de resistencia que presentan

ambos plásmidos es para kanamicina (Imagen1A). Para la clonación del promotor de *cyba* se utilizó vector pmCherry-1 (Life technologies), que contiene el gen de la proteína fluorescente Cherry, este vector carece de promotor por lo que se ligó el promotor de *cyba* (Imagen1B).

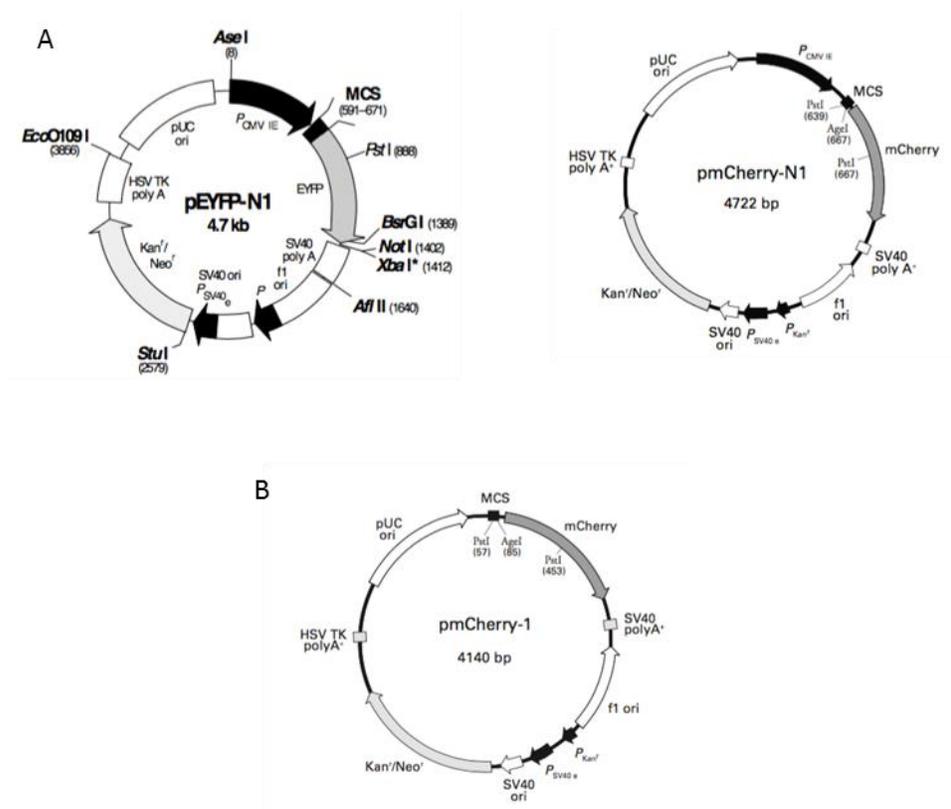


Imagen 1. Vectores plasmídicos. Vectores utilizados para la creación de proteínas quiméricas (A). Vector utilizado para el estudio del promotor de *cyba* (B).

8.3. Análisis *in silico*

Para determinar de manera putativa las interacciones de p22^{phox} con otras proteínas se utilizó el software STRING v10 (<http://string-db.org>). Para la identificación de los factores de transcripción (TFs) que se unen al promotor de *cyba* (2000 pares de bases río arriba del inicio de la transcripción) se empleó la plataforma JASPAR (<http://jaspar.genereg.net>).

8.4. Cultivo primario de hepatocitos de ratón

Los ratones de la cepa C57BL/6, se mantuvieron bajo condiciones libres de patógenos y bajo cuidados específicos de acuerdo al manual de procedimientos de la Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa y la guía de cuidados y uso de animales de laboratorio establecido por el NIH (Bethesda, USA).

Para la obtención de hepatocitos de ratón se usó la técnica de doble perfusión con colagenasa. Se usaron ratones macho de 8 a 12 semanas de edad. Los ratones se anestesiaron intraperitonealmente con 0.7 ml de tribromoetanol (Avertina). La superficie abdominal se limpió con etanol al 70% y se realizó una incisión en el abdomen y tórax para dejar expuesto el hígado y corazón. La vena cava inferior se anudó con hilo de sutura; por la aurícula derecha del corazón se introdujo un catéter Abbocath 22G que esta acoplado a un equipo de perfusión y se cortó la vena porta para abrir la circulación. Como primer paso, el hígado se perfundió con aproximadamente 30 ml de amortiguador HBSS libre de Ca^{2+} y Mg^{2+} a una temperatura de 37°C. En el segundo paso de la perfusión se utilizó 50 ml de colagenasa tipo I al 0.05% en medio Williams con NaHCO_3 25 mM amortiguado con HEPES 10 mM, pH 7.4 a una temperatura de 37° C. Después el hígado se removió y se colocó en una caja Petri de 10 cm de diámetro con 50 ml de medio Williams frío suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 10%, antibiótico y antimicótico (medio de adhesión). El hígado se disgregó utilizando 2 pipetas estériles de 1 ml y se obtuvo una solución con células hepáticas dispersas que se pasaron por un filtro con poros de 100 μm de tamaño. La solución filtrada se centrifugó a 45 g durante 5 minutos a 4°C. Se eliminó el sobrenadante y el botón

celular se resuspendió en 25 ml de medio de adhesión frío para posteriormente mezclarse suavemente con una solución de Percoll con solución Hanks 10X, se centrifugó a 170xg durante 15 minutos a 4°C para obtener un pellet compuesto de hepatocitos viables. Se eliminó el sobrenadante y las células se resuspendieron en 20 ml de medio de adhesión frío. Para determinar la viabilidad se realizó un conteo con azul de tripano en un contador automático Vi- Cell (Beckman Coulter). La viabilidad celular debe ser superior al 95%. Las células viables se sembraron a una densidad de 254,000 células/cm² y se mantuvieron en incubación por 4 h a 37°C en una atmósfera de CO₂ al 5%. Posteriormente se cambió el medio a uno sin suero y se dejó el cultivo toda la noche, al día siguiente se cambió el medio por uno fresco y se procedió a los tratamientos con 50 ng/ml de HGF a diferentes tiempos (0, 0.5, 1, 3, 6, 12 y 24 h), para la inhibición del proteosoma se utilizó 200 nM de epoxomicina 30 min antes del tratamiento con HGF y para inhibir a PI3K se hizo pretratamiento con Wortmanina a una concentración de 2 mM 1 h antes del tratamiento con HGF.

8.5. Extracción de proteínas

Posterior al tiempo del tratamiento, las células se lavaron con PBS frío y se agregaron 100 µl de una solución de lisis RIPA, que contiene una mezcla de inhibidores de proteasas y fosfatasa (Roche), las células se despegaron usando un gendarme de goma, la suspensión celular se centrifugó a 17000 g durante 10 min a 4°C, se recuperó el sobrenadante para hacer el análisis de proteínas (6).

8.6. Análisis de proteínas por Inmunoblot

70µg de proteína se separaron por electroforesis en geles de poliacrilamida al 10%

en presencia de SDS al 0.1%, usando un voltaje de 150 V durante 60 min. Posteriormente la proteína se transfirió a una membrana de PVDF durante 30 min a 120 V. La membrana se boqueó con leche descremada al 5% en TBS-Tween durante 1 h en agitación constante. Para la detección de la proteína, la membrana se incubó con anticuerpos específicos (mostrados en el cuadro 1) durante toda la noche en agitación constante a 4°C. Transcurrido el tiempo se lavó 2 veces con TBS- Tween por 15 min y se incubó con el anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano, diluido en una solución de albúmina en TBS-Tween por 90 min. Después se lavó 2 veces por 10 min con TBS-Tween y 1 vez por 5 min con TBS. Se reveló con 1ml de sustrato luminiscente (SuperSignal® West Pico Substrate, Pierce), las bandas se cuantificaron por densitometría usando el fotodocumentador Gel logic 1500 (Kodak) (6).

Anticuerpo	KDa	Compañía	No. Catalogo
c-Met	145	R&D	74225
p22 ^{phox}	22	Abcam	Ab-20781
P65	65	Santa Cruz	sc-372
PPAR-γ	54	Santa Cruz	sc-7273
p-AKT ser 473	60	Cell Signalling	9271

Cuadro 1. Lista de anticuerpos.

8.7. qRT-PCR

El ARN total se extrajo de las células tratadas con HGF, usando el reactivo de Trizol (Invitrogen). El ARN aislado fue tratado con DNasa (RQ1 RNase-Free DNase) para evitar la contaminación con ADN genómico. La amplificación de RT-PCR de un solo paso se llevó a cabo con el PCR cycler Rotor-Gene Q system (Qiagen, Australia). El RT-PCR en tiempo real se llevó a cabo usando Rotor-Gene

SYBR Green RT-PCR Kit (Qiagen) con 300 nM de oligonucleótidos sentido y antisentido y 250 ng/μl de ARN para un volumen final de 10 μl por reacción. Las condiciones del qRT-PCR fueron las siguientes: 10 min a 55°C y 5 min a 95°C, seguido por 40 ciclos de PCR por 5 seg a 95°C para la desnaturalización, 10 segundos a 60°C para la alineación de los primers (mostrados en el cuadro 2) y extensión. Los resultados fueron expresados en relación con el gen housekeeping (o de referencia). La cuantificación relativa se realizó usando el software Relative Expression Software Tool 2008.

Primer	Secuencia	Tm°C
Nox 1	F ACAGAGGAGAGCTTGGGTGAAAGC R ACTCCAGGAAGGAAATGGAGGG	66°C
Nox 2	F CGGTTGGCTGGGATCACAGG R GTGATGACCACCTTTTGCTGAGATCG	69°C
Nox 4	F AGCAAGATACCAGAATGAGGATCCC R GAAAACCCTCGAGGCAAAGATCC	66°C
Duox 1	F TTTCTCTAGCCGACAAGGATGG R AATCGGAGATCACTGTCGTGG	63°C
Duox 2	F CGAAGGAAGGTTTCAGACAGCTCTCC R CACCCAGGAGTAGTTCCAAGTGGG	68°C
p22 ^{phox}	F AAAGAGGAAAAAGGGGTCCACC R CTCCTCTCACCCCTCACTCGG	62°C
p40 ^{phox}	F AGAGGCCTTGTTGACTTCACTGGG R GAGTCCCACATCCTCATCTGACAGC	68°C
p47 ^{phox}	F CCAAAGATGGCAAGAATAACG R TGTCTGGGGAGGTTTCTTCC	62°C
p67 ^{phox}	F GATTTGCTTCAACATAGGCTGCG R TCATGTTGGTTGCCATGCC	65°C
18S	F TGTGGTGTGAGGAAAGCAG R TCCATCCTTCACATCCTTC	62°C

Cuadro 2. Secuencia de oligonucleótidos empleados para la amplificación de las subunidades de la NADPH oxidasa.

8.8. Determinación de la producción de radical superóxido por medio de la oxidación de dihidro de etidio (DHE).

Se sembraron 254,000 células/cm² en una placa de 12 pozos donde se trato o no con HGF (50ng/ml) a las células o con TGF-β (10ng/ml). Pasado el tiempo de tratamiento del HGF o TGF-β se adicionó el DHE y se dejó incubando 15 min. Finalmente las células se examinaron usando el microscopio confocal Carl Zeiss LSM 780 NLO (Carl Zeiss, Inc., USA).

8.9. Amplificación del promotor de *cyba*.

Para la amplificación de las diferentes partes del promotor de *cyba* se utilizaron los siguientes oligonucleótidos (cuadro 3) los cuales tienen acopladas secuencias de corte para enzimas de restricción (*HindIII* en los oligos forward y *EcoRI* en los oligos reverse), y esto se llevó a cabo bajo las condiciones estándar (establecidas por el fabricante) de la DNA polimerasa *Vent* (BioLabs). Finalmente las células se examinaron usando el microscopio confocal Carl Zeiss LSM 780 NLO (Carl Zeiss, Inc., USA) para posteriormente cuantificar la fluorescencia que fue proporcional a la expresión del gen *cyba*.

Primer	Sequence	Tm °C	%G C	Length
Oligo A	ATATCAAGCTTGAAGGCCGCGCTGGCGGT	71°C	59 %	29
Oligo B	ATATCAAGCTTGAATGGAACCCAGGCAGC	71°C	52 %	31
Oligo C	ATATCAAGCTTCAGACAGCTGCTCATCAGGG A	71°C	47 %	32
Oligo D	ATATCAAGCTTACAGCTGCTGGAGCTGGTCT	71°C	48 %	31
Oligo B- REV	ATATGAATTCGCTGCCTGGGGTTCCATTCC	71°C	50 %	30
Oligo C- REV	ATATGAATTCCTCCTGATGAGCAGCTGTCTG	71°C	45 %	31
Oligo D- REV	ATATGAATTCAGACCAGCTCCAGCAGCTGT	71°C	47 %	30
Oligo E- REV	ATATGAATTCGACGAGGACCCTGCGCACAC	71°C	53 %	30
X	ATATCAAGCTTTGAGTATTTGCCTGCGTGAA T	71°C	36 %	33
Z-REV	ATATGAATTCACCGCCAGCGCGGCCTTC	71°C	57 %	29

Cuadro 3. Secuencia de oligonucleótidos empleados para la amplificación de las diferentes regiones del promotor de *cyba* en rojo sitio de corte para las enzimas de restricción.

8.10. Construcción de proteínas quiméricas para la interacción.

El vector pmCherry-N1 (Life technologies) y el vector peYFP-N1 (proporcionado

por el Dr. Luis Vaca Domínguez, IFC, UNAM, contienen a los genes reporteros mCherry y eYFP respectivamente. Para la amplificación de las secuencias codificantes de p22^{phox} y c-Met se utilizaron oligonucleótidos que tienen acopladas secuencias de corte para enzimas de restricción (*HindIII* en los oligos forward y *EcoRI* en los oligos reverse) que se muestran en el cuadro 4, esto se llevó a cabo bajo las condiciones estándar (establecidas por el fabricante) de la DNA polimerasa *Vent*. Finalmente las células se examinaron usando el microscopio confocal Carl Zeiss LSM 780 NLO (Carl Zeiss, Inc., USA) para posteriormente cuantificar la fluorescencia.

Primer	Secuencia	Tm°C
c-Met F	TCTCGAGATGAAGGCTGGGACC	71°C
c-Met R	AGGGGAACACATGATTCGAACGC	71°C
p22 F	TACTCGAATGGGGCAGATCGAGTG	71°C
p22 R	GACAGATGAGGTCGTGTGAGAATTCAA	71°C

Cuadro 4. Secuencia de oligonucleótidos empleados para la amplificación de c-Met y p22^{phox}.

8.11. Transformación.

Se tomó un vial con 100 µl de células *E. coli* ultracompetentes y se mezcló con 1 µl de vector o en su caso 10 µl de la mezcla de ligación. Las condiciones de transformación por choque térmico de *E. coli* de la cepa STABLE fueron las siguientes. La mezcla se incubó durante 30 min a 4°C y 2 min a 42°C. Posteriormente, las células se incubaron durante 1h a 38°C a 150 rpm. Después se sembraron en placas de LB suplementadas con Ampicilina (100 ug/ml) durante toda la noche a 37°C.

La reacción se incubó 30 min a 4°C y 2 min a 42°C. Posterior a esto se incubó la mezcla durante 1 h a 38°C con agitación en 1 ml de medio LB líquido. Una vez pasada la hora se sembró en medio LB y se incubó toda la noche a 37°C. Esto para la producción del vector.

8.12. Lisis Alcalina: Técnica para obtener ADN plasmídico.

Se hicieron cultivos de *E. coli* durante 16 h. Se centrifugaron 1.5 ml (trata de poner concentraciones o numero de bacterias, los volúmenes no son muy descriptivos) de cultivo durante 2 min a 12,000 x g. Se desechó el sobrenadante y el pellet se resuspendió con ayuda de un palillo y agitación con vortex en 200 ul de SOLUCIÓN 1 hasta la homogeneidad. Se le adicionó 200ul de SOLUCIÓN 2 y se mezcló por inversión de 3 a 5 min o hasta que el lisado quedo claro. Se agregó 200ul de SOLUCIÓN 3, se mezcló por inversión y se dejó reposar en hielo durante 5 min. Se adicionaron 300ul de cloroformo, se mezcló por inversión y se centrifugó 10 min a 12,000 x g para bajar los restos celulares y cromosomas. El sobrenadante se transfirió a otro tubo, se adiciono 2 volúmenes de etanol absoluto, mezclando por inversión y se dejó a temperatura ambiente durante 5 min, enseguida se centrifugó durante 10 min para bajar el ADN. El sobrenadante se desechó y se le agregó 1 volumen de etanol al 70%. Se centrifugó durante 3 min a 12,000 x g y se desechó el sobrenadante. El pellet de ADN se secó a temperatura ambiente y se resuspendió en 30ul de agua libre de nucleasas (grado biología molecular).

Soluciones:

- Solución 1 (100 ml):
 - 10 mM EDTA pH 8.0
 - 50 mM glucosa
 - 25 mM Tris-HCl pH 8.0

- Solución 2 (500 ul):
 - 400 ul de H₂O
 - 50 ul de SDS 10%
 - 50 ul de NaOH 2N (2M)

- Solución 3:
 - 60 ml de acetato de potasio 5 M
 - 11.5 ml de ácido acético glacial
 - 28.5 ml de H₂O
 - mantener en frío

8.13. Transfección

Los plásmidos se transfectaron usando Lipofectamina 2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA) y Amaxa Nucleofector kit, siguiendo las instrucciones del fabricante. Para la visualización de las proteínas reporteras (mCherry y YFP) en el microscopio confocal Carl Zeiss LSM 780 NLO (Carl Zeiss, Inc., USA) se utilizaron 100 ng de plásmido.

8.14. Inmunofluorescencia

Los hepatocitos se sembraron en cámaras Lab-Tek de vidrio tratadas con

colágena, posterior al tratamiento con HGF las células se fijaron con formalina neutra al 10% en PBS durante 10 min a temperatura ambiente y se bloquearon con una solución de albúmina de suero bovino (BSA) al 5% y Triton X-100 al 3% durante 30 min. Posteriormente las células se lavaron con PBS-tween durante 5 min. El anticuerpo específico para p22^{phox}, diluido 1:50 en PBS que con 0.1% de BSA se agregó a las células fijadas y se incubó toda la noche a 4°C en una cámara húmeda. Las células se lavaron con PBS-Tween por 5 min y seguido a esto se incubaron con el anticuerpo secundario correspondiente conjugado con Alexa durante 1 h a temperatura ambiente en oscuridad. Se lavaron las células nuevamente con PBS-Tween y se incubó con DAPI por 5 min. Finalmente las células se examinaron usando el microscopio confocal Carl Zeiss LSM 780 NLO (Carl Zeiss, Inc., USA).

8.15. Cuantificación de proteína

La proteína se cuantificó colorimétricamente utilizando el estuche comercial del ácido bicínico (BCA) (Pierce, USA), se seguirán las instrucciones del fabricante. Esto para realizar el ensayo de Inmunoblot y la inmunoprecipitación.

8.16. Análisis estadístico

Cada experimento se realizó al menos por triplicado usando células de mínimo 3 animales de experimentación y tres pasajes diferentes de línea celular. Los datos son reportados como el promedio error estándar (EE). Para la comparación de medias de diferentes grupos se utilizaron un análisis de varianza (ANOVA), seguido de comparaciones múltiples por la prueba de Tukey. Se empleó el

programa Prism 6. El nivel de significancia utilizado fue de $p \leq 0.05$.

9. RESULTADOS

9.1. Características de $p22^{phox}$

El primer objetivo fue realizar un ensayo *in silico* de la proteína reguladora de la NADPH oxidasa, $p22^{phox}$. En donde el primer punto fue identificar las regiones y características más importantes de $p22^{phox}$ (Figura 1).

Características Generales

Sequence length	192 aa
Molecular weight	20.7483 kD

Características de Secuencia

Feature key	Position(s)	Length	Description
Regions			
Intramembrane	91 – 127	37	
Sites			
Metal binding	94	1	Iron (heme axial ligand)
Amino acid modifications			
Modified residue	147	1	Phosphothreonine
Modified residue	168	1	Phosphoserine
Modified residue	176	1	Phosphoserine

Motivos

Src homology 3 group (SH3)				
Amphiphysin SH3			Gene Card AMPH	
Site	Score	Percentile	Sequence	SA
P152	0.4679	0.091 %	GGTIKQPPTNPPRP	3.536
Basophilic serine/threonine kinase group (Baso_ST_kin)				
PKC delta			Gene Card PRKCD	
Site	Score	Percentile	Sequence	SA
T64	0.3726	0.075 %	GKRKKGSTMERCQK	1.472
PKC alpha/beta/gamma			Gene Card PRKCA	
Site	Score	Percentile	Sequence	SA
T64	0.3843	0.131 %	GKRKKGSTMERCQK	1.472
PKC zeta			Gene Card PRKCZ	
Site	Score	Percentile	Sequence	SA
S63	0.4747	0.199 %	RGKRKKGSTMERCQK	1.503

Figura 1. Características y motivos proteicos de la subunidad reguladora de la NADPH oxidasa, $p22^{phox}$.

9.3. Subunidades expresadas en el hepatocito de ratón.

Se analizó la expresión de los diferentes miembros de la familia de las Nox presentes en el cultivo primario de hepatocitos de ratón no tratados mediante la RT-PCR, donde se encontró que se expresan Nox1, Nox2, Nox4, Duox1/2, y las subunidades reguladoras tales como p22^{phox}, p67^{phox}, p47^{phox} y p40^{phox} (Figura 3).

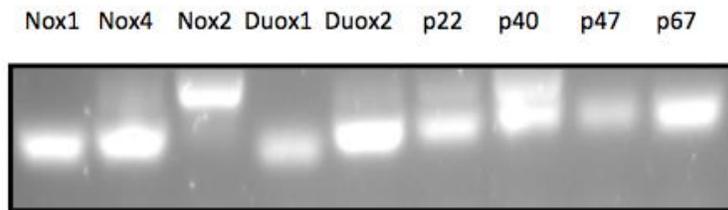


Figura 3. Subunidades catalíticas y reguladoras de las NADPH oxidasa expresadas en el hepatocito de ratón. Las imágenes son representativas de al menos 3 experimentos independientes.

9.4. Expresión de p22^{phox} en hepatocitos de ratón tratados con HGF.

La expresión de p22^{phox} se ve alterada bajo un estímulo de HGF. Se analizó si el HGF regula la actividad de p22^{phox} interviniendo en la expresión del mRNA. Los hepatocitos fueron tratados o no con HGF (50 ng/ml) a diferentes tiempos y después de extraer el mRNA se hizo RT-PCR con los primers utilizados se muestran en el cuadro 2 (Figura 4).

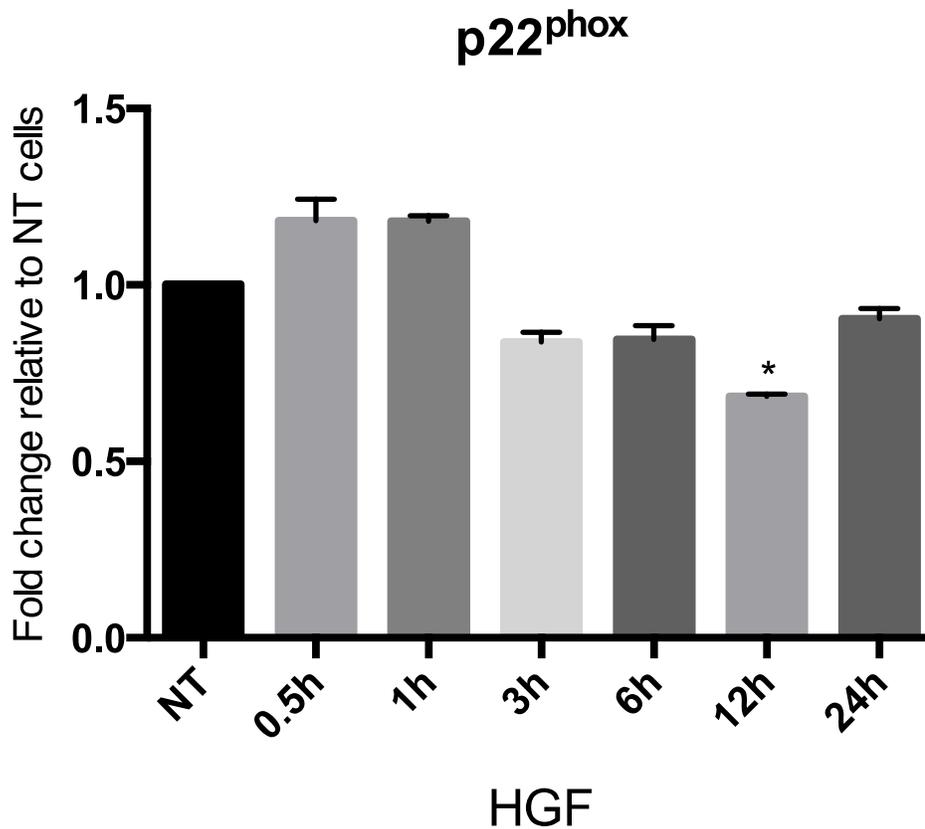


Figura 4. Expresión de p22^{phox} en hepatocitos de ratón tratados o no con HGF (50ng/ml). Los puntos graficados muestran el promedio + EE de al menos 3 experimentos independientes. * p ≤ 0.05 vs células no tratadas al tiempo 0.

9.5. Análisis *in silico* del promotor de *cyba* (p22^{phox}).

Con el fin de investigar el mecanismo probable por el cual el HGF puede regular a p22^{phox} a nivel transcripcional se utilizó una plataforma bioinformática llamada JASPAR, el cual nos permitió analizar la región promotora de *cyba*, el análisis de la región promotora nos mostró la presencia de elementos reguladores putativos para TFs (Figura 5).

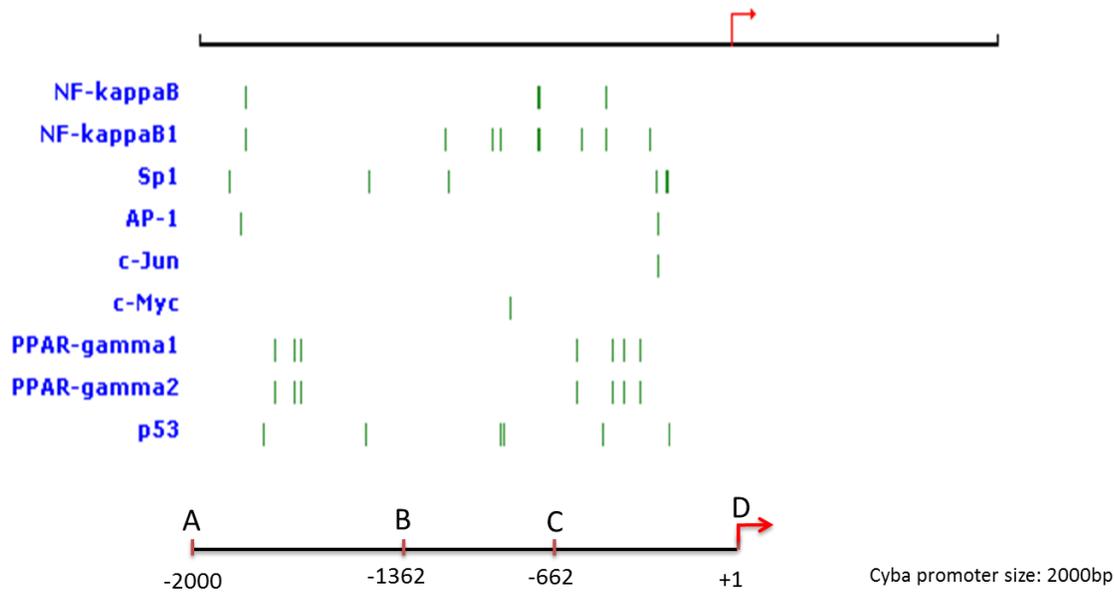


Figura 5. Resultados JASPAR, los cuales nos muestran a TFS que tienen afinidad a la secuencia promotora de *cyba* con una probabilidad del 99%. Mathelier, A., Zhao, X., and Wasserman, W. W. JASPAR 2014: an extensively expanded and updated open-access database of transcription factor binding profiles. *Nucleic Acids Research*, 2013 <http://jaspar.genereg.net>

9.6. Actividad promotora basal.

Mediante la inserción de la región promotora de *cyba* en el vector pmCherry-1 que es carente de promotor y que presenta un gen reportero el cual es la proteína mCherry, se logró la transfección en cultivo primario de hepatocitos de ratón. Y se logró observar que la región más relevante en términos de regulación es la región que va desde -662/-1938 (Figura 6).

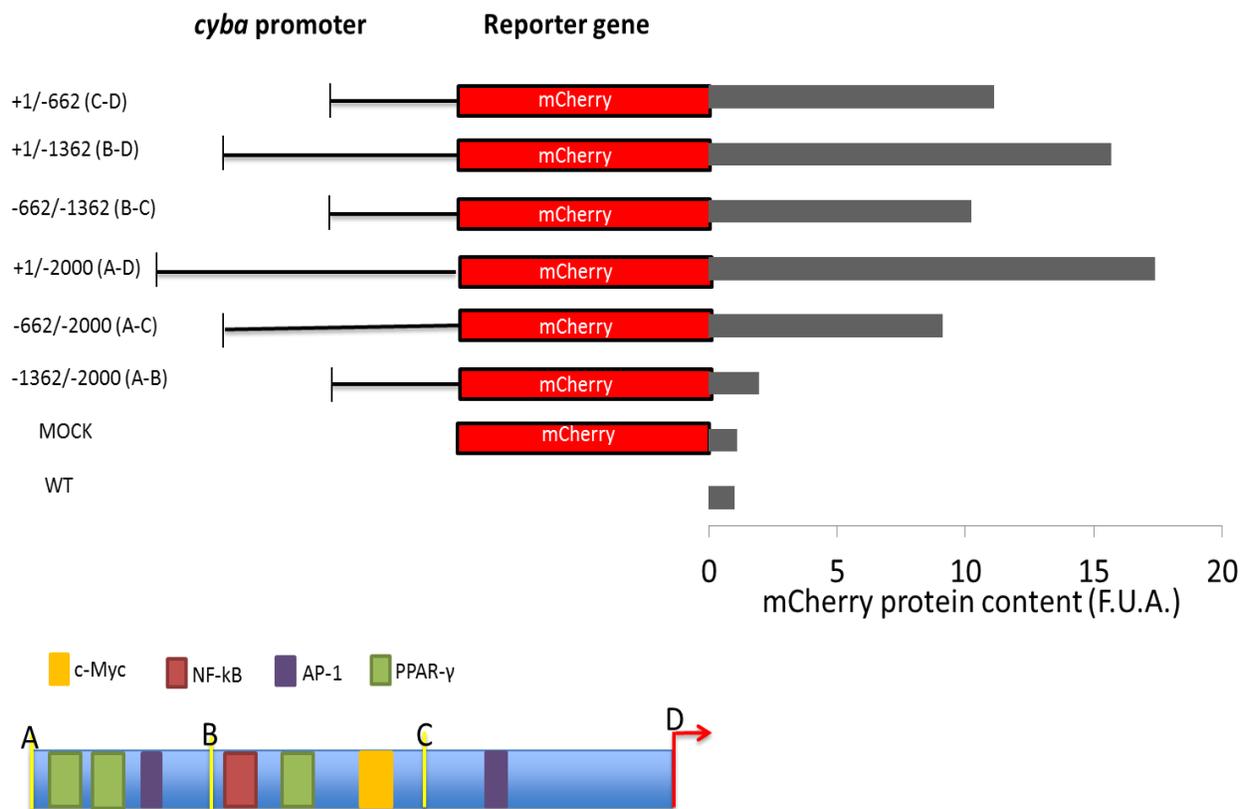


Figura 6. Hepatocitos transfectados con el vector pmCherry-1 el cual contiene diferentes regiones del promotor de *cyba* 100ng de DNA por cada construcción.

9.7. Factores de transcripción involucrados en la regulación

transcripcional de $p22^{phox}$.

El contenido proteico de los posibles factores de transcripción involucrados en la regulación transcripcional de $p22^{phox}$ se midió mediante Western Blot a diferentes tiempos de tratamiento con HGF. Por un lado tenemos que el contenido de p65

fue incrementando de manera tiempo dependiente. Y el contenido proteico de PPAR- γ tuvo diferentes fluctuaciones en los diferentes tiempos (Figura 7).

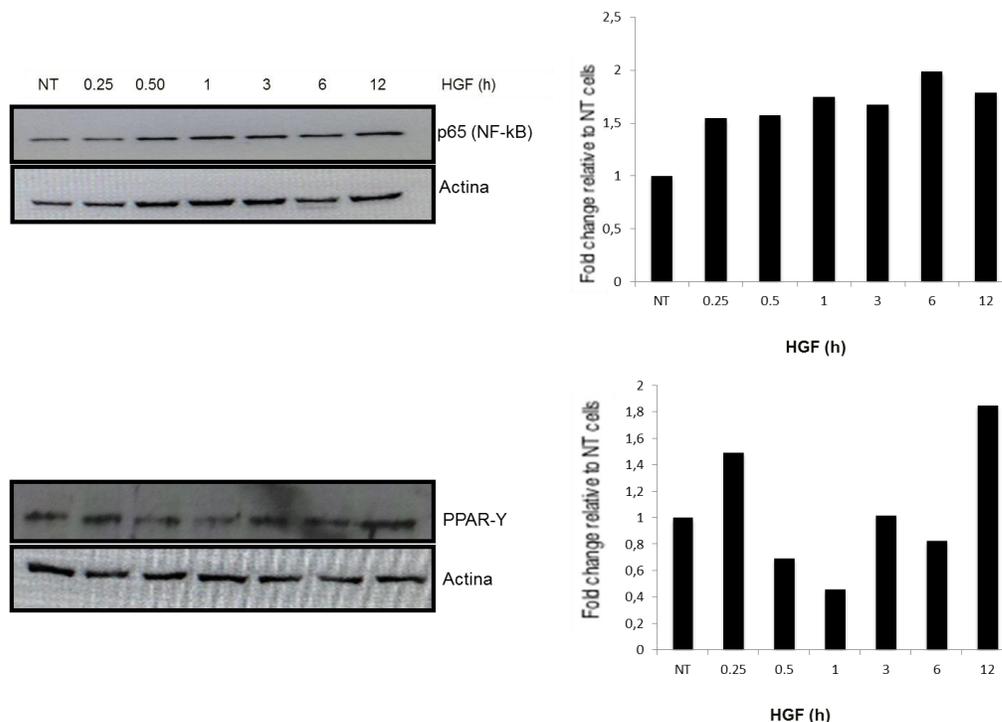


Figura 7. Contenido proteico de p65 y PPAR-gamma en hepatocitos de ratón tratados o no con HGF (50ng/ml).

9.8. Contenido proteico de p22^{phox} en hepatocitos de ratón tratados con HGF.

El contenido proteico de p22^{phox} tratados con HGF se ve modificado a la baja en tiempos largos (12 h). Esto se demuestra mediante Western blot como por una inmunofluorescencia de p22^{phox} (Figura 8).

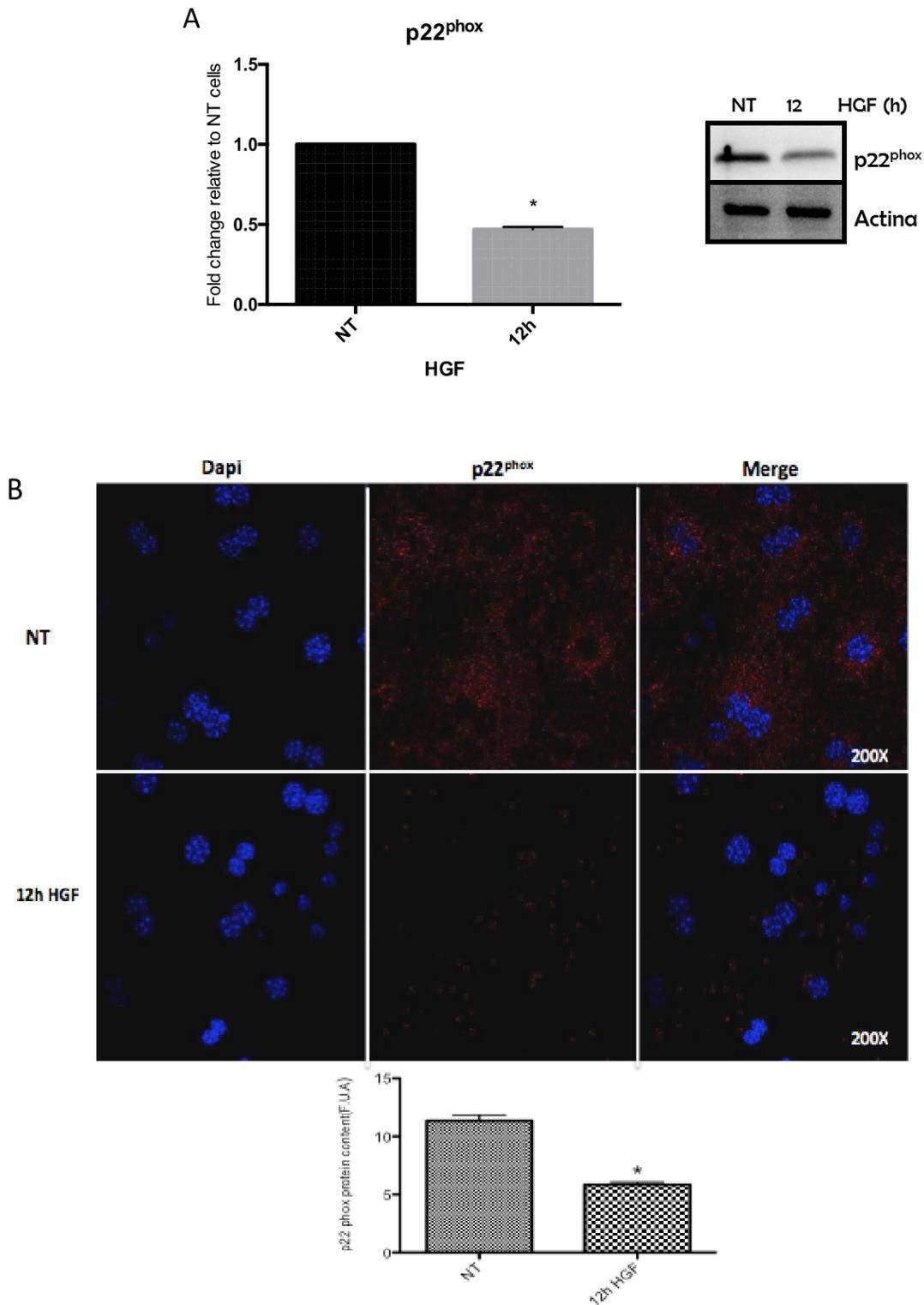


Figura 8. Contenido proteico de p22^{phox} en hepatocitos de ratón tratados o no con HGF (50ng/ml). (A) se muestra mediante Western blot el contenido proteico de p22^{phox}. (B) Inmunofluorescencia de p22^{phox} (rojo) y núcleos (azul). Los puntos graficados muestran el promedio + EE de al menos 3 experimentos independientes. * $p \leq 0.05$ vs células no tratadas al tiempo 0.

9.9. Producción de anión superóxido

El HGF como anteriormente reportó nuestro grupo de trabajo (20) regula la producción de especies reactivas de oxígeno, por lo cual mediante microscopia confocal se observó la producción de EROs en hepatocitos de ratón cuando son tratados con HGF, en el cual se muestra una disminución de estas especies cuando las células son tratadas durante 12 h con HGF (Figura 9).

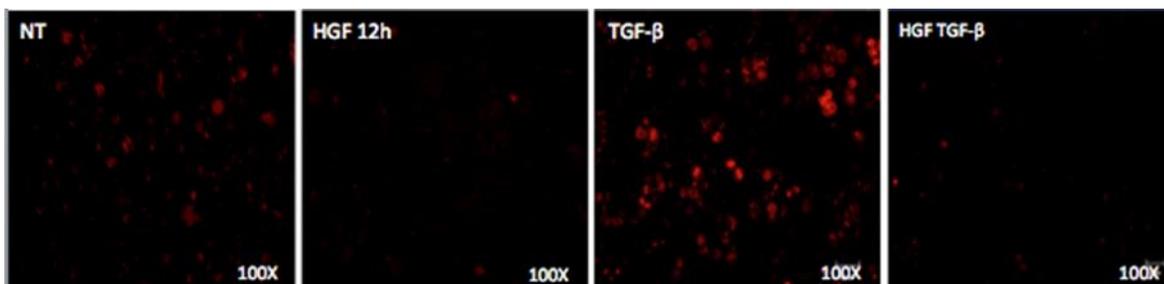
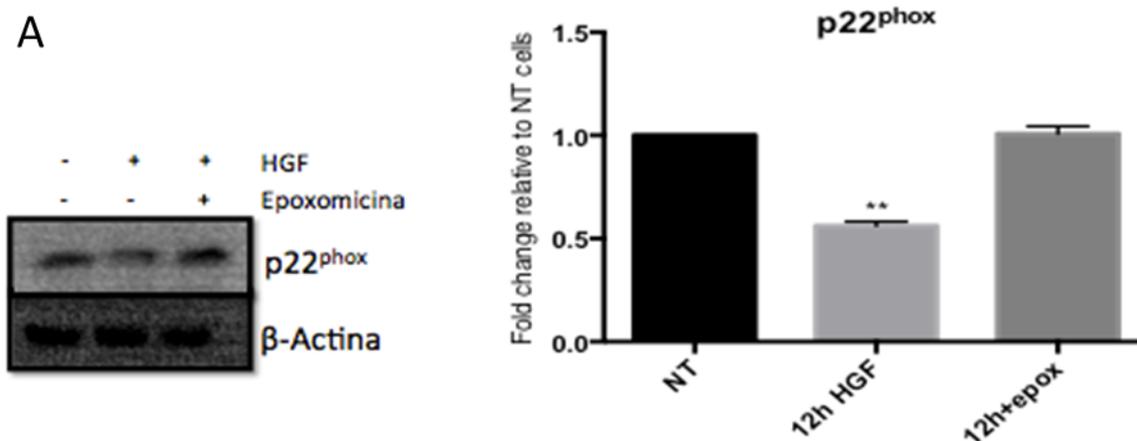


Figura 9. Producción de especies reactivas de oxígeno, las células fueron tratadas o no con HGF (50ng/ml) y como control positivo se utilizó TGF-beta (10ng/ml). Las imágenes son representativas de al menos 3 experimentos independientes.

9.10. Control post-traducional de c-Met sobre p22^{phox}.

Para dilucidar el mecanismo por el cual el contenido proteico de p22^{phox} disminuye después del tratamiento con HGF, se inhibió al proteosoma con epoxomicina

media hora antes del tratamiento de 12 h con HGF y posterior a esto se determinó el contenido proteico. Los datos muestran que el contenido proteico de p22^{phox} no disminuyó lo que sugiere que este mecanismo es mediado por el sistema de proteosoma (Figura 10A). Para confirmar este dato se realizó una inmunofluorescencia en la que se observó el mismo efecto (Figura 10B). Para lograr identificar la cascada de señalización ejercida por c-Met para la degradación de p22^{phox} nosotros proponemos a Mdm2 como la posible ubiquitin ligasa E3 (23), utilizamos un inhibidor de PI3K (Wortmanina), para así poder evitar la activación de Akt, ya que Akt es la responsable en activar esta ligasa E3 (Figura 10C).



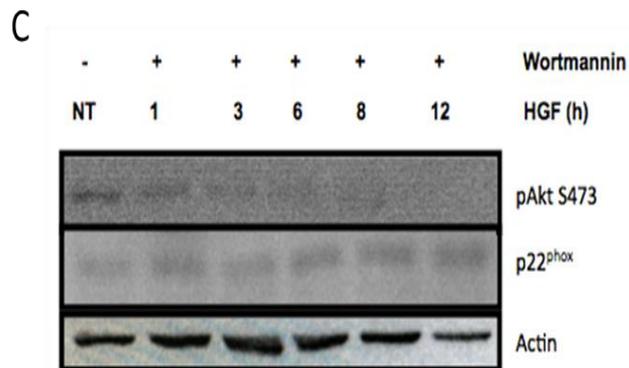
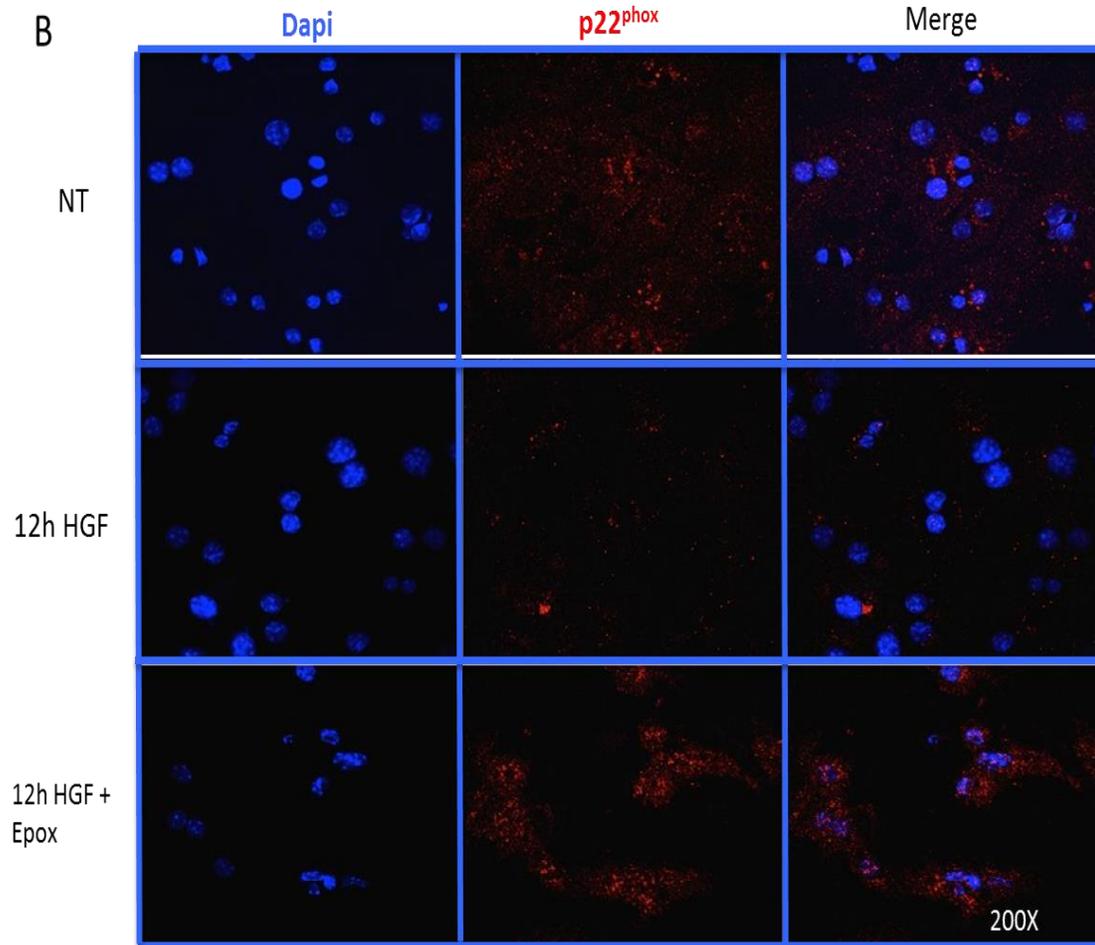


Figura 10. Regulación post- traduccional ejercida por HGF mediante degradación vía proteosoma. Hepatocitos de ratón tratados o no con HGF (50ng/ml). (A) se muestra mediante Western blot el contenido proteico de p22^{phox} en presencia de epoxomicina (200ng/ml). (B) Inmunofluorescencia de p22^{phox} (rojo) y núcleos (azul). (C) Western blot en donde se muestra mediante la Wormanina (2nm) el contenido proteico de p22^{phox}. Los puntos graficados muestran el promedio + EE de al menos 3 experimentos independientes. * p ≤ 0.05 vs células no tratadas al tiempo 0.

9.11. Interacción entre c-Met/ p22^{phox}.

Para reafirmar la amplia regulación que tiene c-Met sobre p22^{phox} no solo a nivel transcripcional sino también de manera directa a nivel de proteína se realizó una inmunoprecipitación en la cual las células fueron tratadas o no con HGF durante 15, 30 y 60 min (Tesis Doctoral Clavijo-Cornejo). Los resultados muestran que hay una interacción entre c-Met y p22^{phox} en los hepatocitos de ratón. Con el fin de confirmar este resultado se realizó una co-localización mediante microscopia confocal se visualizará dicha interacción. Para ello se realizaron diferentes construcciones en las cuales se insertaron tanto a c-Met como a p22^{phox}, estos insertos están acoplados a genes reporteros (Proteína mCherry y proteína fluorescente amarilla respectivamente). Estas construcciones en un primer ensayo, se transfectaron en la línea celular Hepa 1-6 para corroborar su expresión (Figura 11) y el resultado muestra que existe una co-localización de p22^{phox} y c-Met, esto por la presencia de zonas naranjas justo en la membrana donde es característico se exprese c-Met y p22^{phox}.

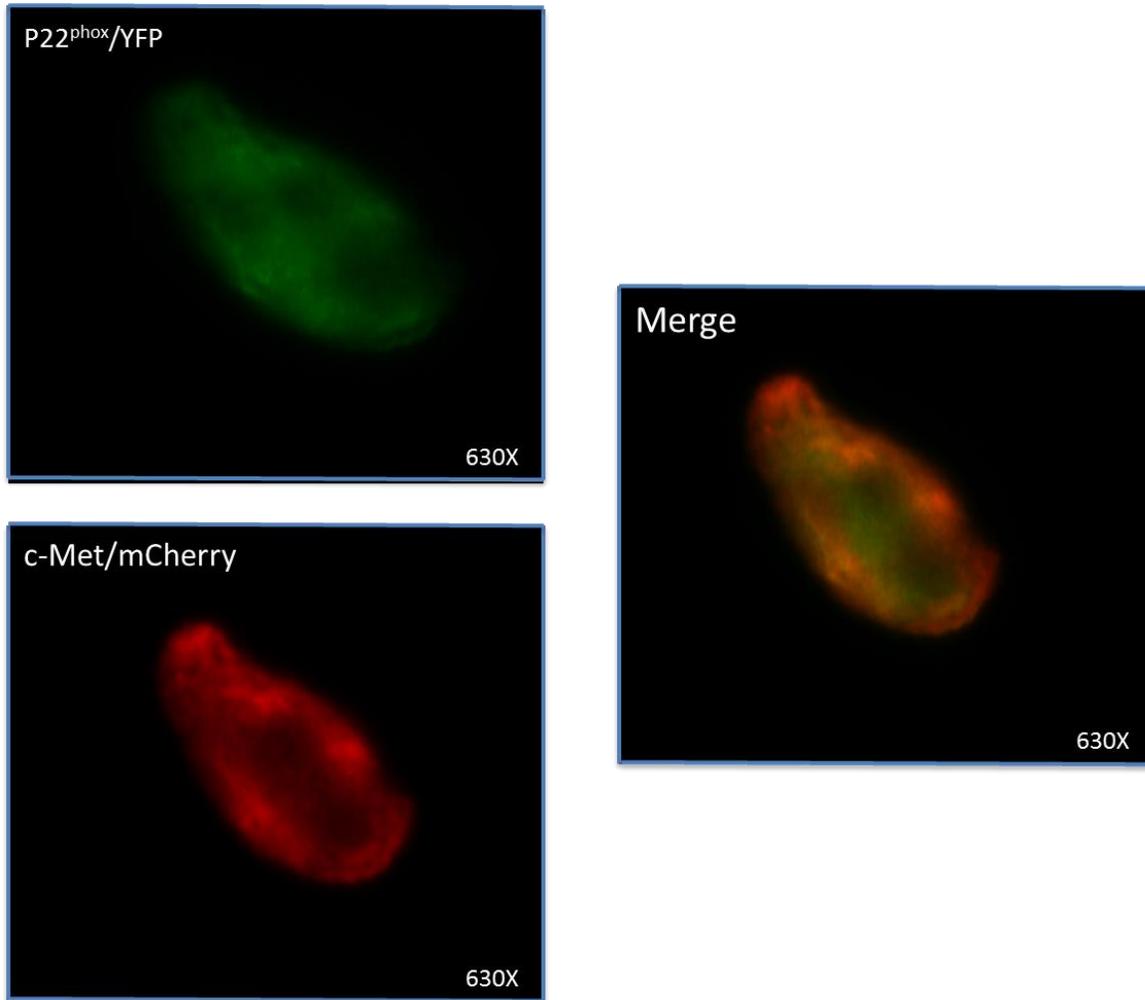


Figura 11. Interacción entre el receptor c-Met y la proteína p22^{phox}. Células Hepa1-6 transfectadas con diferentes vectores pmCherry/Met y peYFP/p22^{phox}. Las imágenes son representativas de al menos 3 experimentos independientes.

10. DISCUSIÓN

Como ya se ha reportado por nuestro grupo de trabajo que HGF/c-Met genera una íntima regulación sobre la producción de EROs generadas por la NADPH oxidasa con fines de señalización celular y no como una respuesta citotóxica como es el caso del TGF- β (22), en el presente trabajo nos enfocamos en el mecanismo de regulación que ejerce a nivel transcripcional el HGF y su receptor c-Met sobre p22^{phox}, la cual es una de las subunidades que está presente a lo largo de la familia de la NADPH oxidasa, este miembro no se ha estudiado con profundidad es por eso que se realizó un ensayo *in silico* de dicha subunidad, este ensayo se realizó tanto a nivel génico como proteico, este análisis nos arrojó datos confirmatorios, los cuales fueron reportados anteriormente por nuestro grupo de trabajo (22), los cuales demuestran que la familia de la proteína cinasa C (PKC) es la principal involucrada en la activación de la NADPH oxidasa, y como características de las regiones tanto membranales como citoplasmáticas de p22^{phox} (Figura 1). Por otro lado mediante el uso del software STRING v10 se obtuvieron las interacciones con otras proteínas más relevantes que interactúan con p22^{phox} (24), tales como Nox1, Nox2, p67^{phox}, p47^{phox} entre otras (Figura 2). Para el análisis a nivel genético se utilizó el software JASPAR el cual nos muestra diferentes sitios de unión a factores de transcripción en el promotor de *cyba* (gen de p22^{phox}), el cual interesantemente nos muestra algunos factores de transcripción regulados por HGF/c-Met, tales como NF-kB y PPAR-gamma, lo que muestra la regulación ejercida por HGF/c-Met sobre p22^{phox} (25) (Figura 5).

Una vez obtenidos los resultados del análisis *in silico* procedimos a confirmar que subunidades de la NADPH oxidasa están expresadas en hepatocitos de ratón

mediante RT-PCR, el cual nos muestra que los hepatocitos cultivados expresaron cinco sitios homólogos catalíticos de los siete descritos hasta ahora Nox1, Nox2, Nox4, Duox1 y Duox2 además de las subunidades reguladoras p40^{phox}, p47^{phox}, p67^{phox} y p22^{phox} (Figura 3). Ya que p22^{phox} si esta expresada en hepatocitos de ratón se procedió a determinar su expresión en células tratadas con HGF a diferentes tiempos, en donde se observa una represión más marcada a las 12 h, para posteriormente regresar a niveles basales a las 24 horas, lo cual indica que HGF/c-Met tiene una regulación directa sobre la transcripción de esta subunidad (Figura 4).

Para confirmar el efecto del HGF sobre p22^{phox} realizamos una serie de inmunodetecciones (Western Blot y Inmunofluorescencia) empleando anticuerpos específicos, los cuales se enlistan en el cuadro 1. Los resultados muestran que efectivamente el HGF tiene una regulación no solo transcripcional sino post-transcripcional (Figura 8). Ya que se demostró tanto a nivel de expresión como de contenido proteico que el tiempo donde hay mayor represión de p22^{phox} es a las 12 h con HGF, tiempo en que se determinó la producción de ERO mediante la determinación de anión superóxido por medio de DHE. Este resultado nos muestra el efecto que tiene el HGF sobre el estado redox celular (Figura 9).

Retomando el efecto que tiene el HGF a nivel transcripcional, se realizaron diferentes vectores plasmídicos, los cuales tienen contenido diferentes fragmentos del promotor de *cyba* (p22^{phox}) (Figura 6), siendo el promotor completo el que presenta un tamaño de 1938 pares de bases (pb) a partir del inicio de la transcripción (+1), esto nos demuestra que la región menos afectada en la expresión de dicho gen reportero es la zona que va desde -662/-1938 con el cual

se identifica que esta región parece tener un papel muy importante en la regulación transcripcional de *cyba*.

Si bien hay una regulación transcripcional de *cyba* ejercida por c-Met, nos preguntamos que es lo que pasa con la proteína (p22^{phox}) basal de la célula, ya que como se demuestra en la figura 6 el contenido proteico de p22^{phox} también disminuye, por lo que se planteo inhibir al proteosoma 26S con el uso del reactivo epoxomicina el cual es un inhibidor específico de este complejo, este experimento nos arrojo datos de que c-Met también tiene un control a nivel post-transcripcional sobre esta subunidad de la NADPH oxidasa, esto se demostró tanto por Western Blot como por Inmunofluorescencia (Figura 10). Una vez observado este fenómeno la siguiente pregunta que nos planteamos es ¿Cual es el mecanismo para ejercer este control post-transcripcional? Esta reportado en la literatura que hay una Ubiquitin ligasa E3 (Mdm29 ampliamente regulada por HGF/c-Met a través de PI3K-Akt(23), es por eso que utilizamos un inhibidor específico de PI3K el cual es Wortmanina, con las células tratadas con HGF y Wortmanina se procedió a hacer un Western Blot para p22^{phox} y vimos como el contenido proteico no se vio alterado, lo que nos sugiere que el mecanismo de post-transcripcional puede ser mediado por la vía de señalización PI3K/AKT/Mdm2.

Si bien se ha identificado a p22^{phox} como una proteína adaptadora entre los componentes citoplasmáticos y catalíticos de la NADPH oxidasa, cada vez se tiene más evidencia del papel regulador de p22^{phox} (datos no publicados). Debido a que el primer punto de regulación que tiene HGF/c-Met sobre p22^{phox} es la interacción que tiene este con c-Met, como se observa en la inmunoprecipitación de p22^{phox}/c-Met (datos no publicados), lo cual sugiere que dicha interacción se pierde cuando se

trata a las células con HGF y por consiguiente vemos que a partir de los 30 min hay una mayor interacción con Nox2. Para confirmar este resultado se realizó la construcción de proteínas quiméricas (c-Met/mCherry y p22/eYFP), con las cuales se realizó una co-localización mediante microscopia de fluorescencia en donde podemos ver que el empalme de ambas emisiones se da en la membrana plasmática (Figura 11).

11. CONCLUSIÓN

Tomando en consideración los datos que presentamos en el trabajo de tesis, junto con los datos previamente publicados por nuestro grupo, nos permite proponer un mecanismo de regulación dual de la NADPH oxidasa por el HGF y su receptor c-Met.

El primer punto de regulación se da por un mecanismo que se muestra en la figura 11. En condiciones basales, c-Met se encuentra interactuando con p22^{phox}, evitando la sobreactivación de la NADPH oxidasa. Tras la unión de HGF con c-Met, p22^{phox} se libera permitiendo el ensamblaje de la oxidasa, que es además, promovido por la activación de PKC por la señalización de c-Met. La NADPH oxidasa, una vez activada, genera las EROs necesarias para la activación del factor de transcripción Nrf2, el cual promoverá la expresión de proteínas de supervivencia. El segundo mecanismo, está dirigido a la represión de la expresión p22^{phox}, que al parecer esta mediada por la represión que ejerce PPAR-gamma al secuestrar a NF-kB. Ésta represión permite disminuir los niveles de NADPH oxidasa generando un bloqueo en la actividad de esta oxidasa. Por otro lado, el HGF/c-Met también tiene un efecto sobre el contenido proteico de p22^{phox}, esto se debe a que el HGF/c-Met activa al proteosoma 26S para que p22^{phox} sea degradado y al parecer esta activación de proteosoma se da mediante el eje PI3K/AKT/Mdm2. En conclusión el presente trabajo reporta nuevos mecanismos de supervivencia ejercidos por el HGF, los cuales pueden ser considerados para el desarrollo de nuevas medidas terapéuticas en donde la sobreactivación de la

NADPH oxidasa sea la condicionante para el inicio o desarrollo de patologías, no solo hepáticas, sino de prácticamente cualquier órgano o sistema.

12. REFERENCIAS

1. Crawford AR, Lin XZ, Crawford JM. The normal adult human liver biopsy: a quantitative reference standard. *Hepatology*. 1998;28(2):323-31.
2. Nakamura T, Mizuno S, Matsumoto K, Sawa Y, Matsuda H, Nakamura T. Myocardial protection from ischemia/reperfusion injury by endogenous and exogenous HGF. *The Journal of clinical investigation*. 2000;106(12):1511-9.
3. Miyazawa K, Tsubouchi H, Naka D, Takahashi K, Okigaki M, Arakaki N, et al. Molecular cloning and sequence analysis of cDNA for human hepatocyte growth factor. *Biochemical and biophysical research communications*. 1989;163(2):967-73.
4. Fausto N, Campbell JS, Riehle KJ. Liver regeneration. *Hepatology*. 2006;43(2 Suppl 1):S45-53.
5. Matsumoto K, Nakamura T. Hepatocyte growth factor: renotropic role and potential therapeutics for renal diseases. *Kidney international*. 2001;59(6):2023-38.
6. Gomez-Quiroz LE, Factor VM, Kaposi-Novak P, Coulouarn C, Conner EA, Thorgeirsson SS. Hepatocyte-specific c-Met deletion disrupts redox homeostasis and sensitizes to Fas-mediated apoptosis. *The Journal of biological chemistry*. 2008;283(21):14581-9.
7. Deheuninck J, Goormachtigh G, Foveau B, Ji Z, Leroy C, Ancot F, et al. Phosphorylation of the MET receptor on juxtamembrane tyrosine residue 1001 inhibits its caspase-dependent cleavage. *Cellular signalling*. 2009;21(9):1455-63.
8. Foveau B, Ancot F, Leroy C, Petrelli A, Reiss K, Vingtdeux V, et al. Down-regulation of the met receptor tyrosine kinase by presenilin-dependent regulated intramembrane proteolysis. *Molecular biology of the cell*. 2009;20(9):2495-507.
9. Giordano S, Di Renzo MF, Narsimhan RP, Cooper CS, Rosa C, Comoglio PM. Biosynthesis of the protein encoded by the c-met proto-oncogene. *Oncogene*. 1989;4(11):1383-8.
10. Longati P, Bardelli A, Ponzetto C, Naldini L, Comoglio PM. Tyrosines1234-1235 are critical for activation of the tyrosine kinase encoded by the MET proto-oncogene (HGF receptor). *Oncogene*. 1994;9(1):49-57.
11. Bokoch GM, Knaus UG. NADPH oxidases: not just for leukocytes anymore! *Trends in biochemical sciences*. 2003;28(9):502-8.

12. Leto TL, Morand S, Hurt D, Ueyama T. Targeting and regulation of reactive oxygen species generation by Nox family NADPH oxidases. *Antioxidants & redox signaling*. 2009;11(10):2607-19.
13. Brown DI, Griending KK. Nox proteins in signal transduction. *Free radical biology & medicine*. 2009;47(9):1239-53.
14. Griffith B, Pendyala S, Hecker L, Lee PJ, Natarajan V, Thannickal VJ. NOX enzymes and pulmonary disease. *Antioxidants & redox signaling*. 2009;11(10):2505-16.
15. De Minicis S, Bataller R, Brenner DA. NADPH oxidase in the liver: defensive, offensive, or fibrogenic? *Gastroenterology*. 2006;131(1):272-5.
16. Boudreau HE, Emerson SU, Korzeniowska A, Jendrysik MA, Leto TL. Hepatitis C virus (HCV) proteins induce NADPH oxidase 4 expression in a transforming growth factor beta-dependent manner: a new contributor to HCV-induced oxidative stress. *Journal of virology*. 2009;83(24):12934-46.
17. de Mochel NS, Seronello S, Wang SH, Ito C, Zheng JX, Liang TJ, et al. Hepatocyte NAD(P)H oxidases as an endogenous source of reactive oxygen species during hepatitis C virus infection. *Hepatology*. 2010;52(1):47-59.
18. Kamata T. Roles of Nox1 and other Nox isoforms in cancer development. *Cancer science*. 2009;100(8):1382-8.
19. Bedard K, Krause KH. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiological reviews*. 2007;87(1):245-313.
20. Valdes-Arzate A, Luna A, Bucio L, Licona C, Clemens DL, Souza V, et al. Hepatocyte growth factor protects hepatocytes against oxidative injury induced by ethanol metabolism. *Free Radic Biol Med*. 2009;47(4):424-30.
21. Conrotto P, Valdembri D, Corso S, Serini G, Tamagnone L, Comoglio PM, et al. Sema4D induces angiogenesis through Met recruitment by Plexin B1. *Blood*. 2005;105(11):4321-9.
22. Clavijo-Cornejo D, Enriquez-Cortina C, Lopez-Reyes A, Dominguez-Perez M, Nuno N, Dominguez-Meraz M, et al. Biphasic regulation of the NADPH oxidase by HGF/c-Met signaling pathway in primary mouse hepatocytes. *Biochimie*. 2013;95(6):1177-84.

23. Moumen A, Patane S, Porras A, Dono R, Maina F. Met acts on Mdm2 via mTOR to signal cell survival during development. *Development*. 2007;134(7):1443-51.
24. Szklarczyk D, Franceschini A, Wyder S, Forslund K, Heller D, Huerta-Cepas J, et al. STRING v10: protein-protein interaction networks, integrated over the tree of life. *Nucleic acids research*. 2015;43(Database issue):D447-52.
25. Mathelier A, Zhao X, Zhang AW, Parcy F, Worsley-Hunt R, Arenillas DJ, et al. JASPAR 2014: an extensively expanded and updated open-access database of transcription factor binding profiles. *Nucleic acids research*. 2014;42(Database issue):D142-7.