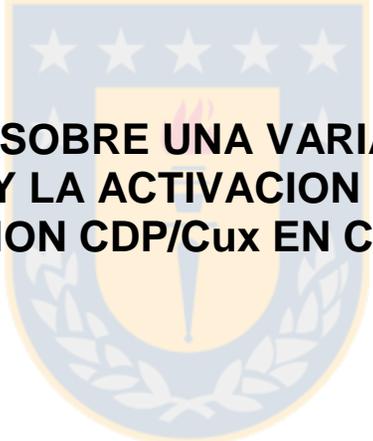




Universidad de Concepción
Dirección de Postgrado
Facultad de Ciencias Biológicas -Programa de Magíster en Bioquímica y
Bioinformática



**EFEECTO DE PMA SOBRE UNA VARIANTE NUCLEAR DE
CATEPSINA L Y LA ACTIVACION DEL FACTOR DE
TRANSCRIPCION CDP/Cux EN CELULAS Caco-2**

VIVIANA ESTEFANIA HERMOSILLA AGUAYO
CONCEPCIÓN - CHILE
2012

Profesor Guía: Dra. Violeta Morin Muñoz
Dpto. de Bioquímica y Biología Molecular
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

RESUMEN

El estudio de los mecanismos moleculares subyacentes al desarrollo del cáncer comprende el uso de compuestos capaces de actuar como promotores tumorales, los que favorecen la proliferación de células incompletamente transformadas. Dentro de ellos, uno de los más ampliamente utilizados es forbol 12-miristato 13-acetato o PMA. Los efectores a nivel celular de este compuesto corresponden a una familia de serina-treonina quinasas, conocidas como “Proteína quinasa C” o PKC, que participan en distintas vías de transducción de señales, regulando procesos como diferenciación, sobrevivencia y proliferación celular. PMA es capaz de producir la activación y posterior depleción de las distintas isoformas de PKC y generar así un fenotipo canceroso mediante la desregulación de complejas vías de transducción de señales y la activación o inactivación de efectores corriente abajo de PKC. Dentro de las proteínas que se ven alteradas bajo el tratamiento con PMA, se encuentra la cisteína proteasa Catepsina L, ya que la exposición a este compuesto durante periodos de tiempo prolongados incrementa los niveles de expresión de esta proteína. Catepsina L participa en la degradación terminal de proteínas en los lisosomas, sin embargo, realiza otras funciones dentro de la célula, las cuales requieren que se localice en otros compartimentos celulares. Un ejemplo de lo anterior es el rol que ejerce esta proteasa a nivel nuclear, donde participa en la activación por clivaje del factor de transcripción CDP/Cux en la transición G1/S del ciclo celular, permitiendo así la transcripción de genes necesarios para llevar a cabo la síntesis de ADN. Este factor de transcripción, previa transición G1/S, se encuentra inactivado por fosforilación mediada por PKC, por lo que su actividad también se ha visto alterada en presencia de PMA, disminuyendo su capacidad de unión a ADN *in vitro* luego de tratamientos de corta duración.

La presente tesis tiene como objetivo determinar variaciones en la expresión, localización y actividad de una variante de Catepsina L, analizando para ello el estado de activación del factor de transcripción CDP/Cux en presencia de PMA, utilizando como modelo de estudio células de cáncer colorrectal Caco-2. Se estudió el efecto de PMA sobre la progresión del ciclo celular desde la transición G1/S mediante la incorporación de 5-bromo-2'-desoxiuridina. Los efectos sobre la variante de Catepsina L se evaluaron al tratar células Caco-2 durante 4 horas desde G1/S. La expresión de la proteasa se determinó a través Western blot y RT-PCR; la localización se evaluó por inmunocitoquímica, mientras que la actividad de la proteasa, tanto *in vitro* como *in vivo*, se evaluó a través del clivaje de sustratos fluorogénicos y por activación de CDP/Cux. Con las técnicas anteriormente mencionadas, se determinó que al tratar células Caco-2 con PMA a partir de la transición G1/S, se produce un retraso en el término de la etapa de síntesis de ADN. A las 4 horas de tratamiento con PMA se produce una disminución en la expresión y actividad de Catepsina L a nivel nuclear, manifestándose en una menor activación del factor de transcripción CDP/Cux. Estos efectos se ven revertidos al incubar con PMA junto con el inhibidor de PKC, queleritrina, sugiriendo que estarían siendo mediados, al menos en parte, por PKC.

Este trabajo constituye un aporte en cuanto a la comprensión de los procesos moleculares desencadenados por la desregulación de vías de transducción de señales donde se ve involucrada Catepsina L y que podrían tener relación con el proceso de carcinogénesis.