

Universidad Nacional de Córdoba

Facultad de Ciencias Químicas

Departamento de Bioquímica Clínica



Consejo Nacional de Investigación Científicas y Tecnológicas (CONICET)

Centro de Investigaciones en Bioquímica Clínica (CIBICI)



**CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DEL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN ZEB1 EN EL
PROGRAMA DE TRANSICIÓN EPITELIO MESENQUIMAL Y LA PROGRESIÓN
TUMORAL**

Tesis para optar por el título de Doctora en Ciencia Químicas

Bióloga María Candelaria Llorens de los Ríos

Directora de Tesis: Dra. Ana María Cabanillas

2017

Comisión de Tesis Doctoral:

Dra. Ana María Cabanillas

Directora de Tesis

Dr. José Luis Bocco

Dr. José Luis Daniotti

Dr. Pablo H. H. López

Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba.

Evaluador Externo:

Marina Simian

Instituto de Nanosistemas
Universidad Nacional de San Martín

El siguiente trabajo de tesis fue realizado gracias al apoyo económico de los subsidios otorgados por la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica- Fondo para la Investigación Científica y Tecnológica (FONCYT), el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), la Secretaría de Ciencia y Tecnología de la Universidad Nacional de Córdoba (SECYT) y el Instituto Nacional del Cáncer (INC).

En memoria a Ana María Cabanillas

A mis padres por su cariño y apoyo incondicional

Agradecimientos

Son muchas las personas y las instituciones que me han acompañado y colaborado para hacer posible esta formación, a las que les estoy infinitamente agradecida:

En primer lugar a la Dra. Ana María Cabanillas por confiar en mí y abrirme las puertas de su laboratorio, guiarme y acompañarme en casi todo este proceso, por incentivar y ayudarme a abrir nuevos caminos, ampliar mis horizontes y atravesar fronteras, por darme libertad para aprender y formarme profesionalmente en lo que más me gusta hacer. Finalizando esta etapa intento honrar parte del trabajo, dedicación y esfuerzo que ella le dedico a este proyecto y a mi formación, *"in memoriam"*.

Al Dr. Gaston Soria quien de manera desinteresada se ofreció a guiarme en esta etapa final, asumiendo esta tarea con mucho compromiso, dedicación y paciencia. Gracias por enseñarme y guiarme, por la motivación, la confianza, la contención, el cariño y por hacer fácil lo que parecía difícil.

A las hermosas personas que formaron parte de mi grupo de trabajo Lupe, Nati C, Anita, Facu G, Vicky, Naty G. A mis compañeros de laboratorio Emi, Javi, Claudio, Dani, Ceci y a mis amigos de la ciencia Anita R, Magui, Ale, Lucas, Ceci R, Gera, Nico y Facu F. Con los que compartí largas jornadas laborales, conocimientos, experimentos y congresos pero sobre todo una gran amistad llena de momentos inolvidables. Gracias por estar y alegrar cada día de trabajo, por la contención y el cariño.

A los grupos colaboradores que permitieron que esta formación sea más diversa y enriquecedora:

- Al Dr. Marcelo Kazanietz y a su grupo en la Universidad de Pennsylvania, por abrirme en las puertas de su laboratorio, enseñarme y guiarme por el mundo de las PKCs.
- A la Dra. Graciela Piwien-Pilipuk por estar siempre dispuesta a escuchar un poster, una charla, una consulta y compartir una devolución o un consejo con muchísima profesionalidad y cariño.
- A la Dra. Giselle Peters por abrirme las puertas de su laboratorio en el Instituto de Oncología Angel H. Roffo y formarme en las etapas iniciales de mi doctorado.

A los miembros de mi tribunal Dr. José Luis Bocco, Dr. José Luis Daniotti y Dr. Pablo López por guiarme a lo largo de estos años con mucha dedicación y criterio, gracias por sus buenos consejos y por la contención en todas las etapas, principalmente al final.

A la Dra. Marina Simian por aceptar ser la evaluadora externa y regalarme parte de su tiempo.

A las chicas del Roffo especialmente a Rocco, Lili, Ine, Helen, Ro, Carito, Sol y Cris, por todo el apoyo, cariño y contención. Son sin dudas otro gran regalo de la ciencia, un hermoso grupo de amigas que trasciende barreras espaciales y temporales.

Al Dr. Pablo Iribarren por la motivación, el apoyo y contención a lo largo de estos años.

A la Dra. Cristina Motran y a mis compañeros de docencia Lauri, Coty, Leo Xime, por abrirme las puertas de su asignatura y permitirme desarrollar mi docencia, una experiencia que disfrute muchísimo.

A todos los profesores y becarios del CIBICI que de diversas maneras me han acompañado y apoyado a lo largo de estos años.

A los secretarios Adri, Laura, Martin, Ceci, Betina de posgrado y a las técnicas y CPA Pili, Paula, Ale, Lau y Gaby por la excelente onda y predisposición para trabajar y colaborar con lo que sea necesario.

A las instituciones que han ayudado económicamente para el desarrollo de este proyecto y mi formación: La Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica, el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), la Secretaría de Ciencia y Tecnología de la Universidad Nacional de Córdoba (SECYT), el Instituto Nacional del Cáncer (INC), Journal of Cell Science (JCS), International Union of Biochemistry and Molecular Biology (IUBMB) y Fulbright - Bunge y Born.

Infinitamente agradecida a la Universidad Nacional de Córdoba y a la Facultad de Ciencias Químicas por brindarme una educación gratuita y de excelencia.

A mis padres Ana y Pedro y a sus compañeros de vida, mil gracias por su ejemplo de trabajo, lucha, esfuerzo, compromiso, responsabilidad y respeto. Gracias por darme desde muy chica la oportunidad de elegir mi camino, por estar siempre acompañando dispuestos a levantarme cuando es necesario y listos para festejar cada triunfo, por más pequeño que sea. Sin duda si llegue hasta acá es porque ellos siempre se encargaron de que nunca me falte nada. Son una fuente inagotable de cariño y contención.

A mi hermana Jime que es la compañera más hermosa que me regalo la vida, mi ejemplo de perseverancia, compromiso y responsabilidad, que a pesar de las distancia siempre está presente.

A mis hermanos Pedro y Matu por su confianza, compañía y cariño incondicional.

A la gran familia que me dio la vida mis amigas del corazón Vale, Sofi, Flor, Romi, Caro y a mis primas Panchi y Rochi que me apoyaron y acompañaron en cada etapa de esta carrera con mucho cariño.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

RESUMEN	11
ABSTRACT	12
ABREVIATURAS y SÍMBOLOS	13
INTRODUCCIÓN	16
1. El factor de transcripción ZEB1	18
1.1 Estructura y dominios funcionales de ZEB1	18
1.2 Rol dual de la proteína ZEB1 en la represión y la activación transcripcional	20
1.3 Expresión de ZEB1 en condiciones fisiológicas	22
1.4 Función y genes regulados por ZEB1	23
1.5 Patología asociada a mutaciones de ZEB1	24
1.6 Regulación del factor de transcripción ZEB1	25
2. El factor de transcripción ZEB1 está involucrado en la progresión tumoral	28
2.1 Características del carcinoma mamario y su evolución	28
..... Rol del factor de transcripción ZEB1 en la transición epitelio mesenquimal y la progresión tumoral	30
2.2 Transición epitelio mesenquimal	30
2.3 Participación del factor de transcripción ZEB1 en el programa EMT, el mantenimiento del fenotipo indiferenciado y la tumorigénesis	34
2.4 Vías de transducción de señales involucradas en la regulación del programa EMT y el factor de transcripción ZEB1	36
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	42
RESULTADOS	44
<i>CAPÍTULO I: CARACTERIZACIÓN DE LA REGIÓN N-TERMINAL DE ZEB1 EN SU ROL COMO MODULADOR DEL PROGRAMA EMT</i>	46
1. Participación de vías de transducción de señales en la regulación de la región N-terminal de ZEB1	46
1.1 Efectos de la región N-terminal de ZEB1 sobre sus genes blanco	46
1.2 Vías de transducción de señales involucradas en la fosforilación de la región N-terminal de ZEB1	47
2. Rol de la región N-terminal de ZEB1 en el programa EMT	51
2.1 Inducción del programa EMT por TGF- β en células NMuMG	51
2.2 Generación de líneas celulares estables con expresión de la región N-terminal de ZEB1 ..	53

2.3	Efecto de NZEB1 sobre la expresión de marcadores morfológicos y moleculares del programa EMT en células NMuMG.....	53
2.4	Participación de SNAIL y β -catenina en el programa EMT inducido por NZEB1 en células NMuMG.....	56
2.5	Efecto de NZEB1 en la organización del citoesqueleto de F-actina	59
2.6	Efecto de NZEB1 sobre parámetros funcionales asociados a la EMT en células NMuMG... 60	
-	Efecto de NZEB1 en células NMuMG sobre la invasión celular	62
-	Efecto de la expresión de NZEB1 en el crecimiento independiente del anclaje en agar blando en células NMuMG	66
	Conclusiones parciales capítulo I	67
	<i>CAPÍTULO II: REGULACIÓN DE NZEB1 EN EL PROGRAMA EMT EN CÉLULAS NMUMG</i>	68
1.	Efectos de las vías de transducción de señales sobre la expresión de E-cadherina y NZEB1 en células NMuMG	68
2.	Regulación de ZEB1 por la vía de IGF-1/IGF-1R en células NMuMG	72
3.	Regulación de la estabilidad proteica de NZEB1 por la vía de IGF-1/IGF-1R en células NMuMG74	
4.	Efecto de la regulación de NZEB1 por IGF-1R sobre parámetros funcionales de EMT en células NMuMG	75
-	Sobre la expresión de E-cadherina y la distribución del citoesqueleto de actina.....	76
-	Sobre la migración e invasión celular	78
	Conclusiones parciales capítulo II	80
	<i>CAPÍTULO III: PARTICIPACIÓN DE LA VÍA DE PKC EN LA REGULACIÓN DE LA FUNCIÓN BIOLÓGICA DE ZEB1 EN LÍNEAS CELULARES DE CÁNCER DE MAMA</i>	81
1.	Relación entre PKC, ZEB1 y marcadores de EMT en líneas celulares de cáncer de mama	81
2.	Efecto de ZEB1 sobre la expresión de PKC α y marcadores de EMT en células MDA-MB-231.	83
3.	Efecto de PKC α sobre la expresión de ZEB1 y marcadores de EMT en líneas celulares de cáncer de mama	85
4.	Efecto de PKC α sobre estabilidad proteica de ZEB1.....	89
5.	Evaluación de la Interacción entre PKC α y ZEB1	91
6.	Regulación de la migración e invasión celular por ZEB1 y PKC α	92
	Conclusiones parciales capítulo III	95
	DISCUSIÓN.....	96
	<i>ZEB1 como un regulador maestro del programa EMT: impacto en fenotipos asociados a la progresión tumoral</i>	97
	<i>Regulación de la actividad de ZEB1: mecanismos postraduccionales</i>	101

<i>PKCs y ZEB1: miembros de un eje regulatorio que controla el fenotipo invasivo en células de cáncer de mama</i>	105
CONCLUSIONES.....	108
MATERIALES Y MÉTODOS.....	110
PRODUCCIÓN CIENTÍFICA	132
BIBLIOGRAFÍA.....	135

RESUMEN

La Transición Epitelio-Mesenquimal (EMT) es un programa esencial de la embriogénesis y un evento crítico en la progresión tumoral. Durante la EMT las células epiteliales experimentan cambios moleculares que promueven un fenotipo mesenquimal, caracterizado por la pérdida de la polaridad celular y uniones intercelulares y la ganancia de propiedades migratorias e invasivas. Este programa es finamente regulado a diversos niveles por factores de transcripción, entre los que se incluyen los miembros de las familias ZEB (Zinc Finger E-box Binding Homeobox), SNAIL y TWIST. Estudios recientes demuestran que ZEB1, uno de los miembros de la familia ZEB, tiene una activa participación en la inducción de EMT en diversos tumores epiteliales, tales como colon, próstata y mama. Sin embargo, existen pocos reportes respecto a las señales extracelulares y los mecanismos que regulan a ZEB1 durante el programa EMT.

Bajo la hipótesis de que la función de ZEB1 está regulada a distintos niveles (transcripcional, postranscripcional, traduccional y postraduccional) por elementos presentes en el entorno intracelular o extracelular, el objetivo general de esta Tesis Doctoral fue caracterizar los mecanismos moleculares y las vías de transducción de señales que tienen impacto sobre la regulación funcional de ZEB1 y su relevancia en el programa EMT y la progresión tumoral.

Durante el desarrollo de esta Tesis Doctoral, en primer lugar, se estudió el rol de la región amino terminal de ZEB1 en el programa EMT, se identificó la porción mínima de ZEB1 (NZEB1) que recapitula la función de ZEB1 *wild type* (wt) en la EMT en una línea celular de epitelio mamario murino no transformado (NMuMG). En segundo lugar, a través del estudio de múltiples cascadas de transducción de señales se estableció que las vías del receptor del factor de crecimiento similar a la insulina 1 (IGF-1R) y de las proteínas quinasa C (PKCs) regulan los niveles proteicos de ZEB1 y consecuentemente el programa EMT. En este sentido, se demostró que la vía de IGF-1R regula la función de NZEB1 mediante la modulación de su estabilidad proteica por un mecanismo dependiente del proteasoma. En tercer lugar, se evaluó la participación de la vía de PKCs en la regulación de la función biológica de ZEB1 utilizando 10 líneas celulares de mama con diferente grado de agresividad. Esto permitió establecer una correlación lineal entre los niveles de expresión de PKC α , ZEB1 y el estado de activación de la EMT. Mediante ensayos con ARNi y el uso de inhibidores farmacológicos se estableció que PKC α regula los niveles de ZEB1, revirtiendo el fenotipo migratorio e invasivo de células MDA-MB-231. De esta manera se demostró por primera vez que la vía de transducción de señales de PKCs regula la función biológica de ZEB1, definiendo un nuevo eje regulatorio del programa EMT en células MDA-MB-231.

Palabras clave: ZEB1, EMT, cáncer de mama, vías de transducción de señales, PKC α , IGF-1R.

ABSTRACT

The Epithelial to Mesenchymal Transition (EMT) is an essential program of embryogenesis and a critical event in tumor progression. During EMT epithelial cells undergo molecular changes that promote a mesenchymal phenotype, which is characterized by loss of cellular polarity and intercellular junctions, together with the gain of migratory and invasive properties. This program is finely regulated at several levels by transcription factors, including members of the ZEB, SNAIL and TWIST families. Recent studies show that ZEB1 (Zinc Finger E-box Binding Homeobox) has an active role in the induction of EMT in diverse epithelial tumors, such as colon, prostate and breast. However, there are few reports about the extracellular signals and mechanisms that regulate ZEB1 during the EMT program.

Under the hypothesis that the ZEB1 function is regulated at several levels (transcriptional, post-transcriptional, translational and post-translational) by elements present in the intracellular or extracellular environment, the aims of this Doctoral Thesis was to characterize the molecular mechanisms and the signaling transduction pathways that drive to the functional regulation of ZEB1 and its relevance in the EMT program and tumor progression.

During the development of this Doctoral Thesis, firstly it was studied the functional role of the N-terminal end of ZEB1 in the EMT program, it was identified the smaller portion of ZEB1 (NZEB1) that recapitulated the function of ZEB1 wt in the EMT in an untransformed murine mammary epithelial cell line (NMuMG). Secondly, by studying multiple signal transduction pathways, it was established that the insulin-like growth factor 1 receptor (IGF-1R) and protein kinase C (PKCs) pathways regulate the protein levels of ZEB1 and, consequently, the EMT program. In this sense, the IGF-1R pathway was shown to regulate the function of NZEB1 by modulating its protein stability by a proteasome-dependent mechanism. Thirdly, it was assessed the involvement of the PKCs pathway in regulation of the biological function of ZEB1 using 10 breast cell lines with different degree of aggressiveness. This establishes a linear correlation between the levels of expression of PKC α , ZEB1 and the EMT activation state. By RNAi and pharmacological inhibitors it was proved that PKC α regulates ZEB1 levels, reversing the migratory and invasive phenotype of MDA-MB-231 cells. In this way, it was demonstrated for the first time that the signal transduction pathway of PKCs regulates the biological function of ZEB1, defining a new regulatory axis of the EMT program in MDA-MB-231 cells.

Keywords: ZEB1, EMT, breast cancer, signaling pathways, PKC α , IGF-1R.

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

aa: amino ácidos

ADN: Ácido desoxirribonucleico

AKT: o proteína quinasa B, del inglés **Protein kinase B**

aPKCs: Proteínas quinasa C atípicas

ARN: Ácido ribonucleico

ARNi: ARN pequeños de interferencia, del inglés **Small interference RNA**

ARNm: Ácido ribonucleico mensajero

ATM: Quinasa Ataxia Telangiectasia Mutada, del inglés **Ataxia-Telangiectasia Mutated**

Cdc2: Quinasa dependiente de ciclina 2, del inglés **Cell Division Control Protein 2** homolog

CID: Dominio de interacción con CtBP, del inglés **CtBP Interacting Domain**

CKI: Caseínas quinasas I, del inglés **Casein Kinase I**

CKII: Caseínas quinasas II, del inglés **Casein Kinase II**

cPKCs: Proteínas quinasa C clásicas

CSC: Células madre de cáncer, del inglés **Cancer Stem Cell**

CtBP: proteína de unión al extremo C-terminal

DAG: Diacilglicerol

DE: Desviación Estándar

DMSO: Dimetilsulfóxido

EE: dominio ácido rico en glutamato

EGF: Factor de crecimiento epidérmico, del inglés **Epidermal Growth Factor**

EMSA: Ensayo de cambio de movilidad electroforética, del inglés, **Electrophoretic Mobility Shift Assay**

EMT: transición epitelio mesenquimal, del inglés **Epithelial-Mesenchymal Transition**

ERK: Quinasa regulada por señales extracelulares, del inglés **Extracellular signal-Regulated Kinases**

Fig.: Figura

FT: Factor de Transcripción

FT-EMT: Factores de Transcripción de la **EMT**

GFP: Proteína verde fluorescente, del inglés **Green Fluorescent Protein**

GSK3-β: Glucógeno sintasa quinasa 3 beta, del inglés **Glycogen Synthase Kinase 3 beta**

HAT: Histona Acetiltransferasa

HER2: Receptor tipo 2 del factor de crecimiento epidérmico humano

IF: Inmunofluorescencia

IGF-1: Factor de crecimiento insulínico tipo 1, del inglés **Insulin-like Growth Factor-1**

IGF-1R: Receptores del factor de crecimiento similar a la insulina 1, del inglés **Insulin-like Growth Factor 1 Receptor**

IP: Inmunoprecipitación

MAPK: Proteínas quinasas activadas por mitógenos, del inglés **Mitogen-Activated Protein Kinases**

MEC: Matriz extracelular

MEK: Quinasa de la proteína quinasa activada por mitógenos, del inglés **Mitogen-Activated Protein Kinases Kinases**

MET: Transición mesenquimal epitelial, del inglés **Mesenchymal-Epithelial Transition**

miR: microARN

MMPs: Metaloproteinasas de matriz

N: Señal de localización nuclear

nPKCs: Proteínas quinasa C noveles o nuevas

NZEB1 o ZD1s: Región N-terminal de ZEB1 con el grupo de dedos de zinc N-terminal incompleto

PI3K: Fosfoinositol 3-quinasa, del inglés **phosphatidylinositide 3-kinase**

PKA: Proteína quinasa A, del inglés **Protein kinase A**

PKCs: Proteínas quinasa C, del inglés **Protein Kinase C**

PMA: Forbol 12-miristato 13-acetato

RE: Receptor de Estrógenos

RP: Receptor de Progesterona

RTK: Receptores tirosina quinasa, del inglés **Receptor Tyrosine Kinase**

RT-qPCR: Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa a tiempo real (RT-qPCR, del inglés **quantitative Reverse Transcription - PCR**)

S: residuos Serina

SFB: Suero Fetal Bovino

SFR: Factor de respuesta al suero, del inglés **Serum Response Factor**

SID: Dominio de interacción con Smads, del inglés **Smad Interacting Domain**

SUMO: SUMOilación

T: residuos Treonina

TGF- β : Factor de crecimiento transformante β , del inglés **Transforming Growth Factor β**

WB: Western Blot

wt: Proteína natural o silvestre, del inglés **Wild Type**

ZD1: Región de dedos de zinc N-terminal de ZEB1

ZD1-HD: Región N-terminal de ZEB1 mas el homeodominio central

ZD1L: Región N-terminal de ZEB1 con el grupo de dedos de zinc N-terminal completo

ZD2: Región de dedos de zinc C-terminal de ZEB1

ZEB1: Zinc Finger E-box Binding Homeobox 1

INTRODUCCIÓN

Las contribuciones realizadas por el laboratorio de la Dra. Cabanillas se citan en negrita

1. El factor de transcripción ZEB1

La familia ZEB (del inglés, Zinc Finger E-box Binding Homeobox) comprende dos proteínas denominadas ZEB1 y ZEB2 respectivamente. Si bien estos son los nombres más utilizados actualmente, ZEB1 también se conoce como δ EF1, AREB6, BZP, MEB1, Nil-2-a, TCF8, ZEB, Zfhp1 y Zfhx1a [1-4], mientras que ZEB2 se conoce también como KIA0569, SIP1, SMADIP-1 y Zfhx1b [1, 3, 4]. Por su parte, en *Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans* y *Zebrafish* se ha descrito un único ortólogo, Zfh-1, Zag-1 y Kheper, respectivamente [2, 4]. Ambos miembros de la familia ZEB son factores de transcripción (**FT**) caracterizados estructuralmente por presentar dos grupos de dedos de zinc (que permiten la interacción con el ADN) y otros dominios funcionales [1, 3, 4]. Las proteínas ZEB se encuentran filogenéticamente conservadas desde *Caenorhabditis elegans* hasta *Homo sapiens*, lo que indica que poseen importantes roles biológicos [2]. Además, ZEB1 y ZEB2 son parálogos con un alto grado de homología, la cual se conserva principalmente a nivel de los dedos de zinc [1, 2, 4].

Aunque los miembros de la familia ZEB juegan un rol fundamental durante el desarrollo embrionario en vertebrados, han recibido poca atención desde su descubrimiento en 1991. En los últimos años, existe un interés incipiente en estas proteínas debido al descubrimiento de nuevas funciones, destacándose el rol de ZEB1 como impulsor y regulador del programa de transición epitelio mesenquimal (**EMT**, del inglés **E**pithelial-**M**esenchymal **T**ransition), un evento clave durante la progresión del cáncer [1, 2, 4].

1.1 Estructura y dominios funcionales de ZEB1

Estructuralmente, ZEB1 es una proteína altamente modular, con regiones independientes que median la unión al ADN, a otros factores de transcripción y a una serie de cofactores proteicos con actividad como activadores o represores transcripcionales [5] [1-4, 6] (**Fig.1**). En la figura 1 se puede observar una representación esquemática de la proteína ZEB1 y sus diferentes regiones funcionales y estructurales. ZEB1 contiene dos dominios que agrupan varios dedos de zinc, los cuales se sitúan en los extremos N-terminal y C-terminal de la proteína (**ZD1** y **ZD2**,

respectivamente). ZD1 contiene cuatro dedos de zinc, mientras que el dominio ZD2 contiene tres. Cada dominio puede unirse de forma independiente a las secuencias E2-box 5'-CACCTG-3' [5] [2, 6-9]. Los grupos de dedos de zinc también son capaces de interactuar con el factor de respuesta al suero (**SRF**, del inglés **Serum Response Factor**). Además, ZEB1 contiene sitios putativos de SUMOilación (**SUMO**) [1, 3].

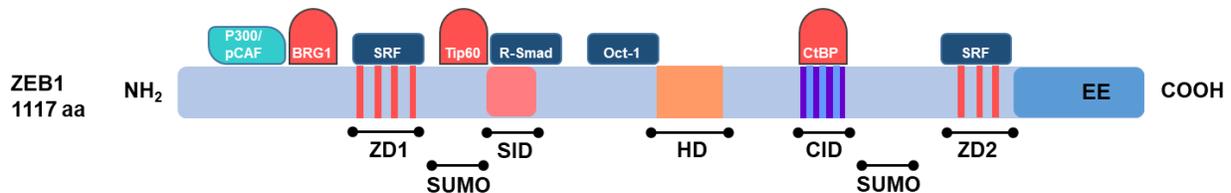


Figura 1: Estructura y dominios funcionales de ZEB1.

La proteína ZEB1 se caracteriza por presentar dos grupos de dedos de zinc uno en la región N-terminal (ZD1) y otro en la región C-terminal (ZD2) y un homeodominio central (HD). Además, presenta un dominio para interacción con proteínas SMADs (SID) y un dominio de interacción con CtBP (CID). En el extremo C-terminal ZEB1 cuenta con un dominio ácido rico en glutamato (EE). Las proteínas marcadas en verde representan co-activadores, las marcadas en rojo co-represores y las marcadas en azul representan otros factores de transcripción. Además, ZEB1 presenta sitios potenciales de SUMOilación (SUMO). Adaptado de [1, 3].

En la región N-terminal ZD1 recluta factores de remodelación de los nucleosomas como BRG1, una de las dos ATPasas del complejo de remodelación de la cromatina SWI/SNF [10]. Esta región también puede interactuar con las histonas acetiltransferasas p300, p/CAF y Tip60 [1, 3, 11].

En el centro de la proteína hay un homeodominio central tipo POU (**HD**), que si bien no participa en la unión al ADN, está involucrado en las interacciones proteína-proteína. A través de este dominio, ZEB1 también puede interactuar con el factor de transcripción Oct-1 [1]. Entre los dominios HD y ZD1 se encuentra un dominio de interacción con Smads (**SID**, del inglés **Smad Interacting Domain**), el cual participa en la regulación de la transcripción de genes blanco aguas abajo en la vía de transducción de señales del factor de crecimiento transformante β (**TGF- β** , del inglés **Transforming Growth Factor β**) [11, 12].

Entre el HD y ZD2 hay un dominio de interacción con CtBP (**CID**, del inglés **CtBP Interacting Domain**), que contiene múltiples secuencias de unión para los cofactores CtBP (proteína de unión al extremo C-terminal). Este dominio forma complejos con histonas desacetilasas y metiltransferasas, proteínas polycomb y coREST. El extremo C-terminal contiene un dominio ácido rico en glutamato (**EE**) típico de los factores de transcripción activadores, el cual ha sido reportado con actividad transactivadora en células de ave, como por ejemplo pollo [1, 3, 7, 13].

1.2 Rol dual de la proteína ZEB1 en la represión y la activación transcripcional

Si bien la lista de genes blanco de ZEB1 fue creciendo rápidamente en los últimos años, el mecanismo de acción de ZEB1 resulta difícil de comprender en su totalidad. La complejidad estructural de esta proteína, combinada con su diverso interactoma y la existencia de potenciales modificaciones postraduccionales, apunta a modos de acción intrincados para la regulación de su función biológica [3]. Como factor de transcripción, ZEB1 regula la expresión de sus genes blanco a través de diversos mecanismos, los cuales incluyen competición con otros factores de transcripción por los sitios de unión al ADN y reclutamiento de co-activadores o co-represores transcripcionales en el promotor de sus genes blanco (**Fig. 2**) [1]. Si bien se ha reportado que ZEB1 tiene una función dual como represor o como activador transcripcional dependiendo del gen blanco y del tejido, un cuerpo creciente de evidencias permite afirmar que ZEB1 actúa principalmente como represor transcripcional [1, 3, 14].

La represión transcripcional por ZEB1 tiene lugar por mecanismos pasivos o activos. En el mecanismo de represión pasiva, ZEB1 compete y desplaza a otros activadores transcripcionales de sus sitios de unión en las secuencias E-box del ADN. Por ejemplo, se ha reportado que ZEB1 reprime el potenciador (“Enhancer”) de la cadena pesada de la inmunoglobulina (IgH) compitiendo con activadores de la familia de proteínas hélice-bucle-hélice básica (**bHLH**) en células B [15]. De manera similar, durante la diferenciación muscular la activación de factor de transcripción p73 es controlada por la acción coordinada de los activadores transcripcionales MyoD/Myf5 o MyoD/Myf6. En este contexto el represor transcripcional ZEB1 compete con MyoD por el sitio de unión al ADN [16]. La $\alpha 7$ -integrina es otro producto génico importante durante la miogénesis esquelética y la miodiferenciación. En este caso, se ha reportado que ZEB1 controla

su expresión en mioblastos mediante la competencia con MyoD por la unión a la región reguladora del promotor de $\alpha 7$ -integrina [17]. Sin embargo, el mecanismo predominante por el cual ZEB1 reprime la expresión génica es a través de la represión transcripcional activa [1, 3, 11, 18-20], la cual implica la unión directa a las secuencias de 5'-CACCTG-3' localizadas en diversos promotores de genes respondedores a ZEB1. De esta manera, ZEB1 selectivamente recluta co-represores específicos para cada promotor, aunque la identidad del (o de los) co-represor (es) implicado (s) sólo se conoce para unos pocos genes blanco de ZEB1. Por ejemplo, se ha sugerido que la represión de CD4 por ZEB1 es mediada por el reclutamiento de Tip60 (una histona acetiltransferasa, HAT) en células Jurkat de linfoma T [21]. De manera similar el complejo represor ZEB1/CtBP regula la hormona del crecimiento [22], interleuquina-2 [23] y Bcl-6 [24]. En el contexto de esta Tesis Doctoral, un importante gen reprimido por ZEB1 es la molécula de adhesión E-cadherina, en cuya represión estarían implicadas las actividades conjuntas de los co-represores CtBP y BRG1 [10, 13].

Aunque la mayor parte de la investigación se ha centrado en la capacidad de ZEB1 para reprimir la expresión génica, algunos estudios también han reportado una capacidad para actuar como un activador transcripcional. Un claro ejemplo es la regulación del receptor de vitamina D3 (VDR). Se ha reportado que ZEB1 se une a dos sitios dentro del promotor VDR *in vitro* y presumiblemente activa la transcripción de este receptor directamente en líneas celulares de carcinoma de colon SW620 [25]. Asimismo, el reclutamiento de co-activadores como p300 o P/CAF y el desplazamiento de CtBP también pueden ser parte de este mecanismo [26]. Por otro lado, hay reportes que indican que la señalización a través de la vía canónica de Wnt convierte a ZEB1 en un activador transcripcional, al reemplazar la unión de CtBP /BRG1 y favorecer la unión del p300. De esta manera ZEB1 incrementaría la expresión de la subunidad gamma 2 de laminina-5 (LAMC2) y del activador del plasminógeno tipo uroquinasa (uPA) en las células de cáncer de colon. Sin embargo en el mismo sistema, pero con señales Wnt inactivas, ZEB1 reprime la expresión de estos mismos genes [27].

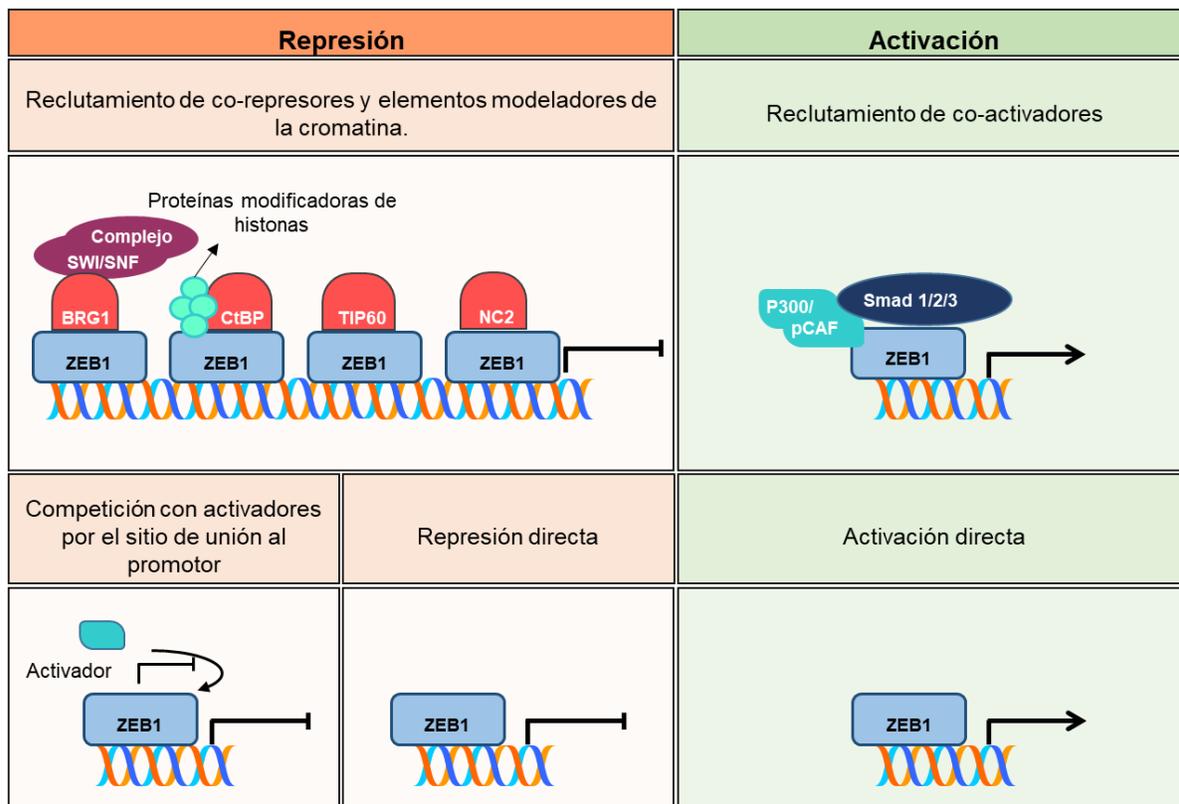


Figura 2: El rol dual de la proteína ZEB1 en la represión y la activación transcripcional.

ZEB1 puede actuar como represor o un activador transcripcional dependiendo del gen blanco y del tejido. La represión y la activación transcripcional se logra principalmente mediante el reclutamiento diferencial de cofactores. Las modificaciones postraduccionales de ZEB1 podrían alterar el conjunto de co-activadores y co-represores reclutados. Adaptado de [1].

1.3 Expresión de ZEB1 en condiciones fisiológicas

Se ha determinado el patrón de expresión de ZEB1 en embriones de ratón y pollo, sin embargo existe escasa información de su patrón de expresión en embriones humanos. Durante el desarrollo embrionario de ratón, ZEB1 se expresa en la notocorda, somitos, extremidades, derivados de la cresta neural y unos pocos sitios restringidos del cerebro y la médula espinal. Por inmunohistoquímica e hibridación *in situ*, se observó la expresión embrionaria de ZEB1 en tejidos mesodérmicos, en derivados de cresta neural, en el neuroectodermo y en regiones del sistema nervioso central. Este patrón es similar en embriones de ratón [18, 28] y de pollo [29].

Durante la vida postnatal en ratones, la expresión de ZEB1 se puede encontrar en músculo y durante la diferenciación esquelética, linfocitos T y en el sistema nervioso central. Mediante análisis northern blot se confirmó la expresión de ARNm de ZEB1 en corazón, cerebro, placenta y músculo. Aunque en niveles muy bajos también se detecta su expresión en pulmón, hígado y riñón. A nivel de tejidos del sistema inmune el ARNm de ZEB1 se expresa en bazo, ganglio linfático, timo y médula ósea [6]. La expresión de ARNm de ZEB1 en los seres humanos adultos es ubicua, en este sentido los tejidos que prestan mayores niveles de expresión de ARNm de ZEB1 son la vejiga, el útero, el músculo esquelético, la aorta y el timo [30].

1.4 Función y genes regulados por ZEB1

La correcta regulación génica espacio-temporal es esencial para la ejecución exitosa de los programas de desarrollo y diferenciación. Numerosos reportes han identificado a la proteína ZEB1 como un regulador transcripcional crucial en la formación de cartílagos, huesos, músculos, así como en el desarrollo de células hematopoyéticas. ZEB1 se encuentra de esta manera involucrado en múltiples vías de desarrollo, lo que le confiere un papel esencial en el desarrollo de la arquitectura normal del organismo [1-3].

La generación de organismos mutantes, deficientes para ZEB1, permitió determinar el rol de este FT durante el desarrollo embrionario y en la diferenciación de ciertos tejidos. Los ratones mutantes heterocigóticos para ZEB1 ($ZEB1^{(-/+)}$) son fértiles y sanos sin alteraciones apreciables en morfología y comportamiento. Sin embargo, los ratones mutantes homocigóticos ($ZEB1^{(-/-)}$), si bien se desarrollan a término, mueren perinatalmente. En general los embriones $ZEB1^{-/-}$ presentan retardos en el crecimiento, extremidades cortas, mandíbulas acortadas, anencefalia, hemorragia interna en la región nasal y falla en el cierre de la médula espinal. Asimismo, los embriones $Zeb1^{(-/-)}$ también presentan timo hipocelular pequeño sin distinción histológica entre la médula y la corteza, y una décima parte del número de timocitos en relación con ratones de tipo salvaje [28].

Las anomalías óseas de los embriones *Zeb1*^(-/-) pueden deberse en parte con el papel de ZEB1 en la regulación de *Col2a1*, que codifica para colágeno tipo II en condrocitos y/o con el rol de ZEB1 en la regulación transcripcional del gen de colágeno I en los osteoblastos [31, 32].

Se ha demostrado que los miembros de la familia ZEB1 regulan la diferenciación muscular tanto en mamíferos (ZEB1), como en *Drosophila* (*zfh-1*). ZEB1 regula la miogénesis embrionaria mediante la modulación de las acciones de las proteínas de la familia MyoD. ZEB1 se une a un subgrupo de secuencias E-box de genes que regulan la diferenciación muscular, y los regula mediante un mecanismo que implica una represión activa de su transcripción. Uno de estos blancos son los miembros de la familia MEF-2, que junto con proteínas de la miogénesis tipo bHLH (MyoD, Myf-5, Myogenin y MRF-4) inducen la diferenciación miogénica [33].

En las células de músculo liso vascular, ZEB1 reprime la expresión de colágeno tipo I, a través de la competencia con el activador transcripcional [34]. Por otro lado, ZEB1 también promueve la transcripción de alfa-actina y la cadena pesada de miosina durante la diferenciación de músculo liso vascular mediante la interacción física con el factor de respuesta de suero y la proteína Smad3 [12].

Además, ZEB1 desempeña un importante rol en el desarrollo de células T, mediante la regulación negativa de la expresión del gen CD4 a través de la unión al potenciador proximal de CD4, [35]. Además, reprime la expresión del gen de IL-2 en células Th2 diferenciadas [19].

La capacidad de ZEB1 para promover y regular el programa embrionario EMT ha despertado el interés de numerosos grupos de investigación en los últimos años [2-4, 36, 37]. Debido a la relevancia del programa EMT en la temática de esta Tesis Doctoral, se le dedicará un apartado completo especial más adelante a la descripción del mismo, así como la participación de ZEB1 en su regulación.

1.5 Patología asociada a mutaciones de ZEB1

En los seres humanos, las mutaciones puntuales homocigotas de ZEB1 están relacionadas con el desarrollo de una patología denominada distrofia corneal polimorfa posterior (PPCD, del inglés posterior polymorphous corneal dystrophy). Esta patología se caracteriza por metaplasia y

crecimiento excesivo de células endoteliales corneales con morfología y patrón de expresión génica epitelial y producción anormal de membrana basal (membrana de Descemet). Varios genes han sido implicados en PPCD, incluyendo VSX1 (sistema visual homeobox gen 1) y COL8A2 (cadena alfa-2 del colágeno VIII). Las mutaciones ZEB1 podrían ser la raíz del fenotipo de PPCD debido a la falta de regulación transcripcional correcta de múltiples genes, como por ejemplo la desregulación de la síntesis del colágeno de la membrana basal [38].

1.6 Regulación del factor de transcripción ZEB1

Durante las diferentes etapas de la diferenciación, las células deben combinar una compleja red de factores que selectivamente controlan la expresión génica en respuesta a señales ambientales. En este sentido, distintos niveles de regulación convergen para modular las funciones biológicas de ZEB1.

- Regulación basal de la transcripción

La proteína ZEB1 es codificada en humanos por el gen ZEB1 localizado en el locus 10p11.2, también conocido como *pcf8* [2]. El gen *pcf8* pertenece a la familia de promotores que carecen de secuencias consenso TATA o CAAT [2, 14, 39]. Sin embargo, el promotor proximal de ZEB1 contiene una región constituida por un 77% de nucleótidos de guanosa (G), denominada “cordón de G”, comprendida aproximadamente – 66 a -1 con respecto al sitio de inicio de la transcripción, que es esencial para la actividad basal del promotor de ZEB1 [14].

- Regulación transcripcional y mecanismos auto-regulatorios de ZEB1

Si bien el ARNm de ZEB1 aparentemente es de expresión ubicua y constitutiva en la mayoría de los tejidos derivados del mesodermo, sus niveles pueden ser alterados por numerosos factores de transcripción. Entre estos FT se destacan Snail 1 y Twist, los cuales también participan en la regulación del programa EMT; así como Gli3, NF-κB, Rb-E2F, Lbx1, HIF-1, NeuroD, p63, TAZ-tead1, Ets-1, la familia Runx [2, 14]. Muchos de estos factores de transcripción han mostrado tener una estrecha relación con los niveles de expresión del ARNm de ZEB1. Sin embargo, su interacción física con el promotor aún debe ser demostrada experimentalmente.

Curiosamente, ZEB1 también presenta mecanismos auto-regulatorios y transcripcionales. El gen de ZEB1 da lugar a la expresión de dos isoformas generadas por corte y empalme alternativo (“splicing”) de su ARNm, ZEB1-a y ZEB1-b [5]. A su vez, ambas isoformas participan en la autorregulación transcripcional de ZEB1. ZEB1-a representa a la proteína completa, mientras que ZEB1-b carece de la mayor parte del dominio de dedos de zinc del extremo N-terminal, al estar carente del primer exón. ZEB1-a es capaz de reprimir su propio promotor mediante la unión a secuencias E-box específicas en su promotor proximal localizadas entre -220 y -225 en relación con el sitio de inicio transcripcional. Mientras que ZEB1-b a pesar de unirse fuertemente a estas mismas regiones E-box, no reprime la expresión de su propio gen. Ensayos de competición han demostrado que ZEB1-b compite con ZEB1-a por los sitios de unión al su propio promotor, comportándose como una isoforma dominante negativa de ZEB1-a [14]. Consistentemente, el homólogo de ZEB1 en *C. elegans* (Zag-1) también es capaz de reprimir su propia expresión [40].

- **Regulación postranscripcional de ZEB1 por la familia de los micro ARN miR200**

Se ha reportado que los micro ARN de la familia miR-200, que incluye miR-200a, miR-200b, miR-200c, miR-141 y miR-429 pueden revertir el programa EMT y son poderosos inductores de la diferenciación epitelial [41-43]. Numerosos estudios han demostrado que los miembros de la familia miR-200 controlan el fenotipo epitelial y revierten el programa EMT a través de la unión a la región 3' no traducida (3' UTR, del inglés 3'-untranslated region) del ARNm de los miembros de la familia ZEB (ZEB1 y ZEB2) [42-45]. Curiosamente, todos los miembros de la familia miR-200 son blancos transcripcionales de ZEB1 y ZEB2 mediante inhibición directa de su transcripción [43]. De esta manera, los miembros de la familia ZEB y los miembros de la familia miR-200 no sólo tienen funciones opuestas, sino que también controlan recíprocamente su expresión mediante un doble bucle de retroalimentación negativa [43].

- **Regulación postraduccional de ZEB1**

En los últimos años ha tomado fuerza la hipótesis de que las funciones de ZEB1 también podrían ser moduladas por modificaciones postraduccionales. Se ha hipotetizado que estas modificaciones podrían cambiar la función del FT de represor a activador transcripcional, modificar su localización subcelular, afectar la estabilidad de la proteína, entre otras. Se cree que

las modificaciones postraduccionales de ZEB1 podrían actuar como importantes moduladores de la función de ZEB1 tipo tejido específico, en diferentes contextos fisiológicos y patológicos. Sin embargo, hasta el momento, las modificaciones postraduccionales de ZEB1 así como sus consecuencias funcionales, han sido escasamente descritas y necesitan ser blanco de nuevas investigaciones.

Evidencia previa sugiere que ZEB2 y ZEB1 podrían ser modificados por SUMOilación y que, al menos para ZEB2, se demostró que la conjugación de SUMO es llevada a cabo por la proteína polycomb Pc2, su SUMO E3-ligasa. Esta modificación covalente no afecta a la localización subcelular de ZEB2, pero atenúa su actividad transcripcional de una manera dependiente del contexto del promotor, resultando en una represión menos eficiente de la E-cadherina [46]. Aunque estos sitios se encuentran conservados en ZEB1, y se han predicho motivos putativos de SUMOilación en la secuencia proteica de ZEB1 humano con alto score, aún no se ha reportado SUMOilación para ZEB1.

ZEB1 también es regulado postraduccionalmente por fosforilación. ZEB1 se expresa en líneas celulares bajo dos formas, hipo e hiperfosforiladas cuyo predominio depende del tipo celular [47]. En este sentido, trabajos previos del laboratorio de la Dra. Cabanillas han demostrado mediante ensayos de genes reporteros y EMSA (por sus iniciales en inglés, **E**lectrophoretic **M**obility **S**hift **A**ssay) que una disminución en la fosforilación de ZEB1 aumenta tanto la afinidad de unión al ADN, como la represión transcripcional de ZEB1 por sus genes blanco (*CD4*, *CDH1*, *P73* y *CD49d*). Mediante mutagénesis sitio dirigida se identificaron cuatro sitios clave de fosforilación en la región C-terminal de ZEB1 cerca del segundo grupo de dedos de zinc (ZD2). El análisis funcional de estos mutantes demostró que eventos de fosforilación llevados a cabo por vías de señalización específicas MEK/ERK1-2 (Proteínas quinasas activadas por mitógenos, del inglés **M**itogen-**A**ctivated **P**rotein **K**inases) y PKCs (Proteínas quinasas C, del inglés **P**rotein **K**inase **C**) pueden inhibir la represión transcripcional de ZEB1. Además, se determinó que el residuo T867 es fosforilado directamente por MEK1-2/ERK1-2 en consecuencia de la activación de la vía de IGF-1R, contribuyendo a la inactivación del rol biológico de ZEB1 como represor transcripcional, afectando su localización subcelular en un contexto celular no transformado

representado por células CHO-K1 y COS-7 [48]. Estos estudios proporcionaron las primeras evidencias de que la actividad de ZEB1 está regulada directamente por la señalización de quinasas, identificando dos vías de quinasas relevantes (MEK/ERK y PKCs). Esto sugiere además que la fosforilación de ZEB1 puede participar en la integración las señales de TGF- β con otras citoquinas y factores de crecimiento como el factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF-1, del inglés Insulin-like Growth Factor-1) en el entorno local de la célula.

2. El factor de transcripción ZEB1 está involucrado en la progresión tumoral

2.1 Características del carcinoma mamario y su evolución

Cáncer es un término genérico que designa a un amplio grupo de enfermedades caracterizadas por la adquisición de propiedades celulares distintivas que colectivamente gobiernan transformación celular y la metástasis. Las características distintivas del cáncer comprenden el crecimiento y proliferación autosuficientes, insensibilidad a las señales inhibitorias del crecimiento, inmortalidad replicativa, resistencia a la muerte celular (apoptosis), reprogramación de la energía metabólica, evasión de respuesta inmune, inducción de angiogénesis e invasión tumoral [49]. Estas características son subyacentes a la inestabilidad genómica y la inflamación. Además de las células cancerosas, los tumores presentan otra dimensión de complejidad, ya que contienen un repertorio de células aparentemente normales que constituyen el "microambiente tumoral" (Fig.3) [49].



Figura 3: Las características del cáncer.

La ilustración abarca las características distintivas del cáncer. Adaptado de [49].

Según la organización mundial de la salud, el cáncer es la segunda causa de muerte luego de las enfermedades cardiovasculares en países en vías de desarrollo. A nivel mundial, el cáncer de mama representa actualmente el tipo de cáncer más frecuentemente diagnosticado en mujeres y una de las principales causas de muerte por cáncer en esta misma población. Más de 1,3 millones de casos de cáncer de mama invasivo se diagnostican anualmente, ocasionando la muerte de más de 450.000 personas [50]. La enfermedad metastásica, definida como la propagación de un foco canceroso a un órgano diferente de aquel en que se inició, sigue siendo la condición más crítica. La probabilidad de supervivencia a cinco años después del diagnóstico disminuye de >90% para la enfermedad localizada a <20% una vez que se ha producido una metástasis [51].

A pesar de que el desarrollo tumoral puede ocurrir en cualquiera de los tejidos que componen la mama, se da con mayor frecuencia en el tejido epitelial glandular. Estos adenocarcinomas se pueden diferenciar a carcinomas *in situ* y carcinomas invasivos infiltrantes. Mientras que los primeros se producen en las etapas tempranas del desarrollo tumoral y no llegan a sobrepasar la membrana basal, los segundos invaden el tejido que rodea a los conductos [52, 53]. Desde el punto de vista molecular, el cáncer de mama es una enfermedad muy heterogénea. Uno de los mayores factores discriminantes del tipo de cáncer de mama es la presencia o ausencia de receptores hormonales (receptor de estrógenos α , (RE), receptor de progesteronas (RP)) y el receptor del factor de crecimiento epidérmico humano-2 (HER2/neu). En base a la expresión de receptores hormonales se puede clasificar el cáncer de mama en dos grupos: ER⁺ y ER⁻. Los tumores de mama ER⁺ comprenden dos subtipos, ambos definidos por la expresión de genes que normalmente se expresan en las células epiteliales luminales de mama: I) **Luminal A** (RE⁺ y/o RP⁺, HER-2⁻ o HER-2⁺ sin sobreexpresión) y II) **Luminal B** (RE⁺ y/o RP⁺, HER-2 sobreexpresado). Por otro lado, los tumores RE⁻ comprenden también dos subtipos: I) **HER-2⁺** (tumores enriquecidos en HER-2) y II) **Tipo basales** (RE⁻, RP⁻ y HER-2⁻). Este último subtipo, también se conocido triple negativo, representa un tipo tumoral clínicamente muy agresivo, caracterizados por la expresión de genes típicos de las células mioepiteliales o basales [54, 55].

Rol del factor de transcripción ZEB1 en la transición epitelio mesenquimal y la progresión tumoral

2.2 Transición epitelio mesenquimal

La trans-diferenciación de células epiteliales en células mesenquimales móviles, conocida con el nombre EMT, es un programa embrionario evolutivamente conservado que contribuye a la histogénesis y la organogénesis. La EMT ocurre después de la implantación en el endodermo primitivo para formar el endodermo parietal. Posteriormente, durante la implantación, los trofoblastos localizados en la punta de las vellosidades coriónicas experimentan la EMT e invaden el endometrio. El programa EMT así como el proceso inverso, la transición mesenquimal epitelial (**MET**, del inglés **M**esenchymal-**E**pithelial **T**ransition), se producen en diferentes etapas del desarrollo embrionario, dentro de las cuales se destacan la gastrulación, delaminación de la cresta neural y formación del corazón. Algunos tejidos en el embrión en desarrollo se producen como resultado de hasta 3 ciclos sucesivos de EMT y MET. Tal plasticidad del desarrollo, requiere que las células sean capaces de mantener un fenotipo diferenciado estable pero que conserven la capacidad de cambiar a un fenotipo alternativo [56-59]. Este proceso integral durante la vida posnatal contribuye a la homeostasis corporal, dirigiendo la cicatrización de heridas. Sin embargo, si el programa EMT es aberrantemente activado, puede contribuir a eventos patológicos como la fibrosis. Además, ha sido ampliamente demostrado que el programa EMT incrementa las propiedades invasivas de las células tumorales epiteliales y promueve la metástasis tumoral [59-62]. Actualmente hay amplio consenso en que la activación del programa EMT también está asociada con el mantenimiento de las propiedades de las células madre de cáncer (CSC, del inglés **C**ancer **S**tem **C**ell) y aumento de la resistencia a la apoptosis y resistencia a las terapias antitumorales [60, 61, 63-65].

Basados en estas funciones se ha clasificado al programa EMT en tres tipos, dependiendo del contexto biológico y sus consecuencias funcionales: **EMT tipo 1** se asocia con procesos de desarrollo, **EMT tipo 2** se asocia con procesos de cicatrización y regeneración tisular, y **EMT tipo 3** se asocia con la progresión tumoral [57, 61, 64, 66]. El factor común en todos estos contextos celulares y tisulares es que las células epiteliales polarizadas, que normalmente interactúan con

su membrana basal, pierden su organización intercelular, reprograman la expresión génica y desarrollan múltiples cambios bioquímicos que las capacitan para adquirir un fenotipo mesenquimal [57, 59, 61, 62, 64]. Como consecuencia se disuelven las uniones celulares epiteliales, se pierde la polaridad apical-basal y se adquiere una polaridad antero-posterior que desencadena cambios en los programas de señalización, disminución en la expresión génica de marcadores epiteliales y activación de genes que ayudan a definir el fenotipo mesenquimal. Esto conduce a una capacidad migratoria e invasiva aumentada, resistencia a la apoptosis y producción elevada de componentes de la matriz extracelular. Posteriormente se promueve la degradación de la membrana basal y la formación de células mesenquimales que pueden migrar en forma individual o colectiva, invadir el tejido circundante y desplazarse hasta sitios distantes [56, 59, 61, 64, 66] (**Fig. 4**).

- **Desestabilización de las uniones intercelulares y la polaridad celular**

Los complejos proteicos especializados de la superficie celular forman uniones celulares homotípicas que son esenciales para la integridad epitelial. Las células de vertebrados se contactan entre sí a través de uniones estrechas u oclusivas, uniones adherentes y uniones comunicantes o tipo GAP [67]. Tras la iniciación del programa EMT, estas uniones se desestabilizan y las moléculas de adhesión pueden relocalizarse y/o degradarse. A medida que la EMT avanza, la expresión de estas moléculas es adicionalmente reprimida a nivel transcripcional, lo que consolida la pérdida del fenotipo epitelial [61, 68-70]. De esta manera la disolución de las uniones celulares se acompaña de la disminución de la expresión de moléculas de adhesión como claudina, ocludina, zonula ocludens 1 (ZO1), conexina, E-cadherina, entre otras [68]. Particularmente durante la desestabilización de las uniones adherentes, E-cadherina se escinde en la membrana plasmática y la proteína β -catenina, involucrada en la formación de uniones celulares adherentes junto a E-cadherina, ya no puede interactuar con la E-cadherina. En este punto β -catenina puede ser degradada o bien translocar al núcleo, donde actúa como factor de transcripción [68].

- **Cambios en el citoesqueleto y motilidad celular**

Las células sometidas a la EMT reorganizan su citoesqueleto de actina cortical, de una manera que les permite el alargamiento dinámico de las células y la motilidad direccional (**Fig. 4**). Las nuevas proyecciones de membrana ricas en actina facilitan el movimiento celular y actúan como extensiones sensoriales del citoesqueleto. Estas proyecciones incluyen ondulaciones de membrana conocidas como “ruffles”, protuberancias de membrana en forma de lámina llamadas lamelipodios y extensiones similares a espinas llamadas filipodios que generalmente se encuentran en el borde de los lamelipodios. El conjunto de estas estructuras se denomina invadipodios, los cuales son ricos en actina y ejercen una función proteolítica en la degradación de la matriz extracelular (MEC), facilitando así la invasión celular [56, 71].

- **Cambios en la expresión génica durante la EMT**

Las variaciones en los perfiles de expresión de genes asociados a la EMT son evidentes y dependen del tipo de células, tejidos y del grado de progresión hacia la diferenciación mesenquimal [56, 61, 64, 66]. El sello distintivo de la EMT es la regulación negativa de E-cadherina para reforzar la desestabilización de las uniones adherentes. La pérdida de E-cadherina se considera un evento inicial crítico no sólo en la EMT, sino también en la progresión tumoral y metástasis. Además, la represión de los genes que codifican claudinas, occludina, desmoplaquina y placofilina estabiliza la disolución de las uniones estrechas apicales y los desmosomas, respectivamente [66-68, 70]. En manera concomitante a la represión de estos genes, se acompaña la activación de genes que promueven la adhesión del tipo mesenquimal, como por ejemplo la expresión de la cadherina neural mesenquimal (N-cadherina). A través de este cambio, las células en transición pierden su asociación con las células epiteliales y adquieren una afinidad por las células mesenquimales a través de interacciones homotípicas de N-cadherina. Estas interacciones son más débiles que las interacciones homotípicas de E-cadherina, facilitando la migración y la invasión celular [66, 71, 72].

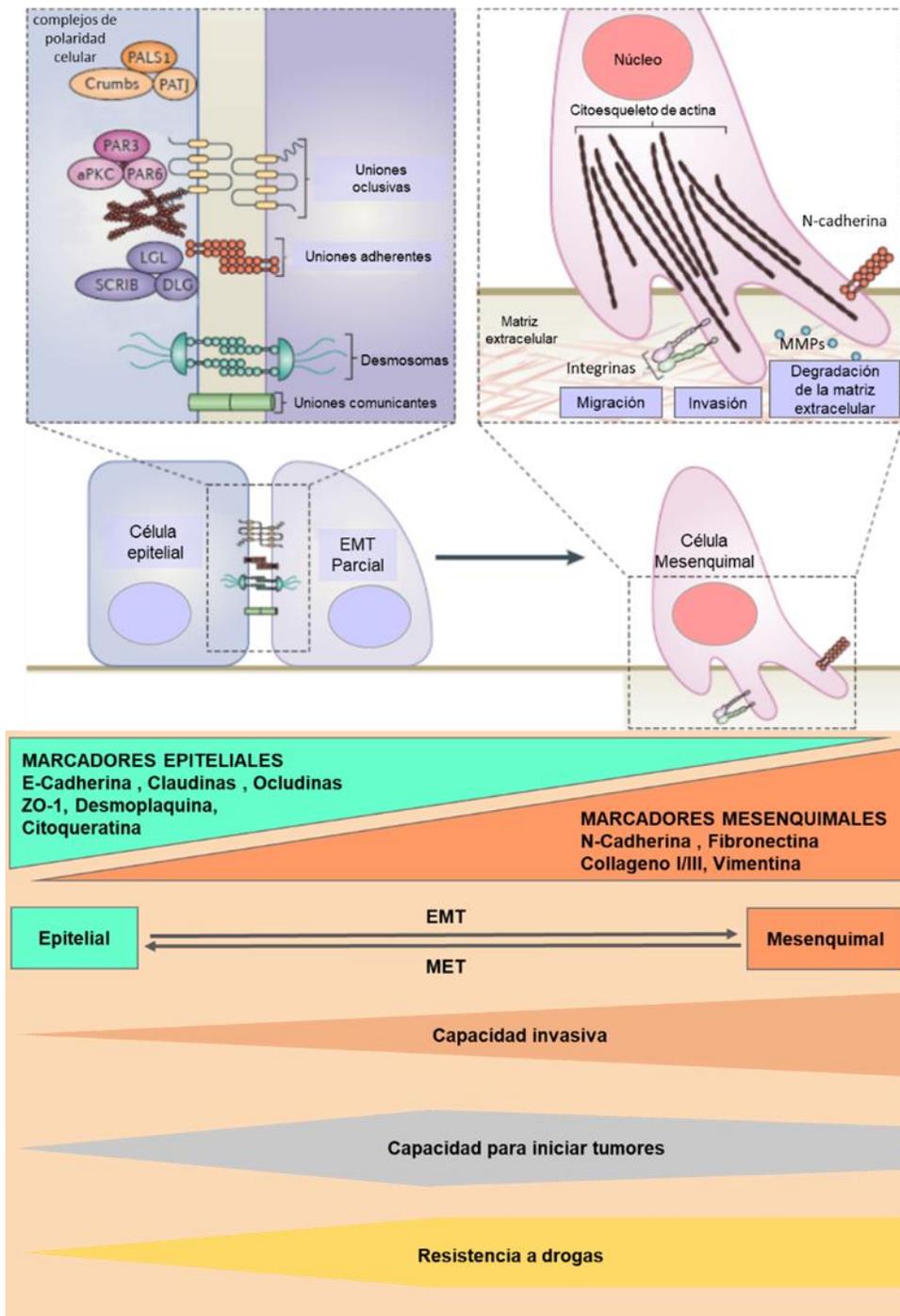


Figura 4: Eventos celulares durante el programa EMT.

Resumen de los principales eventos celulares y moleculares durante el programa EMT. Adaptada de [61].

A medida que las células epiteliales se diferencian en células mesenquimales, la interacción con la membrana basal y la comunicación con la MEC es progresivamente diferente. Por lo tanto, las células regulan negativamente algunas integrinas epiteliales, pero activan la expresión de otras. Algunas de estas integrinas recién expresadas tienen papeles clave en la progresión de la EMT [61]. Los cambios en el repertorio de integrinas durante la EMT se correlacionan con el aumento de la expresión de proteasas, tales como las metaloproteinasas de matriz MMP2 y MMP9, lo que favorece la degradación de las proteínas de la MEC y permite la invasión. Las MMPs degradan adicionalmente a algunas proteínas transmembrana, lo que da como resultado la liberación del dominio extracelular de E-cadherina, contribuyendo de este modo a la pérdida de uniones de adherentes [56, 64, 73].

- Factores de transcripción que conducen el programa EMT

Los cambios en la expresión génica que contribuyen a la represión del fenotipo epitelial y la activación del fenotipo mesenquimal implican reguladores maestros, que incluyen principalmente los miembros de la familia SNAIL (Snail 1 y Slug o Snail 2), la familia de factores de transcripción bHLH (E12, E47, Twist1 y Twist2) y la familia de factores de transcripción ZEB (ZEB1 y ZEB2). Todos estos reguladores se denominan en conjunto Factores de Transcripción de la EMT (**FT-EMT**). Su expresión se activa tempranamente en la EMT, y por lo tanto tienen un papel central en el desarrollo embrionario, la reparación de heridas y el cáncer. Como estos factores de transcripción tienen perfiles de expresión diferentes, sus contribuciones durante la EMT dependen del tipo de células o tejidos implicados y las vías de señalización que inician el programa EMT [61].

2.3 Participación del factor de transcripción ZEB1 en el programa EMT, el mantenimiento del fenotipo indiferenciado y la tumorigénesis

La capacidad de ZEB1 de reprimir la molécula de adhesión E-cadherina e inducir el programa EMT, lo transforma no solo en un importante regulador del desarrollo embrionario, sino también en un regulador clave de la progresión tumoral [3, 10, 13]. La expresión aberrante de ZEB1 se ha observado en numerosos cánceres humanos, tales como cáncer de útero, páncreas, pulmón, hígado, estómago, colon y mama. En los últimos años, una gran cantidad de

reportes han vinculado la expresión de ZEB1 con una mayor agresividad y una mayor capacidad metastásica. Notablemente, en estos tumores la expresión de ZEB1 se correlaciona con la pérdida de la E-cadherina y se asocia con estadios avanzados de la enfermedad o la metástasis [10, 63, 74-79].

Durante la progresión de un carcinoma *in situ* hacia un carcinoma invasivo, se ha demostrado que ZEB1 no incrementa su expresión en las áreas relativamente bien diferenciadas de los carcinomas epiteliales, sino en células aisladas del estroma y en los bordes tumorales invasivos. De esta manera, en los tumores positivos para ZEB1, la expresión del FT en el frente invasivo se traduce en una mayor capacidad metastásica (**Fig. 5**) [1, 63].

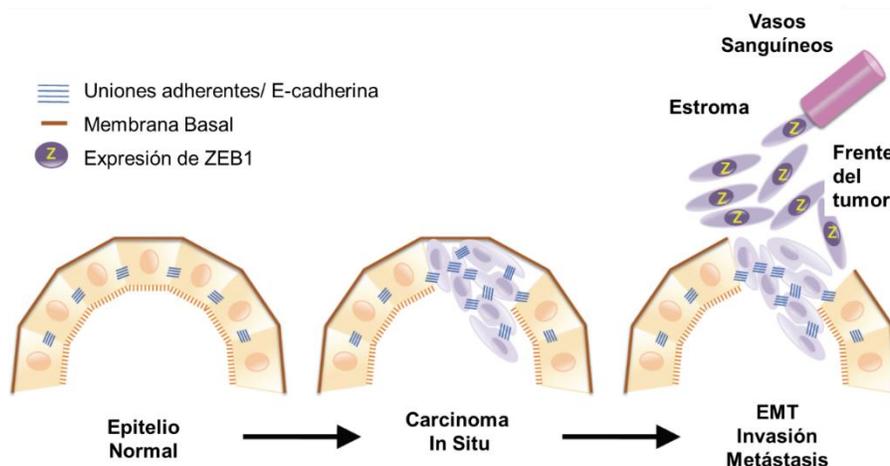


Figura 5: Representación esquemática de la evolución de un carcinoma in situ en un carcinoma invasivo.

ZEB1 no se encuentra presente en las células epiteliales normales o en el centro de los carcinomas bien diferenciados, pero se expresa de manera aberrante en el frente tumoral de cánceres invasivos en células sometidas al programa EMT. Adaptado de [1].

En los modelos de xenoinjertos de ratón, la expresión de ZEB1 promueve la metástasis de células de carcinoma colorrectal y carcinoma de páncreas [77, 78]. Esta noción está respaldada por estudios funcionales usando líneas celulares de cáncer humano, en las que la sobreexpresión de ZEB1 puede inducir la EMT y promover metástasis en múltiples líneas celulares, tales como cáncer de mama, cáncer de colon y líneas de células de cáncer de pulmón [1, 3]. En línea con

estos resultados, se ha reportado que la depleción de ZEB1 en la línea celular de cáncer de mama humano MDA-MB-231 da lugar al incremento de aproximadamente 200 genes y la disminución de aproximadamente 30 genes, la mayoría de los cuales son determinantes de la diferenciación epitelial y la adhesión celular [80].

Si bien las propiedades de ZEB1 para dirigir el programa EMT están vinculadas a la modulación de E-cadherina, hay evidencia que también tendría la capacidad de modular la expresión de otros marcadores epiteliales como P-cadherinas, R-cadherinas, marcadores epiteliales implicados en la polaridad celular (ej. CRB3, HUGL2, PATJ), componentes de uniones estrechas (ej. occludina, claudinas, JAM1, ZO), uniones comunicantes (ej, conexinas 26 y 31) y desmosomas (ej. desmoplaquina, placofilina) [1, 3, 80, 81]. A su vez se ha reportado que ZEB1 sería capaz de activar la expresión de genes mesenquimales como vimentina y N-cadherina. Sin embargo, los mecanismos subyacentes a esta activación transcripcional no han sido identificados [1, 3, 82]. En carcinoma colorrectal se ha reportado que ZEB1 regula también los componentes de la membrana basal, cuya ruptura es un paso clave en la invasión tumoral. Por ejemplo, el silenciamiento de ZEB1 regula positivamente la cadena $\alpha 3$ de la laminina 5 (LAMA3) y la cadena $\alpha 2$ del colágeno IV (COL4A2) [76]. Por otra parte, ZEB1 aumenta el potencial tumorigénico de células en varios tipos de cánceres humanos mediante la inhibición de la expresión de microARNs de la familia miR-200 [43].

2.4 Vías de transducción de señales involucradas en la regulación del programa EMT y el factor de transcripción ZEB1

Se han identificado numerosos factores de crecimiento inductores de la EMT, dentro de los cuales se destacan TGF- β , el factor de crecimiento epidérmico (EGF, del inglés **E**pidermal **G**rowth **F**actor) e IGF-1. Estos factores de crecimiento parecen ser responsables de la inducción o activación funcional de los FT-EMT, especialmente de Snail, Slug, ZEB1 y Twist. Una vez expresados y activados, cada uno de estos FT puede actuar pleiotrópicamente para coreografiar el complejo programa EMT. Sin embargo, la implementación efectiva del programa EMT depende de una serie de redes de señalización intracelular que implican a otras proteínas de transducción de señales como MAPK, ERK, PI3K, AKT, Smads y β -catenina [57, 61, 83, 84]. En la figura 6 se

resumen las vías de transducción de señales y factores de crecimiento implicados en la regulación del programa EMT que resultan más relevantes en el desarrollo de esta Tesis Doctoral. Dada la gran complejidad de cada una de estas vías, solo una breve introducción de cada una de ellas se llevará a cabo cuando resulte relevante en las secciones de resultados y discusión.

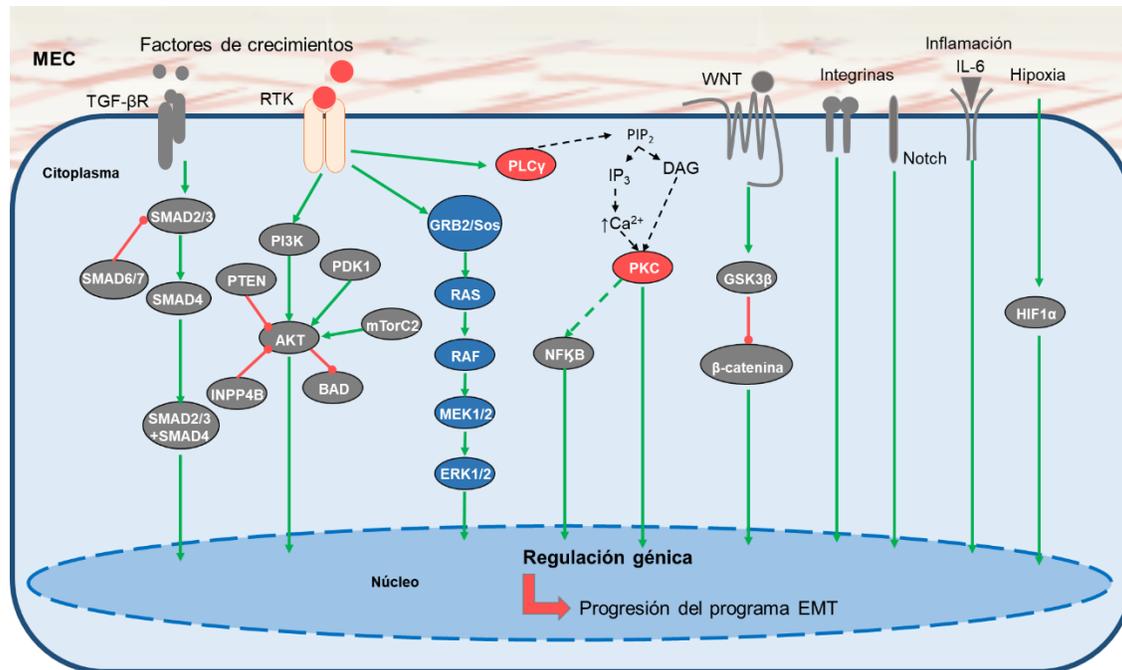


Figura 6: Principales vías de señalización involucradas en el programa EMT.

La progresión del programa EMT se regula mediante diversas vías de señalización que pueden cooperar para inducir respuestas de la EMT parcial o completa. Adaptado de [61, 85].

- **Participación de la vía de IGF-1/IGF-1R en la regulación del programa EMT y el factor de transcripción ZEB1**

Dentro de los factores de crecimiento capaces de activar a receptores tirosina quinasa (RTK, del inglés Receptor Tyrosine Kinase) y regular el programa EMT, resulta de particular relevancia para el desarrollo de esta Tesis Doctoral el factor de crecimiento IGF-1. El sistema del factor de crecimiento similar a insulina (IGF) consiste en tres ligandos: la insulina y los factores

de crecimiento similar a la insulina tipo 1 y 2 (IGF-1 e IGF-2); tres receptores: los receptores del factor de crecimiento similar a la insulina 1 y 2 (IGF-1R e IGF-2R, del inglés **Insulin-like Growth Factor-1 Receptor** e **Insulin-like Growth Factor-2 Receptor**) y el receptor de insulina (IR, del inglés **Insulin Receptor**), del cual existen dos isoformas IRA e IRB; y una familia de seis proteínas de unión a IGF-1 de alta afinidad (IGFBPs) [86]. IGF-1R es un RTK que regula el crecimiento, el desarrollo y el metabolismo por unión de los ligandos de IGF-1. Particularmente la activación de IGF-1R da como resultado la fosforilación intrínseca del receptor y la activación de las proteínas adaptadoras IRS-1 (IRS-1, del inglés **Insulin Receptor Substrate 1**) y Shc, conduciendo a la activación de dos vías de señalización: *IRS-1 / PI3K / Akt* y *Ras / Raf / ERK* [85, 87, 88].

Si bien los efectos de la señalización de IGF-1R en la biología del cáncer son duales, un cuerpo creciente de evidencias indica que la señalización a través de IGF-1R también está implicada en la metástasis ligada al programa EMT y en la resistencia a tratamientos antitumorales. El señalamiento a través de IGF-1R se torna aberrante en determinados tumores por cuatro razones principales: incremento en la producción autocrina del ligando, sobreexpresión del receptor, transducción de señales por unión de ligando y el entrecruzamiento entre vías de señalización [87]. Curiosamente, la EMT a su vez puede desencadenar una producción autocrina de IGF-1 [89]. Además, una expresión incrementada de IGF-1R se observa en un 80% de los pacientes con cáncer de pulmón y cerca del 90% de los pacientes con cáncer de mama [87]. La sobreexpresión de IGF-1R promueve los comportamientos migratorios e invasivos de las líneas celulares de cáncer de mama triple negativo [90].

Se ha reportado que IGF-1 es capaz de inducir el programa EMT en algunos modelos de cultivo celular. La activación de IGF-1R provoca la EMT en células epiteliales mamarias, dando como resultado la pérdida de E-cadherina, y la ganancia de N-cadherina, vimentina y fibronectina [91]. En cáncer de próstata se ha demostrado que la activación de ERK por estímulos con IGF-1 resulta en la regulación de la expresión de ZEB1, lo que induce la progresión de la EMT [74]. De manera similar, IGF-1 induce altos niveles de ARNm de ZEB1 en estadios avanzados de carcinomas de endometrio y ovario [30]. Otros estudios han demostrado que tanto la vía de AKT como la vía de ERK se encuentran parcialmente involucradas en la inducción de la EMT por IGF-1 en cáncer gástrico. En este caso, la inhibición o silenciamiento de las vías AKT y/o ERK revierten

de manera parcial el programa EMT inducido por IGF-1. Esto se logra a través del incremento de la expresión de los microARN 200c, los cuales tienen como blanco a miembros de la familia ZEB [92]. En coincidencia trabajos previos del laboratorio han reportado que la proteína matricelular CCN6 (WISP3, del inglés **WNT1-Inducible-Signaling pathway Protein 3**) regularía la expresión de ZEB1, modulando así el programa EMT y la invasión del cáncer de mama mediante la señalización de IGF-1 en líneas celulares de cáncer de mama [79].

- **El vínculo entre PKCs con la progresión tumoral y el programa EMT.**

Las PKCs, constituyen una clase de serina/treonina quinasas que regulan diversas funciones celulares a través de la fosforilación de las proteínas blanco. Estas funciones celulares comprenden una amplia variedad de procesos fisiológicos fundamentales, incluyendo transducción de señales, modulación de la expresión génica, proliferación, apoptosis y diferenciación [93-96]. Si bien las PKCs han sido pobremente relacionadas con la regulación del programa EMT, han sido claramente vinculadas con la regulación del comportamiento migratorio e invasivo, consecuencias funcionales del programa EMT. Por lo tanto, es altamente probable que estas vías estén entrecruzadas en algún grado [95-97].

Las PKCs adquirieron gran relevancia en oncología cuando se descubrió que un subgrupo de PKCs se activan por ésteres de forbol, conocidos agentes promotores de tumores [93]. La complejidad en la señalización por la vía de PKC surge del hecho de que PKC es una multifamilia de quinasas estructuralmente relacionadas con diversas funciones biológicas. De hecho, las PKCs de mamíferos abarcan 10 miembros que representan los productos de nueve genes diferentes localizados en distintos cromosomas. Las isoenzimas PKCs se clasifican en base a sus características estructurales y regulatoria en tres grupos: **PKCs “clásicas” (cPKCs)**: que están compuestos de PKC α , dos variantes de empalme de PKC β (PKC β I y PKC β II) y PKC γ ; **PKCs “noveles” (nPKCs)**: un grupo que incluye PKC δ , PKC ϵ , PKC η y PKC θ ; y **PKCs “atípicas”**: (aPKCs) ζ e ι (λ) (Fig. 7) [93-96].

Mientras que PKC α , δ y ϵ se expresan ampliamente y de manera ubicua en diversos tipos celulares, la expresión de otros parálogos de PKCs es en gran parte de tipo celular específico. Sólo hay un número limitado de casos en los que se vinculan mutaciones en las isoenzimas de PKCs

con fenotipos transformados. Sin embargo, se han reportado cambios en los niveles de expresión o estado de activación de isoenzimas de PKCs en numerosos cánceres humanos, y en muchos casos se ha descrito una correlación entre los niveles elevados de PKCs y grado de agresividad [93, 95, 96]

El aumento de la producción intracelular de Ca^{2+} y diacilglicerol (**DAG**) son pasos clave para la activación de PKC clásicas [98, 99]. En la membrana, las PKCs sufren un cambio conformacional que expone sitios de unión para sustratos y proteínas de anclaje/andamiaje y resulta en la activación de la quinasa. Las PKCs también experimentan una serie de eventos de trans-fosforilación de serina/treonina y autofosforilación que se requieren para la maduración, activación y estabilidad de la quinasa [98, 99]. En respuesta a los ésteres de forbol o a la estimulación de RTK, las isoenzimas de PKC pueden redistribuirse a la membrana nuclear o a organelas tales como las mitocondrias o el aparato de Golgi. Aunque esta redistribución diferencial es clave para dictar el acceso a sustratos específicos de isoenzimas y conferir selectividad funcional, los mecanismos que dirigen la localización no se entienden completamente. Dos de los principales eventos aguas abajo de la activación de PKCs incluyen la activación de las vías de MEK/ERK y PI3K/AKT [93, 95, 96, 98, 99].

La motilidad y la capacidad invasiva también son moduladas por la expresión y/o activación de PKCs. En este sentido, la sobreexpresión de PKC α puede contribuir al aumento del crecimiento independiente del anclaje, capacidad tumorigénica y metástasis, mientras que la sobreexpresión de PKC β II da lugar a un aumento de la capacidad invasiva, posiblemente a través del aumento de la activación de Ras y MEK. Por otro lado, la inhibición de PKC ϵ conduce a una disminución de la motilidad y la invasión, así como a una reducción en el crecimiento del tumor y el desarrollo de metástasis. Del mismo modo, la sobreexpresión de PKC ϵ aumenta la capacidad de las células para crecer independientemente del anclaje al sustrato y aumenta la incidencia y el número de metástasis pulmonares de las células de cáncer de mama. La regulación negativa de PKC δ se ha asociado con una mayor capacidad invasiva en células cancerígenas, a través del aumento de la secreción de proteasas, y lo contrario se observa tras la sobreexpresión de esta isoenzima de PKCs [94-96].

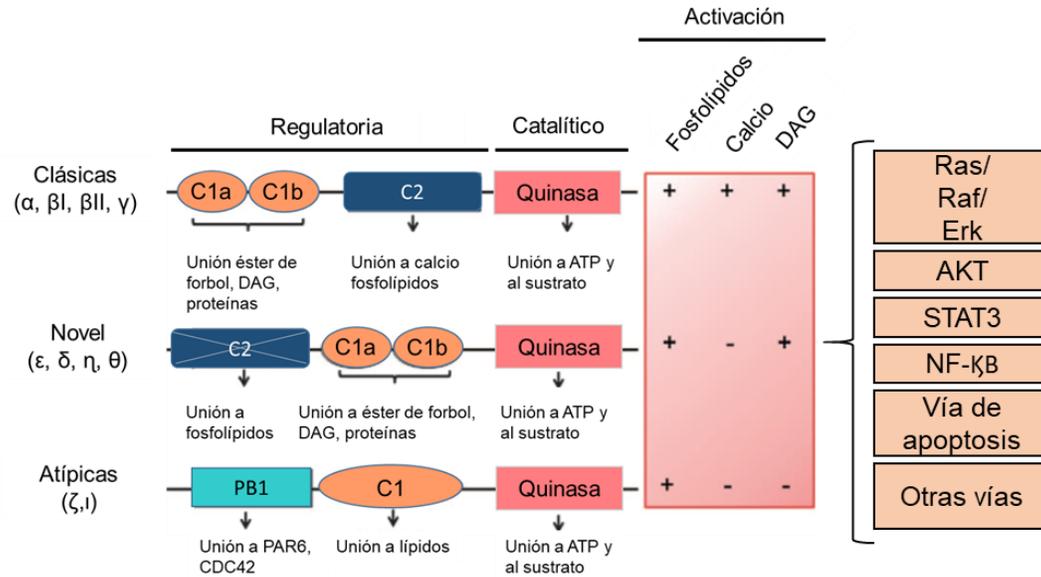


Figura 7: Estructura de isoenzimas de PKCs.

Representación esquemática de las diferentes isoenzimas de PKCs. Las PKCs son proteínas multidominio que están reguladas por lípidos e interacciones proteína-proteína. El DAG generado en la activación de los receptores provoca la activación de cPKCs y nPKCs, y sus acciones son imitadas por ésteres de forbol. Las aPKCs no responden a los ésteres de forbol o DAG. Las PKCs activan vías de transducción de señales que regulan la tumorigénesis y la metástasis. Adaptado de [95]

HIPÓTESIS Y OBJETIVO

Las decisiones de destino celular son reguladas por diversos factores, los cuales activan programas de transcripción que especifican linaje y estado de diferenciación. Esta capacidad es crítica para el desarrollo embrionario normal, pero cuando se recapitula en el adulto puede contribuir a la aparición de tumores. Un claro ejemplo es el programa EMT, el cual es un proceso esencial de la embriogénesis, así como también un evento crítico en la progresión del cáncer.

Durante el programa EMT, factores del medio extracelular (TGF- β , IGF-1, Wnt, etc.) y del medio intracelular (FT y/o vías de señalización que responden a señales externas) redirigen el fenotipo de las células epiteliales a células de expresión mesenquimal. Entre los factores intracelulares mencionados anteriormente, se destaca ZEB1.

Aunque se ha demostrado que ZEB1 tiene una activa participación en la inducción de la EMT en tumores epiteliales, existen pocos reportes respecto a las señales que regulan a ZEB1 durante el programa EMT.

Hipótesis: La función de ZEB1 es regulada a distintos niveles (transcripcional, postranscripcional, traduccional y postraduccional) y por elementos presentes en el entorno intracelular o extracelular, cuyo desbalance conlleva al disparo del programa EMT, promoviendo la migración, invasión y progresión tumoral.

Objetivo general: Caracterizar los mecanismos moleculares y las vías de transducción de señales que tienen impacto sobre la regulación funcional de ZEB1 y su relevancia en el programa EMT y la progresión tumoral.

Objetivo específico N° 1: Caracterizar la región N-terminal de ZEB1 en su rol como modulador del programa EMT.

Objetivo específico N° 2: Identificar las vías de transducción de señales involucradas en la regulación de la función biológica de ZEB1 durante el programa EMT.

Objetivo específico N° 3: Evaluar la participación de la vía de PKCs en la regulación de la función biológica de ZEB1 en líneas celulares de cáncer de mama, estudiando fenotipos asociados a la progresión tumoral.

RESULTADOS

CAPÍTULO I: CARACTERIZACIÓN DE LA REGIÓN N-TERMINAL DE ZEB1 EN SU ROL COMO MODULADOR DEL PROGRAMA EMT

En un esfuerzo por identificar factores claves de la regulación funcional de ZEB1, y basándose en la existencia de formas hipo e hiper fosforiladas de ZEB1, se estudiaron de manera separada los dominios C y N-terminal de dicho FT. En primer lugar, en un trabajo conjunto, realizado con la Dra. Guadalupe Lorenzatti, se identificaron y caracterizaron funcionalmente 4 sitios clave de fosforilación de la región C-terminal de ZEB1 denominada ZD2, así como las vías de transducción de señales implicadas (MEK/ERK y PKC) en su regulación en un contexto celular no transformado [48]. El primer objetivo de esta tesis fue caracterizar de manera similar el dominio N-terminal de ZEB1, para lo cual se realizó un estudio detallado de su funcionalidad y regulación, como será desarrollado en las secciones siguientes.

1. Participación de vías de transducción de señales en la regulación de la región N-terminal de ZEB1

1.1 Efectos de la región N-terminal de ZEB1 sobre sus genes blanco

Con el objetivo de disectar la regulación de ZEB1 y determinar la unidad mínima funcional y regulable del FT se utilizaron 3 construcciones de ZEB1 de diferentes tamaños y dominios estructurales (**Fig. 8 A**), ZD1HD de 741 amino ácidos (aa), que contiene el grupo de dedos de zinc N-terminal (ZD1) y el homeodominio central (HD); ZD1L de 379 aa que contiene la región ZD1 completa y ZD1S de 130 aa que contiene el grupo de dedos de zinc ZD1 incompleto, debido a que comprende los tres primeros dedos de zinc de los cuatro que componen esta estructura. Estos dos últimos constructos tienen la ventaja de estar fusionados a la proteína verde fluorescente (**GFP**, del inglés **Green Fluorescent Protein**), lo que facilita su visualización por microscopía de fluorescencia. Estas construcciones fueron generadas por la Dra. Cabanillas y el Dr. Douglas S. Darling (University of Louisville, KY, USA), tal como se especifica en el apartado de materiales y métodos.

Dada la capacidad de ZEB1 wt de reprimir al promotor de E-cadherina [4] y su propio promotor [14], se evaluó la capacidad de las diferentes construcciones disponibles (ZD1HD, ZD1S

y ZD1L) de regular la transcripción de ambos promotores mediante ensayos de genes reporteros. Células CHO-K1 y HEK293T fueron co-transfectadas con el promotor de E-cadherina (**Fig. 8 B y D**) o de ZEB1 (**Fig 8 C y E**), ambos fusionados al reportero luciferasa. Se utilizaron ZEB1, ZD1HD, ZD1L, ZD1S o el vector vacío (control) en conjunto con el plásmido de normalización CMV- β (promotor CMV acoplado al gen de la enzima β -galactosidasa). La actividad transcripcional fue determinada como porcentaje de actividad luciferasa relativa a la condición control (vector), que fue considerada como 100%. Tanto la actividad de promotor de E-cadherina como la del promotor de ZEB1 fueron reprimidas hasta un 75% con la sobreexpresión de los constructos utilizados (**Fig. 8 B-E**). No se observaron diferencias significativas en el nivel de represión ejercido por ZEB1 y las diferentes construcciones de la región N-terminal de ZEB1 (ZD1HD, ZD1L y ZD1S). Estas observaciones indican que los diferentes fragmentos de la región N-terminal de ZEB1 conservan la misma capacidad de reprimir a sus genes blanco, siendo ZD1S la mínima porción de ZEB1 evaluada que conserva actividad como represor transcripcional.

1.2 Vías de transducción de señales involucradas en la fosforilación de la región N-terminal de ZEB1

Una vez determinada la funcionalidad de las construcciones N-terminales de ZEB1, se abordó el estudio de su regulación por fosforilación. En primer lugar, se realizó un análisis *in silico* de la región N-terminal de ZEB1 utilizando las bases de datos KinasePhos y NetPhos 3.1 [100-102]. Se identificaron numerosos sitios putativos de fosforilación con una alta probabilidad de ocurrencia para diferentes serinas/treoninas (S/T) quinasas, dentro de las cuales se destacan la familia de las PKCs, proteínas quinasas A (**PKA**), MAPK, la quinasa dependiente de ciclina 2 (Cdc2, del inglés **Cell Division Control Protein 2** homolog), caseinas quinasas I y II (**CKI y II**, del inglés **Casein Kinase**) y la quinasa Ataxia Telangiectasia Mutada (**ATM**, del inglés **Ataxia-Telangiectasia Mutated**) (**Tabla I**).

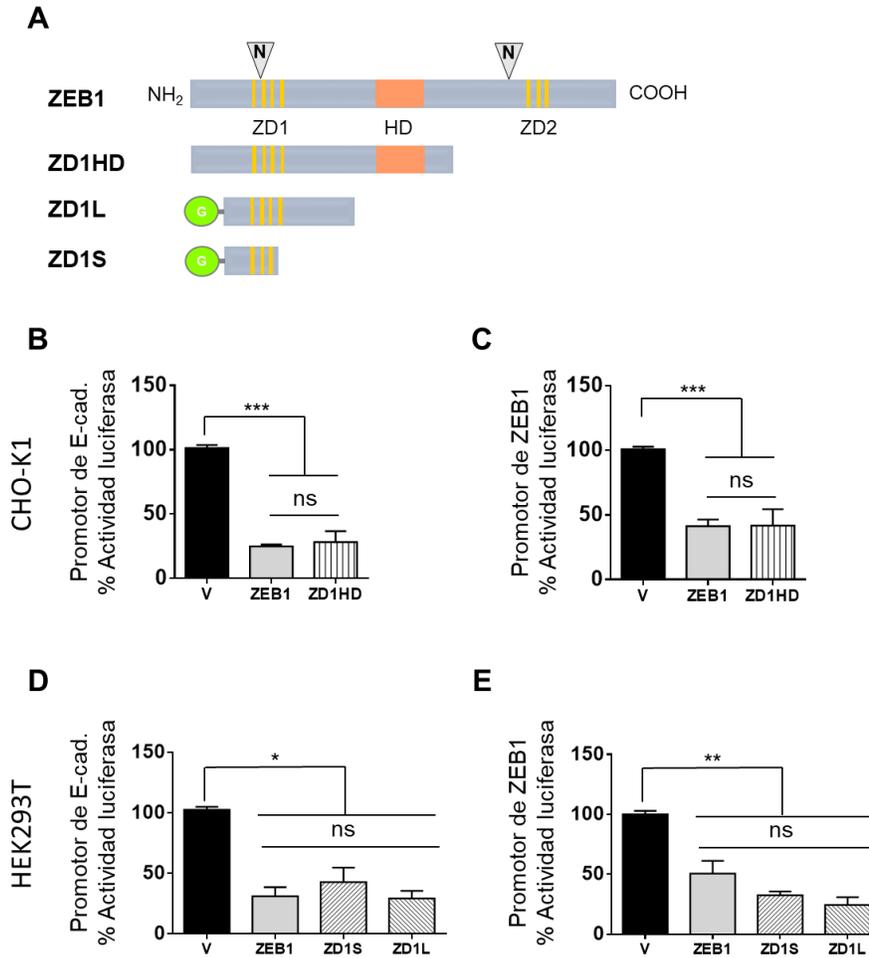


Figura 8: Los sub-clones de la región N-terminal de ZEB1 conservan el mismo efecto transcripcional de ZEB1 wt sobre sus genes blanco.

(A) Estructura de ZEB1 wt y los diferentes sub-clones de la región N-terminal de ZEB1 utilizados. Se indican los grupos de dedos de zinc (ZD1 y ZD2), el Homeodominio (HD) y la señal de localización nuclear (N). La estructura ZEB1 representa los 1117 aa de la proteína completa (wt). ZD1HD de 741 aa contiene ZD1 y HD; ZD1L de 379 aa, contiene el grupo de dedos de zinc ZD1 y ZD1S de 130 aa contiene el grupo de dedos de zinc ZD1 incompleto, con 3 de los 4 dedos de zinc que comprenden ZD1. Todos los sub-clones conservan la señal de localización nuclear. Ensayos de genes reporteros en células CHO-K1 y HEK293T co-transfectadas de manera transitoria con promotores respondedores a ZEB1 unidos al reportero luciferasa, E-cadherina (B y D) y ZEB1 (C y E) y vectores de expresión plasmídico para ZEB1, ZD1HD, ZD1L, ZD1S o el vector vacío (V) en conjunto con el plásmido de normalización CMV- β . La actividad transcripcional se expresa como porcentaje de actividad luciferasa relativa a la actividad del promotor con el vector vacío (100%). Los resultados se expresan como media \pm Desviación Estándar (DE). La diferencia entre las medias fue analizada por ANOVA y test de Bonferroni. *** $p \leq 0,001$. ** $p \leq 0,01$, * $p \leq 0,05$. Figura representativa de tres experimentos independientes (n=3).

Residuo de aminoácidos de ZEB1	Secuencia	Base de datos	Puntuación	Proteínas quinasas putativas
S-31	VEANSDSDD	NetPhos 3.1	0.995	
S-33	ANSDSDDDED	KinasePhos		CKII/ CKI/ATM
		NetPhos 3.1	0.977/0.742	CKII
S-46	VEEESVTDA	KinasePhos		CKI
		NetPhos 3.1	0.996	
S-94	DECSDAEN	KinasePhos		CKI/CKII
		NetPhos 3.1	0.976/ 0.739	CKII
T-131	QRQGTPEAS	KinasePhos		MAPK/PKA
		NetPhos 3.1	0.947	
T-142	DDNGTPDAF	KinasePhos		MAPK
T-163	YKRFTSLKE	NetPhos 3.1	0.721	PKC
S-164	KRFTSLKEH	KinasePhos		PKA
		NetPhos 3.1	0.997/0.718	PKA
T-200	ERHMTSHKS	KinasePhos		PKC
		NetPhos 3.1	0.959	
T-212	QRHVTQSGG	KinasePhos		PKA
T-214	HVTQSGGNR	NetPhos 3.1	0.895	PKC
S-265	GSYSSHISS	NetPhos 3.1	0.822	PKC
S-269	SHISSKICI	NetPhos 3.1	0.877	PKC
S-288	SGLKTSQCS	NetPhos 3.1	0.737	PKC
T-289	GLKTSQCSS	KinasePhos		ATM/IKK
		NetPhos 3.1	0.868	
S-293	SQCSSPMLS	KinasePhos		cdc2/CDK
T-298	PSLSTSPGS	NetPhos 3.1	0.752	PKC
S-299	SLSTSPGSP	KinasePhos		IKK/cdc2/MAPK/CDK/ATM
		NetPhos 3.1	0.986/0.737	cdk5
S-302	TSPGSPTRP	KinasePhos		cdc2/IKK
		NetPhos 3.1	0.994/0.713	cdk5
S-322	QEPLSVNQL	KinasePhos		ATM
S-366	QATSSPQGV	KinasePhos		cdc2/CDK
T-378	VVLPTVGLV	NetPhos 3.1	0.721	PKC
S-485	KSCCKSEKSP	KinasePhos		IKK
		NetPhos 3.1	0.996	
S-545	PAPATEKPE	KinasePhos		MAPK
S-550	EKPESSASS	KinasePhos		CKII/IKK
S-553	ESSASSAGN	KinasePhos		CKII/IKK
S-561	NGDLSPSQP	KinasePhos		ATM
S-563	DLSPSQPPL	KinasePhos		ATM
S-624	LEPPSPGPG	KinasePhos		MAPK/cdc2/ ATM
S-657	TRGQSPLKM	KinasePhos		cdc2
S-664	KMTSSPVLP	KinasePhos		cdc3
S-681	RSCTSSPSP	KinasePhos		CKI /IKK
S-682	SCTSSPSPL	KinasePhos		cdc2
S-684	TSSPSPLNL	KinasePhos		cdc2
S-689	PLNLSSARN	KinasePhos		cdc2

Tabla 1: Análisis *in silico* de sitios de fosforilación de la región N-terminal de ZEB1.

Sitios de fosforilación predichos para la secuencia de ZD1HD de rata empleando 2 programas diferentes: KinasePhos [100] y NetPhos 3.1. Para NetPhos 3.1[101, 102] se muestran los sitios de mayor puntuación, KinasePhos fue utilizado con una especificidad del 100% aplicando criterios de selección positivos.

Con la finalidad de validar experimentalmente las predicciones obtenidas mediante el análisis *in silico* se realizaron ensayos de inmunoprecipitación (IP) para ZEB1, los cuales se revelaron con diferentes anticuerpos anti-fosfo substratos específicos de quinasas. Estos anticuerpos reconocen serinas y/o treoninas fosforiladas en sitios consenso específicos de quinasas (por ejemplo el anticuerpo contra fosfo substrato MEK/ERK, reconoce serinas fosforiladas seguidas de una prolina (S*P), una región consenso de las MAPK, ERK 1,2). Células HEK293T fueron transfectadas de manera transitoria con el vector de expresión de ZD1HD. Los extractos celulares totales fueron inmunoprecipitados con anticuerpos anti-ZEB1 y revelados por **Western Blot (WB)** con diferentes anticuerpos anti-fosfo-substratos específicos de quinasas (**Fig. 10**).

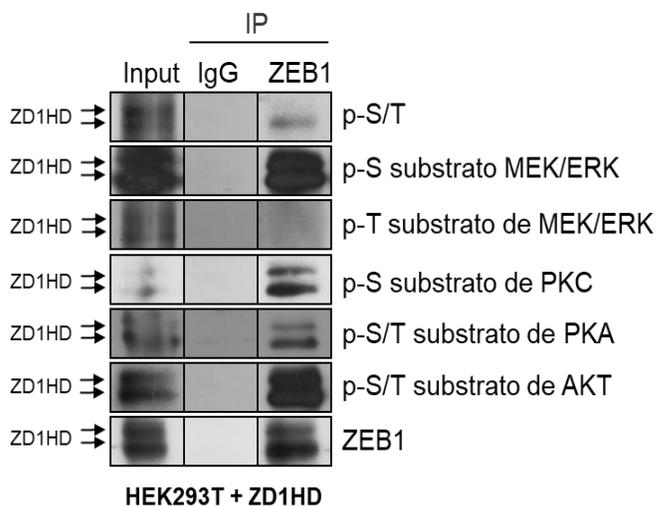


Figura 10: Vías de señalización celular involucradas en la fosforilación de la región N-terminal de ZEB1.

Células HEK293T fueron transfectadas con el vector de expresión de ZD1HD, los extractos celulares totales fueron inmunoprecipitados con anticuerpo anti-ZEB1 o anticuerpo anti-IgG como control y revelado por WB con anticuerpos anti-fosfo-S/T (p-S/T); anti-fosfo S substrato MEK/ERK; anti-fosfo T substrato de MEK/ERK; anti-fosfo S substrato de PKC; anti-fosfo S/T substrato de PKA; anti-fosfo S/T substrato de AKT o anti-ZEB1. Figura representativa de tres experimentos independientes.

Los resultados revelaron la presencia de serinas y/o treoninas fosforiladas por la vía de las MAPK MEK/ERK, la familia de quinasas PKCs, PKA y la quinasa AKT. Estos resultados, si bien validan las predicciones del análisis *in silico*, revelan un nivel de complejidad inesperado en la regulación por fosforilación del extremo N-terminal de ZEB1. Esta alta densidad de sitios de fosforilación, en combinación con la identificación de múltiples quinasas regulatorias, complica el estudio de la regulación de esta región mediante estudios clásicos de mutagénesis sitio dirigida, tal como se realizó en el estudio del fragmento C-terminal de ZEB1 [48]. De hecho, si

solo se considerara mutar los sitios de alto score detallados en la tabla I, se requerirían más de 30 mutaciones en un fragmento relativamente corto. Con lo cual, incluso de obtener estos mutantes, sería improbable que tal construcción mantenga su estructura y funcionalidad. Por lo tanto, en esta instancia se decidió que no era estratégicamente adecuado continuar con la caracterización de estos sitios por mutagénesis sitio dirigida. En secciones posteriores de esta Tesis Doctoral se aborda nuevamente esta problemática con otro tipo de estrategia, con particular atención en la familia de quinasas PKCs.

2. Rol de la región N-terminal de ZEB1 en el programa EMT

Para abordar el estudio de la región N-terminal de ZEB1 en el desarrollo del programa EMT, se utilizó una línea celular proveniente de epitelio mamario murino no transformado (**NMuMG**), la cual fue seleccionada principalmente por su plasticidad para activar el programa EMT al ser estimuladas con TGF- β . Si bien este fenómeno ha sido bien reportado para esta línea y es un modelo celular ampliamente utilizado en la bibliografía para el estudio de la EMT, las vías de transducción de señales aguas abajo del factor TGF- β que modulan el programa EMT, aún no se conocen en detalle [20, 103, 104]. Dado que NZEB1 representó la fracción más pequeña de ZEB1 identificada capaz de reprimir a su gen blanco E-cadherina; se planteó la hipótesis de que la sobreexpresión de la región N-terminal de ZEB1 en la línea celular NMuMG es capaz de activar el programa EMT, contribuyendo de esta manera a la adquisición de un fenotipo celular transformado e invasivo.

2.1 Inducción del programa EMT por TGF- β en células NMuMG

Para comenzar se confirmó la plasticidad de las células NMuMG para activar el programa EMT mediante tratamientos con TGF- β (5ng/ml) a diferentes tiempos, tal como se describe en la bibliografía [20, 103] (**Fig. 11**). La valoración fenotípica mediante un examen microscópico de las células NMuMG reveló una marcada alteración en la morfología celular después de la exposición a TGF- β por 96 horas, lo cual resulta compatible con la activación del programa EMT. Las células NMuMG no tratadas mostraron aspecto de cubo, característico de células epiteliales, mientras que el tratamiento con TGF- β indujo un cambio fenotípico caracterizado por un alargamiento

celular y la adquisición de la morfología ahusada característica de células mesenquimales (**Fig. 11 A**).

La activación de la EMT se corroboró a nivel molecular, donde se evaluó por WB la expresión de E-cadherina en correlación con la expresión de ZEB1. Los resultados revelaron una disminución gradual en la expresión del marcador epitelial E-cadherina, dependiente del tiempo de exposición a TGF- β , que fue acompañada por un incremento gradual en la expresión de ZEB1 (**Fig. 11 B**).

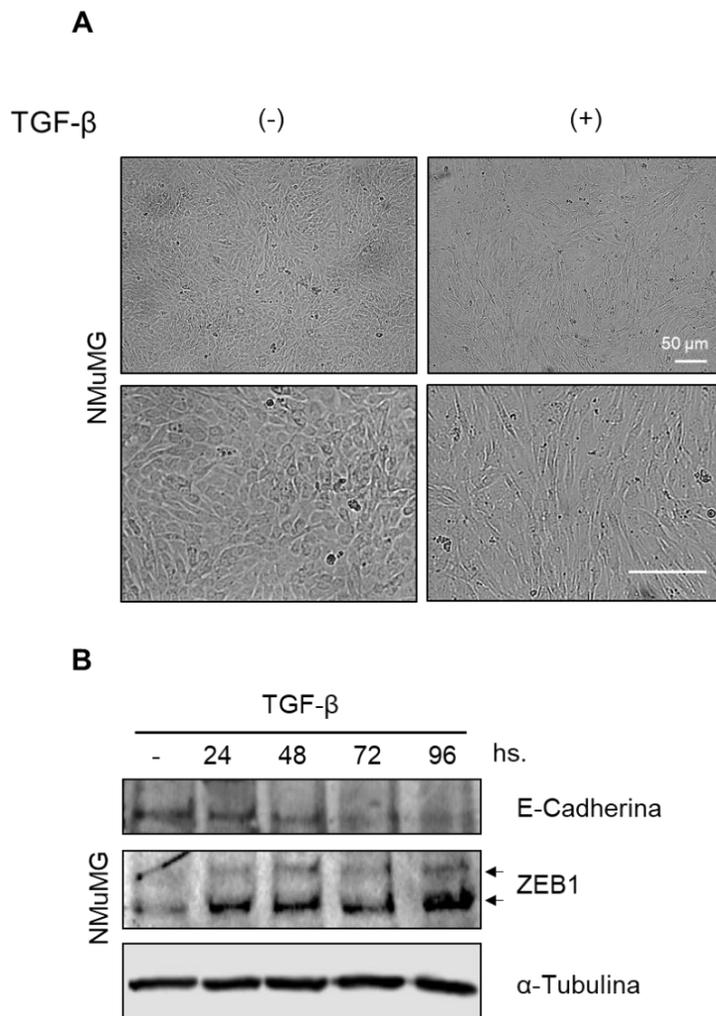


Figura 11: Inducción del programa EMT por TGF- β en células NMuMG.

(A) Valoración fenotípica mediante microscopía de contraste de fase de células NMuMG tratadas por 96 horas, con o sin con TGF- β (5 ng/ml). Magnificación: 100X (panel superior). En los paneles inferiores se muestran una magnificación de la imagen original. Barra= 50 μ m. (B) Células NMuMG fueron tratadas con TGF- β (5 ng/ml) por los tiempos indicados, a partir de los extractos proteicos totales se analizó por WB la expresión de E-cadherina y ZEB1, los niveles de α -tubulina fueron utilizados como control de carga, las dos flechas indican las formas hipo e hiper fosforiladas de ZEB1. Las imágenes son representativas de dos experimentos independientes.

2.2 Generación de líneas celulares estables con expresión de la región N-terminal de ZEB1

Bajo la hipótesis que la sobreexpresión de la región N-terminal de ZEB1 en la línea celular NMuMG es capaz de activar el programa EMT y con el objetivo de estudiar la participación y la regulación de NZEB1 en dicho programa, se generaron líneas celulares NMuMG con expresión estable de la región N-terminal de ZEB1 y su respectivo control (Vector). Para ello se transfectaron células con los plásmidos, GFP-ZD1S (en adelante NZEB1) o el vector vacío GFP (en adelante Vector). Este vector codifica dos marcadores de selección. Por un lado, expresa el gen de resistencia a G418 que permite selección por este antibiótico, y por otro lado codifica GFP, lo que permite la selección y enriquecimiento por cell sorting. Las subpoblaciones generadas de esta manera se denominaron NMuMG-NZEB1 y NMuMG-Vector respectivamente. Con la finalidad de evaluar y caracterizar la participación de NZEB1 en el programa EMT, se valoraron parámetros morfológicos, moleculares y funcionales que permitieron describir y definir a distintos niveles dicho programa.

2.3 Efecto de NZEB1 sobre la expresión de marcadores morfológicos y moleculares del programa EMT en células NMuMG

La valoración fenotípica mediante el examen con microscopía de contraste de fase reveló que las células NMuMG-Vector mostraron el aspecto de cubo característico de células epiteliales, mientras que las células NMuMG-NZEB1 mostraron un cambio fenotípico caracterizado por la adquisición de una morfología más ahusada, que se corresponde con un fenotipo del tipo mesenquimal (**Fig. 12 A**).

Posteriormente se valoró por microscopía de epifluorescencia la expresión y distribución subcelular de NZEB1, haciendo uso de la señal GFP que contiene el vector de expresión utilizado para la generación de las sub-líneas (**Fig. 12 B**). Mientras que las células NMuMG-Vector presentaron una distribución subcelular principalmente citosólica, las células NMuMG-NZEB1 presentaron una distribución exclusivamente nuclear. La expresión de NZEB1 y ZEB1 endógeno se determinó por WB (**Fig. 12 C**). Este ensayo no solo permitió corroborar la expresión de NZEB1

exógeno (aproximadamente 44 KDa), sino que también determinó que la expresión de ZEB1 endógeno no se modificó por la sobreexpresión de NZEB1, con lo cual es factible atribuir los cambios observados a la expresión de NZEB1 en este sistema. En este punto resulta importante destacar que si bien se describió que ZEB1 tiene propiedades auto-regulatorias, al ser capaz de reprimir a su propio promotor, en este sistema biológico tal efecto no se manifestó a nivel de la expresión proteica de ZEB1.

El evento característico que permite definir la activación del programa EMT es la disminución de la expresión del marcador epitelial E-cadherina. Sin embargo, una valoración integral del programa debe contemplar también la inducción de marcadores mesenquimales, por ejemplo, vimentina. El análisis de la expresión proteica de E-cadherina y su cuantificación (**Fig. 12 C**) evidenciaron una drástica caída de esta molécula de adhesión en células NMuMG-NZEB1. Esta caída fue incluso más pronunciada que la disminución de E-cadherina observada en la inducción de la EMT por TGF- β en NMuMG (**Fig. 11B**). Sin embargo, la expresión del marcador mesenquimal vimentina no resultó afectada por la expresión exógena de NZEB1, ya que ninguna de las dos sublíneas (Vector y NZEB1) lo expresaron en manera detectable, en este punto la línea celular MCF7 se utilizó como control positivo de expresión de vimentina (**Fig. 12 D**). Probablemente ZEB1 no esté involucrado en la regulación de este marcador mesenquimal, o su inducción por parte de ZEB1, puede ser dependiente del contexto celular o del estado de activación de determinadas vías de transducción de señales [27].

La expresión y localización subcelular de E-cadherina se corroboró mediante ensayos de microscopia de fluorescencia confocal (**Fig.13**). Además de la disminución en la expresión de E-cadherina, producida por degradación y/o represión transcripcional de la misma, también es común que durante la EMT se observe la relocalización subcelular de esta y otras moléculas de adhesión [61, 67]. La figura 13 muestra que la línea celular NMuMG-Vector presentó una expresión de E-cadherina a nivel de membrana plasmática característica de células epiteliales, evidenciando focos de adhesión celular que se corresponden con estructuras de adhesión celular homotípica. De manera inversa, la línea NMuMG-NZEB1 presentó una drástica caída de la expresión de E-cadherina, evidenciándose solo unos pocos focos de adhesión (**Fig. 13**).

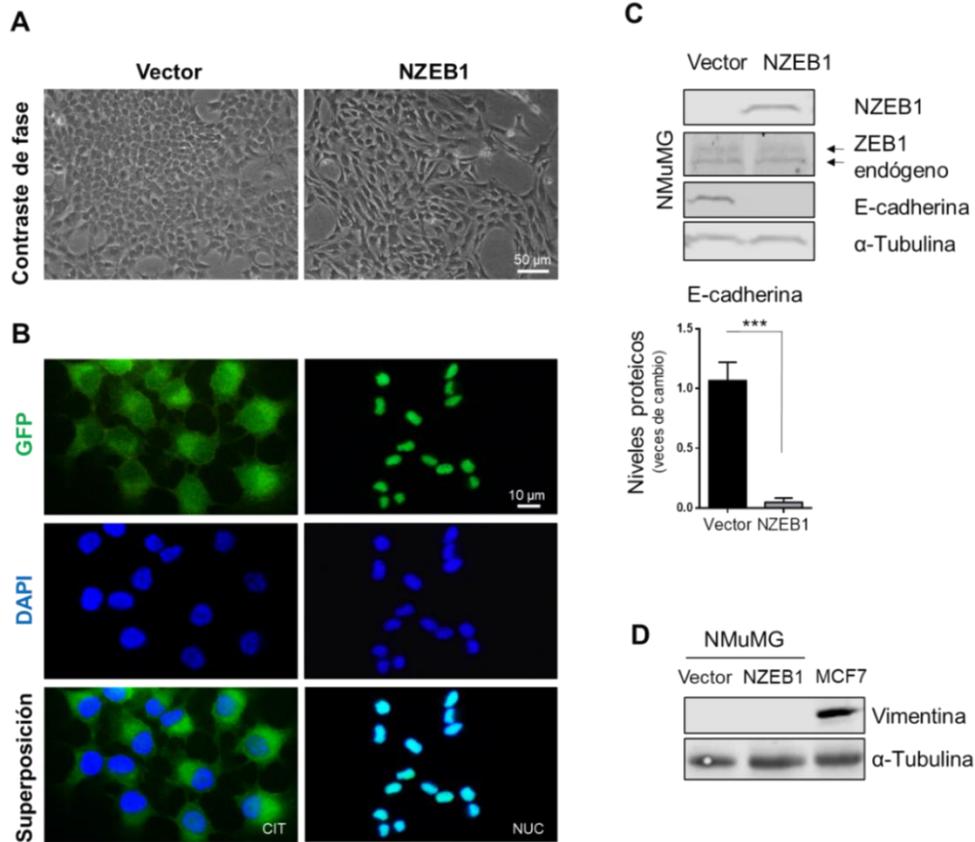


Figura 12: NZEB1 induce el programa EMT en células NMuMG.

Células NMuMG fueron transfectadas de manera estable con eGFP-ZD1S (NZEB1) o con el vector de expresión vacío eGFP (Vector). (A) Valoración fenotípica mediante microscopía de contraste de fase. Magnificación: 200X. Barra= 50 μ m. (B) Microscopía de epifluorescencia, detección de Vector o NZEB1 a través de la señal de la proteína de fusión GFP (señal verde), tinción de núcleos con DAPI (señal azul), en los paneles inferiores se muestran la superposición de los dos canales, indicando la localización subcelular citosólica (CIT) o nuclear (NUC) de la señal GFP. Magnificación=1000X. Barra= 10 μ m. (C) Se determinó por WB la expresión proteica de NZEB1, ZEB1 endógeno y E-cadherina, los niveles de α -tubulina fueron utilizados como control de carga y el gráfico de barras representa la cuantificación de la expresión proteica de E-cadherina normalizada con los valores del control de carga (n=6), las dos flechas representan las formas hipo e híper fosforiladas de ZEB1 endógeno para esta línea celular. (D) Se determinó por WB la expresión proteica de Vimentina, los niveles de α -tubulina fueron utilizados como control de carga, la línea celular MCF7 se utilizó como control positivo (n=3). Las gráficas de barras representan la media \pm DE. La diferencia entre las medias fue analizada por test-t ***p \leq 0,001.

La disminución del marcador epitelial E-cadherina implica una disminución en las uniones célula-célula, que se correlaciona indirectamente con la adquisición de mayor motilidad (parámetro que se evaluó más adelante). Estos resultados sugieren que la sobreexpresión de NZEB1 sería suficiente para inducir cambios moleculares asociados a un estadio intermedio de EMT en células NMuMG, sin la necesidad de intervención de factores externos como TGF- β . Estos cambios involucran una alteración en el fenotipo epitelial de células NMuMG-NZEB1, producida por la caída en la expresión de E-cadherina y redistribución de su localización subcelular, pero sin expresión del marcador mesenquimal vimentina.

2.4 Participación de SNAIL y β -catenina en el programa EMT inducido por NZEB1 en células NMuMG.

La molécula de adhesión β -catenina interactúa con E-cadherina como parte del complejo de unión célula-célula. La desestabilización de las uniones celulares adherentes inducida por la disminución de E-cadherina puede afectar de dos maneras a β -catenina, lo que impactará en su participación en el programa EMT:

- 1) β -catenina citoplasmática puede ser fosforilada por el complejo APC/Axina/GSK-3 y luego degradada por la vía del proteasoma.
- 2) β -catenina citoplasmática puede ser protegida de la degradación, por ejemplo en respuesta a la activación de la vía Wnt, translocando al núcleo, donde se une a los factores de transcripción TCF/LEF para transactivar los genes blancos que median la EMT [27, 61, 105, 106].

Con el objetivo de evaluar la participación de β -catenina en el programa EMT inducido por NZEB1, se determinó por WB e inmunofluorescencia (IF) la expresión y localización subcelular de esta proteína en células NMuMG- Vector y NZEB1 (Fig. 14 A y B). No se evidenciaron cambios en la expresión proteica de β -catenina por WB en presencia de NZEB1 estable, aun cuando estas células presentaron un marcada y significativa disminución de E-cadherina, en comparación con el control (Fig. 14 A). El análisis de la distribución subcelular de β -catenina mediante inmunotinción y microscopia de fluorescencia confocal, mostró una distribución subcelular a nivel de membrana plasmática en células control (Fig. 14 B paneles de la derecha), la cual es similar a la distribución de E-cadherina (Fig. 13) para esta misma condición experimental. Sin embargo, en células NMuMG-NZEB1, la distribución de β -catenina no evidenció una

translocación nuclear, mostrándose principalmente cortical y citosólica (Fig. 14 B, paneles de la derecha). Estos resultados sugieren que, si bien esta molécula no ha sido degradada, tampoco sufrió una translocación a núcleo para desempeñar funciones transcripcionales.

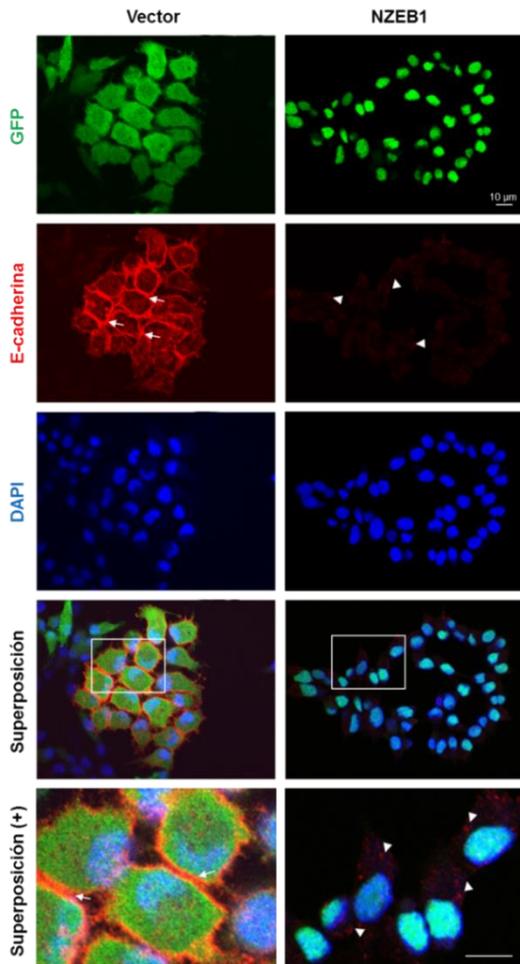


Figura 13: NZEB1 modifica la expresión y localización subcelular del marcador epitelial E-cadherina en células NMuMG.

Se determinó la expresión y localización subcelular de E-cadherina mediante ensayos de inmunofluorescencia seguido de microscopía de fluorescencia confocal en células NMuMG (vector) y (NZE1). Las imágenes revelan la expresión y localización de E-cadherina (rojo), Vector o NZEB1 a través de la señal de la proteína de fusión GFP (verde), y tinción de núcleos con DAPI (señal azul). En los paneles inferiores se muestran las superposiciones de los canales y una magnificación de la imagen original (superposición (+)). Las flechas y puntas de flecha indican la expresión y localización de E-cadherina en NMuMG vector y NZEB1 respectivamente. Magnificación= 600X. Barra= 10 µm. Las imágenes son representativas de 3 experimentos independientes.

Como se mencionó anteriormente, es sabido que puede existir una cooperación entre los FT-EMT tanto para activar, como para mantener el programa EMT y fenotipos celulares indiferenciados [20, 83]. Con el objetivo de evaluar la participación de otros FT reguladores de la EMT, se valoró por WB la expresión de Snail1 un FT ampliamente estudiado en la literatura y con una importante función en el desarrollo y progreso del programa EMT (Fig. 14C). Los resultados no mostraron diferencias estadísticamente significativas en la expresión proteica del FT Snail1 en células NMuMG-NZE1 en comparación con el control NMuMG-Vector. Si bien experimentos

adicionales serían necesarios para descartar una contribución de Snail1 en este sistema, los resultados sugieren que los cambios de la EMT observados hasta el momento en células NMuMG-NZEB1 estarían principalmente vinculados a la expresión aberrante de NZEB1 sin afectar los niveles de Snail1.

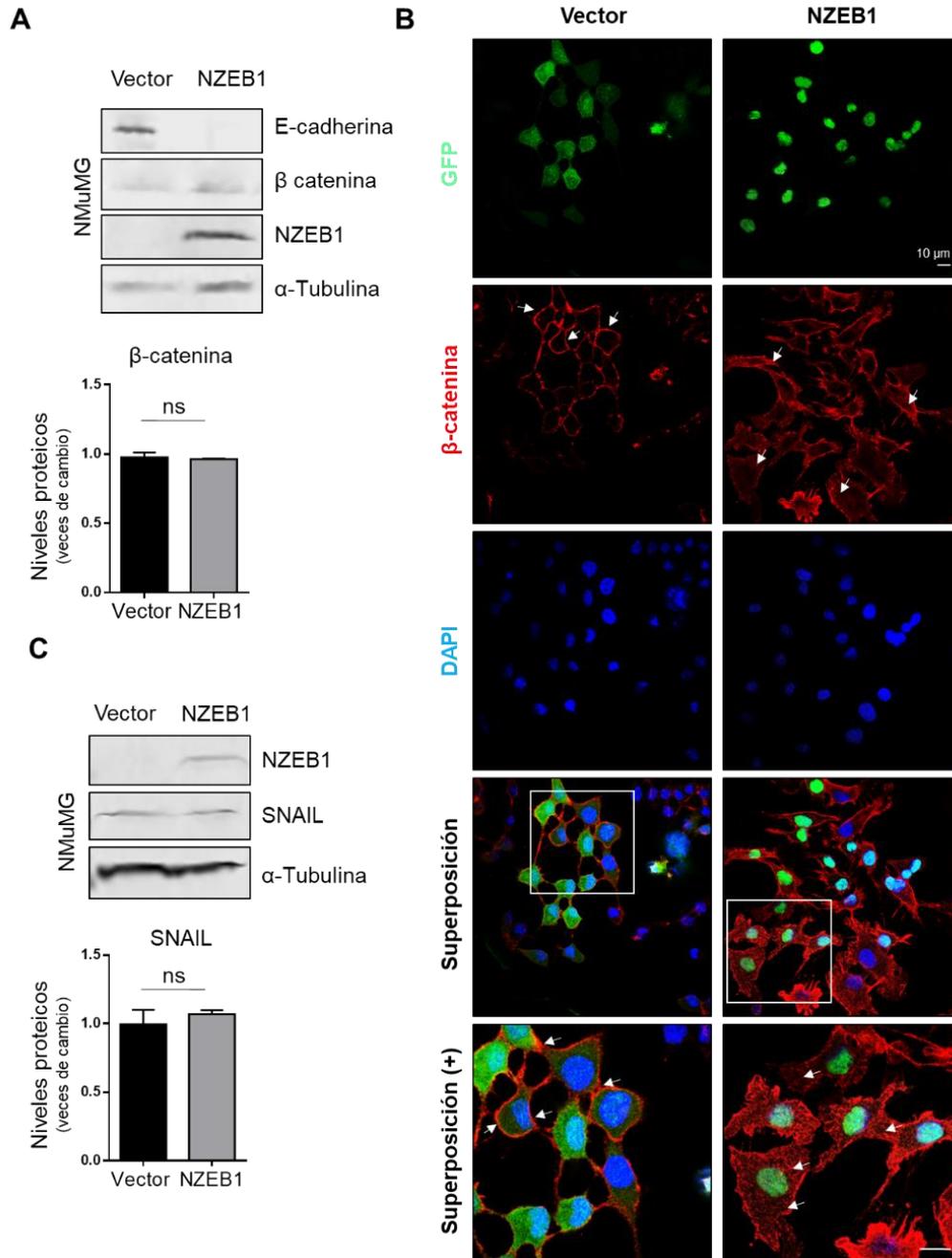


Figura 14: β -catenina y Snail no participan el programa EMT inducido por NZEB1 en células NMuMG.

Se determinó por WB la expresión de β -catenina (A) y Snail (B), NZEB1 y E-cadherina fueron utilizados como control del modelo, α -tubulina fue utilizada como control de carga. Los gráficos de barras representan la cuantificación de la expresión proteica de β -catenina y Snail normalizada con el control de carga y relativizadas al Vector (n=2). Las gráficas de barras representan la media \pm DE. La diferencia entre las medias fue analizada por test-t, ns= no significativo. (c) la expresión y localización subcelular de β -catenina se determinó por inmunofluorescencia y microscopía confocal. Las imágenes revelan inmunodetección de β -catenina (rojo), Vector o NZEB1 a través de la señal de la proteína de fusión GFP (verde), y tinción de núcleos con DAPI (señal azul). Los paneles inferiores muestran las superposiciones de los canales y una magnificación de la imagen original (superposición (+)). Las flechas indican la expresión y localización de β -catenina. Magnificación= 600X. Barra= 10 μ m. Las imágenes son representativas de 2 experimentos independientes.

2.5 Efecto de NZEB1 en la organización del citoesqueleto de F-actina

Con el objetivo de determinar cambios y/o alteraciones en el citoesqueleto de actina se evaluó la distribución de F-actina (actina filamentosa) mediante tinción con faloidina conjugada con rodamina seguida de microscopía confocal (**Fig. 15**). La línea celular NMuMG-Vector presentó una distribución localizada de F-actina en la región subcortical, un rasgo característico de células epiteliales (**Fig. 15** paneles de la izquierda). En contraste la línea celular NMuMG-NZEB1 presentó un drástico cambio en la distribución de F-actina, evidenciado por la reorganización en la distribución subcelular de la misma. Se observó la formación de proyecciones de la membrana plasmática ricas en actina, compatibles con lamelipodios y filipodios, además de una incrementada polaridad celular antero posterior (**Fig. 15** paneles de la derecha).

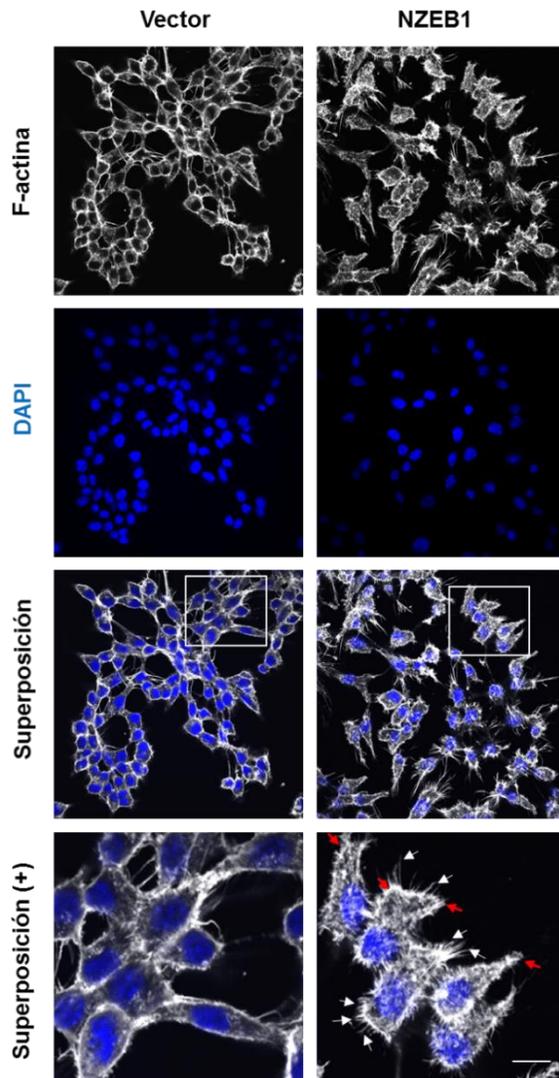


Figura 15: NZEB1 modifica la organización del citoesqueleto de actina en células NMuMG.

En células NMuMG Vector y NZEB1 se determinó la expresión y distribución del citoesqueleto de actina mediante la tinción con faloidina conjugada a rodamina, seguida de microscopía de fluorescencia confocal. Las imágenes revelan detección del citoesqueleto de F-actina y la tinción de núcleos con DAPI. En los paneles inferiores se muestran las superposiciones de los canales y una magnificación de la imagen original (superposición (+)). Las flechas rojas y blancas indican lamelipodios y filipodios respectivamente. La tinción con faloidina se muestra en blanco para maximizar el contraste y la detección de los lamelipodios y filipodios. Magnificación= 600X. Barra= 10 μ m. Las imágenes son representativas de 2 experimentos independientes.

2.6 Efecto de NZEB1 sobre parámetros funcionales asociados a la EMT en células NMuMG

La reorganización de la arquitectura del citoesqueleto de actina y la desestabilización de las uniones adherentes resultan en cambios en la morfología celular, adquisición de una polaridad antero-posterior, formación de filipodios y lamelipodios. Todos estos eventos esenciales del programa EMT permiten la migración direccional y en muchos casos determinan la evolución hacia un fenotipo invasivo. Por esta razón se evaluaron parámetros funcionales estrechamente relacionados con la EMT, como migración, invasión y crecimiento independiente del anclaje.

- **Efecto de NZEB1 en células NMuMG sobre la migración celular**

Para conocer el impacto de NZEB1 sobre la migración celular se realizaron ensayos de cierre de la herida (wound healing), en el cual se monitorizó la velocidad de avance del frente celular para cerrar la herida (**Fig. 16 A y B**). Paralelamente estos resultados fueron verificados mediante ensayos de migración en transwell (**Fig. 16 B y C**), en los cuales se estudió la capacidad de las células para atravesar una membrana con poros de 8 μm en respuesta a un estímulo quimioattractante (Suero Fetal Bovino, SFB, al 10%).

Con el fin de asegurar que el avance celular fuera producido exclusivamente por el proceso de migración, sin interferencias del proceso proliferativo, los experimentos fueron realizados en condiciones de bajo suero (DMEM 1% SFB) y con tiempos de migración que nunca excedieron las 24 horas. Esto se estableció ya que las curvas de crecimiento de las dos poblaciones celulares mostraron tasas de crecimientos similares en un período de 24 horas, garantizando una mínima interferencia de procesos proliferativos en la valoración de la migración (**Fig. 16 C**). Como se muestra en la figura 16, las células que expresan NZEB1 presentaron mayor migración en relación a las células control (Vector). El ensayo de cierre de la herida mostró que las células NMuMG-NZEB1 presentaron una capacidad para cerrar la herida aproximadamente 40% mayor que las células NMuMG vector (**Fig 16 A**). Resultados similares se observaron en el ensayo de migración en transwell, donde las células NMuMG-NZEB1 migraron aproximadamente un 58% más que las células control (**Fig 16 B**).

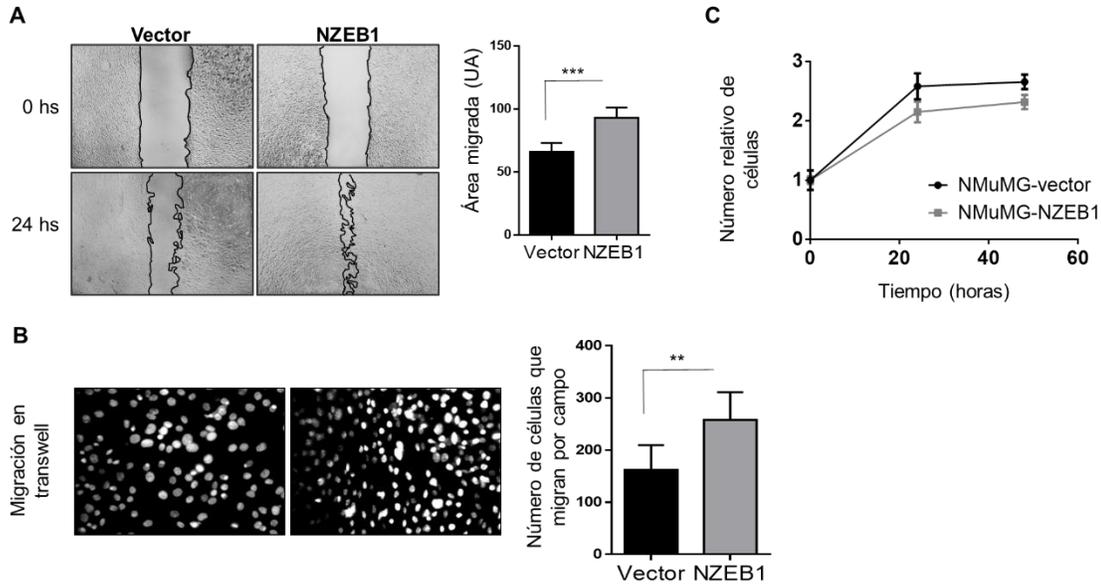


Figura 16: NZEB1 incrementa la migración en células NMuMG.

En células NMuMG Vector y NZEB1 se evaluó la migración celular mediante: (A) Ensayo de cierre de la herida (o wound healing), las imágenes obtenidas mediante microscopía óptica (magnificación= 100X) muestran los frentes de migración a tiempos inicial (0 hs.) (paneles superiores) y 24 horas (24 hs.) (paneles inferiores). Se muestra la cuantificación del área migrada en unidades aleatorias (UA). (B) Ensayo de migración en transwell, las imágenes obtenidas mediante microscopía de epifluorescencia (Magnificación= 400X) muestran núcleos de células teñidos con DAPI (blanco) que representan las células que atravesaron la membrana porosa (poros de 8 μ m) después de 24 horas de ensayo y la respectiva cuantificación del número de células migradas por campo. Los gráficos de barras representan la media \pm DE. La diferencia entre las medias fue analizada por test-t a dos colas para muestras no apareadas. ** $p \leq 0,01$ y *** $p \leq 0,001$. Las imágenes y sus respectivas cuantificaciones son representativas de 3 experimentos independientes (n=3). (C) curva de crecimiento, se grafica el numero relativo de células NMuMG Vector y NZEB1 a diferentes tiempos durante la fase de crecimiento exponencial, cada punto representa la media \pm D.S. (n=4). La figura muestra el resultado de un experimento representativo de dos ensayos independientes.

- Efecto de NZEB1 en células NMuMG sobre la invasión celular

La disrupción de las membranas basales por parte de las células tumorales es uno de los requisitos básicos para completar distintos pasos de la cascada de la metástasis que culmina con el establecimiento de un tumor secundario [49]. Dado que se comprobó que los cambios observados en los marcadores de la EMT y en el citoesqueleto de actina se traducen en un cambio funcional en la capacidad migratoria de las células, se planteó la hipótesis de que el potencial invasivo de células NMuMG podría verse afectado por expresión de NZEB1. Para verificar esta

hipótesis, se realizaron ensayos de invasión utilizando cámaras de transwells con poros de 8 μm , al igual que en los experimentos de migración, pero anteponiendo entre las células y la membrana porosa una matriz extracelular reconstruida con Matrigel. En la cámara inferior se utilizó 10% SFB como quimioattractante y tras un periodo de incubación de 24 horas se cuantificaron las células que fueron capaces de migrar a través del Matrigel (invasión) mediante la tinción de los núcleos con DAPI (Fig. 17).

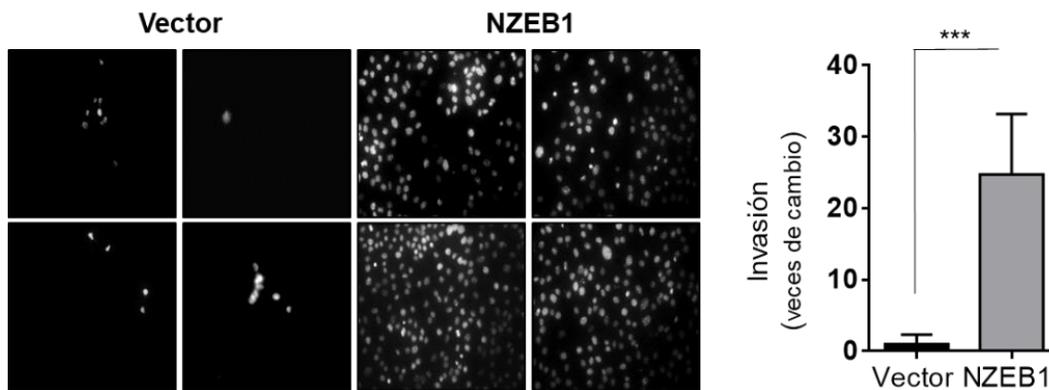


Figura 17: NZEB1 incrementa la capacidad invasiva en células NMuMG.

En células NMuMG Vector y NZEB1 se evaluó la invasión mediante ensayos de invasión en Matrigel. Imágenes representativas de microscopía de epifluorescencia (magnificación= 400X) donde se muestran núcleos de células teñidos con DAPI (blanco) que representan las células que atravesaron el Matrigel y la membrana porosa después de 24 horas de ensayo y la respectiva cuantificación del número de células que invaden por campo relativo al control. El gráfico de barras representa la media \pm DE. La diferencia entre las medias fue analizada por test-t a dos colas para muestras no apareadas, *** $p \leq 0,0001$. Las imágenes y su respectiva cuantificación son representativas de 3 experimentos independientes (n=3).

Los resultados mostraron que después de 24 horas de ensayo un número marcadamente mayor de células NMuMG-NZEB1 fueron capaces de atravesar la matriz de Matrigel y la membrana porosa en comparación con las células NMuMG-Vector. Esto evidencia un drástico incremento en el potencial invasivo de las células NMuMG inducido por la sobreexpresión de NZEB1. Este fenotipo fue consistente con los cambios observados en la migración celular y la reorganización del citoesqueleto de actina para células NMuMG-NZEB1. Resulta importante

destacar que la sobreexpresión de NZEB1 es suficiente para incrementar drásticamente el potencial invasivo de células NMuMG.

Uno de los procesos claves que estimulan la invasión es la secreción de enzimas de degradación de la MEC, tales como metaloproteinasas de matriz (MMPs). La actividad de estas enzimas puede estar alterada en condiciones patológicas, particularmente MMP2 y MMP9 se observan incrementadas en varios tipos de cánceres, incluyendo el cáncer de mama invasivo [107]. Por lo tanto, el incremento invasivo observado en NMuMG-NZEB1 puede ser una consecuencia de un incremento en la actividad proteolítica sobre los componentes de la MEC. Por esta razón se decidió evaluar MMPs críticas para la regulación de la invasión (como MMP2 y MMP9).

El análisis de la actividad enzimática de MMPs secretadas mediante zimografía, con medios condicionados provenientes de células NMuMG-Vector y NMuMG-NZEB1, reveló un cambio en el patrón de actividad de MMP2 y MMP9 en células NMuMG-NZEB1. Mientras MMP9 disminuyó levemente su actividad, MMP2 incrementó significativamente su actividad con respecto al control (NMuMG vector) (**Fig 18 A y B**). Dado que este resultado sugiere que la actividad incrementada de MMP2 podría facilitar la invasión celular mediante la degradación de la MEC, paralelamente se realizó una inmunotinción de manera de determinar la expresión y localización de MMP2 a nivel subcelular. Los resultados confirmaron una mayor expresión de MMP2 con una acentuada localización en la membrana plasmática y en proyecciones citosólicas, que podrían relacionarse a frentes de migración (**Fig 18 C**). Si bien el cambio de patrón en la expresión de MMPs inducido por NZEB1 no implica *per se* un cambio selectivo en la actividad enzimática de estas metaloproteinasas, se puede concluir que el nivel total de MMPs está incrementado en esta condición. En conjunto, estos resultados sugieren que la sobreexpresión de NZEB1 en células NMuMG promueve la invasión celular mediante un cambio en el perfil de secreción de MMPs.

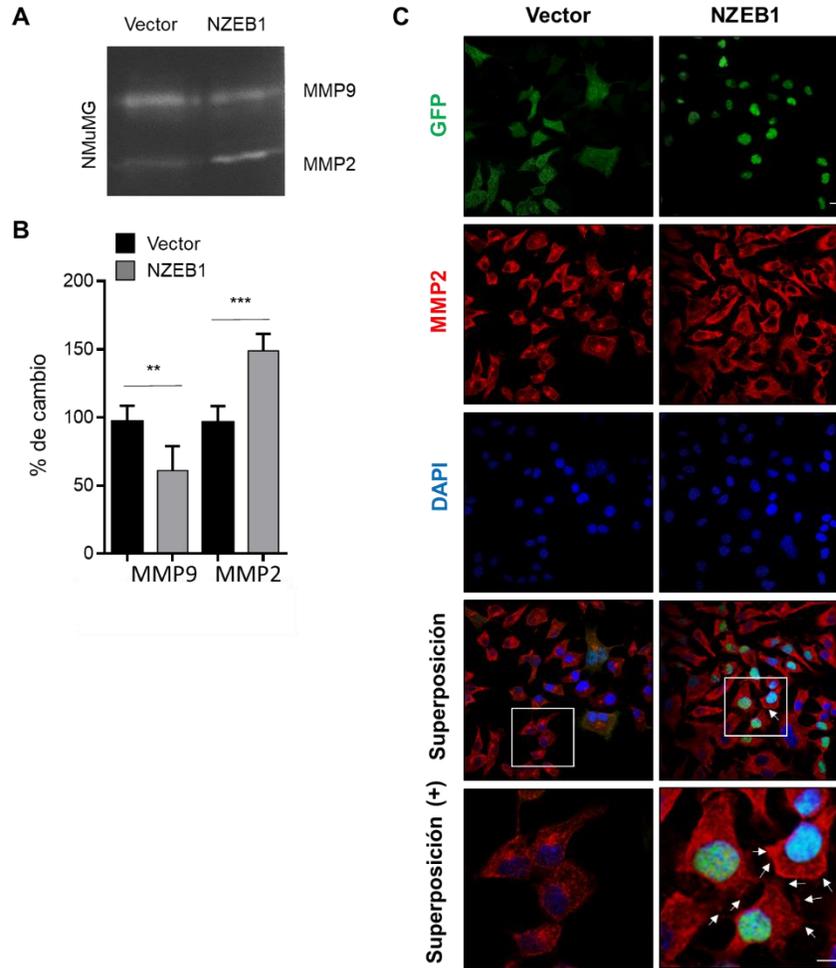


Figura 18: NZEB1 modifica el patrón de expresión y secreción de MMPs en células NMuMG.

En células NMuMG Vector y NZEB1 se determinó (A) La actividad enzimática de MMP2 y MMP9 secretada en medios condicionados, mediante zimografía y se realizó (B) una cuantificación de la actividad enzimática, expresada como porcentaje de cambio relativo a la actividad del vector como control. El gráfico de barras representa la media \pm DE. La diferencia entre las medias fue analizada por test-t a dos colas para muestras no apareadas, $**p \leq 0,001$, $***p \leq 0,0001$. Las imágenes y su respectiva cuantificación son representativas de 3 experimentos independientes. (C) Expresión y localización subcelular de MMP2 determinada mediante ensayos de inmunofluorescencia seguido de microscopía de fluorescencia confocal. Las imágenes revelan inmunodetección de MMP2 (rojo), Vector o NZEB1 a través de la señal de la proteína de fusión GFP (verde), y tinción de núcleos con DAPI (señal azul). En los paneles inferiores se muestran las superposiciones de los canales y una magnificación de la imagen original (superposición (+)). Las flechas indican la expresión y localización de MMP2 en los frentes de avance de NMuMG-NZEB1. Magnificación= 600X. Barra= 10 μ m. Las imágenes son representativas de 2 experimentos independientes.

- **Efecto de la expresión de NZEB1 en el crecimiento independiente del anclaje en agar blando en células NMuMG**

Para continuar caracterizando el impacto de la expresión estable de NZEB1 se evaluó en estas líneas celulares el potencial para crecer de manera independiente al anclaje a través del ensayo de formación de colonias en agar blando. Este tipo de ensayo es ampliamente utilizado para evaluar la transformación celular *in vitro*, ya que en las células normales se impide el crecimiento independiente de anclaje debido a un tipo particular de muerte celular apoptótica denominado anoikis, mientras que las células transformadas tienen la capacidad de crecer y dividirse sin unirse a un sustrato [108, 109].

Células NMuMG-Vector y NMuMG-NZEB1 fueron resuspendidas en medio completo adicionado con agar 0,3% sobre una base de medio completo con 0,5% de agar. Posteriormente las placas fueron cultivadas hasta observar la aparición de colonias. Los resultados revelaron que ambas líneas celulares fueron capaces de crecer en un medio semisólido, formando focos de colonias tridimensionales. Sin embargo, se observaron diferencias significativas en cuanto a la cantidad de colonias formadas (**Fig. 19 B**), así como en la morfología de las mismas (**Fig. 19 A**). Las células NMuMG-NZEB1 presentaron una capacidad mayor para formar colonias que las células NMuMG-Vector. Además, las células NMuMG-NZEB1 formaron colonias de forma y bordes irregulares, evidenciando un fenotipo más agresivo en comparación con las colonias de células NMuMG-vector, que fueron redondeadas y con bordes bien definidos. Estos resultados sugieren que la expresión NZEB1 por si sola potencia el crecimiento independiente del anclaje y transformación celular en células NMuMG *in vitro*.

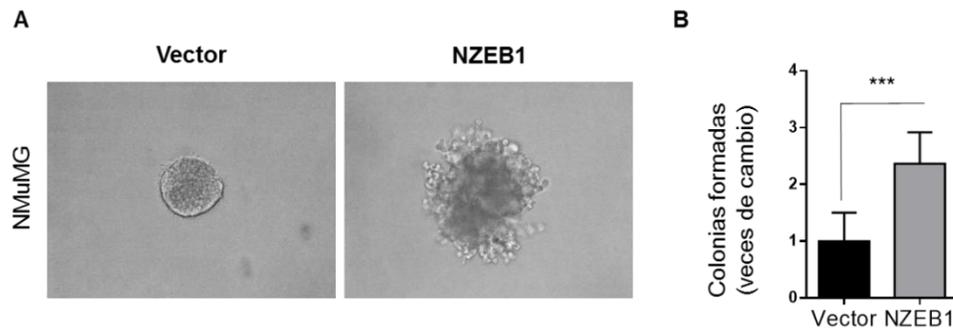


Figura 19: La expresión de NZEB1 compromete la transformación celular en NMuMG.

En células NMuMG-Vector y NZEB1 se realizó el ensayo de formación de colonias en agar blando. (A) Imágenes obtenidas mediante microscopía óptica (magnificación= 200X) que muestran colonias representativas, donde se evidencian sus fenotipos. (B) Cuantificación del número de colonias formadas, expresado como veces de cambio con respecto al valor obtenido en las células vector. El gráfico de barras representa la media \pm DE. La diferencia entre las medias fue analizada por test-t a dos colas para muestras no apareadas, *** $p \leq 0,0001$. Las imágenes y su respectiva cuantificación son representativas de 2 experimentos independientes (n=4).

CONCLUSIONES PARCIALES CAPÍTULO I

Del desarrollo de este capítulo de resultados se puede concluir que NZEB1 representa la mínima porción de ZEB1 identificada (10% de la proteína wt) que recapitula la función de ZEB1wt en el programa EMT. La sobreexpresión de NZEB1 induce cambios moleculares, morfológicos y funcionales asociados a estadios intermedios de la EMT en células NMuMG, independientemente de señales extracelulares como TGF- β y sin alterar los niveles de expresión de otros FT-EMT como Snail. Estos cambios están representados por una marcada represión de E-cadherina, cambio en el perfil de MMPs, reorganización del citoesqueleto de actina, incremento de la motilidad e invasión celular y crecimiento independiente del anclaje.

CAPÍTULO II: REGULACIÓN DE NZEB1 EN EL PROGRAMA EMT EN CÉLULAS NMUMG

Profundizar el conocimiento de los mecanismos que operan en la regulación de ZEB1 es clave para comprender la modulación del programa EMT y el comportamiento invasivo celular en un contexto neoplásico. Por esta razón, en esta segunda sección de resultados se estudiaron las vías de transducción de señales que podrían ser responsables de regular de manera directa o indirecta la función de NZEB1 durante la EMT, haciendo foco principalmente en las vías activadas aguas abajo del receptor de IGF-1 (IGF-1R) y las vías de transducción de señales orquestadas por la súper-familia de las PKCs.

1. Efectos de las vías de transducción de señales sobre la expresión de E-cadherina y NZEB1 en células NMuMG

Inicialmente se evaluó si la activación o inhibición de diferentes vías de transducción de señales se traducen en cambios en la expresión de E-cadherina y NZEB1. Células NMuMG-NZEB1 fueron tratadas por 48 horas con los siguientes estímulos: IGF-1, EGF, TGF- β , PMA (Forbol 12-miristato 13-acetato) o con los inhibidores farmacológicos específicos de las vías de IGF-1R (NVP-AEW541), PI3K (LY294002), MEK/ERK (PD 98059 y UO126), GSK3- β (Glucógeno sintasa quinasa 3 beta) (LiCl), PKC total (GF 109203) o PKC clásicas (GÖ 6983). Se determinó por WB la expresión de E-cadherina y NZEB1, utilizando α -tubulina como control de carga. Se corroboró la actividad de los inhibidores utilizados mediante la determinación de las variantes fosforiladas y totales de AKT, MEK/ERK y PKC. Se observó que la activación de los receptores tirosina quinasa a través de los estímulos con TGF- β , IGF-1, EGF, o la activación de las quinasas PKC clásicas y noveles (con PMA/Ionomicina), no revirtieron el efecto de NZEB1 sobre su blanco E-cadherina (**Fig. 20 A y B**). De manera similar, la inhibición de las principales quinasas en estudio por inhibidores farmacológicos específicos para IGF-1R, GSK3- β , PI3K, MEK/ERK tampoco modificaron la expresión de E-cadherina (**Fig. 20 D y E**). La expresión proteica de NZEB1 tampoco se modificó bajo los mismos tratamientos con IGF-1, EGF y PMA/Ionomicina, o con los inhibidores farmacológicos para GSK-3 β , PI3K, MEK/ERK.

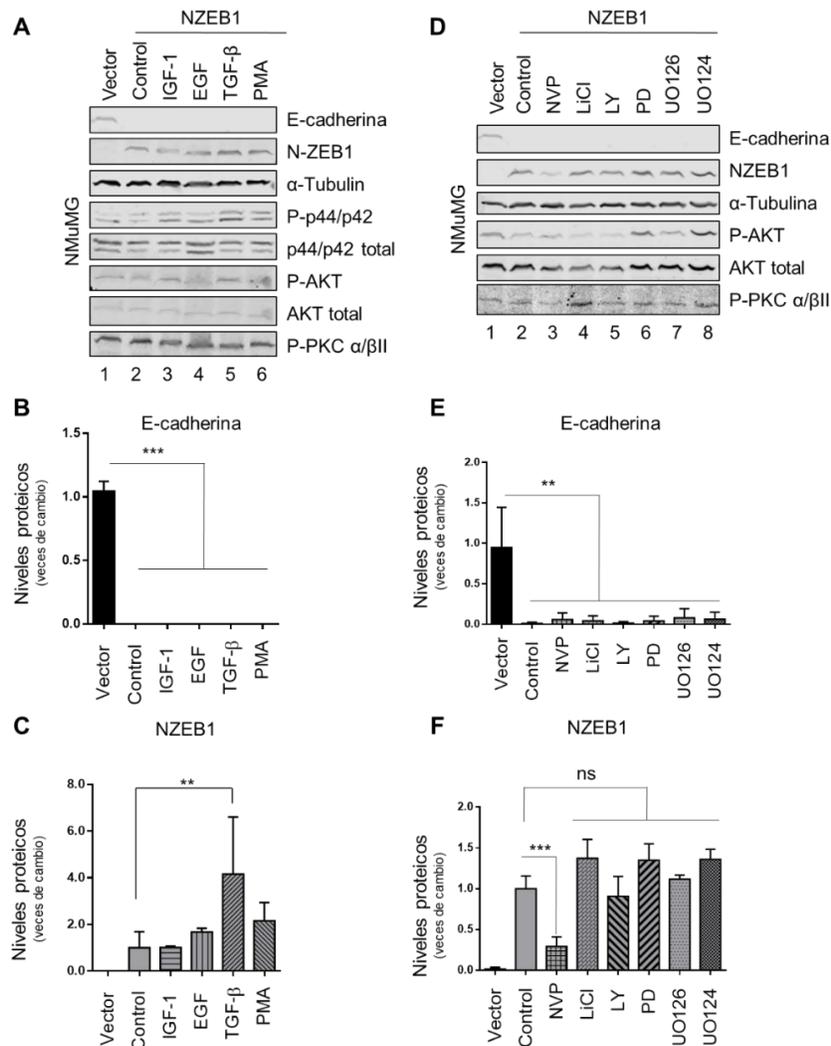


Figura 20. Efectos de la modulación farmacológica de diferentes vías de señalización sobre la expresión de E-cadherina y ZEB1 en células NMuMG-NZEB1.

Células NMuMG-NZEB1 fueron tratadas por 48 horas con activadores (A) o inhibidores (D) específicos de vías de señalización en estudio. DMSO (Control), IGF-1 (10 nM), EGF (50 ng/ml), TGF-β (5ng/ml), PMA/Ionomicina (10ng/ml de PMA y 10 ng/ml) NVP-AEW541 (5μM) y LiCl (50 mM), LY294002 (20 μM), PD98059 (20 μM), UO126 y UO 124 (20 μM). Los extractos celulares totales fueron analizados mediante electroforesis en condiciones desnaturizantes y WB revelados con anti GFP, anti ZEB1, anti E-cadherina y anti α-tubulina como control de carga. También se corroboró el funcionamiento de las vías de AKT, MEK/ERK y PKC a través de la determinación de sus formas fosforiladas y totales. (B) (E) cuantificación de la expresión proteica de E-cadherina, normalizada con los valores del control de carga α-tubulina y relativizados al control (NMuMG-NZEB1 + DMSO) (C) (F) cuantificación de la expresión proteica de ZEB1. Los resultados se expresan como media ± DE. La diferencia entre las medias fue analizada por ANOVA y Test de Dunnett. ns: no significativo; **p≤0,01; ***p≤0,001. Las imágenes son representativas de 3 experimentos independientes.

No obstante, se observaron dos cambios significativos en los niveles de ZEB1 en estos experimentos. Por un lado, se observó un incremento significativo de NZEB1 después de 48 horas de tratamiento con TGF- β (**Fig. 20 A y C**). Por otro lado, también se observó que la inhibición de IGF-1R (NVP-AEW541) produjo una caída de NZEB1 de aproximadamente el 70% con respecto al control (NVP: $0,29 \pm 0.17$ comparado con el Control: 1 ± 0.15 ; $P < 0,0001$) (**Fig. 20 D y F**).

Paralelamente también se analizó el efecto de la vía de PKCs sobre la expresión proteica de E-cadherina y NZEB1. Células NMuMG-NZEB1 fueron tratadas por diferentes tiempos con dos inhibidores específicos para de PKCs diferentes, GF 109203 (inhibidor de PKCs total) y GÖ 6983 (PKCs clásicas). Al igual que lo observado para IGF-1R, PI3K, MEK/ERK (**Fig. 20**), la inhibición de PKCs no modifico la expresión de E-cadherina (**Fig. 21 A**). Sin embargo, la expresión proteica de NZEB1 mostró una caída de entre un 30% y un 40% en células NMuMG-NZEB1 luego de uno o dos días de tratamiento con estos inhibidores. Estos resultados sugieren que la disminución de los niveles de NZEB1 puede ser una consecuencia directa de los cambios de estado de fosforilación por PKCs. De hecho, en la primera sección de resultados se mostró tanto por análisis *in silico* como en células, que ZEB1 es substrato directo de fosforilación por PKCs (**Tabla 1 y Fig. 10**). Para profundizar este análisis se decidió determinar si NZEB1 (región de ZEB1 comprendida entre los aa 111 y 241) es sustrato directo de fosforilación por la familia de PKCs. Para ello se realizaron ensayos de inmunoprecipitación de NZEB1 y se reveló por WB con un anticuerpo que reconoce motivos fosforilados por PKCs. Los resultados obtenidos fueron contundentes, indicando que incluso una fracción que representa solo el 10% de la proteína completa es sustrato de PKCs (**Fig. 21 C**). Esto resalta la posibilidad de que esta familia de quinasas tenga un rol importante en la regulación de ZEB1 (este vínculo funcional será analizado en detalle en la siguiente sección de resultados).

Resulta interesante destacar que aun cuando los niveles proteicos de NZEB1 disminuyeron significativamente, no se revirtió la expresión de su blanco E-cadherina, al menos bajo las condiciones ensayadas. Probablemente la re-expresión de E-cadherina requiera una caída más sostenida en el tiempo de NZEB1. En este sentido, se ha reportado que ZEB1 reprime

a E-cadherina directamente a nivel transcripcional e indirectamente a nivel epigenético mediante el reclutamiento de elementos modeladores de la cromatina (como ADN metiltransferasas o histonas deacetilasas) [110, 111].

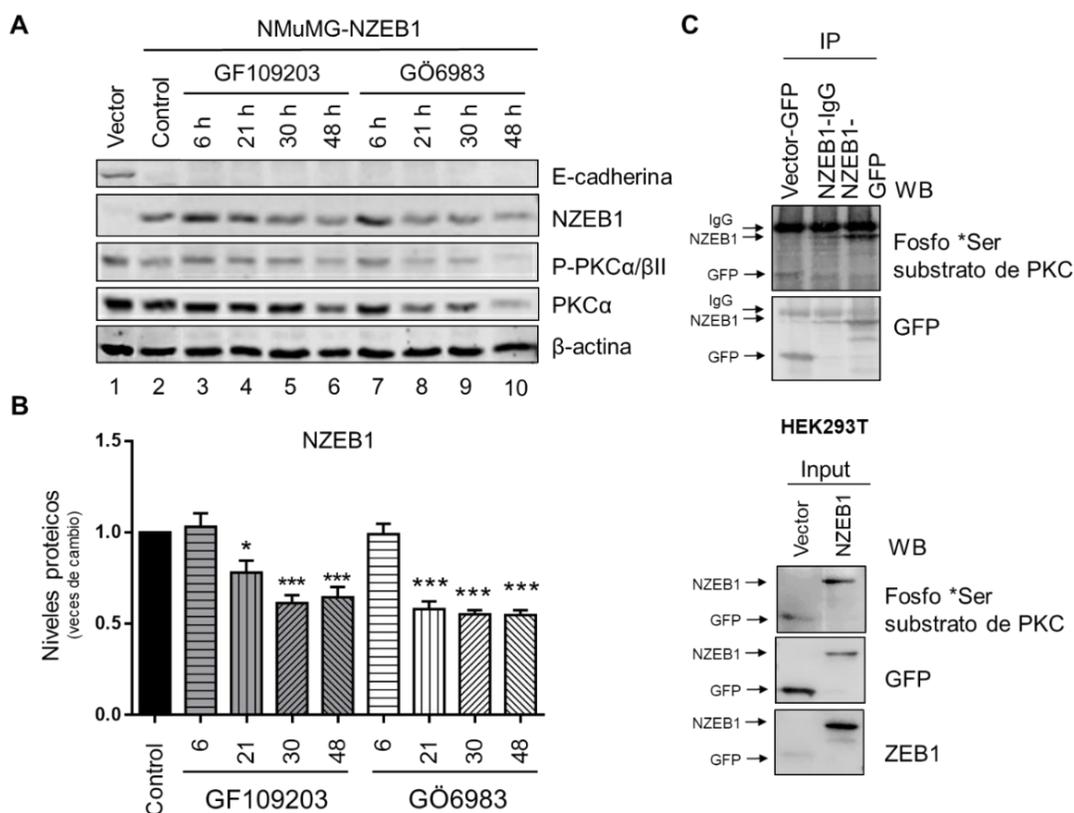


Figura 21: Efecto de la inhibición de la vía de PKC sobre la expresión de E-cadherina y NZEB1 en células NMuMG-NZEB1.

Las células NMuMG-NZEB1 fueron tratadas con los inhibidores de PKC totales GF109203 (5µM) o el inhibidor de PKC clásicas GÖ6983 (5µM) por los tiempos indicados. (A) Los extractos celulares totales fueron analizados mediante electroforesis en condiciones desnaturalizantes y WB revelado con anticuerpos anti ZEB1, anti E-cadherina y anti β-actina como control de carga. También se corroboró el funcionamiento de la vía de PKC a través de la determinación de la forma fosforilada de PKC α/βII y anti PKCα total. (B) Cuantificación de la expresión proteica de NZEB1, normalizada con los valores del control de carga β-actina y relativizados al control (NMuMG-NZEB1 + DMSO). (C) Células HEK293T fueron transfectadas con el vector de expresión de ZD1S (NZEB1), los extractos celulares totales fueron inmunoprecipitados con anticuerpo anti GFP o anticuerpo anti IgG como control y revelado por WB con anticuerpos anti-fosfo substrato de PKC, anti ZEB1 y anti GFP. Los resultados se expresan como media ± DE. La diferencia entre las medias fue analizada por ANOVA y Test de Dunnett. ns: no significativo; *p≤0,05; ***p≤0,001. Las imágenes son representativas de 2 experimentos independientes.

2. Regulación de ZEB1 por la vía de IGF-1/IGF-1R en células NMuMG

Para corroborar el vínculo de la vía IGF-1/IGF-1R sobre la expresión de NZEB1, células NMuMG-NZEB1 fueron estimuladas con IGF-1 durante diferentes períodos de tiempo y posteriormente se valoró por WB la expresión de NZEB1. El correcto funcionamiento del tratamiento se monitoreó mediante la valoración de las formas fosforilada y total de la MAPK ERK1/2 (P-p44/42 y p44/42 total; **Fig. 22**). Este tratamiento no indujo cambios significativos en el patrón de expresión de NZEB1 con los estímulos ensayados (**Fig. 22 B-C**). Por el contrario, el tratamiento con el inhibidor de IGF-1R (NVP-AEW541) indujo una disminución significativa de NZEB1. El tratamiento con el inhibidor de IGF-1R (NVP-AEW541 5 μ M) produce una caída en la expresión de NZEB1 estadísticamente significativa entre las 30 y 48 horas de tratamiento, sin observarse un comportamiento dosis respuesta (**Fig. 22 D-F**). Es importante destacar que estos resultados fueron corroborados en la proteína completa utilizando la línea celular de cáncer de mama tipo basal MDA-MB-231, la cual se caracteriza por presentar un fenotipo invasivo, así como una elevada expresión endógena de ZEB1. En respuesta a los tratamientos con el inhibidor de IGF-1R, las células MDA-MB-231 evidenciaron una caída en la expresión de ZEB1 de entre el 40% y el 60% entre las 24 y 48 horas (**Fig. 22 G y H**).

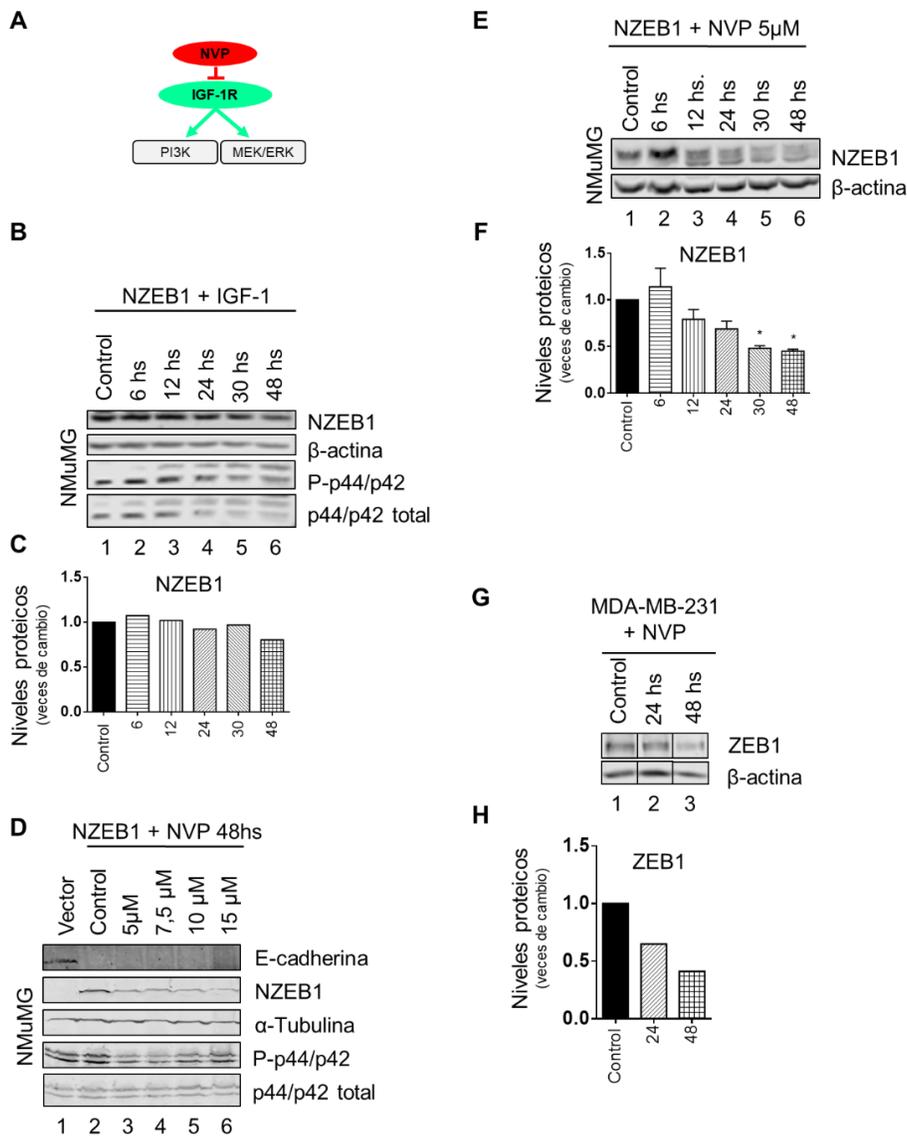


Figura 22: Efectos de la vía de IGF-1R sobre la expresión ZEB1.

(A) Representación esquemática de las vías canónicas de IGF-1R. La vía de IGF-1R fue estimulada con IGF-1 (10 nM) por los tiempos indicados, en células NMuMG-NZEB1 (B) o inhibida con NVP-AEW541 (5 μ M, diferentes tiempos o 48 horas con diferentes dosis, según se indica en la figura, en células NMuMG-NZEB1 (D) (E) y MDA-MB-231 (G). Tratamientos con el solvente DMSO fueron utilizados como control. Los extractos celulares totales fueron analizados mediante electroforesis en condiciones desnaturalizantes y WB revelado con anti ZEB1, anti E-cadherina y anti α -tubulina o anti β -actina como control de carga. Se corroboró el funcionamiento de los tratamientos por determinación de formas fosforiladas y totales ERK 1/2. (C) (F) (H). Cuantificación de la expresión proteica de ZEB1, normalizada con los valores del control de carga y relativizados al control (DMSO). (H) representación esquemática de las vías canónicas de IGF-1R. Los resultados se expresan como media \pm DE. La diferencia entre las medias fue analizada por ANOVA y Test de Dunnett. ns: no significativo; * p \leq 0,05. Las imágenes son representativas de 3 experimentos independientes

3. Regulación de la estabilidad proteica de NZEB1 por la vía de IGF-1/IGF-1R en células NMuMG.

Dado que el sistema de expresión exógena de NZEB1 utilizado en esta tesis (promotor CMV) supone la ausencia de mecanismos de regulación a nivel transcripcional, se planteó la hipótesis que NVP-AEW541 regula los niveles de NZEB1 por un mecanismo postraducciona. Mientras que mecanismos de regulación postraduccionales que involucran ubiquitinación y degradación por la vía del proteasoma han sido descritos para los reguladores de la EMT Snail y Twist, la regulación de la estabilidad de ZEB1 es actualmente poco conocida [112].

En primer lugar, se decidió evaluar la participación de la vía del proteasoma en la regulación de la estabilidad de NZEB1 mediante su inhibición farmacológica con MG132. Células NMuMG-NZEB1 fueron tratadas con NVP-AEW541 y/o MG132 durante 48 horas. Los extractos celulares totales fueron analizados por WB utilizando anticuerpos anti NZEB1 y anti α -tubulina o β -actina como control de carga. Fue muy interesante observar que la inhibición de la degradación de proteínas revirtió la caída en la expresión de NZEB1 inducida por NVP-AEW541 (**Fig. 23 A y B**). Es importante destacar que el tratamiento con MG132 por sí solo no produjo cambios significativos en la expresión proteica de NZEB1. (**Fig. 23 A y B**). Para corroborar estos resultados se realizaron tratamientos con el inhibidor de IGF-1R por 48 horas, en combinación con MG132 por diferentes tiempos. El efecto del inhibidor de IGF-1R fue revertido de manera tiempo dependiente con MG132, demostrando la especificidad de esta respuesta (**Fig. 23 C y D**). Esto sugiere que la degradación proteica no es un mecanismo de regulación de los niveles basales de ZEB1, sino que podría ser un mecanismo exclusivo de respuesta a estímulos (como por ejemplo en respuesta a la vía IGF-1R).

Resta determinar si el control de los niveles de NZEB1 por medio de NVP-AEW541 implica una degradación directa de NZEB1 por la vía del proteasoma o si existe un mecanismo indirecto a nivel postraducciona que requiera la actividad del proteasoma.

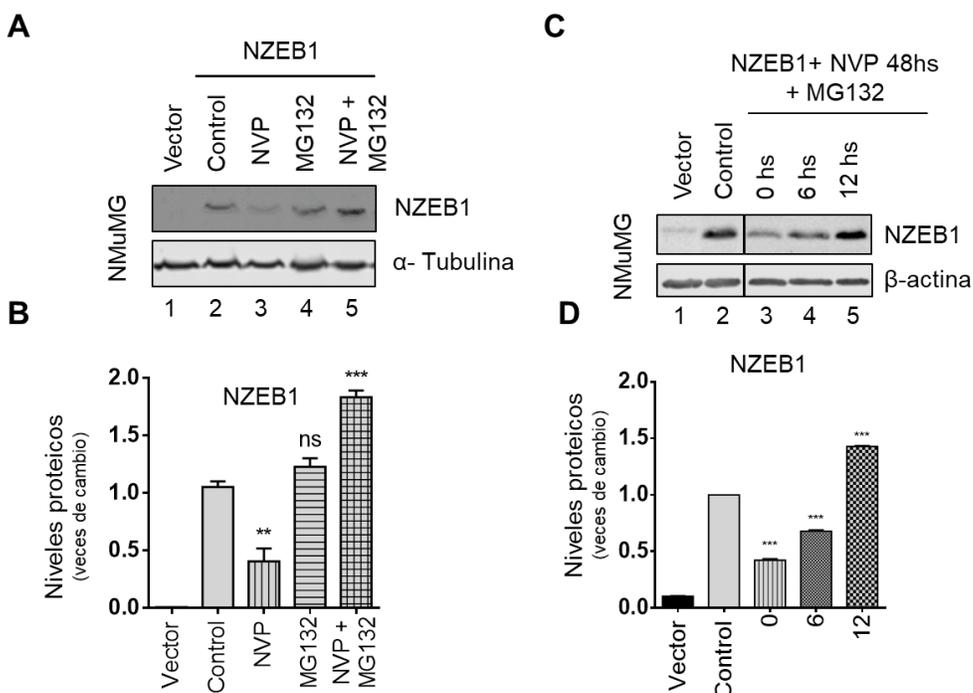


Figura 23: La vía de IGF-1R regula la estabilidad proteica de NZEB1.

Células NMuMG-NZEB1 fueron tratadas con NVP-AEW541 5 μ M y/o MG 132 5 μ M durante 48 horas (A), o con NVP-AEW541 5 μ M 48 horas más MG 132 5 μ M por diferentes tiempos (6 y 12 horas) (C). Los extractos celulares totales fueron corridos por WB y revelados con anti ZEB1, anti α -tubulina o anti β -actina como control de carga. (B y D) Cuantificación de la expresión proteica de NZEB1 normalizada con los valores del control de carga y relativizados al control (DMSO). Los resultados se expresan como media \pm DE. La diferencia entre las medias fue analizada por ANOVA y Test de Dunnett. ns: no significativo; * $p \leq 0,05$. ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$. Las imágenes son representativas de 3 experimentos independientes.

4. Efecto de la regulación de NZEB1 por IGF-1R sobre parámetros funcionales de EMT en células NMuMG

Luego de haber descrito el potencial mecanismo por el cual la vía de IGF-1R regularía a NZEB1 en EMT, el siguiente paso fue determinar si estos efectos tenían alguna repercusión sobre parámetros funcionales asociados al programa EMT regulado por NZEB1. Es decir, si la caída de NZEB1 es capaz de revertir su efecto sobre este programa.

- **Sobre la expresión de E-cadherina y la distribución del citoesqueleto de actina**

Un hallazgo controversial que surgió en el desarrollo de los resultados anteriores fue que aun cuando fue posible reducir la expresión de NZEB1, no se revirtió el efecto que este tiene sobre su blanco E-cadherina (**Fig. 20 D; 22 E**). Para corroborar estos resultados se determinó la expresión y distribución subcelular de E-cadherina por inmunofluorescencia y microscopía de fluorescencia confocal en células NMuMG-NZEB1 con o sin tratamiento con el inhibidor de IGF-1R (NVP-AEW541) (**Fig. 24**). Los resultados corroboraron los datos obtenidos por WB, demostrando que bajo el tratamiento con NVP-AEW541 las células NMuMG-NZEB1 no cambian la expresión y/o distribución de E-cadherina con respecto a las células no tratadas (**Fig. 24**).

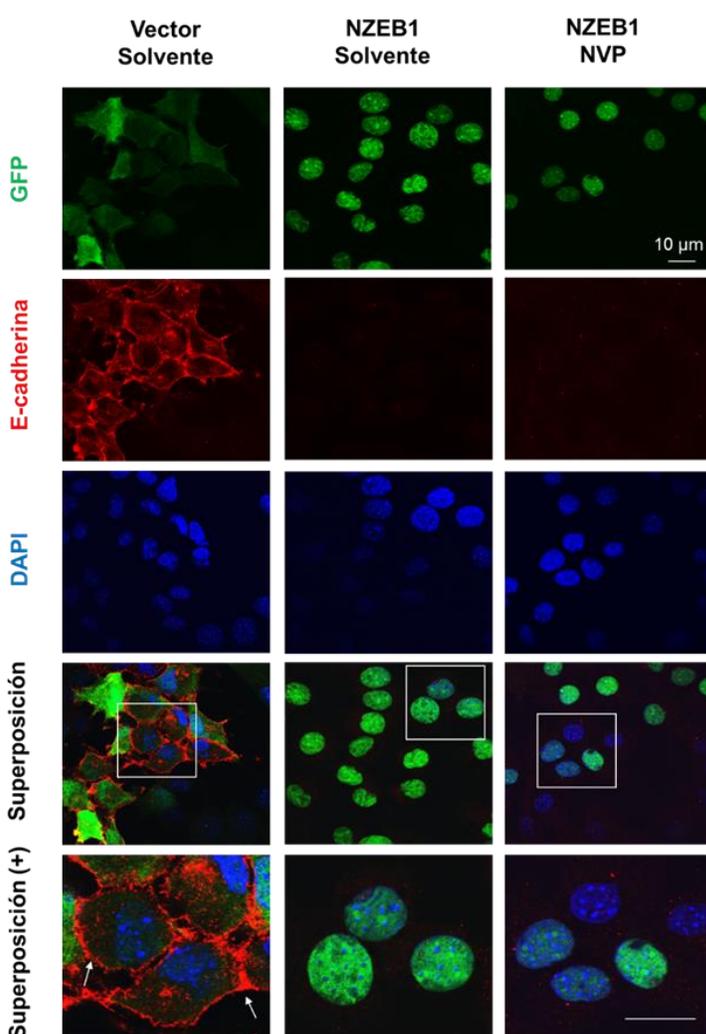


Figura 24: La caída de NZEB1 por inhibición de la vía de IGF-1R no modificó la inhibición de la expresión del marcador epitelial E-cadherina.

Células NMuMG-NZEB1 o Vector fueron tratadas con DMSO (solvente) o NVP-AEW541 5µM (NVP) por 48 horas. Se determinó la expresión y localización subcelular de E-cadherina mediante ensayos de inmunofluorescencia seguido de microscopía de fluorescencia confocal. Las imágenes revelan la expresión y localización de E-cadherina (rojo), Vector o NZEB1 a través de la señal de la proteína de fusión GFP (verde), y tinción de núcleos con DAPI (señal azul). En los paneles inferiores se muestran las superposiciones de los canales y una magnificación de la imagen original [superposición (+)]. Las flechas indican la expresión y localización de E-cadherina. Magnificación= 600X. Barra= 10 µm. Las imágenes son representativas de 2 experimentos independientes.

Por este motivo se valoraron otros parámetros funcionales asociados a EMT. Se determinó por microscopía confocal la expresión y distribución subcelular del citoesqueleto de actina en células NMuMG. Las células NMuMG-NZEB1 tratadas con NVP-AEW541 presentaron una notable reversión de su fenotipo mesenquimal, evidenciado por la reorganización de los filamentos de actina de manera cortical, adoptando una organización similar a células epiteliales. Este fenotipo es similar al que presentan las células NMuMG-Vector (que no expresan NZEB), lo que es consistente con la disminución de la expresión de NZEB1 luego del tratamiento con el inhibidor de IGF-1R. Estos fenotipos contrastan marcadamente con el observado en células NMuMG-NZEB1 tratadas con DMSO (solvente), donde se observa una marcada desorganización en la distribución de los filamentos de actina, con presencia de fibras de estrés y prolongaciones de la membrana plasmática tipo lamelipodios y filipodios (**Fig. 25**).

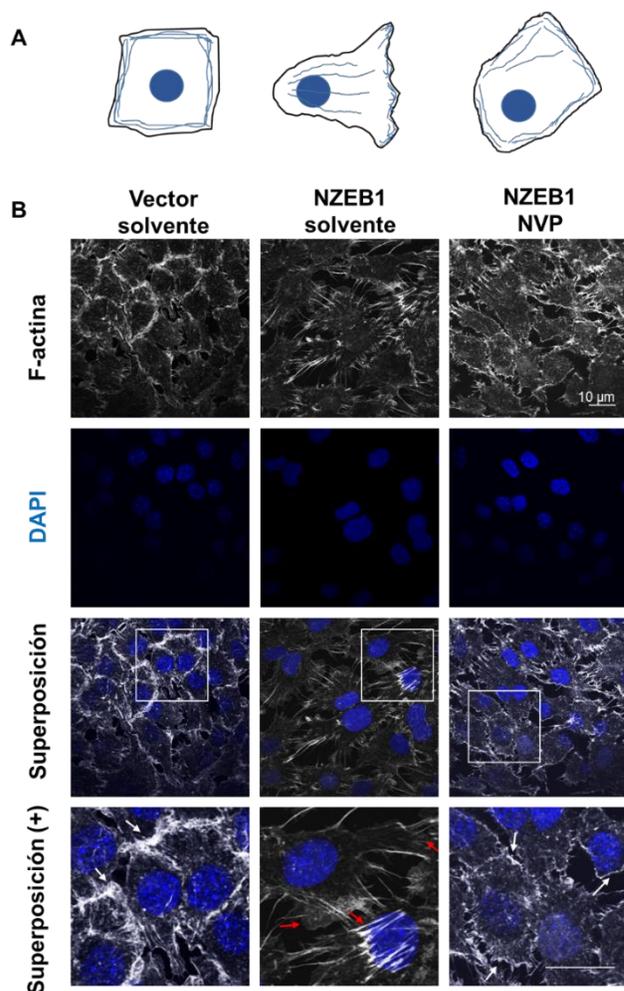


Figura 25: La caída de NZEB1 por inhibición de la vía de IGF-1R modifica el patrón de distribución del citoesqueleto de actina en células NMuMG.

(A) Representación esquemática de los diferentes fenotipos de EMT (B) Células NMuMG-NZEB1 o Vector fueron tratadas con DMSO o NVP-AEW541 5µM por 48 horas. Se determinó la expresión y distribución del citoesqueleto de actina mediante la tinción con faloidina conjugada a rodamina, seguida de microscopía de fluorescencia confocal. Las imágenes revelan detección del citoesqueleto de F-actina y la tinción de núcleos con DAPI. En los paneles inferiores se muestran las superposiciones de los canales y una magnificación de la imagen original [superposición (+)]. Las flechas rojas indican lamelipodios y fibras de estrés, las flechas blancas muestran la distribución cortical de citoesqueleto de actina. La tinción con faloidina se muestra en blanco para maximizar el contraste y la detección de los lamelipodios y filipodios. Magnificación= 600X. Barra= 10 µm. Las imágenes son representativas de 2 experimentos independientes.

- Sobre la migración e invasión celular

Para conocer el impacto de la regulación de NZEB1 por IGF-1R sobre la migración e invasión celular se realizaron ensayos de cierre de la herida (wound healing) y ensayos de invasión en Matrigel respectivamente en células NMuMG-NZEB1 tratadas con solvente (DMSO) o el inhibidor de IGF-1R (NVP-AEW541, 5µM por 48 horas).

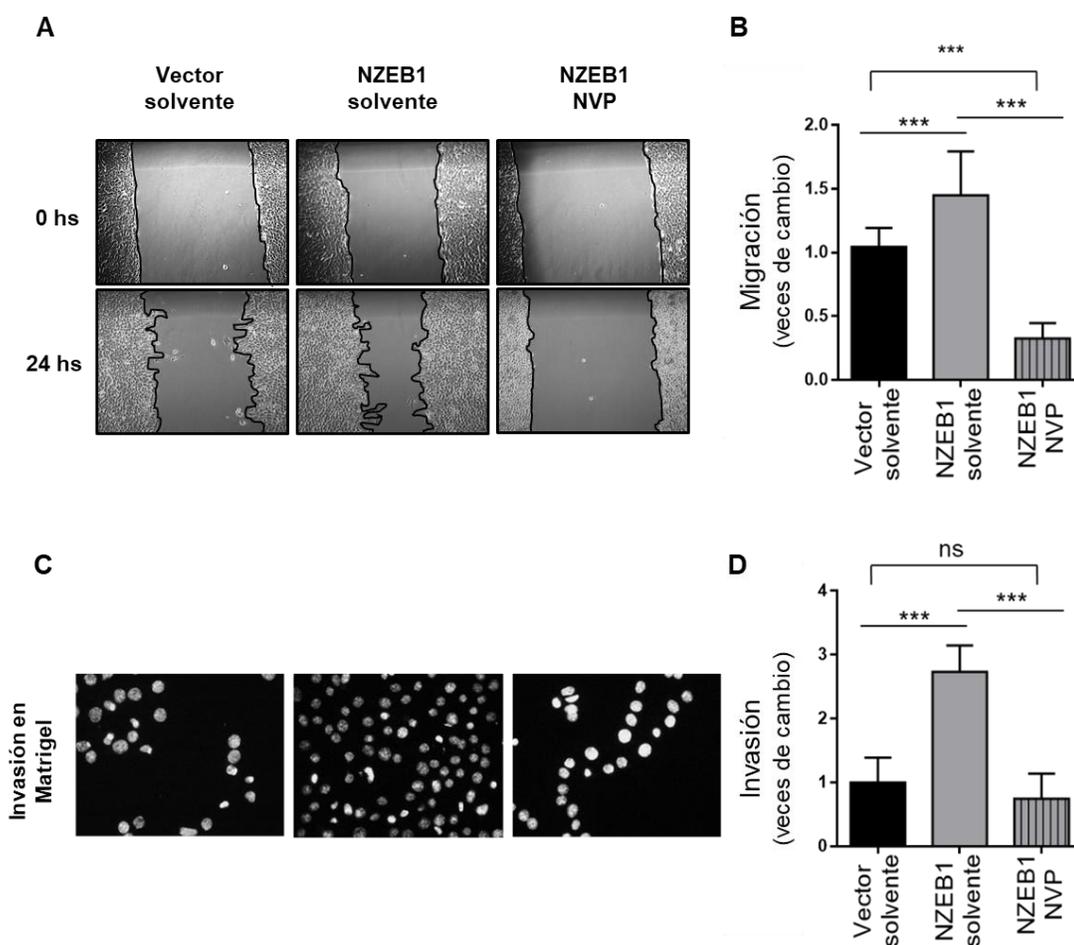


Figura. 26: Efectos del inhibidor de IGF-1R sobre la capacidad de células NMuMG-NZEB1 para migrar e invadir.

Células NMuMG-NZEB1 y/o vector fueron tratadas con DMSO o NVP-AEW541 5µM por 48 horas. Se evaluó la capacidad migratoria e invasiva mediante los ensayos de cierre de la herida (Wound healing) (A) (B) e invasión en Matrigel (C) (D) respectivamente. Los resultados se expresan como media ± DE. La diferencia entre las medias fue analizada por ANOVA y test de Bonferroni. ns: no significativo ***, p≤0,001. Las imágenes y su respectiva cuantificación son representativas de 3 experimentos independientes (n=3)

El ensayo de cierre de la herida mostró que las células NMuMG-NZEB1 tratadas con NVP-AEW541 presentaron una marcada y significativa disminución en su capacidad para cerrar la herida en relación con las células tratadas con el solvente, incluso menor que la observada en células NMuMG vector (**Fig. 26 A y B**). Resultados similares se observaron en el ensayo de invasión en Matrigel, donde las células NMuMG-NZEB1 tratadas con NVP-AEW541 presentaron una drástica caída en su capacidad invasiva con relación a las células NMuMG-NZEB1 tratadas con solvente (control), presentando de esta manera un comportamiento invasivo muy similar a las células que no expresan NZEB1 (NMuMG-Vector) (**Fig. 26 C y D**).

Los resultados descriptos sugieren que, aunque la disminución de NZEB1 inducida por NVP-AEW541 no revierte los niveles de E-cadherina, es suficiente para modular parámetros funcionales asociados al programa EMT. Sin embargo, es posible que estos efectos, aunque dependientes de NVP-AEW541, no sean consecuencia directa de la disminución de NZEB1. Por lo tanto, para descartar esta posibilidad, células NMuMG-Vector fueron tratadas con DMSO (solvente) o NVP-AEW541 5 μ M por 48 horas. Se determinó por inmunofluorescencia y microscopía de fluorescencia confocal la expresión de E-cadherina y del citoesqueleto de actina, y la capacidad migratoria mediante ensayos de cierre de la herida. El tratamiento con el inhibidor de IGF-1R, no modificó los patrones afectados por NZEB1 en ninguna de las variables ensayadas en células NMuMG-Vector (**Fig. 27**), corroborando de esta manera que los resultados observados en células NMuMG-NZEB1 son debidos a efectos directos o indirectos del inhibidor de IGF-1R sobre NZEB1.

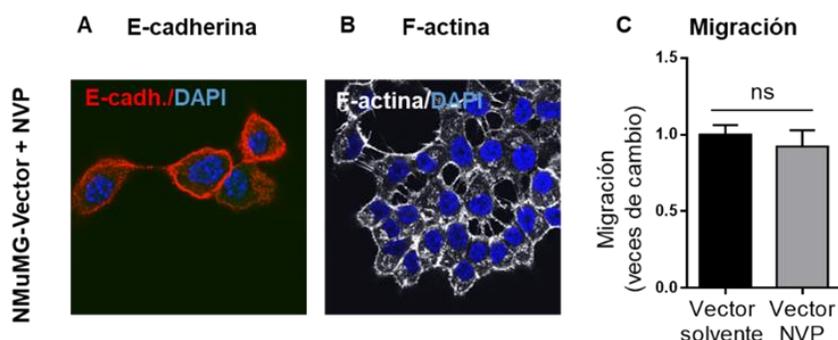


Figura. 27: Efectos del inhibidor de IGF-1R sobre la expresión de E-cadherina, citoesqueleto de actina y migración en células NMuMG-Vector.

Células NMuMG-Vector fueron tratadas con DMSO o NVP-AEW541 5 μ M por 48 horas. Se determinó la expresión y localización subcelular de E-cadherina (A) y del citoesqueleto de F-actina (B) mediante ensayos de inmunofluorescencia seguido de microscopía de fluorescencia confocal. Las imágenes revelan la expresión y localización de E-cadherina (rojo) o citoesqueleto de F-actina (blanco) y tinción de núcleos con DAPI (señal azul). Magnificación= 600X. (c) Se evaluó la capacidad migratoria mediante el ensayo de cierre de la herida (Wound healing). Los resultados se expresan como media \pm DE. La diferencia entre las medias fue analizada por test-t, ns: no significativo. Las imágenes y su respectiva cuantificación son representativas de 2 experimentos independientes (n=3).

CONCLUSIONES PARCIALES CAPÍTULO II

Del desarrollo del capítulo II de resultados se puede concluir que las vías de IGF-1R y PKC regulan la expresión proteica de NZEB1 en un modelo celular de EMT. La vía de IGF-1R regula la función de NZEB1 y consecuentemente el programa EMT mediante la modulación de la estabilidad proteica de dicho factor de transcripción por un mecanismo que involucra la vía del proteasoma. La disminución de la expresión de NZEB1, aun cuando no llega a reestablecer la expresión de E-cadherina tal como se observa en células epiteliales, es suficiente para contrarrestar el fenotipo transformado e invasivo en células con un programa EMT activo

CAPÍTULO III: PARTICIPACIÓN DE LA VÍA DE PKC EN LA REGULACIÓN DE LA FUNCIÓN BIOLÓGICA DE ZEB1 EN LÍNEAS CELULARES DE CÁNCER DE MAMA

Para abordar el estudio de la regulación funcional de ZEB1 por la familia de PKC, se inició un proyecto de colaboración internacional con el laboratorio del Dr. Marcelo Kazanietz en la Universidad de Pennsylvania. Esta colaboración fue central en esta tesis debido a que el Dr. Kazanietz es un referente en el estudio de la familia de las PKCs y su rol en cáncer.

Parte de los experimentos de esta sección fueron realizados durante una pasantía de cinco meses en su laboratorio dentro del Departamento de Farmacología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Pennsylvania, Estados Unidos. La pasantía fue co-financiada por becas recibidas de “IUBMB” (Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular), “JCS” (Journal of Cell Science) y el Programa de Movilidad Internacional de Profesores del Cuarto Centenario de la Universidad Nacional de Córdoba.

1. Relación entre PKC, ZEB1 y marcadores de EMT en líneas celulares de cáncer de mama

Con el objetivo de determinar si existe alguna relación entre PKC, ZEB1 y marcadores de la EMT se utilizaron 10 líneas celulares de mama humanas de diferente grado de agresividad, como se describe en la tabla 2.

Subtipo	Líneas celulares
No transformadas	MCF10A
Luminales (ER ⁺ / PR ⁺)	MDA-MB-453, T47D, SKBR3, MDA-MB-361, BT-474 y MCF7
Basales (ER ⁻ / PR ⁻ / HER-2-Neu ⁻)	MDA-MB 231, MDA-MB 468 y BT 549.

Tabla 2. Líneas celulares de mama humanas utilizadas durante el desarrollo del capítulo III

En todas estas líneas celulares se analizó por WB la expresión proteica de ZEB1, las isoenzimas de PKC (clásicas: α ; noveles: ϵ y δ) y marcadores de EMT (epiteliales: E-cadherina y mesenquimales: N-cadherina y vimentina) (**Fig. 28 A**).

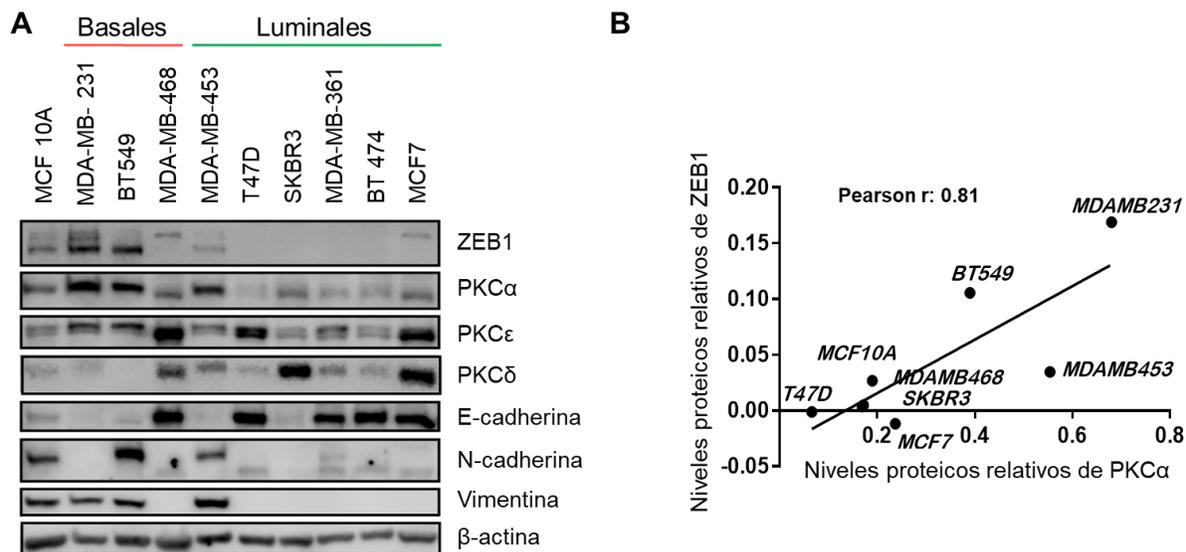


Figura. 28: Los niveles de expresión de PKC α están directamente correlacionados con los niveles de ZEB1 en líneas celulares de cáncer de mama.

(A) Los niveles proteicos de ZEB1, PKC (α , ϵ y δ), E-cadherina, N-cadherina y vimentina fueron determinados mediante análisis de WB a partir de extractos celulares totales de líneas celulares de cáncer de mama, los niveles de β -actina fueron utilizados como control de carga. (B) Regresión lineal entre los niveles de expresión proteica de PKC α y ZEB1 en diferentes líneas celulares de cáncer de mama. * $p < 0,05$. Figura representativa de tres experimentos independientes.

Los resultados evidenciaron una fuerte asociación positiva entre los niveles de expresión de PKC α y de ZEB1. Es decir que aquellas líneas celulares que expresaron altos niveles de PKC α , también presentan mayor expresión proteica de ZEB1 (MDA-MB-231 y BT549). Esto también se correlacionó con una baja expresión del marcador epitelial E-cadherina, y una alta expresión del marcador mesenquimal vimentina. Fue remarcable observar un marcado incremento en los niveles de ZEB1 y PKC α en las líneas celulares de cáncer de mama del tipo basales, las cuales se corresponden patológicamente con tumores triples negativos y poseen un fenotipo muy invasivo. De manera contraria, las líneas celulares de subtipo luminales (caracterizadas por ser menos invasivas), presentan bajos o nulos niveles de PKC α y ZEB1, así como altos niveles de E-cadherina y bajos niveles de vimentina. El análisis estadístico de la expresión proteica de isoenzimas de PKC (α , ϵ y δ), ZEB1 y otros marcadores de EMT, reveló que existe una correlación

del tipo lineal entre los niveles proteicos de PKC α y ZEB1 en líneas celulares de cáncer de mama (r de pearson: 0,81; $*p \leq 0,05$) (**Fig. 28 B**). Resulta interesante resaltar que también se observó una asociación inversa entre los niveles de ZEB1 y la expresión de PKC δ en las líneas celulares basales utilizadas (**Fig. 28 A**), aunque la mismas no mostraron una correlación estadísticamente significativa.

2. Efecto de ZEB1 sobre la expresión de PKC α y marcadores de EMT en células MDA-MB-231.

Para comenzar se estudió el efecto de ZEB1 sobre PKC α y marcadores de EMT. Células MDA-MB-231, las cuales poseen altos niveles de expresión de ZEB1, PKC α y marcadores de EMT, fueron transfectadas de manera transitoria por 72 y 96 horas con cuatro variantes de ARN de interferencia (**ARNi**) específicos para silenciar ZEB1 (ARNi #1; #2; #3; #4), o con un ARNi no específico (**NTC**: nontarget control) como control. La línea parental (P) constituida por células MDA-MB-231 sin transfección se utilizó como un control interno de los tratamientos con el ARNi NTC. Se evaluó el nivel de expresión de ARNm y proteína de ZEB1, PKCs y marcadores de EMT, mediante la reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa a tiempo real (**RT-qPCR**, del inglés quantitative Reverse Transcription - PCR) y WB respectivamente (**Fig. 29**). El silenciamiento de ZEB1 no modificó la expresión de PKC α a nivel de transcritpo ni a nivel proteico, sugiriendo que ZEB1 no regula a PKC α (**Fig.29**). Sin embargo, como consecuencia del silenciamiento de ZEB1, se modificó el patrón de expresión del marcador epitelial E-cadherina de manera tiempo dependiente con relación al control (NTC). A las 72 horas de interferencia de ZEB1, el ARNm de E-cadherina se incrementó significativamente con respecto al control, aunque este cambio no impactó en los niveles de proteína (**Fig. 29 A y B**). No obstante, a las 96 horas de silenciamiento de ZEB1 el incremento en la expresión de E-cadherina se manifestó tanto a nivel de ARNm como a nivel de proteína. Si bien este incremento fue evidente para las cuatro interferencias de ZEB1 (ARNi ZEB1 #1, #2, #3 y #4), solo el aumento producido por las interferencias #1 y #4 mostraron significancia estadística con relación a la condición control (NTC) (**Fig. 29 C-E**).

E-cadherina mostró un patrón de expresión dependiente e inversamente proporcional al nivel de expresión proteica de ZEB1 (**Fig. 29 C**), resaltando la especificidad de esta respuesta.

Por otro lado, el silenciamiento de ZEB1 no produjo cambios significativos sobre el patrón de expresión de PKCε ni sobre el marcador mesenquimal vimentina. Estos resultados fueron consistentes con los obtenidos en la línea celular NMuMG, donde se demostró que la sobreexpresión de NZEB1 fue suficiente para activar el programa de EMT y un fenotipo invasivo y transformado, principalmente a través de la represión de E-cadherina, pero sin cambios en el marcador mesenquimal vimentina (**Fig. 12**).

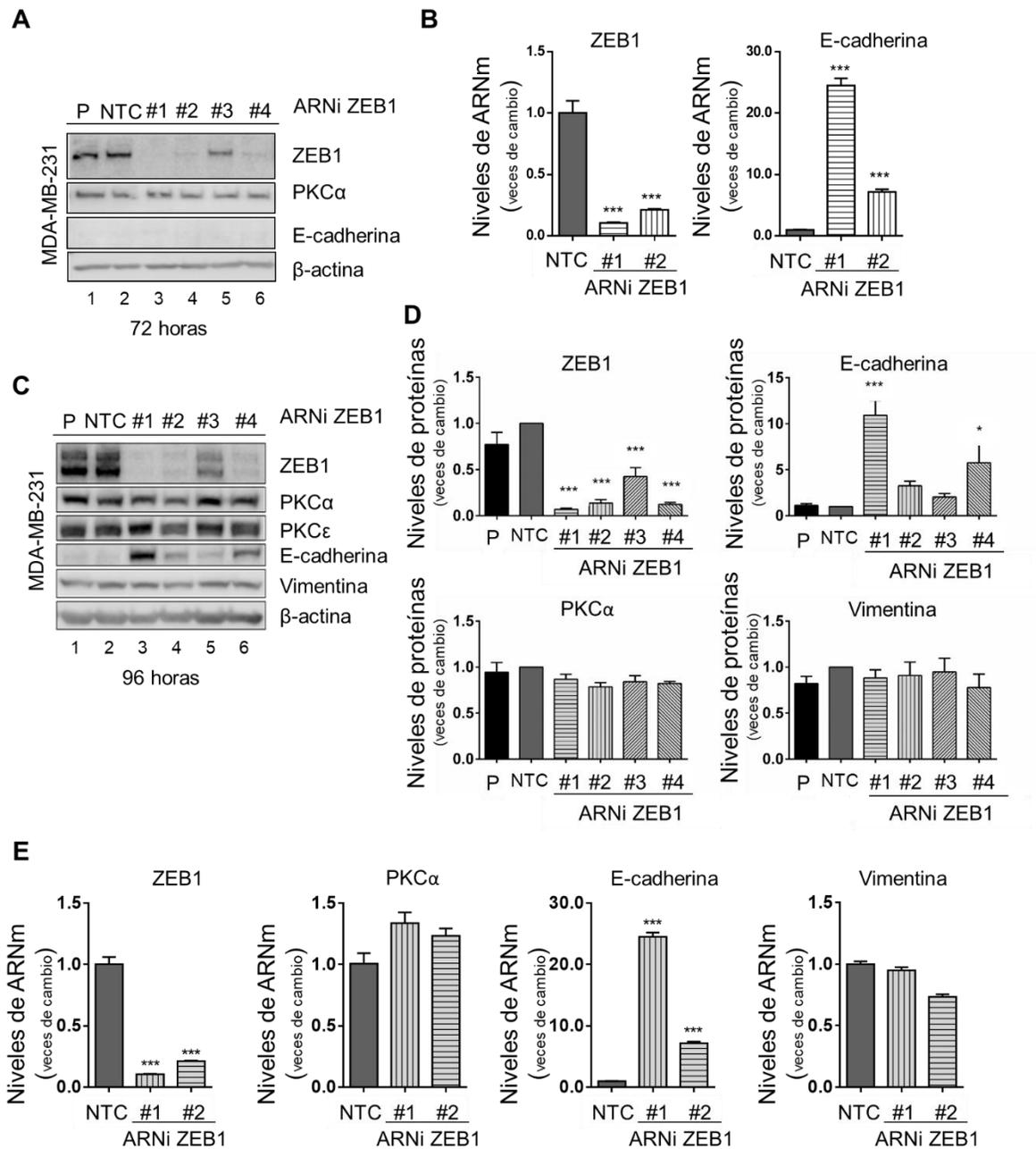


Figura 29: Efecto de ZEB1 sobre la expresión de PKC α y marcadores de EMT en células MDA-MB-231.

Células MDA-MB-231 fueron transfectadas de manera transitoria con cuatro variantes de ARN interferente pequeño (ARNi) específicos para silenciar ZEB1 (ARNi #1; #2; #3; #4), con un ARNi no específico (NTC: nontarget control) como control, también se muestra la línea parental (P) células no transfectadas (control interno del NTC). La expresión proteica de ZEB1, PKC (α y ϵ), E-cadherina y vimentina se determinó por WB. Los niveles de β -actina fueron utilizados como control de carga (A) 72 horas de interferencia; (B) 96 horas de interferencia. (D) Cuantificación de la expresión proteica de ZEB1, PKC α , E-cadherina y vimentina, normalizada con los valores del control de carga y relativizados al control (NTC) a las 96 horas de ARNi ZEB1. Se determinó mediante la reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa a tiempo real (RT-qPCR, Reverse Transcription quantitative Polymerase Chain Reaction) la expresión del ARNm de ZEB1 y E-cadherina a las 72 horas de interferencia (B) y de ZEB1, PKC α , E-cadherina y vimentina a las 96 horas de interferencia (E). Los valores UBC (Ubiquitin C) fueron utilizados para la normalización. Los resultados se expresan como media \pm DE. La diferencia entre las medias fue analizada por ANOVA y test de Dunnett. * $p \leq 0,05$ ** $p \leq 0,01$ *** $p \leq 0,001$. Figura representativa de dos experimentos independientes (n=3).

3. Efecto de PKC α sobre la expresión de ZEB1 y marcadores de EMT en líneas celulares de cáncer de mama

Para estudiar la potencial regulación de ZEB1 por PKC α se inhibió la función de la misma mediante ARNi para o mediante inhibición farmacológica de PKC totales (PKCs) y clásicas (cPKCs) (**Fig.30-32**). Se seleccionaron dos líneas celulares de cáncer de mama tipo basales (MDA-MB-231 y BT549) caracterizadas por su alta expresión de ZEB1 y PKC α , así como una línea celular de cáncer de mama tipo luminal (MDA-MB-453) que presenta niveles de ZEB1 menores que las otras dos líneas, pero altos niveles de las tres isoenzimas de PKCs estudiadas (α , ϵ y δ) (**Fig. 28**). Esta última línea fue seleccionada a modo de control, debido a que estudios previos han demostrado que la alteración de la expresión de una isoenzima de PKC puede alterar la expresión de otros miembros de la familia de PKC. Por ejemplo, la sobreexpresión de PKC α altera la expresión de PKC δ y PKC ϵ en varios modelos celulares [113-115].

Se realizó el silenciamiento de PKC α en las líneas celulares anteriormente mencionadas mediante transfecciones transitorias de 2 variantes de ARNi específicos para PKC α (ARNi $\alpha 1$ y $\alpha 2$) por 72 y 96 horas. Debido a que ambos tiempos de silenciamiento arrojaron la misma tendencia, se presentan los resultados obtenidos con el silenciamiento por 72 horas. El análisis por WB de la expresión de PKCs mostró una depleción de PKC α de aproximadamente el 80%. Esto ocasionó una disminución de aproximadamente un 50% de los niveles de ZEB1 en las tres

líneas celulares seleccionadas (**Fig. 30 y 31 A y C**). La caída de la expresión de ZEB1 por silenciamiento de PKC α se corroboró en la línea celular MDA-MB-231 utilizando cuatro ARNi específicos para PKC α adicionales (ARNi α 3, α 4, α 5 y α 6) (**Fig. 31**). Los niveles proteicos de los marcadores de EMT E-cadherina y vimentina, así como el patrón de expresión de PKC ϵ y PKC δ , no mostraron diferencias significativas (**Fig.30 A, C y Fig. 31 A, C**).

Los resultados presentados hasta el momento sugieren que PKC α podría regular a ZEB1 en líneas celulares de cáncer de mama principalmente en el subtipo basal. Este tipo de tumores se caracteriza por ser triple negativo para receptores hormonales y el receptor de HER-2 (no responden a terapias hormonales) y presentan una alta agresividad y capacidad invasiva. Dada esta potencial relevancia a nivel terapéutico, se continuó indagando acerca de los mecanismos regulatorios de ZEB1 por PKC α en la línea celular MDA-MB-231. Se evaluaron los niveles de expresión del ARNm de ZEB1, PKC α y marcadores de EMT, mediante RT-qPCR en células MDA-MB-231 tratadas con ARNi contra PKC α por 72 horas (**Fig. 31 D**). Sorprendentemente, en las células transfectadas con el ARNi para PKC α , los niveles de ARNm de ZEB1 no presentaron diferencias significativas en comparación con las células control (NTC) (**Fig. 31**), a diferencia de lo que ocurre a nivel de expresión proteica. A su vez, las células MDA-MB-231 silenciadas para PKC α presentaron un incremento significativo en los niveles de ARNm de E-cadherina en comparación con el control (NTC) (**Fig. 31 C y D**). Si bien este incremento no se hizo evidente a nivel proteico, estos resultados sugieren una tendencia incipiente a revertir del fenotipo mesenquimal, la cual puede atribuirse a la disminución proteica de ZEB1 producida por el silenciamiento de PKC α .

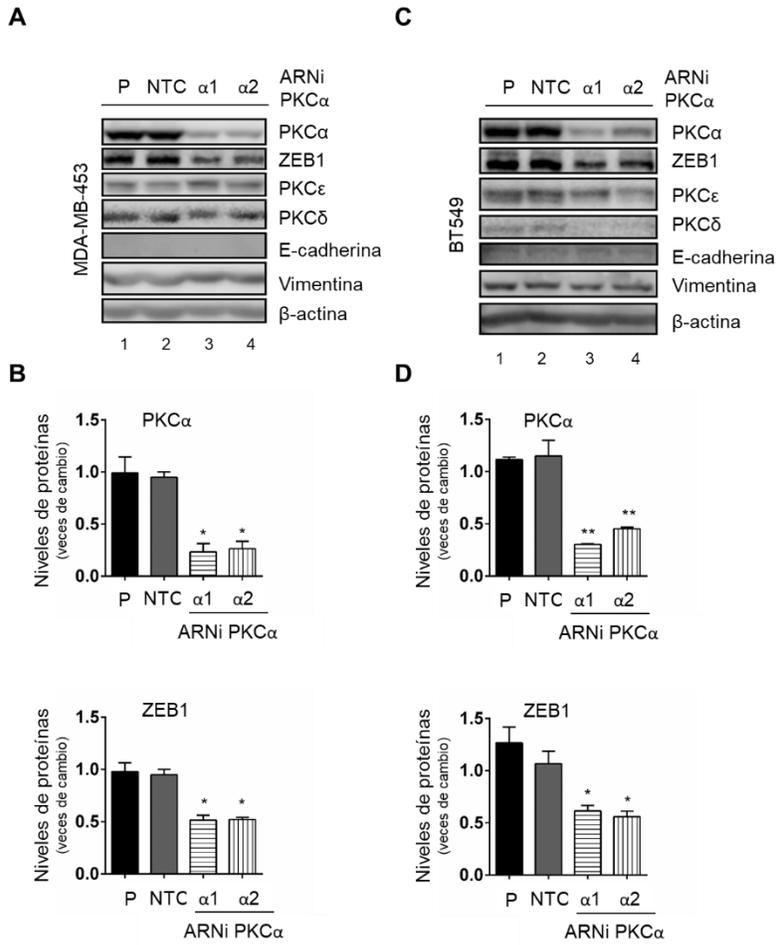


Figura. 30: PKCα regula la expresión proteica de ZEB1 en líneas celulares de cáncer de mama MDA-MB-453 y BT549.

Las líneas celulares de cáncer de mama MDA-MB-453 (A) BT549 (B), fueron transfectadas con ARNi para PKCα (α1 y α2) por 72 horas. La expresión proteica de ZEB1, PKC (α, ε y δ), E-cadherina, N-cadherina y vimentina se determinó por WB. Los niveles de β-actina fueron utilizados como control de carga. (B)(D) Cuantificación de la expresión proteica de PKCα y ZEB1, normalizada con los valores del control de carga y relativizados al control (NTC). Los resultados se expresan como media ± DE. La diferencia entre las medias fue analizada por ANOVA y test de Dunnett. *p≤0,05 **p≤0,01. La figura es representativa de tres experimentos independientes.

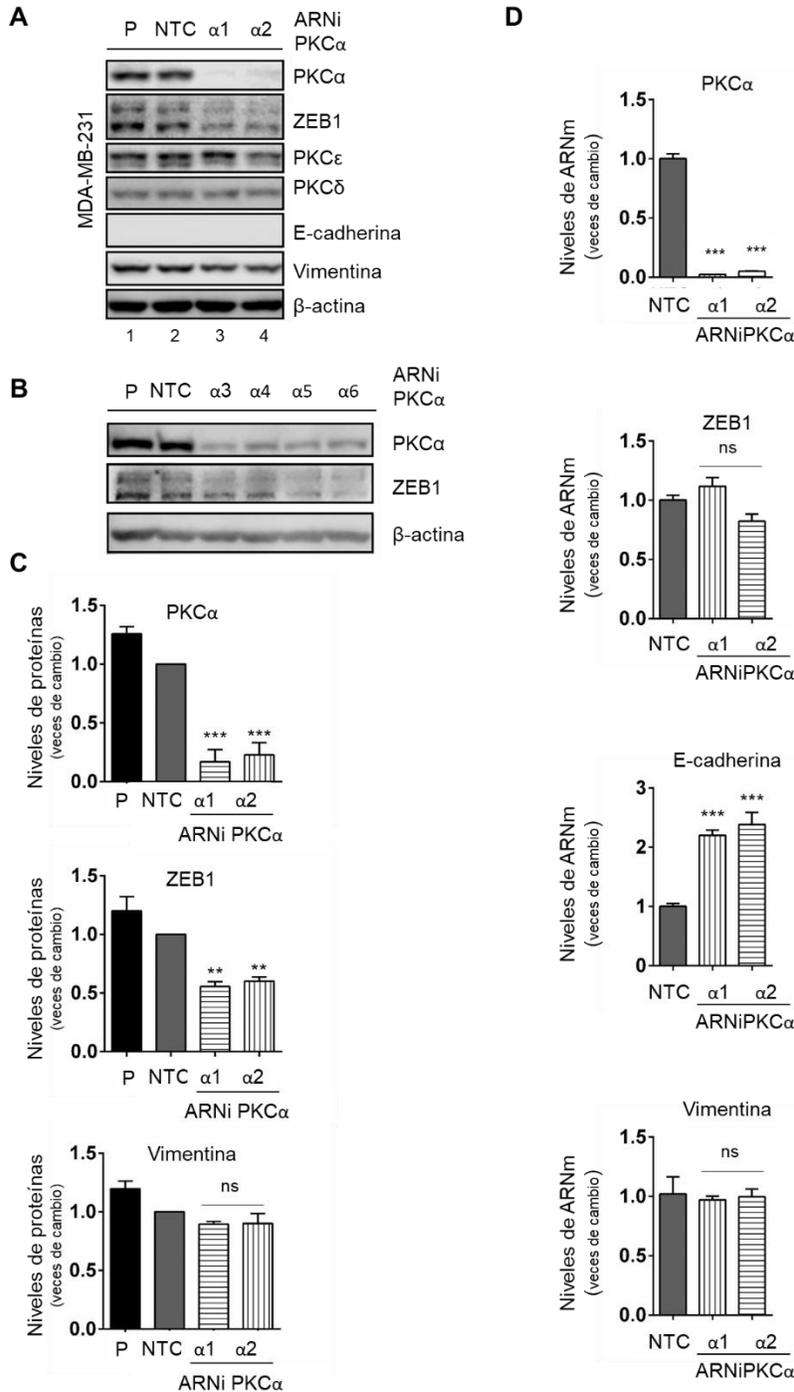


Figura. 31: PKCα regula la expresión proteica de ZEB1 y modifica los niveles de ARNm de E-Cadherina en células MDA-MB-231.

Células MDA-MB-231 fueron transfectadas con ARNi para PKCα (α1, α2) (A) o con ARNi para PKCα (α3, α4, α5, α6) (B) por 72 horas. La expresión proteica de ZEB1, PKCs (α, ε y δ), E-cadherina, N-cadherina y vimentina se determinó por WB. Los niveles de β-actina fueron utilizados como control de carga. (C) Cuantificación de la expresión proteica de PKCα, ZEB1 y vimentina fue normalizada con los valores del control de carga y relativizados al control (NTC). (D) Se determinó mediante RT-qPCR la expresión del ARNm de PKCα, ZEB1, E-cadherina y vimentina. Los valores UBC (Ubiquitin C) fueron utilizados para la normalización. Los resultados se expresan como media ± DE. La diferencia entre las medias fue analizada por ANOVA y test de Dunnett. *p≤0,05 **p≤0,01 ***p≤0,0001. La Figura es representativa de tres experimentos independientes (n=3).

Para confirmar estos resultados mediante otra aproximación experimental se recurrió a la inhibición farmacológica de PKCs. Células MDA-MB-231 fueron tratadas por 48 horas con dos inhibidores farmacológicos de PKCs, GF109203 (inhibidor de PKCs total) y GÖ6976 (inhibidor de

cPKCs clásicas, dentro de las cuales se encuentra PKC α). Para corroborar el funcionamiento de los tratamientos se valoró el estado de activación de la vía mediante la detección de formas fosforiladas de PKC α / β II y la caída de los niveles totales de PKC α , la cual se induce debido a que las formas fosforiladas de esta proteína son más estables [95].

En coincidencia con los resultados arrojados con el silenciamiento de PKC α por ARNi, la inhibición farmacológica de la vía de PKC condujo a una significativa disminución en la expresión de ZEB1 (**Fig. 32 A y B**).

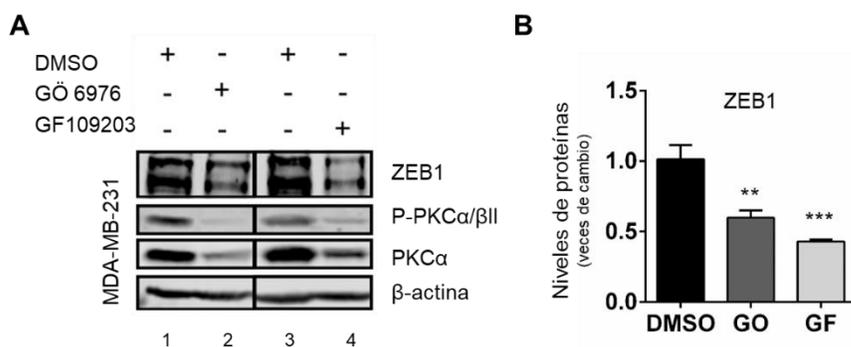


Figura. 32: La inhibición farmacológica de la vía de PKC reduce la expresión de ZEB1 en células MDA-MB-231.

Células MDA-MB-231 fueron tratadas con los inhibidores farmacológicos de cPKCs (Gö 6983) y PKCs total (GF109203) (5 μ M) o DMSO (control) por 48 horas. La expresión proteica de ZEB1 y PKC α se determinó por WB. Fosfo PKC α / β II se utilizó como control de los tratamientos y los niveles de β -actina fueron utilizados como control de carga. Los resultados se expresan como media \pm DE. La diferencia entre las medias fue analizada por ANOVA y test de Dunnett. * $p \leq 0,05$ ** $p \leq 0,01$ **** $p \leq 0,0001$. Figura representativa de tres experimentos independientes.

4. Efecto de PKC α sobre estabilidad proteica de ZEB1

Con el fin de indagar acerca del mecanismo mediante el cual la inhibición de PKC α regula a ZEB1, se realizaron estudios de la estabilidad de la proteína. Células MDA-MB-231 en condiciones normales de cultivo o tratadas con los inhibidores farmacológicos o ARNi fueron a su vez tratadas con el inhibidor de la traducción CHX y posteriormente se determinó la expresión de ZEB1 mediante WB (**Fig. 33**). Se graficaron los niveles relativos de ZEB1 en función del tiempo con la finalidad de determinar su estabilidad frente a los diferentes tratamientos. Se determinó que la inhibición de PKC α mediante ARNi disminuyó significativamente la estabilidad de ZEB1 en

relación con el control en función del tiempo (Fig. 33 A y B). De manera similar, la inhibición farmacológica de PKCs indujo una degradación progresiva de ZEB1 mayor que la condición control (Fig. 33 D y E). Estas observaciones, en conjunto con los resultados de niveles de ARNm (Figura 31 B), sugieren que PKC α podría regular a ZEB1 a nivel postraduccional de manera directa mediante modificaciones que alteren su estabilidad proteica.

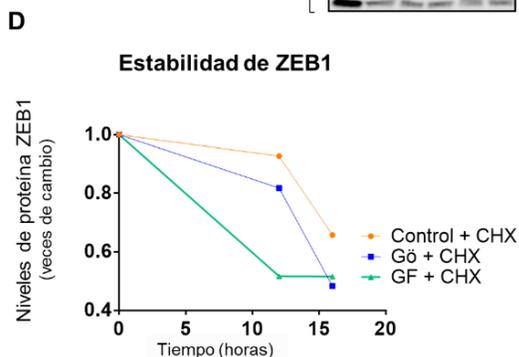
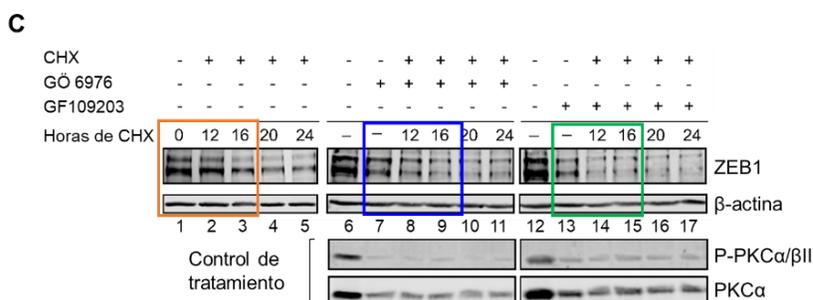
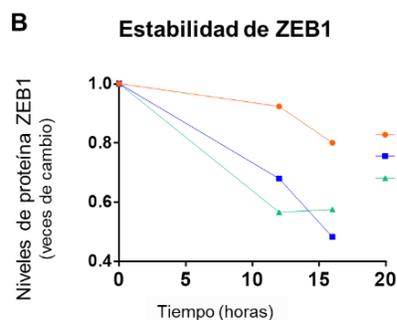
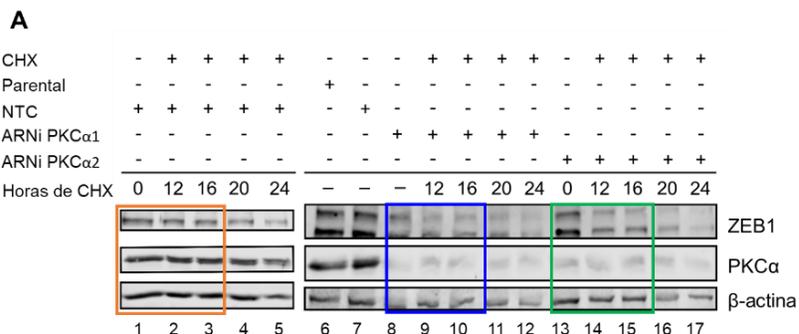


Figura. 33: La inactivación de PKC α por silenciamiento o inhibición farmacológica disminuye la estabilidad proteica de ZEB1 en células MDA-MB-231.

Células MDA-MB-231 fueron transfectadas con ARNi para PKC α (α 1, α 2) por 72 horas (A) o tratadas con los inhibidores farmacológicos de cPKCs (GÖ 6983) y PKCs total (GF109203) (5μ M) por 48 horas (C) solas o en combinación con cicloheximida (CHX) 25ug/ml (12, 16, 20, 24 horas) La expresión proteica de ZEB1 y PKC α se determinó por WB. Los niveles de β -actina fueron utilizados como control de carga. (B y D) Gráficos de los niveles proteicos relativos de ZEB1 en función del tiempo. Se consideró como valor inicial (1) la expresión de ZEB1 a tiempos cero de CHX. Figura representativa de tres experimentos independientes.

5. Evaluación de la Interacción entre PKC α y ZEB1

Resultados presentados en capítulos anteriores demostraron que la región N-terminal de ZEB1 es sustrato de fosforilación de la familia de PKC (**Fig. 10 y 21 C**), aunque estos ensayos no permiten determinar la identidad de la isoenzima de PKC involucrada en esta modificación postraduccional. Para obtener pruebas de un posible mecanismo directo de fosforilación de PKC α sobre ZEB1 se realizaron ensayos de co-inmunoprecipitación (Co-IP). En una primera aproximación experimental se utilizó la línea MDA-MB-231, la cual presenta altos niveles de expresión endógena de ambas proteínas (ZEB1 y PKC α). Para favorecer una posible interacción se realizaron estímulos de la vía de PKC mediante tratamientos con PMA o con un análogo de DAG soluble con selectividad por PKC α (HK654). Los extractos celulares totales fueron inmunoprecipitados con anticuerpos anti-ZEB1 o anti-IgG como control (**Fig. 34 A**). Los resultados evidenciaron una interacción directa entre ZEB1 y PKC α luego del tratamiento con PMA o con HK654 (**Fig. 34 A**). Para corroborar estos resultados células HEK293T fueron transfectadas de manera transitoria con los vectores de expresión plasmídico de HM-ZEB1 y PKC α . En este caso para favorecer la interacción entre ambas proteínas también se estimuló la vía de PKC mediante tratamientos con PMA (cPKCs y nPKCs) o con HK654 (PKC α). A continuación, haciendo uso de la proteína de fusión de ZEB1-6His, se realizó la purificación de ZEB1 con perlas de níquel bajo condiciones no desnaturizantes, y posteriormente se determinó la interacción de ambas proteínas por WB. Los resultados corroboraron la interacción entre ZEB1 y PKC α , la cual además fue proporcional al estado de activación de PKC (**Fig. 34B**). Si bien estos resultados sugieren que existiría una interacción entre ZEB1 y PKC α , no puede descartarse la presencia de alguna proteína adaptadora intermediaria de dicha interacción.

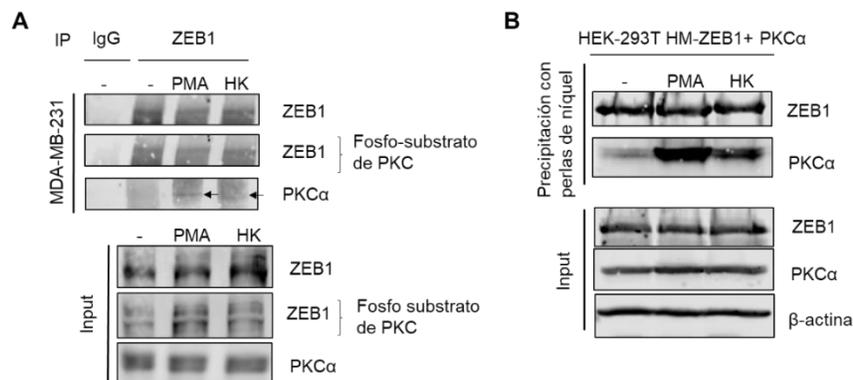


Figura. 34: PKCα interactúa con ZEB1 en células de cáncer de mama MDA-MB-231.

(A) Células MDA-MB-231 fueron tratadas con activadores de PKC (PMA) 10nM y PKCα (HK654) 10uM por 15 minutos, los extractos celulares totales fueron co-inmunoprecipitados con anticuerpos anti ZEB1 o Anti IgG como control. (B) Purificación con perlas de níquel de extractos celulares totales de células HEK293T transfectadas de manera transitoria con los vectores de expresión HM-ZEB1 y PKCα y tratadas con activadores de PKC (PMA) 10nM y PKCα (HK654) 10uM por 15 minutos. La expresión proteica de ZEB1, PKCα y fosfo-substrato de PKC se determinó por WB. Las muestras del input representan menos del 10% del extracto celular total para cada condición. Las figuras son representativas de dos experimentos independientes

6. Regulación de la migración e invasión celular por ZEB1 y PKCα

Bajo la hipótesis que la disminución de ZEB1 sería suficiente para revertir el programa de EMT y consecuentemente el fenotipo transformado, se evaluó la repercusión de la caída de la expresión de ZEB1 inducida por la inhibición de PKCα sobre dos parámetros funcionales de EMT: migración e invasión celular. Inicialmente, se valoró migración mediante ensayos de cierre de la herida en células MDA-MB-231 luego del silenciamiento de PKCα o ZEB1 mediante ARNi, o luego de la inhibición farmacológica de la vía de PKC (GÖ6976 o GF 109203) (**Fig. 35**). Las células MDA-MB-231 tratadas con ARNi contra ZEB1 mostraron una contundente disminución de la migración en relación con el control (NTC). Posteriormente se evaluó el efecto del silenciamiento de PKCα sobre este mismo parámetro. Las células MDA-MB-231 depletadas de PKCα presentaron una disminución significativa en la migración, de manera similar a lo observado luego del silenciamiento de ZEB1 (**Fig. 35 B**). Paralelamente el efecto de PKCα sobre la migración fue corroborado mediante la inhibición farmacológica de PKC, la cual produjo una contundente

disminución en la migración, similar a la observada bajo los efectos del silenciamiento de PKC α mediante ARNi (Fig. 35 C).

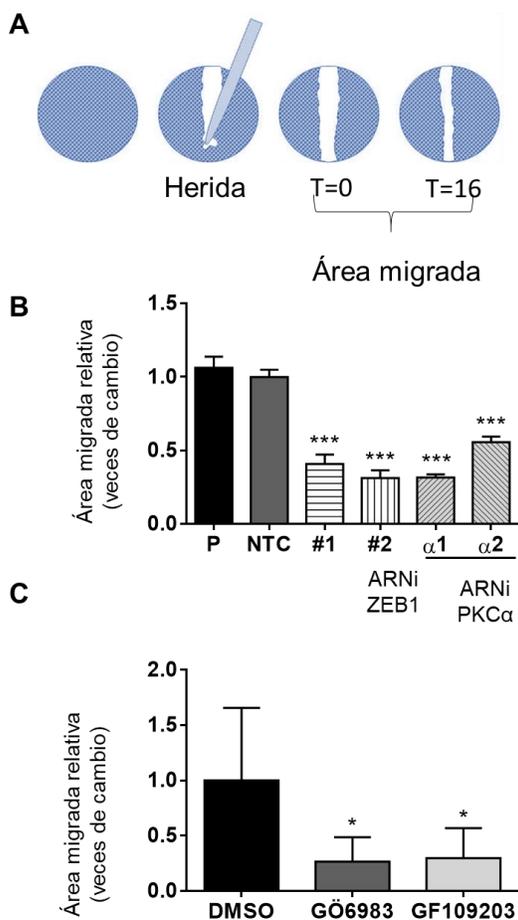


Figura 35: El silenciamiento de ZEB1 y PKC α inhiben la migración en células MDA-MB-231.

(A) representación esquemática del ensayo de migración por cierre de la herida. (B) se evaluó la capacidad migratoria mediante el ensayo de cierre de la herida en células MDA-MB-231 transfectadas de manera transitoria por 72 horas con ARNi específicos para silenciar ZEB1 (ARNi #1 y #2) o PKC α ($\alpha 1$ y $\alpha 2$), o con un ARNi no específico (NTC) como control, también se muestra la línea parental (P) células no transfectadas (control interno del NTC) se muestra la cuantificación del área migrada relativa al control NTC (A) o en células MDA-MB231 tratadas con los inhibidores farmacológicos de cPKCs (GÖ 6983) y PKCs total (GF109203) (5 μ M) o DMSO (control) por 48 horas (C) cuantificación del área migrada relativa al control DMSO. Los resultados se expresan como media \pm DE. La diferencia entre las medias fue analizada por ANOVA y test de Dunnett *p \leq 0,05. Las imágenes son representativas de 2 experimentos independientes (n=3).

Posteriormente, se analizó la capacidad invasiva de las células MDA-MB-231 silenciadas para ZEB1 o PKC α mediante ensayos de invasión en Matrigel. Para garantizar la pertinencia y especificidad de esta respuesta, en estos ensayos se utilizaron 4 ARNi diferentes para ZEB1 (#1, #2, #3 y #4) y 6 ARNi para PKC α ($\alpha 1$; $\alpha 2$; $\alpha 3$; $\alpha 4$; $\alpha 5$ y $\alpha 6$). Las células MDA-MB-231 silenciadas para ZEB1 mostraron una sustancial reversión en la capacidad invasiva con relación a la condición control (NTC), la cual fue directamente proporcional al nivel de inhibición de ZEB1 (Fig. 36 A-C). En este punto la interferencia #3 (ARNi ZEB1 #3) representó un control interno que pone de manifiesto la especificidad de esta respuesta, debido a que correlaciona el nivel de silenciamiento de ZEB1 de manera proporcional a la inhibición de la invasión. En manera similar, las 6 interferencias de PKC α utilizadas indujeron una caída significativa en la capacidad invasiva

(Fig. 36 D-F), la cual fue consistente y proporcional con la disminución de ZEB1 observada (Fig. 31 A y B).

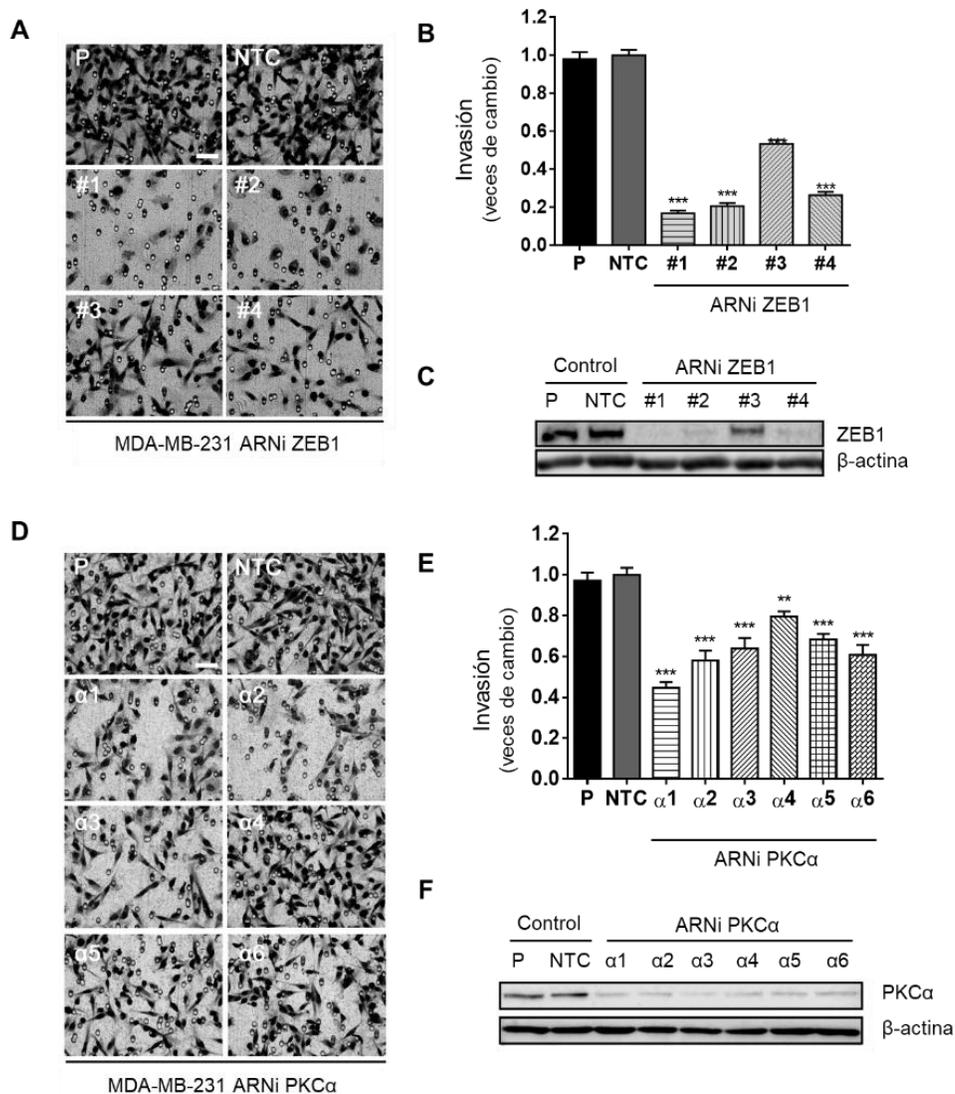


Figura 36: ZEB1 y PKCα son necesarios para regular la invasión de células MDA-MB-231.

Se evaluó la capacidad invasiva mediante ensayos de invasión en Matrigel en células MDA-MB-231 transfectadas de manera transitoria por 72 horas con ARNi específicos para silenciar ZEB1 (ARNi #1, #2, #3 y #4) (A) o PKCα (α1, α2, α3, α4, α5 y α6) (D) o con un ARNi no específico (NTC) como control, también se muestra la línea parental (P) células no transfectadas (control interno del NTC). (B) (E) cuantificación del número de células que invaden por campo relativo al control NTC. (C)(F) WB donde se corroboró el funcionamiento de las interferencias y el control de carga inicial durante el ensayo. Los resultados se expresan como media ± DE. La diferencia entre las medias fue analizada por ANOVA y test de Dunnett **p≤0,01 ***p≤0,001. Las imágenes son representativas de 3 experimentos independientes.

CONCLUSIONES PARCIALES CAPÍTULO III

Del desarrollo del capítulo III se puede concluir que PKC α regula la expresión de ZEB1 a nivel proteico en líneas celulares basales de cáncer de mama. Presumiblemente esta regulación estaría coordinada por la fosforilación de ZEB1 por PKCs, la cual sería promovida por la interacción directa entre ambas proteínas. Esta regulación postraducional implica un mecanismo que en última instancia modifica la estabilidad proteica de ZEB1, con importantes consecuencias en los comportamientos migratorios e invasivos. Estos resultados demuestran por primera vez que la vía de transducción de señales de PKCs regula la función biológica de ZEB1, donde el eje PKC α -ZEB1 adquiere un rol central del programa EMT en líneas celulares de cáncer de mama, controlando la migración e invasión celular.

DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

ZEB1 como un regulador maestro del programa EMT: impacto en fenotipos asociados a la progresión tumoral

En este trabajo se estableció un rol clave de ZEB1 como regulador de los eventos del programa EMT asociados a la progresión tumoral mediante la utilización de dos modelos celulares que representan los extremos opuestos de este programa. Por un lado, se utilizó una línea celular de epitelio mamario murino no transformado (NMuMG), con muy bajos niveles de expresión de ZEB1 endógeno. En este contexto la expresión exógena de NZEB1 fue suficiente para recapitular el programa de EMT, sin modificaciones de la expresión proteica de otros factores de transcripción de EMT (FT-EMT) como Snail e independientemente de señales pro-oncogénicas como TGF- β . Por otro lado, el silenciamiento de ZEB1 en una línea celular altamente transformada MDA-MB-231 revirtió de manera contundente el fenotipo mesenquimal y el comportamiento invasivo de estas células. En conjunto, estos resultados posicionan a ZEB1 como un componente necesario y suficiente para la regulación de la migración e invasión celular en líneas celulares de cáncer de mama.

Si bien numerosos reportes afirman que la activación del programa EMT es un prerrequisito para la invasión y la metástasis [49, 61, 116], actualmente existe controversia en cuanto a la participación del programa EMT y particularmente los FT-EMT en los procesos invasivos. Dos importantes trabajos recientemente publicados abordan esta temática desde diferentes ópticas. Por un lado Zheng y colaboradores reportaron en un modelo animal de cáncer de páncreas que el silenciamiento de Snail1 o Twist1 no afecta de manera significativa la formación de tumores, invasión y metástasis. Basándose en sus resultados, estos autores proponen que la EMT es dispensable para la metástasis [117]. Por otro lado, en una reciente publicación del laboratorio del Dr. Brabletz utilizando el mismo modelo animal, se observó que ZEB1 es clave para el desarrollo tumoral y la metástasis. Estos autores demostraron que la depleción de ZEB1 suprime el fenotipo indiferenciado, la capacidad de colonización y en particular la plasticidad fenotípica [78]. Estos datos están en clara contraposición con el modelo propuesto por Zheng y colaboradores, ya que vinculan directamente la activación de la EMT con

la progresión tumoral. En conjunto se puede argumentar que si bien ZEB1 actúa en paralelo con los FT-EMT Snail y Twist en el cáncer de páncreas, existen sub funciones específicas de los FT-EMT que no son redundantes, pero si complementarias.

En este punto, cobra relevancia la especificidad que estos FT-EMT puedan tener a nivel espacial y temporal. Durante el desarrollo de esta Tesis Doctoral se demostró que la sobreexpresión de NZEB1 en células NMuMG es suficiente para recapitular estadios intermedios del programa EMT sin cambios en la expresión proteica de Snail. Esto sugiere que los cambios fenotípicos observados son principalmente atribuidos a la expresión aberrante de NZEB1 en este modelo celular, posicionando a ZEB1 aguas abajo de Snail en la activación y mantenimiento de la EMT. En línea con estas observaciones, numerosos estudios reportan que las transfecciones de Snail, Twist o ZEB1 inducen la EMT [61, 97, 118, 119]. Sin embargo, en estos casos se observó que la expresión ectópica de Snail conduce a la expresión de ZEB1, mientras que la expresión de ZEB1 no tiene efecto alguno sobre los niveles de Snail [120-122]. Es decir que si bien la activación del EMT por parte de Snail puede vincularse a la inducción de ZEB1, la activación del EMT por parte de ZEB1 no involucra a Snail. Un posible mecanismo sería la activación directa de ZEB1 por medio de Snail a nivel transcripcional. Esta posibilidad está sustentada por el hecho de que el promotor del gen de ZEB1 humano tiene un sitio putativo de unión a Snail [2].

Este modelo de activación espacio-temporal de Snail y ZEB1 es consistente con el programa EMT activado por citoquinas. Por ejemplo, en respuesta TGF- β en células NMuMG, Snail1 es el primer factor de transcripción que incrementa su expresión, siendo detectado entre 30 minutos y 1 hora después de la exposición a la citoquina. En cambio, la inducción de ZEB1 requiere entre 6 y 8 horas [122, 123]. Resulta interesante remarcar que si bien la inducción de Snail se da muy rápidamente con el estímulo con TGF- β , Snail tiene una vida media que ronda los 30 minutos [112, 124]. Por el contrario, ZEB1 es de inducción tardía con una vida media que ronda entre las 18 y 24 horas [118]. Estos resultados, en conjunto con los obtenidos en esta Tesis Doctoral, sugieren que Snail es un factor transcripcional de respuesta temprana que desencadena la EMT, mientras que ZEB1 sería un efector de las etapas avanzadas del programa EMT. Esto posiciona a ZEB1 como un regulador maestro del programa EMT, responsable de consolidar el fenotipo mesenquimal.

En esta Tesis Doctoral se propone un modelo en el que NZEB1 induce estadios intermedios de EMT con fenotipo mesenquimo-epitelial, caracterizado por la pérdida del marcador epitelial E-cadherina, incremento en la secreción de MMP2, pero sin la ganancia del marcador mesenquimal vimentina. La consecuente adquisición de comportamientos típicos de EMT, como reorganización del citoesqueleto de actina, capacidades migratorias e invasivas incrementadas, así como la capacidad de crecimiento independiente del anclaje, pone de manifiesto el rol clave de ZEB1 en la transformación y metástasis. ZEB1 demostró tener mayor incidencia en la represión de marcadores epiteliales, dentro de los cuales se destaca E-cadherina. Probablemente la represión de E-cadherina por ZEB1 implique el reclutamiento de sus clásicos co-represores CtBP y BRG1 [3, 4, 10]. Sin embargo es muy probable que mecanismos independientes de sus co-represores canónicos estén implicados en la regulación negativa de E-cadherina por la versión N-terminal (NZEB1), ya que si bien esta región conserva el dominio de interacción con el ADN de sus blancos transcripcionales, no conserva el sitio de unión a su clásico co-represor CtBP (CID), que se encuentran en la región C-terminal [3, 4, 83].

Por otro lado resulta importante destacar que, si bien trabajos de otros grupos reportan que ZEB1 activa el marcador mesenquimal vimentina [27], ZEB1 tuvo baja o nula incidencia sobre la expresión de vimentina en los modelos estudiados en esta Tesis Doctoral. Tanto la expresión ectópica de NZEB1 en células NMuMG, así como el silenciamiento de ZEB1 en MDA-MB-231 no alteraron los niveles de vimentina. Probablemente la inducción de marcadores mesenquimales por parte de ZEB1 puede ser dependiente del contexto celular o del estado de activación de determinadas vías de transducción de señales.

Gran parte del efecto de ZEB1 y NZEB1 sobre el fenotipo transformado, podría ser atribuido a la depleción de E-cadherina con la consecuente desestabilización de la arquitectura celular normal. Esta reorganización a nivel inter-celular podría causar los cambios observados en la distribución del citoesqueleto de actina, favoreciendo la formación de estructuras que favorecen la migración e invasión (filipodios, lamelipodios e invadipodios). Sin embargo, también es posible que ZEB1 module la formación de invadipodios por un mecanismo activo de regulación directa de proteínas de interacción con actina [125]. Otro posible mecanismo es que ZEB1 module marcadores mesenquimales asociados a la degradación de la matriz extracelular,

favoreciendo de esta manera la invasión. En tal sentido, en este trabajo de Tesis Doctoral se evidenció un cambio en el patrón de MMP2 y MMP9 secretadas por células NMuMG-NZEB1. Tampoco se descarta la participación de otras metaloproteinasas de matriz no ensayadas, así como de otras moléculas de adhesión que podrían ser reguladas por ZEB1. En apoyo a estos resultados, estudios de otros investigadores demostraron que la inducción de EMT por pérdida de la expresión de E-cadherina facilita la invasión de manera dependiente de MMP2 y ZEB1 en líneas de carcinoma de pulmón de células no pequeñas (NSCLC: A549) [126].

En conclusión, un modelo actualizado podría considerar al programa EMT como un proceso múltiple y dinámico que fluctúa entre el fenotipo epitelial y mesenquimal, en contraposición a un proceso que implica una única decisión binaria. De manera similar a los estadios de EMT intermedios observados en líneas celulares, la ejecución de EMT en cáncer no es homogénea. De hecho, para tumores de tipo epiteliales la descripción del frente invasivo del tumor difiere funcionalmente al centro del mismo, indicando una heterogeneidad en el tipo de EMT ejecutado dentro del microambiente tumoral. Mientras el frente invasor gana propiedades mesenquimales debido a un sistema de adhesión celular debilitado, el centro tumoral mantiene un fenotipo epitelial [70, 83, 127]. Por lo tanto, es interesante especular que durante la progresión tumoral se observe un gradiente de diferentes estadios de EMT dependiendo de la heterogeneidad molecular intrínseca que surge de diversos perfiles de mutación y del delicado equilibrio de los conductores transcripcionales, los represores de EMT o las redes de señalización involucradas.

La reversión del programa de EMT podría representar entonces una opción terapéutica atractiva para combatir las metástasis. Además, dado que la pérdida del fenotipo mesenquimal se ha visto asociada a la recuperación de sensibilidad a ciertos tratamientos quimioterapéuticos [97, 118, 120, 128], la inhibición farmacológica del EMT proporcionaría una forma interesante de re-aprovechar terapias convencionales. Sin embargo, hay varios factores que deben considerarse: 1) Dada la existencia de gradientes de EMT, todavía es incierto hasta qué punto la reversión del fenotipo mesenquimal es eficaz para contrarrestar la metástasis y/o aumentar la sensibilidad a fármacos antitumorales convencionales; 2) Mientras que el programa EMT es necesario para la invasión y diseminación de células tumorales, el proceso inverso (MET)

promovería la colonización y la proliferación metastásica del tumor secundario en un órgano distante. Por lo tanto una reversión completa de la EMT podría tener el efecto indeseado de promover pasos tardíos de la cascada de la metástasis [65, 70, 120].

Regulación de la actividad de ZEB1: mecanismos postraduccionales

El programa de EMT es un proceso dinámico que puede ser desencadenado y/o modulado por la interacción compleja de factores de crecimiento (TGF- β , IGF-1, EGF), receptores con actividad tirosina quinasa y diversas vías de transducción de señales que regulan a nivel temporal y espacial la abundancia y actividad transcripcional de los FT-EMT [61, 70, 84]. En este mismo sentido, ZEB1 puede ser fosforilado en sus residuos serina o treonina y se expresa bajo dos formas diferentes según su estado de fosforilación (hiperfosforilado o hipofosforilado), el cual varía según el tipo celular. Esto podría contribuir en la regulación de las diferentes funciones de ZEB1 en la EMT [47]. Paralelamente, antecedentes del laboratorio previos a esta tesis indican que el estado de fosforilación de ZEB1 y particularmente de la región C-terminal de ZEB1, regula la afinidad de unión de ZEB1 a sus genes blanco, su actividad transcripcional y su localización subcelular en un contexto celular no transformado [48].

En esta Tesis Doctoral, mediante ensayos de inmunoprecipitación revelados con anticuerpos anti fosfo-substrato específico, se estableció que la región N-terminal de ZEB1 se encuentra constitutivamente fosforilada en numerosos residuos serina y/o treonina por diversas quinasas, dentro de las cuales se destacan MEK/ERK, PKC, PKA y AKT (**Fig. 10**). Estos resultados, si bien validan las predicciones del análisis *in silico* (**Tabla 1**), revelan un alto nivel de complejidad en la regulación por fosforilación del extremo N-terminal de ZEB1. Esto por un lado apoya la noción de que ZEB1 es un factor maestro del programa de EMT con múltiples niveles posibles de regulación. Por otro lado, pone en evidencia la dificultad que implica el estudio de la regulación de esta región mediante mutagénesis sitio dirigida. En este sentido, la disección de la molécula e identificación de la unidad mínima funcional y regulable del FT resultó una herramienta clave de este trabajo, ya que permitió establecer las bases de mecanismos postraduccionales de regulación de ZEB1 durante el programa EMT. Cuando se restringió el análisis *in silico* a una variante mínima de la región N-terminal de ZEB1 (NZEB1), cobraron

particular relevancia la vía de MEK/ERK y la vía de PKCs. Esto fue consistente con trabajos previos del laboratorio que apoyan la participación de las vías de IGF-1/IGF-1R y PKC como reguladoras de ZEB1 en un contexto celular no transformado [48].

La regulación de la estabilidad de proteínas es un evento clave para el mantenimiento de la homeostasis celular. Las proteínas destinadas a la degradación por el proteasoma se conjugan mediante una "etiqueta" de ubiquitina, a través de una cascada enzimática finamente regulada. La degradación desregulada de proteínas, así como su estabilización aberrante, pueden interferir con la homeostasis celular [129]. En este sentido, mecanismos postraduccionales que involucran regulación de la estabilidad, ubiquitinación y degradación por la vía del proteasoma han sido bien descritos y estudiados para FT-EMT como Snail y Twist. Sin embargo, la regulación de la abundancia proteica de ZEB1 continua siendo escasamente comprendida en la actualidad [112, 124, 130-132]. En este trabajo de tesis se presentan diversas evidencias que sugieren que la regulación de la estabilidad proteica de ZEB1 es un mecanismo mediante el cual se regula la abundancia del FT y por lo tanto su función biológica durante el programa EMT.

En un contexto de EMT activo inducido en células NMuMG por la expresión estable de NZEB1, se observó que la inhibición de la vía de IGF-1R mediante NVP-AEW541, así como también la inhibición farmacológica de PKCs (PKCs, GF 109203 y cPKCs GÖ 6983), dispararon una pronunciada caída de los niveles de NZEB1 (**Figs. 20 y 21**). Dado que el sistema de expresión exógena de NZEB1 utilizado en esta tesis supone la ausencia de mecanismos de regulación a nivel transcripcional (se utiliza un promotor CMV), es altamente probable que los cambios observados a nivel de proteína estén dados por modificaciones postraduccionales. La primera hipótesis que se evaluó fue la participación de la vía del proteasoma. Esta premisa se corroboró mediante la utilización de MG132, la cual revirtió el efecto de NVP-AEW541 sobre los niveles proteicos de ZEB1 (**Fig. 23**). Reforzando este concepto, este patrón de regulación también se repitió en el contexto de la proteína endógena en la línea celular MDA-MB-231, donde el silenciamiento de PKC α condujo a una significativa disminución de la expresión proteica de ZEB1 sin alterar el ARNm (**Fig. 31**).

La regulación de la estabilidad proteica de ZEB1 expone varios interrogantes que ameritan futuras investigaciones. Por un lado, resta determinar si los cambios en la estabilidad

de ZEB1 están acompañados por cambios en su estado de ubiquitinación. De ser así, sería importante determinar la identidad de la ubiquitin E3 ligasa responsable de etiquetar a ZEB1 para su degradación. Por otro lado, si bien este trabajo sugiere que los cambios en la estabilidad de ZEB1 son orquestados por cambios en el estado de fosforilación, aún resta identificar que sitios puntuales de fosforilación le conferirían estabilidad a ZEB1.

En relación al impacto biológico de la regulación postraduccional de ZEB1, este trabajo estableció que la disminución de la estabilidad de ZEB1 tiene importantes consecuencias sobre la migración y la invasión celular. En células NMuMG-NZEB1, la disminución de la estabilidad de NZEB1 mediada por la inhibición de IGF-1R indujo una marcada disminución de la migración y de la invasión (**Fig. 26**). De manera similar, la desestabilización de ZEB1 provocada por la inhibición de PKC redujo las capacidades migratorias e invasivas de células MDA-MB-231 (**Fig. 35-36**). En línea con estos resultados, dos trabajos recientes vinculan cambios de la estabilidad proteica de ZEB1 con la regulación del programa de EMT y resistencia a las terapias antitumorales. Por un lado, Zhang y colaboradores proponen que la modulación de la estabilidad de ZEB1 es el vínculo entre el programa EMT y la radio-resistencia. Estos autores demuestran que la estabilidad de ZEB1 se incrementa por fosforilación de la quinasa ATM, y que este evento promueve la resistencia a la radioterapia en células tumorales de mama en EMT tanto *in vitro* como *in vivo* [118]. Asimismo, Chen y colaboradores identificaron a la ubiquitin E3-ligasa Siah como reguladora del programa de EMT a través de la regulación directa de los niveles proteicos de ZEB1 en líneas celulares de mama (NMuMG y MCF-7) [133].

En resumen, un cuerpo creciente de evidencias permite afirmar que ZEB1 es regulado de manera postraduccional a través de cambios en su estabilidad proteica durante el programa EMT. El modelo emergente propone que la activación de señales aguas abajo de receptores con actividad tirosina quinasa mediarían un incremento en la estabilidad de ZEB1 por fosforilación, promoviendo de esta manera la migración e invasión celular (**Fig. 37**).

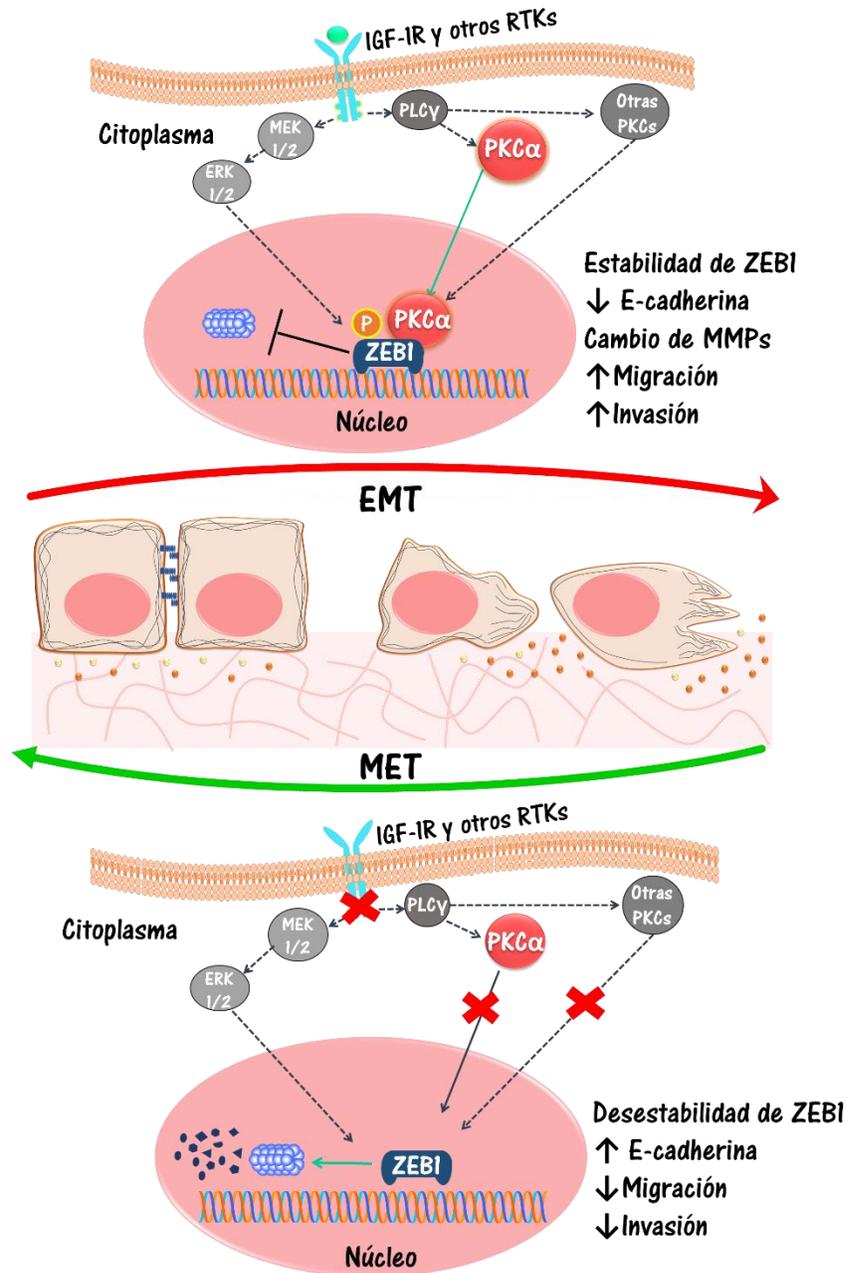


Figura 37: Representación esquemática del modelo propuesto de regulación de ZEB1 en el programa EMT.

El mecanismo de regulación de la abundancia de ZEB1 y su función biológica durante el programa EMT implica una regulación a nivel postraducciona a través de cambios en la estabilidad proteica de ZEB1. La activación de señales aguas abajo de receptores con actividad tirosina quinasa (RTKs), particularmente la vía IGF-1R/PKCα, mediarían un incremento en la estabilidad de ZEB1 por fosforilación, promoviendo el programa EMT la migración e invasión celular. De manera recíproca la inhibición de RTKs o efectores aguas abajo como PKCs (particularmente PKCα) disminuye la estabilidad de ZEB1 por un mecanismo que involucraría la vía del proteasoma, revirtiendo parámetros asociados a EMT como la migración y la invasión celular en líneas celulares de cáncer de mama.

PKCs y ZEB1: miembros de un eje regulatorio que controla el fenotipo invasivo en células de cáncer de mama

El análisis *in silico* de potenciales sitios de fosforilación, así como las inmunoprecipitaciones reveladas con anticuerpos anti-fosfo-substratos, demostraron que NZEB1 es substrato de fosforilación de PKCs. Estos resultados, en conjunto con la observación de que la inhibición de PKCs conduce a la disminución de la expresión de NZEB1, llevaron a considerar la posibilidad de que la función biológica de ZEB1 esté regulada por PKCs. La utilización de 10 líneas celulares de mama con diferente grado de agresividad estableció una correlación lineal entre los niveles de expresión de PKC α y ZEB1. En este contexto también se observa un paralelismo con el estado de activación de la EMT cuando se analizaron marcadores epiteliales y mesenquimales. Esto resulta particularmente llamativo en las líneas celulares de cáncer de mama del tipo basales triple negativas (ER $^-$, PR $^-$, HER $^-$), la cuales presentan altos niveles de PKC α y ZEB1, con un perfil de EMT activado. Otra observación interesante realizada fue una clara relación inversa entre los niveles de ZEB1 y la expresión de PKC δ en las líneas celulares basales utilizadas (**Fig. 28**). Si bien la participación de esta isoenzima no fue estudiada en mayor profundidad durante el desarrollo de esta Tesis Doctoral, este resultado es consistente con numerosos estudios que involucran a PKC δ en respuestas proapoptóticas y antiproliferativas en diferentes contextos tumorales [94, 95].

Una investigación exhaustiva de la bibliografía llevó a identificar varios trabajos donde se vinculan tanto PKC α como ZEB1 en manera independiente con el programa EMT y un fenotipo agresivo en cáncer de mama. Por un lado, dos trabajos reportan la existencia de una fuerte asociación positiva entre niveles de expresión de PKC α y la agresividad tumoral en cáncer de mama. Estos autores demostraron que la sobreexpresión de PKC α en células MCF-7 y T47-D reduce los niveles de receptor de estrógeno (ER), promueve el crecimiento independiente de anclaje e induce la pérdida de la morfología epitelial [113, 114]. Por otro lado, la sobreexpresión de ZEB1 en células de cáncer de mama da lugar a la iniciación y progresión tumoral *in vitro* e *in vivo* [134, 135]. Coincidentemente, ZEB1 también ha sido vinculado con la disminución de la expresión del receptor de estrógeno en cáncer de mama y resistencia a las terapias

antitumorales [134]. Asimismo, un importante estudio realizado por el laboratorio del Dr. Weinberg, ha reportado la presencia de altos niveles de PKC α , FT-EMT y marcadores de EMT en subpoblaciones de células madre de cáncer (CSCs) derivadas de transformación espontánea de células de mama normales HME [97]. Si bien este estudio apoya la existencia de una importante correlación entre PKC α , la activación de la EMT y la progresión tumoral en cáncer de mama, el vínculo entre ZEB1 y PKC α no ha sido abordado en este estudio, ni en trabajos de otros autores hasta la fecha.

Los ensayos de pérdida de función de la vía de PKCs mediante ARNi o inhibición farmacológica demostraron que la inhibición de la vía de PKC en diferentes líneas celulares redundaba en una caída significativa de los niveles de ZEB1 endógeno, sin alteraciones evidentes en los niveles de ARNm de ZEB1, pero con importantes consecuencias funcionales a nivel de migración e invasión. En este punto resulta importante resaltar que en algunas condiciones experimentales la inhibición de PKCs con el inhibidor global (GF 109203) produce una caída de los niveles de ZEB1 más importante que el inhibidor específico de PKCs clásicas (GÖ 6983) e incluso que los RNA de interferencia para PKC α . Estos resultados sugieren que otras isoenzimas de PKCs no evaluadas en este trabajo también podrían colaborar en esta regulación. Otra observación interesante fue que los inhibidores farmacológicos de PKCs inducen una caída no solo de las formas fosforiladas, sino también de las formas totales de PKCs. Esto puede deberse a que la estabilidad de estas quinasas disminuye en manera proporcional a su estado de fosforilación [98, 99].

Otra conclusión interesante que se desprende de estos resultados es que sin importar la eficiencia de la inhibición o silenciamiento de PKCs, la expresión de ZEB1 no fue revertida completamente. Esto sugiere la existencia de mecanismos compensatorios que modulan la vida media de ZEB1 para mantener el fenotipo indiferenciado. Además, en este contexto es importante destacar que ZEB1 es una proteína con una vida media que ronda entre las 18 y 24 horas [118], lo que ayudaría a evitar bajadas abruptas de sus niveles.

Una de las preguntas centrales a responder en el campo de las PKCs en cáncer es la identificación de los substratos claves de PKC que promueven los fenotipos pro y anti/tumorales

[96]. En este sentido, en este trabajo de tesis se determinó mediante inmunoprecipitación que ZEB1 es efectivamente sustrato de fosforilación de PKC, corroborando de esta manera los resultados obtenidos mediante el análisis *in silico*. Paralelamente, mediante ensayos de co-inmunoprecipitación también se estableció que PKC α interacciona físicamente con ZEB1 (**Fig. 34**). Esta interacción entre ZEB1 y PKC α apoya fuertemente la hipótesis de que ZEB1 sería sustrato de fosforilación de PKC α . Un aspecto a considerar es la localización subcelular en la cual puede tener lugar esta fosforilación, dado que la asociación de cPKCs a la membrana plasmática es un requisito para la activación mediada por DAG, es posible considerar que la interacción PKC α /ZEB1 tenga lugar en el citosol. Sin embargo, dado que ZEB1 es un FT con localización principalmente nuclear, se debe considerar también la posibilidad de que la interacción PKC α /ZEB1 ocurra en el núcleo. Esto podría ser posible debido a que las PKCs pueden ser redistribuidas a diversos compartimentos intracelulares tales como mitocondrias, complejo de Golgi, retículo endoplásmico y membrana nuclear [95].

En conjunto, este trabajo revela la existencia de un eje regulatorio entre PKC α y ZEB1 en la regulación de la EMT. Este eje cobra una posición estratégica para el desarrollo de aproximaciones terapéuticas para contrarrestar el programa EMT. De esta manera se puede apuntar a efectores finales del programa EMT, cuya inhibición selectiva tendría un efecto pleiotrópico mucho menor que el desencadenado al inhibir por ejemplo receptores tirosina quinasa. ZEB1 representa el factor con mayor potencial de especificidad de este eje, ya que su desestabilización ha sido vinculada de manera exclusiva a la inhibición del EMT. El desarrollo de inhibidores para esta vía tiene además el potencial de establecer una prueba de concepto para una nueva aproximación de la terapia oncológica, donde se apuntaría a inhibir el fenotipo metastásico de células tumorales, contribuyendo así con las terapias citotóxicas, citostáticas y antiangiogénicas disponibles actualmente.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

- ✓ NZEB1 representa la mínima porción de ZEB1 identificada (10% de la proteína wt) que recapitula la función de ZEB1wt en el programa EMT.
- ✓ La sobreexpresión de NZEB1 induce cambios moleculares, morfológicos y funcionales asociados a estadios intermedios de la EMT en células NMuMG, independientemente de señales extracelulares como TGF- β y sin alterar los niveles de expresión de otros FT-EMT como Snail. Estos cambios están representados por una marcada represión de E-cadherina, cambio en el perfil de MMPs, reorganización del citoesqueleto de actina, incremento de la motilidad e invasión celular y crecimiento independiente del anclaje
- ✓ IGF-1R y PKC regulan la expresión proteica de NZEB1 en un modelo celular de EMT.
- ✓ La vía de IGF-1R regula la función de NZEB1 y consecuentemente el programa EMT mediante la modulación de la estabilidad proteica de dicho factor de transcripción por un mecanismo que involucra la vía del proteasoma.
- ✓ La disminución de la expresión de NZEB1, aun cuando no llega a reestablecer la expresión de E-cadherina tal como se observa en células epiteliales, es suficiente para contrarrestar el fenotipo transformado e invasivo en células con un programa EMT activo.
- ✓ PKC α interactúa físicamente con ZEB1 y regula su expresión proteica en líneas celulares basales de cáncer de mama. Esta regulación postraducional implica un mecanismo que en última instancia modifica la estabilidad proteica de ZEB1.
- ✓ Estos resultados demuestran por primera vez que la vía de transducción de señales de PKCs regula la función biológica de ZEB1, donde el eje PKC α -ZEB1 adquiere un rol central del programa EMT en líneas celulares de cáncer de mama, controlando la migración e invasión celular

MATERIALES Y MÉTODOS

Plásmidos reporteros y de expresión

1.1 Vectores reporteros y de expresión para ZEB1 y sus dominios N-terminal

El ADNc de ZEB1 de rata [5] se sub-clonó en pcDNA4/HisMaxB (Invitrogen). El promotor humano del gen ZEB1 (Z1P1000Luc) se aisló como se indica en [14]. Esta construcción contiene la región -913 a +44 del promotor de ZEB1 acoplado a la secuencia codificante para el gen de luciferasa en el plásmido pGL3-basic (Promega).

El plásmido ZD1HD (714 aminoácidos) que comprende el dominio N-terminal y homeodominio central, se generó por subclonado del gen de rata sometido a deleciones con diferentes enzimas de restricción en el vector pcDNA1/Amp (Invitrogen).

Los vectores de expresión para eGFP-ZD1L y eGFP-ZD1S, se realizaron en el laboratorio del Dr. Douglas S. Darling (University of Louisville, KY, USA) por subclonado de porciones de ADNc de ZEB1 de rata por métodos estándares, en el vector eGFP-C3 (Clontech). Estos vectores contienen una etiqueta de proteína verde fluorescente (GFP, *Green Fluorescent Protein*).

Para la generación de eGFP-ZD1L, que comprende el dominio de dedos de zinc N-terminal (entre los aminoácidos 111 al 490), el ADNc de ZEB1 fue digerido con las enzimas de restricción Pst y BglII, mientras que para ZD1s, que comprende 3 de los 4 dedos de zinc que conforman el dominio N-terminal (entre los aminoácidos 111 al 241) se utilizaron las enzimas Pst y Bam.

Todas las secuencias y la orientación de los clones fueron verificadas por secuenciación.

1.2 Otras vectores reporteros y de expresión

La construcción para el promotor de E-cadherina fue amablemente cedida por el Dr. Frans Van Roy (Unidad de Biología Celular molecular, Departamento de Biología Molecular, Universidad VIB-Ghent Gent, Bélgica). La misma incluye la secuencia -308 a +21 del gen CDH1 obtenida por PCR del ADN genómico humano extraído de la línea celular MCF7 e introducido en el vector pGL3-basic Luciferasa (pGL3-basic/E-cadherin wt Luc) [36].

El vector de expresión para HA-PKC α , fue amablemente cedido por el Dr. Alberto Díaz Añiel. Instituto de Investigación Médica Mercedes y Martín Ferreyra de Córdoba (INIMEC-CONICET-UNC).

1. Cultivo de líneas celulares eucariotas

Las líneas celulares empleadas así como las condiciones estándar de cultivo empleadas en diferentes experimentos de describen a continuación:

2.1 Líneas celulares empleadas

Tabla III: Líneas celulares utilizadas en el desarrollo de esta Tesis Doctoral.

Nombre de la línea celular	Tejido	Enfermedad	Organismo
CHO-K1	Ovario	No transformadas	Hámster chino
HEK293T	Riñón	No transformadas	Embrionario humano
NMuMG	Glándula mamaria	No transformadas	Ratones NAMRU
NMuMG-Vector	Glándula mamaria	No transformadas	Ratones NAMRU
NMuMG-NZEB1	Glándula mamaria	EMT	Ratones NAMRU
MDA-MB-231	Metástasis pleural de un tumor de mama	Adenocarcinoma	Humano
MDA-MB-468	Metástasis pleural de un tumor de mama	Adenocarcinoma	Humano
MDA-MB-453	Metástasis de derrame pericárdico de un tumor de mama	Carcinoma	Humano
BT-549	Glándula mamaria	Carcinoma ductal	Humano
T47D	Metástasis pleural de un tumor de mama	Carcinoma ductal	Humano
MCF7	Metástasis pleural de un tumor de mama	Adenocarcinoma	Humano
SK-BR-3	Metástasis pleural de un tumor de mama	Adenocarcinoma	Humano
MDA-MB-361	Metástasis en cerebro de un tumor de mama	Adenocarcinoma	Humano
BT-474	Glándula mamaria	Carcinoma ductal	Humano
MCF10A	Glándula mamaria	Enfermedad fibroquística	Humano

1.2 Condiciones estándar de cultivo

Las líneas celulares empleadas en los distintos experimentos se mantuvieron en cultivo en placas de 100 mm, y se cultivaron en atmósfera de CO₂ 5% v/v a 37 °C con los siguientes medios de cultivo suplementados:

- Las líneas celulares MCF7 y T47D se mantuvieron en RPMI (Gibco) suplementado con penicilina 100 U/mL y estreptomina 100 µg/mL (Gibco), Suero Fetal Bovino (SFB) (Gibco) al 10% v/v y glutamina 2 mM.
- La línea celulares MCF10A: se mantuvo en DMEM:F12 (1:1) (Thermo Scientific) suplementado con penicilina 100 U/mL y estreptomina 100 µg/mL (Gibco), suero de caballo 5% v/v (Gibco), insulina 10 µg/mL (sigma), hidrocortisona 0.5 µg/ml, el factor de crecimiento epidérmico (EGF) 20ng/mL y toxina colérica 100ng/mL (Calbiochem).

- Las líneas celulares NMuMG-NZEB1 y NMuMG-Vector se mantuvieron en DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Sigma o Gibco) suplementado G418 400µg/mL (Sigma), SFB (PAA) al 10% v/v y glutamina 2 mM.
- El resto de las líneas celulares se mantuvieron en DMEM, suplementado con penicilina 100 U/mL y estreptomicina 100 µg/mL, SFB al 10% v/v y glutamina 2 mM.

Los repiques celulares se realizaron mediante tripsinización a una confluencia entre el 70% y el 90%. Para ello los cultivos celulares fueron lavados 2 o 3 veces con tampón fosfato salino (PBS: NaCl 8 g/L; KCl 0.2 g/L; Na₂HPO₄ 1.4 g/L y KH₂PO₄ 0.2 g/L pH 7.4) y posteriormente tratados con 1 mL de tripsina 0.05% p/v (sigma) de 2 a 5 minutos a 37 °C, dependiendo la línea celular. La neutralización se realizó con medio de cultivo completo adecuado para cada línea celular; suplementado con suero al 10% v/v (SFB o de caballo según corresponda).

Los pasajes celulares se realizaron a razón de 1/5 a 1/10 según recomendaciones de la ATCC para cada línea celular.

La criopreservación de las distintas líneas celulares fue llevada a cabo en vapor de nitrógeno líquido en una solución de dimetilsulfoxido (DMSO, Invitrogen) al 10% en SFB, Para las células MDA-MB-231 se utilizó DMSO al 5% SFB.

Para los subcultivos se siguieron las recomendaciones dadas por la ATCC (American Type Culture Collection); para más información acerca de las líneas celulares que se detallaron consultar el sitio web de la ATCC: <http://www.atcc.org>.

2. Generación de líneas celulares estables

Para la generación de las líneas celulares NMuMG-NZEB1 y NMuMG-Vector derivadas de la línea celular NMuMG, descritas en esta tesis se realizaron transfecciones de los vectores de expresión plasmídico con la región N-Terminal de ZEB1 fusionado a la proteína GFP o su correspondiente vector vacío (eGFP) seguida de selección tal como se describe a continuación.

3.1 Transfecciones

La generación de las subpoblaciones NMuMG-NZEB1 y su respectivo control NMuMG-Vector se realizó a partir de la transfección de células NMuMG con los plásmidos eGFP-ZD1S o el vector de expresión vacío eGFP-C3, mediante la utilización de lipofectamina 2000 (Invitrogen) siguiendo las indicaciones del fabricante:

Para ello el día previo a las transfección 3.5×10^5 células/pocillo fueron sembradas en DMEM 10% SFV v/v sin antibiótico; en placas de seis pocillos.

Al día siguiente 4µg de eGFP-ZD1S o eGFP-C3 se mezclaron con 100 µL de Opti-MEM (Gibco) y se incubaron durante 5 minutos a temperatura ambiente. Al mismo tiempo 8 µL de Lipofectamina 2000 fueron incubados con 100 µL de Opti-MEM durante 5 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se combinaron ambas soluciones y se incubaron durante 20 minutos a temperatura ambiente.

Las células NMuMG crecidas en placas de 6 pocillos con una confluencia entre el 70% y el 80%, fueron lavadas dos veces con PBS y posteriormente se les agregó 1 mL de DMEM 10% SFB v/v sin antibiótico. Se agregaron 200µl/pocillo de la mezcla ADN: Lipofectamina (en una proporción 1:2) en toda la superficie de células y se incubaron durante 4 horas en estufa a 37 °C y CO₂ 5% v/v. Pasadas las 4 horas de transfección, el medio de cultivo fue remplazado por DMEM 10% SFB sin antibiótico.

3.2 Selección

Como el vector de expresión utilizado contiene un casete de resistencia a neomicina, que permite que las células eucariotas transfectadas ser seleccionadas establemente al ser tratadas con geneticina (G418, Sigma). Transcurridas las 48 horas de la transfección, se comenzó la selección G418, se remplazó el medio de cultivo DMEM completo (sin antibiótico) por el mismo medio pero suplementado con 700 µg/mL de G418 durante 10 días. Las células seleccionadas por resistencia a antibiótico fueron expandidas. Para corroborar la expresión de los vectores transfectados se valoró la expresión de la proteína de fusión verde fluorescente (GFP) por microscopía de fluorescencia.

Las células seleccionadas de esta manera fueron expandidas utilizando DMEM 10% SFB y G418 (400 µg/mL, dosis de mantenimiento) para posteriormente ser sometidas a una segunda ronda de selección mediante citometría de flujo utilizando un cell sorter (BD FACSAria). De esta manera se obtuvieron las subpoblaciones de células fluorescentes que expresaban NZEB1 (eGFP-ZD1S) o las células Vector (eGFP) a través de la selección de poblaciones celulares positivas para GFP. Las células seleccionadas por citometría de flujo fueron expandidas y seleccionadas nuevamente de la misma manera (dos ciclos de cell sorter en total). La sobreexpresión del gen de interés fue confirmada por western blot y por microscopía de fluorescencia. Estas Células se mantuvieron en medio DMEM Completo suplementado con 400 µg/mL de G418.

3. *Análisis in silico*

Las predicciones de los potenciales sitios de fosforilación en ZEB1 (ZD1-HD) se realizaron utilizando las bases de datos KinasePhos [100] y NetPhos 3.1 [101, 102]. Para NetPhos 3.1 se muestran los sitios de mayor puntuación, KinasePhos fue utilizado con una especificidad del 100% aplicando criterios de selección positivos.

4. *Amplificación y purificación de plásmidos*

5.1 *Generación de células competentes*

Para la transformación de los diferentes plásmidos se generaron células competentes a partir de un cultivo bacteriano de *Escherichia coli* cepa XL1-blue (cat. N200130, Stratagene).

Una colonia de *E.coli* XL1-blue fue crecida en medio de cultivo Luria-Bertani (LB) a 37 °C y 250 rpm en agitador metabólico, durante toda la noche. El cultivo bacteriano fue diluido 1:100 en 50 mL de solución A e incubado en las mismas condiciones por 90 minutos (hasta su fase de crecimiento logarítmica). A continuación, el cultivo fue enfriado en hielo durante 10 minutos y se centrifugo a 1.500 rpm durante 10 minutos a 4 C. para así resuspender las células en 1:500 partes (500 µL) de solución A fría. Se añadieron 2.5 mL (5 volúmenes) de la solución B (“de conservación”) a la suspensión de bacterias, procediéndose luego a su homogeneización. Se prepararon alícuotas de 300 µL que se conservaron a -80 hasta su utilización.

Solución A (esterilizada por filtración): Medio LB (triptona 1%; extracto de levadura 0.5%; NaCl 0.5%); glucosa 0.2%; MgSO₄ 10mM.

Solución B (esterilizada por filtración): Glicerol 36%; polietilenglicol (PEG) MW 7500-8000 12%; MgSO₄ 12 mM.

5.2 *Transformación de células competentes*

Para la transformación de las bacterias competentes estas se descongelaron lentamente en hielo y se tomó una alícuota de 100 µL a la cual se agregó 100-500 ng del ADN plasmídico de interés. Se realizaron controles negativos y positivos, con 100 ng de un vector plasmídico purificado de identidad conocida o el mismo volumen de agua libre de nucleasas, respectivamente.

Luego de incubar 30 minutos en hielo se añadieron 900 µL de LB/glucosa 20mM estéril. Las bacterias fueron crecidas en medio LB no selectivo por 1 hora a 37 °C y agitación constante (250 rpm). Se sembraron 100 µL de este cultivo en LB agar (LBA) con ampicilina 100 µg/mL (para los vectores en general) o Kanamicina 50µg/mL (para los vectores GFP) para seleccionar las células transformadas por resistencia al antibiótico. La misma fue evaluada luego de su crecimiento durante toda la noche a 37 °C.

Las bacterias seleccionadas se repicaron en 10 mL de LB con antibióticos, se fraccionaron (30% glicerol/70% cultivo bacteriano) y se conservaron a -80 C.

5.3 Aislamiento y purificación de ADN plasmídico

Las bacterias transformadas se amplificaron y los plásmidos se purificaron mediante el método de lisis alcalina (Birnboim y Doly, 1979). Para lo cual las células transformadas se crecieron en LBA. Una colonia seleccionada se creció en 10 mL de LB a 37 °C durante toda la noche en agitación (250 rpm). Este pre-cultivo fue inoculado a razón 1:100 en LB (habitualmente 300 mL). Se incubó a 37 °C por 14-18 horas en agitación.

El cultivo fue centrifugado a 5000 rpm por 15 minutos a 4 °C y el concentrado bacteriano fue resuspendido en 10mL de solución de resuspensión y posteriormente fue incubado en hielo por 30 minutos.

Las bacterias fueron lisadas en un volumen de solución de lisis por 5 minutos. Luego de la adición de un volumen de solución de neutralización solo el ADN cromosómico y las proteínas precipitaron (30 minutos en hielo). Posteriormente la centrifugación por 30 minutos a 14000 rpm a 4°C permitió separar el sobrenadante conteniendo el ADN plasmídico en solución, el cual fue precipitado con 0.6 volúmenes de isopropanol y seguidamente centrifugado.

Posteriormente se prosiguió a la re-suspendió en TE 0.5 X y purificación de AND plasmídico por precipitación de los contaminantes con LiCl 2 M por 10 minutos (ADN genómico, ARN, nucleótidos libres) y centrifugación. La adición de 0.5 volúmenes de la solución fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (PIC) 25:24:1 ayudo a extraer y desnaturalizar las proteínas remanentes. Posteriormente el ADN fue nuevamente precipitado con 0.6 volúmenes de isopropanol y homogeneizado en 500 µL de TE 0.5X mas ARNasa (100 µg/ mL) e incubado 30 minutos a 37 °C. Finalmente, se realizaron 2 extracciones con 1 volumen de PIC y otra con cloroformo para así precipitar el ADN con un volumen de isopropanol (luego del agregado de 10 % de acetato de sodio 3M pH7). El ADN plasmídico purificado fue disuelto en TE 0.5% o agua.

Cuando un aislamiento a pequeña escala fue requerido, este se llevó a cabo a partir del primer cultivo por “mini-preparación” basada en lisis alcalina. En este caso la purificación del ADN plasmídico se realizó por mezcla de la suspensión ya neutralizada con tierra de diatomeas (D-5384, Sigma) en clorhidrato de guanidina 6M. Las preparaciones fueron pasadas a través de minicolumnas (WiZard

Minicolumnas part #A7211, Promega) el ADN adsorbido se lavó con isopropanol 80% y posteriormente fue eluido en 50 μ L de agua.

Todos los cultivos se realizaron con el antibiótico de selección correspondiente, en las condiciones anteriormente señaladas.

La concentración del ADN plasmídico y su calidad fue analizada a través de electroforesis en gel de agarosa y cuantificada espectrofotométricamente midiendo absorbancia a 260 nm y a 280 nm. Se estableció como criterio de pureza para la preparación de ADN plasmídico una relación A260nm/ A280 nm entre 1.8 y 2.0.

La integridad y calidad del mismo fue corroborada por corrida electroforética en gel de agarosa 1% teñido con SYBR Safe DNA gel stain (Cat.No S33102, invitrogen) y buffer TAE.

Solución de re-suspensión (TEG): Tris. HCL pH8.3 25mM; EDTA 10nM; glucosa estéril 1%

Solución de lisis: NaOH 0.2N; dodecilsulfato de sodio (SDS) 1%.

Solución de neutralización: Acetato de potasio 3M; ácido acético 11.5%

Solución de Tris-EDTA (TE) 1X: Tris. ClH pH 8 10mM; Na₂EDTA. H₂O pH 8.1 mM

Buffer TAE: Tris-acetato 40 mM (mezcla equimolar de tris base y ácido acético) Na₂ EDTA.H₂O 2 mM.

5. Ensayos de genes reporteros

El día previo al comienzo del ensayo 5 x 10⁴ células CHO-K1 o HEK293T fueron sembradas en placas de 24 pocillos en DMEM suplementado con 10 % SFB, sin antibiótico. Las mismas se co-transfectaron de manera transitoria por lipofección con PEI (polietilenimina MAX, Polyscience inc) [136] a una relación 2:1 respecto a la cantidad de DNA utilizada.

Para la formación de los complejos PEI-DNA ambos componentes fueron disueltos en Opti-MEM I Reduced Serum Medium (Invitrogene), sometidos a mezcla mediante vortex e incubados por 20 minutos, y posteriormente esta mezcla fue agregada gota a gota sobre cada pocillo de células.

Se utilizaron los siguientes ADNs plasmídicos:

- 0.3 μ g del vector de expresión del promotor de ZEB1 o CDH1 (E-cadherina) unidos al gen de luciferasa como reportero (pGL3-basic/Z1p1000Luc o pGL3-basic/Ecadherina wt Luc).
- 0.5 μ g del vector de expresión de ZEB1, ZD1-HD o 0,2 μ g del vector de expresión ZD1L o ZD1L.

- 0.3 µg del plásmido pCMVbeta (clontech) conteniendo el promotor del citomegalovirus (CMV) acoplado al gen de la enzima β-Galactosidasa para normalizar la eficiencia de transfección.
- Como control basal se empleó el vector pGL3-basic (Promega) o eGFP-C3 (Clontech)

A las 4 horas de transfección las células fueron lavadas con PBS (buffer fosfato salino) y el medio se reemplazó por DMEM suplementado con antibiótico. 48 horas después de la transfección las células fueron lavadas con PBS y lisadas con Reporter Lysis Buffer (Promega) y a partir de los sobrenadantes se determinó la actividad luciferasa y β-galactosidasa.

Las actividades luciferasa se midieron en 10 µL de extractos proteicos en el sistema de multi detección BioTek® empleando el sistema de ensayos reporteros de luciferasa (Luciferase Reporter Assay System, Promega) según las instrucciones del fabricante. La actividad luciferasa se normalizó a la actividad β-galactosidasa en cada extracto celular.

La actividad de los promotores ensayados se evaluó como el cociente de las actividades reporteras de luciferasa y del control β-galactosidasa. Ese cociente fue expresado como veces de cambio sobre la actividad del promotor en las células en estado basal. Coincidiendo arbitrariamente su actividad con el 100%.

6. Ensayos de transfecciones transitorias para sobreexpresión de ZEB1 y otros vectores de expresión

La sobreexpresión de los diferentes fragmentos de la región N-terminal de ZEB1, se llevó a cabo mediante transfecciones transitorias por lipofección con PEI (Polietilenimina MAX, Polyscience inc.) [136] a una relación 2:1 respecto a la cantidad de DNA utilizada.

Se sembraron 0.5×10^5 ; 5×10^5 ; 1×10^6 células por pocillos en placas de 24 pocillos, 60mm o 100mm, respectivamente, según la necesidad de cada tipo de experimento. 24 horas después, las células crecidas en medio libre de antibióticos, fueron transfectadas utilizando 1 µg (placa de 24 pocillos), 3 µg (para placas de 60 mm) o 5 µg (placas de 100 mm) de plásmido de expresión para ZEB1 o sus clones N-terminal o el vector de expresión vacío.

La solución de los plásmidos y el lipofectante, se realizó en OptiMEM, como se describió anteriormente para ensayo de genes reporteros. Luego de 4 horas de incubación con la mezcla de transfección el medio fue reemplazado por DMEM suplementado con 10% de SFB y antibióticos, 48 horas después de la transfección, estas células se utilizaron para los distintos experimentos (IF, WB, IP, purificación con perlas de níquel).

7. Preparación de extractos proteicos totales

8.1 Lisis con RIPA

Para la obtención de lisados celulares totales para inmunoprecipitación se procedió de la siguiente manera: Las células adheridas se preservaron en hielo, fueron lavadas con PBS y lisadas con buffer RIPA modificado, en agitación por 30 min (500 μ L y 200 μ L para placas de p-100 mm y p-60 mm respectivamente). A continuación los lisados celulares fueron recolectados en tubos eppendorfs de 1.5 mL y las muestras fueron sonicadas con dos pulsos de 10 segundos y una amplitud de 40% (en hielo); posteriormente centrifugadas a 10.000 rpm 10 minutos a 4 °C para la separación de los detritos celulares. El buffer RIPA fue adicionado con cocteles de inhibidores de proteasas (Calbiochem, Cat#539134) y fosfatasas (Sigma, Cat#P0044).

Buffer RIPA modificado: Tris.HCl pH 7.6 25mM; NaCl 150 mM; NP-40 1%; deoxicolato de sodio 0.5%; SDS 0.1%.

8.2 Lisis Para Western Blot

Para la obtención de lisados celulares totales para WB, se procedió de la siguiente manera: Las células adheridas fueron lavadas con PBS y lisadas directamente con Buffer Laemmli 1X en una proporción 5 X 10⁵ células/ml se buffer de lisis; las alícuotas de proteínas se hirvieron durante 10 min. Las muestras preparadas de esta manera fueron almacenadas a -20°C hasta su utilización.

Buffer Laemmli 1X: Glicerol 25%; SDS 2%; Tris. HCl pH 6.8 60mM; β -mercaptoetanol 14.4 mM, Azul de bromofenol 0.1%

8. Detección de proteínas por Western Blot

El Análisis de la expresión de proteínas se realizó mediante electroforesis en geles de poliacrilamida, western blot e inmunodetección con anticuerpos específicos realizando los pasos que se describen a continuación.

Se sembraron entre 20 y 40 μ L de cada muestra de extracto proteico en un gel de dodecilsulfato sódico (SDS) y poliacrilamida al 7.5%, 10% o 12% p/v, según el tamaño esperado de la proteína de interés, y se corrieron a 90V durante los primeros 30 minutos y a 110V por aproximadamente 60 minutos en tampón de corrida (25 mM de Tris-base, 192 mM de glicina y 0,1% de SDS p/v). Luego se realizó una electro transferencia húmeda en frío de 90 minutos a 100 V a una membrana de nitrocelulosa o difluoruro de polivinilideno (PVDF) (Li-cor y Amersham respectivamente). Las membranas de PVDF fueron activadas por inmersión en metanol antes de su uso. Seguidamente la membrana se bloqueó con albumina sérica humana al 5% p/v (Laboratorio de Hemoderivados, UNC, Córdoba, Argentina) en buffer

TBS (20 μ M de Tris y 150 μ M de NaCl, pH 7.8) suplementado con 0.1% v/v de tween 20 (TBS-T) por 1 h a temperatura ambiente. Posteriormente se incubó con el anticuerpo primario pertinente en agitación durante toda la noche a 4°C. Seguidamente la membrana se lavó 3 veces por 5 min a temperatura ambiente con TBS-T y se incubó 1 hora a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario en una solución de albumina 5% en TBS. Se realizaron 3 lavados de 5 min en TBS-T. Para la detección de los complejos proteína-anticuerpo se procedió de dos maneras diferentes, según la naturaleza del anticuerpo secundario utilizado:

- Para anticuerpos secundarios conjugados con la enzima peroxidasa: la presencia de complejos proteína-anticuerpo se detectó incubando la membrana por 5 min con el reactivo de quimioluminiscencia ECL y exposición en placa radiográfica (Kodak) entre 1 y 15 min.
- Para anticuerpos secundarios marcados con los fluorescentes IRDye 800CW o IRDye 680RD (LiCor Biosciences) la presencia de complejos proteína-anticuerpo se detectó mediante el sistema Odyssey (LiCor Biosciences). La señal revelada se cuantificó con el programa de análisis de imágenes del sistema Odyssey (Image Studio 3.1), para su posterior análisis semicuantitativo.

Buffer de corrida: Tris 25nM; glicina 192nM; SDS 0.1%

Buffer de transferencia: Tris 25nM; glicina 192nM; SDS 0.1%; metanol 15%

TBS-Tween 20 (TBS-T): tris 20 mM; NaCl 500mM; Tween 20 0.5%

Solución ECL: Tris pH8 10mM; ácido p-cumárico, 0,3 mM; luminol 2mM; H₂O₂ 0.01 V/V.

Tabla IV: Anticuerpos utilizados para la determinación de la expresión proteica por WB

Anticuerpo	Casa comercial	Dilución	Especie
Anti ZEB1	Laboratorio Dr. Darling	1/7500	Conejo
Anti ZEB1	Santa Cruz Biotechnology	1/500	Conejo
Anti E-cadherina	BD Biosciences	1/500	Ratón
Anti Vimentina	Cell Signaling	1/1000	Conejo
Anti Vimentina	Abcam	1/1000	Conejo
Anti β -catenina	BD Biosciences	1/1000	Ratón
Anti SNAIL	Santa Cruz Biotechnology	1/500	Cabra
anti fosfo serinas/treoninas	Abcam	1/500	Conejo
anti fosfo serinas sustrato MEK/ERK	Cell Signaling	1/1000	Conejo
anti fosfo treoninas sustrato de MEK/ERK	Cell Signaling	1/1000	Conejo
anti fosfo serinas sustrato de PKC	Cell Signaling	1/1000	Conejo
anti fosfo serinas/treoninas sustrato de PKA	Cell Signaling	1/1000	Conejo
anti fosfo serinas/treoninas sustrato de AKT	Cell Signaling	1/1000	Conejo
Anti fosfo-p44/442 (Fosfo ERK1/2)	Cell Signaling	1/1000	Conejo
Anti p44/442 (ERK 1/2 total)	Cell Signaling	1/1000	Conejo
Anti fosfo AKT	Cell Signaling	1/1000	Conejo
Anti AKT total	Cell Signaling	1/1000	Conejo
Anti fosfo PKC α / β II	Cell Signaling	1/1000	Conejo
Anti GFP	Abcam	1/10000	Ratón
Anti PKC α	Santa Cruz	1/1000	Conejo
Anti PKC ϵ	Santa Cruz	1/1000	conejo
Anti PKC δ	Cell Signaling	1/1000	conejo
Anti α -tubulina	Sigma	1/2500	Ratón
Anti β -actina	Sigma	1/2500	Ratón
Anti conejo HRP	Cell Signaling	1/2500	-
Anti ratón HRP	Cell Signaling	1/2500	-
Anti conejo IRDye 800CW	LiCor Biosciences	1/15000	-
Anti ratón IRDye 800CW	LiCor Biosciences	1/15000	-
Anti ratón IRDye 680RD	LiCor Biosciences	1/15000	-
Anti cabra IRDye 800CW	LiCor Biosciences	1/2500	-

9. Tratamientos con activadores e inhibidores de vías de transducción de señales

10.1 Tratamientos farmacológicos para Inducción de EMT por TGF- β

Para la inducción de EMT, mediante tratamientos con TGF β (5 ng/ml) las células NMuMG fueron tratadas por 24; 48; 72 y 96 horas con TGF β (5 ng/ml) en DMEM al 0.1% SFB [20, 103].

10.2 Tratamientos farmacológicos para análisis por WB de ZEB1 y marcadores de EMT

Para la valoración del efecto de las vías de transducción de señales sobre los niveles de expresión proteica de ZEB1 y marcadores de EMT células NMuMG-NZEB1 fueron tratadas por 48 horas con IGF-1 (10 nM); EGF (50 ng/ml); TGF- β (5ng/ml); PMA/Ionomicina (10ng/ml de PMA y 10 ng/ml); el inhibidor del receptor de IGF-1 NVP-AEW541 (5 μ M); el inhibidor de GSK3 LiCl (50 mM); LY294002 (20 μ M), PD98059 (20 μ M), el inhibidor de MEK1 y 2 UO126 y su respectivo control UO124 (20 μ M) o con los inhibidores de PKC totales GF109203 (5 μ M) o el inhibidor de PKC clásicas GÖ6983 (5 μ M) o DMSO (solvente). Para la valoración de la vía de PKC sobre la expresión de ZEB1 y marcadores de EMT, las células MDA-MB-231 con los inhibidores farmacológicos de PKC totales GF109203 (5 μ M) o el inhibidor de PKC clásicas GÖ6983 (5 μ M) o DMSO (solvente) o con activadores de PKC (PMA) 10nM y PKC α (HK654) 10uM por 15 minutos.

El activador específico para PKC α fue amablemente cedido por la doctora María Julieta comin (INTI-QUIMICA: Centro de Investigación y Desarrollo en Química - INTI Instituto Nacional de Tecnología Industrial)

10.3 Tratamientos farmacológicos para ensayos de estabilidad proteica

Para los ensayos de estabilidad las células NMuMG-NZEB1 o MDA-MB-231 fueron tratadas con el inhibidor farmacológico de la traducción de proteínas cicloheximida 25 μ g/ml por diferentes tiempos (12; 24; 48 y 72 horas), o con el inhibidor del Proteasoma MG132 (5 μ M) por diferentes tiempos (6; 12 y 24 horas) o DMSO (solvente). La cantidad usa de DMSO no excedió en ningún cado el 0.1%V/V.

Tabla V: Activadores e inhibidores utilizados

Activadores/inhibidores	Casa comercial	Numero de catálogo
LY294002	Calbiochem	CAS 154447-36-6
PD98059	Calbiochem	CAS 167869-21-8
Calphostin C	Millipore	208725
NVP-AEW541	Novartis	NVP-AEW541
UO126	Calbiochem	662005
UO124	Calbiochem	662006
GF109203	Enzo	BML-EI 2460001
GÖ6983	Enzo	BML-EI296
PMA	Calbiochem	80055-400
Ionomicina	Calbiochem	407952
IGF-1	Millipore	GF138
EGF	PeptoTech	AF-100-15
TGF- β 1	PeptoTech	100-21
HK654	INTI- QUIMICA	-
MG132	Abcam	ab141003
Cicloheximida	Calbiochem	D00172329

10. Silenciamiento con ARN interferente pequeño (RNAi)

Los silenciamientos transitorios de ZEB1 y PKC α mediante ARN interferente pequeño (RNAi) se llevaron a cabo mediante transfección reversa con lipofectamina RNAiMAX (invitrogen) como de describe a continuación.

11.1 Silenciamiento de ZEB1 en células MDA-MB-231

Se realizó una dilución 25nM de ARNi para ZEB1 (#1, #2, #3, #4) o con el ARNi no específico (NTC: nontarget control) (ver tabla) en 1ml de Opti-MEM (Gibco), después de 5 minutos de incubación se agregaron 10 μ L de lipofectamina RNAiMAX (invitrogen). Esta nueva solución se dejó incubar durante 20 minutos. Paralelamente se preparó una dilución con Opti-MEM más lipofectamina RNAiMAX, para la generación de un control interno adicional denominado parental (P), constituido por la línea parental sin transfección con ARNi.

Posteriormente se preparó una suspensión de células MDA-MB-231 (3×10^5) en 1 mL de Opti-MEM más 2mL de DMEM suplementado al 10% v/v con SFB y sin antibióticos, a la cual se le agregó la solución de RNAi mas lipofectante preparada anteriormente y se sembraron en placas de 60 mm.

Después de 16 horas de transfección, el medio fue remplazado por DMEM 10% v/v de SFB más antibióticos. Transcurridas 72horas o 96 horas del tratamiento con los diferentes ARNi las células fueron preparadas para los experimentos posteriores.

11.2 Silenciamiento de PKC α en células MDA-MB-231, BT549 y MDA-MB-453

Para el silenciamiento de PKC α , en las células MDA-MB-231, BT-549 y MDA-MB-453 se procedió de la misma manera que para el silenciamiento de ZEB1 descrito anteriormente, en este caso se utilizaron seis ARNi diferentes específicos para PKC α (RNAi PKC α 1, α 2, α 3, α 4, α 5 y α 6).

Tabla VI: Secuencias de ARNi utilizadas para el silenciamiento de ZEB1 y PKC α

Nombre	Secuencia blanco	Marca
ZEB1 #1	CUGUAAGAGAGAAGCGGAA	Dharmacon
ZEB1 #2	CUGAAAUCCUCUCGAAUGA	Dharmacon
ZEB1 #3	GCGCAAUAACGUUACAAAU	Dharmacon
ZEB1 #4	GCAACAGGGAGAAUUUAUUA	Dharmacon
PKC α 1	CCAUCCGCUCCACACUAAA	Dharmacon
PKC α 2	GAACAACAAGGAAUGACUU	Dharmacon
PKC α 3	UAAGGAACCACAAGCAGUA	Dharmacon
PKC α 4	UUUAUAGGGAUUCUGAAGUUA	Dharmacon
PKC α 5	GAAGGGUUCUCGUAUGUCA	Dharmacon
PKC α 6	UCACUGCUCUAUGGACUUA	Dharmacon
NTC	UGGUUUACAUGUUUUCUGA	Dharmacon

11. Ensayos de migración

12.1 Migración por cierre de la herida

Se pondero la migración de células NMuMG-Vector, NMuMG-NZEB1, y MDA-MB-231 a través de su habilidad de moverse hacia un espacio acelular.

Se sembraron 6×10^5 células en por pocillo en placas de 6 pocillos, 24 horas antes de comenzar el ensayo en DMEM suplementado con 10% SFB v/v con su respectivo antibiótico. El día del ensayo con las células crecidas en monocapa con una confluencia del 100 % se realizan 3 “heridas” longitudinales por pocillo (cada pocillo por duplicado) con la ayuda de un tip, de forma que se interrumpió la monocapa de células. A continuación, se lavaron los pocillos con PBS, para eliminar las célula que se desprendieron y se añadió DMEM suplementado con 0,1% SFB v/v, para asegurar que no exista interferencia de

proliferación con la migración. En este momento se tomaron fotografías en un microscopio de contraste de fase, utilizando una magnificación final de 100X, para cuantificar posteriormente el área de la herida a tiempo 0 h (se seleccionaron 3 puntos por herida). Posteriormente las células fueron mantenidas en cultivo entre 16 y 18 horas, bajo condiciones estándares, transcurrido este tiempo se realizan nuevas fotografías, en las mismas zonas de la herida que en el tiempo inicial. Las áreas de las heridas en tiempo inicial y final fueron cuantificadas mediante el programa de análisis de imagen *Fiji (ImageJ)*.

Por cada condición o tratamiento se realizan 3 heridas por pocillo y se toman al menos 3 fotos por herida en diferentes puntos, además cada condición se realiza por duplicado. Las fotografías se toman con un aumento total 100X. Con los datos obtenidos se calcula el área migrada que resulta de la diferencia del área inicial y el área a tiempo final.

Cabe agregar que este tiempo fue elegido de manera tal de reducir el aporte de la proliferación al cierre de la herida.

12.2 Migración en transwell

Se pondero la migración de células NMuMG-Vector, NMuMG-NZEB1 a través de su habilidad para atravesar poros de 8 de μm de diámetro en una cámara de transwell.

Se utilizaron placas de 24 pocillos con insertos con poros de 8 μm de diámetro (Corning Costar). Se sembraron 5×10^4 células en 200 μL de medio DMEM suplementado con 0,1% p/v de BSA en la cara superior del inserto. Sobre la base del pocillo se colocaron 300 μL del mismo medio pero con 10% v/v de SFB en lugar de BSA, como quimioatrayente, a fin de generar un gradiente y así favorecer el pasaje de las células hacia la porción inferior del transwell. Las células se incubaron en condiciones estándar durante 18 a 24 horas. Finalmente, se eliminó el medio, se lavaron los pocillos con PBS y la porción inferior del transwell, donde se encontraban las células que migraron, se fijó con paraformaldehído al 4% durante 5 minutos; se realizó la tinción con el marcador nuclear DAPI (0,3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en PBS) durante 10 minutos. Las células remanentes en la cámara superior del transwell se eliminaron exhaustivamente con un hisopo. Los transwells se montaron en un portaobjeto con una gota de líquido de montaje acuoso y se fotografiaron diez campos en una magnificación final de 400X en un microscopio de fluorescencia, para luego cuantificarse el número de células que migraron por campo mediante el programa de análisis de imagen *Fiji (ImageJ)*.

12. Ensayo de invasión celular

La capacidad invasiva de células NMuMG-Vector, NMuMG-NZEB1, y MDA-MB-231 se evaluó utilizando cámaras de invasión con Matrigel que simulo una matriz extracelular.

13.1 Invasión en transwell

Para el ensayo de invasión en transwell se utilizaron placas de 24 pocillos con insertos que presentaban poros de 8 μm de diámetro (Corning Costar). Sobre la capa superior del transwell se colocó, en frío, una dilución $\frac{1}{4}$ de Matrigel® (BD Bioscience) en DMEM sin suplementar y se dejó gelificar durante 40 min a 37°C. Posteriormente se sembraron 5×10^4 células en 200 μL de medio DMEM suplementado con 0,1% p/v de albúmina de suero bovino (BSA) en la cara superior del inserto. Sobre la base del pocillo se colocaron 300 μL del mismo medio pero con 10% v/v de SFB en lugar de BSA, como quimioatrayente, a fin de generar un gradiente y así favorecer el pasaje de las células hacia la porción inferior del transwell. Las células se incubaron en condiciones estándar durante 16 a 24 horas. Finalmente, se eliminó el medio, se lavaron los pocillos con PBS y la porción inferior del transwell, donde se encontraban las células que invadieron, se fijó con paraformaldehído al 4% durante 5 minutos; se realizó la tinción con el marcador nuclear DAPI durante 10 minutos. Las células remanentes en la cámara superior del transwell, sobre el Matrigel, se eliminaron exhaustivamente con un hisopo. Los transwells se montaron en un portaobjeto con una gota de líquido de montaje acuoso y se fotografiaron diez campos en una magnificación final de 400X en un microscopio de fluorescencia, para luego cuantificarse el número de células que migraron por campo mediante el programa de análisis de imagen Fiji (ImageJ). Cada condición se ensayó por duplicado.

13.2 Invasión en cámara de quimiotaxis

Las células se tripsinizaron, se suspendieron en DMEM suplementado al 0,1% p/v con BSA / y se sembraron ($2,5 \times 10^4$ células / pocillo) en el compartimiento superior de una cámara de quimiotaxis (NeuroProbe). Se utilizaron membranas de policarbonato con poros de 8 μm de diámetro previamente embebidas en una dilución $\frac{1}{4}$ de matrigel (BD Bioscience) en DMEM. En la cámara inferior, se utilizó DMEM suplementado al 10% v/v con SFB. Después de un período de incubación de 16 a 24 horas, se recuperaron las membranas y se limpiaron las células de la superficie superior (no invasivas). Las células en el lado inferior de la membrana (invasivas), se fijaron y se tiñeron con el kit Diff- Quik Stain Set (Dade Behring). Se fotografiaron 5 campos independientes en una magnificación final de 100X en un microscopio de contraste de fase, para luego cuantificarse el número de células que invaden por campo mediante el programa de análisis de imagen Fiji (ImageJ). Cada condición se ensayó por triplicado.

13. Inmunofluorescencia (IF)

Las células fueron crecidas sobre portaobjetos circulares estériles en placas de cultivo. Luego de transcurrido el tiempo necesario acorde al experimento realizado, los portaobjetos se lavaron 3 veces con PBS y se fijaron 10 min con paraformaldehído al 4% p/v en PBS a temperatura ambiente. Se realizaron 3 lavados de 5 minutos con PBS. Inmediatamente las células se permeabilizaron 7 min con 0,01% v/v de tritón X-100 en PBS y se hicieron 3 lavados en PBS de 5 minutos. Para evitar uniones inespecíficas de los anticuerpos primarios se realizó un bloqueo 10 minutos con 0,5 % v/v de albumina sérica humana en 0,2% v/v de tween-20 en PBS (PBS-T) (solución de bloqueo). La detección de las proteínas de interés se llevó a cabo utilizando los anticuerpos primarios correspondientes disueltos en solución de bloqueo que se incubaron durante 1h en cámara húmeda a 37°C. Los anticuerpos primarios utilizados fueron los siguientes: anti E-cadherina en una dilución final 1/200 (BD Biosciences), β -catenina (BD Biosciences) 1/200, anti MMP2 (Abcam) 1/200. Las células se lavaron 5 veces en PBS-T por 5 min y fueron incubadas con el anticuerpo secundario anti anti-IgG de ratón o anti- IgG de conejo marcado con AlexaFluor 594(rojo) (Molecular Probes). Las células se lavaron con PBS y se incubaron con DAPI (0,3 μ g/mL en PBS) Durante 5 minutos. El citoesqueleto de actina se tiñó incubando las células durante 1hora con faloidina conjugada con rodamina (rojo, TRITC) o Alexa Fluor 488 (verde) (Molecular Probes) diluida 1:200 en solución de bloqueo. Finalmente las preparaciones se montaron sobre portaobjetos utilizando el medio de montaje (ProLong Gold Antifade Reagent, Invitrogen). Las Células fueron analizadas mediante microscopía confocal, utilizando un microscopio OLYMPUS Fluoview 1000 o en el microscopio de epifluorescencia Nikon Eclipse TE2000-U.

14. Formación de colonia en agar blando

La capacidad de crecimiento independiente del anclaje de células NMuMG-Vector, NMuMG-NZEB1, se evaluó mediante el ensayo clonogenico en agar blando.

En una placa de 24 pocillos se colocó una primera capa de 0.3 mL de agar al 0.5% p/v en DMEM, una vez que el agar solidifico, se agregó una suspensión de 3000 células /pocillo en 0.5 mL de agar al 0.35% p/v en DMEM suplementado con 10% SFB v/v. Una vez que solidifico la segunda capa de agar con células, se le realizo un agregado de 0.5 mL de DMEM completo. La placa se incubo durante 15 días a 37 °C bajo condiciones estándares de cultivo. Cada 3 días se realizó una renovación del medio de cultivo. Transcurridos los 15 días las colonias fueron teñidas con MTT (bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol) (Sigma) 5 mg/mL durante 3 horas, en estufa de cultivo (37 °C, 5% CO₂ v/v). Luego de la incubación se quitó suavemente el medio de cultivo y se realizaron 3 lavados con PBS. Posteriormente

se fotografiaron 10 campos independientes en una magnificación final de 100X en un microscopio de contraste de fase, para luego cuantificarse el número de colonias formadas por más de 20 células. Cada condición de evaluó por triplicado.

15. Detección de actividad de MMP-2 y MMP-9 por Zimografía

La actividad colagenolítica se determinó sobre electroforesis en gel de poliacrilamida, en sodio dodecil sulfato (SDS-PAGE) con gelatina al 1.5% como sustrato para la detección de la actividad enzimática de las MMPs.

16.1 Obtención de la muestra: 1.5×10^6 células NMuMG-NZEB1 o NMuMG-Vector se sembraron en una placa de 100 mm con 10 mL de medio completo. Al día siguiente las células fueron lavadas 3 veces con PBS y se les agregó 7 mL de DMEM sin antibióticos y sin suplementar; 48 horas después los medios condicionados fueron recolectados y concentrados por liofilización para medir los niveles de MMP-2 y MMP-9 liberados por las células. Las muestras concentradas fueron resuspendidas en 500 μ L de PBS.

16.2 Preparación de la muestra: 5 partes de muestra en 1 parte de Buffer Laemmli 6X sin β -mercaptoetanol. Como control positivo se utilizó sangre capilar.

16.3 Detección de actividad MMPs: Se sembraron entre 20 y 40 μ L de cada muestra de los medios condicionados en un gel de poliacrilamida SDS-7.5% co-polimerizado con gelatina (1.5 mg/mL) (sigma) en condiciones no reductoras. Las muestras fueron corridas durante 110 minutos a 100V constante, la corrida se realizó en hielo. Una vez finalizada la corrida los geles fueron lavados dos veces con Triton X-100 al 2,5% (v/v) durante 40 minutos. Después de dos lavados con agua destilada durante 10min; los geles fueron incubados en buffer enzima (Tris 0,25 M, NaCl 1 M y CaCl_2 25 mM a pH 7,4) durante 24 horas a 37°C. Después de la incubación, los geles se tiñeron con azul brillante de Coomassie (Bio-Rad) al 0,125% en metanol al 45% y ácido acético al 5% seguido de decoloración con etanol al 25% y ácido acético al 10%. La actividad gelatinolítica fue detectada como bandas no teñidas contra el fondo azul de la gelatina coloreada con azul de Coomassie. El área lítica de las bandas sobre los geles teñidos fue cuantificada densitométricamente y analizada con el programa de análisis de imágenes GELPRO32. La densidad de banda de células NMuMG-Vector en cada experimento se definió como 100%.

16. Extracción de ARN total y PCR cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR)

El ARN total se extrajo de cultivos de células MDA-MB-231 subconfluentes (500.000 células/placa 60mm) usando el kit RNeasy Mini Kit (Qiagen). La cuantificación de ARN se estimó mediante lectura

espectrofotométrica a 260 nm. La pureza de los ácidos nucleicos se calculó a través de la relación de absorbancias a 260 nm respecto a 280 nm, considerando aceptables valores entre 1.8 y 2.0

El ARN total (1 µg) se transcribió inversamente a ADN complementario (ADNc) utilizando el kit TaqMan Reverse Transcription (Applied Biosystems), con random hexámeros como primers (cebadores) siguiendo el protocolo establecido por la compañía.

La reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real (qPCR) se realizó usando un sistema de detección ABI PRISM 7700 (Applied Biosystems); utilizando TaqMan Universal PCR MasterMix (Applied Biosystems) cebadores diana (primers) (concentración final 900nM), sonda fluorescente (concentración final 250nM) y 9 µL del ADNc (dilución 1/25) de acuerdo a las recomendaciones del fabricante.

El protocolo de ciclado empleado incluyó un ciclo de 2 minutos a 50 °C, seguido por un paso de desnaturalización de 10 min a 95 °C, seguido por 40 ciclos a 95 °C por 15 segundos y a 60 °C por 1 minuto.

Las sondas TaqMan específicas para ZEB1, PKC α , E-cadherina, vimentina y el gen de control endógeno UBC (utilizado para la normalización) fueron adquiridas en Applied Biosystems: ZEB1-FAM™ dye Hs01566408_m1 para ZEB1; PRKCA-FAM™ dye Hs00925195_m1 para PKC α ; Vimentin-6FAM™ dye Hs00185584_m1 para vimentina; E-cad-6FAM™ dye Hs01023894_m1 para E-cadherina y UBC-VIC™ dye Hs00824723_m1 para ubiquitina C (control endógeno). La formación del producto de PCR se monitorizó continuamente usando el Sequence Detection System software versión 1.7. Los resultados se expresaron como veces de cambio del gen diana por $2^{-\Delta\Delta Ct}$ y las muestras fueron normalizadas con la situación control NT (non target control). Todas las reacciones de qPCR se realizaron por triplicado. Cada experimento se realizó tres veces.

17. Inmunoprecipitación (IP)

Los ensayos de IP fueron realizados según las recomendaciones indicadas por el kit Classic IP kit (Pierce®) (Catalogo: 26146). Las células se lisaron en buffer RIPA modificado más inhibidores de proteasas y fosfatasa como se describió anteriormente en la sección 8.1. Antes de comenzar los ensayos de IP, un 10% de los extractos celulares totales fueron separados para ser utilizado como control (input).

Para los ensayos de IP, los extractos celulares totales, primero fueron preclareados utilizando una resina de agarosa control (4% de perlas de agarosa) durante 1 hora a 4°C en agitación por rotación. Los lisados preclareados posteriormente fueron incubados con anticuerpos anti ZEB1 (1/250 anti ZEB1-HD-

conejo policlonal desarrollado por el laboratorio del Dr. Darling) anti GPF (1/500 Abcam, ab-290) anti PKC α (1/100, Santa Cruz Biotechnology, sc-208) o anti IgG (control) (1/250, Santa Cruz Biotechnology) durante 16 horas a 4°C en agitación por rotación. La captura del inmunocomplejo se realizó incubando los inmunocomplejos con perlas de proteína A/G (Pierce Protein A/G agarosa) según recomendación del fabricante durante 2 horas a 4°C en agitación por rotación. Posteriormente las muestras fueron lavadas y las proteínas unidas se eluyeron por ebullición por 10 minutos en buffer Laemmli 1 x.

Las muestras así obtenidas fueron posteriormente analizadas mediante electroforesis en geles de poliacrilamida, western blot e inmunodetección con anticuerpos específicos según lo descrito en la sección 9.

18. Purificación con perlas de níquel

La purificación con perlas de níquel se llevó a cabo bajo condiciones no desnaturalizantes. Las células a partir de las cuales se realizó la purificación fueron resuspendidas en 1mL de His-Binding Buffer, sonicadas con dos pulsos de 10 segundos y una amplitud del 40%, posteriormente. Los extractos celulares totales obtenidos de esta manera se incubaron con perlas de níquel (QIAGEN) durante 4 horas a temperatura ambiente en agitación por rotación y en protección de la luz. Posteriormente las muestras fueron lavadas 1 vez con his binding buffer, dos veces con his wash buffer y finalmente las muestras fueron eluidas por ebullición durante 10 minutos en buffer de elución. Las muestras así obtenidas fueron posteriormente analizadas mediante electroforesis en geles de poliacrilamida, western blot e inmunodetección con anticuerpos específicos según lo descrito en la sección 9.

His-Binding-Buffer: 50mM Tris-HCl (pH 8.0), 5mM imidazole, 100mM NaCl, 0.1 mM EDTA, 1mM PMSF

His-Wash-Buffer: 50mM Tris-HCl (pH 8.0), 300mM NaCl, 0.1 mM EDTA, 5mM imidazole

Buffer de elución: buffer Laemmli 2x, 300 mM imidazol.

19. Ensayo de proliferación celular: curva de crecimiento

La capacidad proliferativa se determinó evaluando el número de células durante la fase de crecimiento exponencial. En placas de 24 pocillos se sembraron 3×10^4 células de cada línea celular (NMuMG-Vector y NMuMG-NZEB1), en el medio habitual de cultivo. A diferentes tiempos después de la siembra, las células fueron lavadas con PBS, tripsinizadas y su número se determinó por recuento en cámara de Neubauer.

20. Análisis estadístico

Para el análisis de los resultados de este trabajo de tesis, obtenidos a partir de ensayos muestrales, se partió de la premisa de que la distribución de datos era gaussiana. Cuando la comparación se realizó entre dos grupos (condiciones), para su análisis se utilizó un *test t* no apareado de dos colas. Para la comparación de múltiples grupos de datos se utilizó el test paramétrico ANOVA de una vía seguido del test de comparación de Dunnet o de Bonferroni. Los resultados se presentan como el Valor Medio \pm Desviación Estándar (DE). Los análisis estadísticos se realizaron usando el programa GraphPadPrism 6.01 y los datos se consideraron estadísticamente diferentes cuando el valor de probabilidad (p) fue menor a 0.05. Las probabilidades estadísticas fueron expresadas como * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$.

1. Presentaciones en congresos y simposios:

- 1.1 **“Participación de la vía de señalamiento de IGF1 en la actividad del promotor y el nivel de expresión del factor de transcripción ZEB1”**. Perrone, A; Llorens, M; Cavallo, N.; Cabanillas, A. LVII Reunión Científica Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica. Mar del Plata, Buenos Aires Argentina 14 al 17 de noviembre, 2012.
- 1.2 **“Transferrin as a potential carrier in photodynamic therapy (PDT) and cell phototoxicity induced by cr (PHEN) 33+”**. García, P; Cavallo, N; Llorens de los Ríos, C; Perrone, A; Cabanillas, A. LVII Reunión Científica Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica. Mar del Plata, Buenos Aires Argentina 14 al 17 de noviembre, 2012.
- 1.3 **“Phosphorylation regulates the function of ZEB1 transcriptional repressor”**. Perrone AP, Llorens MC, Cabanillas AM. SAIB -Sociedad Argentina de Investigación en *Bioquímica y Biología Molecular*. Buenos Aires. República Argentina. 6-7 de Noviembre 2013.
- 1.4 **“Participación de las vías de señalización en la fosforilación del dominio amino terminal de ZEB1 y su localización subcelular”**. Llorens M.; Cavallo N.; Perrone A.; Cabanillas A. LVIII Reunión Científica Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica. Mar del Plata, Buenos Aires Argentina 20 al 23 de noviembre, 2013.
- 1.5 **“Regulación de ZEB1 por NOTCH1 en leucemia linfática aguda T”**. Cavallo N.; Llorens M.; Perrone A.; Cabanillas A. LVIII Reunión Científica Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica. Mar del Plata, Buenos Aires Argentina 20 al 23 de noviembre, 2013.
- 1.6 **“El proceso de fosforilación regula el rol biológico de ZEB1”**. Perrone A.; Llorens M.; Cabanillas A. LVIII Reunión Científica Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica. Mar del Plata, Buenos Aires Argentina 20 al 23 de noviembre, 2013.
- 1.7 **“Role of signaling pathways in N-ZEB1 phosphorylation and in Epitelial-Mesenchymal Transition (EMT)**. Llorens MC, Cavallo NL, Cabanillas AM. SAIB -Sociedad Argentina de Investigación en *Bioquímica y Biología Molecular*. Rosario. República Argentina. 11- 14 de Noviembre 2014.
- 1.8 **“Identificación y caracterización de un fragmento del dominio amino terminal de ZEB1 que induce la Transición Epitelio Mesenquimatoso (EMT)”**. Llorens MC.; Cavallo NL; Cabanillas

- AM. LIX Reunión Científica Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica (SAIC). Mar del Plata, Buenos Aires Argentina 19 al 22 de noviembre, 2014.
- 1.9 **“Role of N-ZEB1 in Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT)”**. Llorens María Candelaria y Cabanillas, Ana María. Proceedings of the 106th Annual Meeting of the American Association for Cancer Research; 2015 Apr 18-22; Philadelphia, PA. Philadelphia (PA): AACR; Cancer Res 2015;75(15 Suppl):Abstract nr 1988. doi:10.1158/1538-7445.AM2015-1988.
- 1.10 **“Regulación de ZEB1 por IGF-1R en la transición epitelio mesenquimal de células NMuMG de epitelio mamario murino”** Llorens Ma. Candelaria; Vaglianti Victoria; Cabanillas Ana Maria. LX Reunión de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica (SAIC). Mar del Plata, Buenos Aires Argentina 18 al 21 de noviembre, 2015.
- 1.11 **“Glypican-3 (GPC3) Induces a Mesenchymal-Epithelial Transition in Human Breast Cancer Cells Lines”** Castillo LF, Tascón R, Lago Huvelle MA, Novak G, Llorens MC, Cabanillas AM, Bal de Kier Joffé E, Peters MG. . Simposio Internacional Programa RAICES Red de Científicos Argentinos en el Noreste de EE.UU. “Ganando la guerra contra el cáncer”. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 12 y 13 de Mayo de 2016. Buenos Aires, Argentina. Internacional.
- 1.12 **“PKC α regula ZEB1 en líneas celulares de cáncer de mama”** Llorens, MC, López-Haber C, Barrio-Real L, Kazanietz M y Cabanillas, AM. Simposio Internacional Programa RAICES Red de Científicos Argentinos en el Noreste de EE.UU. “Ganando la guerra contra el cáncer”. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 12 y 13 de Mayo de 2016. Buenos Aires, Argentina. Internacional.
- 1.13 **“Papel del Glipicano-3 (GPC3) y ZEB1 en la transición epitelio-mesenquimática (TEM) de células tumorales mamarias humanas”**. Gisela V. Novack, Lilian F. Castillo, María Amparo Lago Huvelle, María Candelaria Llorens de los Ríos, Ana Cabanillas, Elisa Bal de Kier Joffé, María Giselle Peters. XXX Jornadas de Oncología. Instituto de oncología Angel H. Roffo. Buenos Aires. 29 y 30 de Septiembre 2016. Buenos Aires, Argentina. Nacional.
- 1.14 **“IGF-1 modulates ZEB1 stability during epithelial mesenchymal transition (EMT)”**. Llorens MC, Vaglianti MV, Cabanillas AM. 52 th Annual Meeting Argentine Society for Biochemistry and Molecular Biology (LII Reunión Anual Sociedad Argentina de Investigación en Bioquímica y Biología Molecular). 7 al 10 de Noviembre 2016. Córdoba, República Argentina. Internacional.

- 1.15 **“ZEB1 is regulated by PKC-alpha in breast cancer cell lines”**. María Candelaria Llorens, Cynthia Lopez Haber, Laura Barrio-Real, María Victoria Vaglianti, Marcelo Kazanietz, Ana María Cabanillas. LXI Reunión Científica Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica (SAIC). Mar del Plata, Buenos Aires Argentina 15 al 19 de noviembre, 2016. Internacional.
- 1.16 **“ZEB1 is modified post-translationally by sumoylation”** María Victoria Vaglianti, María Candelaria Llorens, Ana María Cabanillas. LXI Reunión Científica Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica (SAIC). Mar del Plata, Buenos Aires Argentina 15 al 19 de noviembre, 2016. Internacional
- 1.17 **Glypican-3 (GPC3) modulates epithelial- mesenchymal transition (EMT) of human breast cancer cells by downregulating ZEB1**. Gisela Vanina Novack¹, Lilian Fedra Castillo¹, María Amparo Lago Huvelle², María Candelaria Llorens de los Ríos³, Ana María Cabanillas³, Elisa Bal de Kier Joffé¹, María Giselle Peters. LXI Reunión Científica Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica (SAIC). Mar del Plata, Buenos Aires Argentina 15 al 19 de noviembre, 2016. Internacional

2 Artículos publicados

- 2.1 **“Phosphorylation Regulates Functions of ZEB1 Transcription Factor”** Llorens MC, Lorenzatti G, Cavallo NL, Vaglianti MV, Perrone AP, Carenbauer AL, Darling DS, Cabanillas AM., J Cell Physiol. 2016. Oct;231(10):2205-17. doi: 10.1002/jcp.25338.
- 2.2 **“Glypican-3 induces a mesenchymal to epithelial transition in human breast cancer cells”** Castillo, L., Tascón, R., Huvelle, M., Novack, G., Llorens, M.C., Ferreira dos Santos, A., Shortrede, J., Cabanillas, A.M. Bal de Kier Joffé, E., Labriola, L. and Peters, M.G. Oncotarget. 2016 Sep 13;7(37):60133-60154. doi: 10.18632/oncotarget.11107.

BIBLIOGRAFÍA

1. Sanchez-Tillo, E., et al., *Expanding roles of ZEB factors in tumorigenesis and tumor progression*. Am J Cancer Res, 2011. **1**(7): p. 897-912.
2. Broege, A.M., B. M. Anose, and M. M. Sanders *Regulating the expression of the ZEB1 transcription factor in health and disease*. Current Trends in Endocrinology 2011. **5**: p. 16.
3. Vandewalle, C., F. Van Roy, and G. Berx, *The role of the ZEB family of transcription factors in development and disease*. Cell Mol Life Sci, 2009. **66**(5): p. 773-87.
4. Gheldof, A., et al., *Evolutionary functional analysis and molecular regulation of the ZEB transcription factors*. Cell Mol Life Sci, 2012. **69**(15): p. 2527-41.
5. Cabanillas, A.M. and D.S. Darling, *Alternative splicing gives rise to two isoforms of Zfh1, a zinc finger/homeodomain protein that binds T3-response elements*. DNA Cell Biol, 1996. **15**(8): p. 643-51.
6. Postigo, A.A. and D.C. Dean, *Differential expression and function of members of the zfh-1 family of zinc finger/homeodomain repressors*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(12): p. 6391-6.
7. Postigo, A.A. and D.C. Dean, *Independent repressor domains in ZEB regulate muscle and T-cell differentiation*. Mol Cell Biol, 1999. **19**(12): p. 7961-71.
8. Sekido, R., et al., *The delta-crystallin enhancer-binding protein delta EF1 is a repressor of E2-box-mediated gene activation*. Mol Cell Biol, 1994. **14**(9): p. 5692-700.
9. Remacle, J.E., et al., *New mode of DNA binding of multi-zinc finger transcription factors: deltaEF1 family members bind with two hands to two target sites*. Embo j, 1999. **18**(18): p. 5073-84.
10. Sánchez-Tilló, E., et al., *ZEB1 represses E-cadherin and induces an EMT by recruiting the SWI/SNF chromatin-remodeling protein BRG1*. Oncogene, 2010. **29**(24): p. 3490-3500.
11. Postigo, A.A., et al., *Regulation of Smad signaling through a differential recruitment of coactivators and corepressors by ZEB proteins*. Embo j, 2003. **22**(10): p. 2453-62.
12. Nishimura, G., et al., *DeltaEF1 mediates TGF-beta signaling in vascular smooth muscle cell differentiation*. Dev Cell, 2006. **11**(1): p. 93-104.
13. van Grunsven, L.A., et al., *Interaction between Smad-interacting protein-1 and the corepressor C-terminal binding protein is dispensable for transcriptional repression of E-cadherin*. J Biol Chem, 2003. **278**(28): p. 26135-45.
14. Manavella, P.A., et al., *The ZFH1A gene is differentially autoregulated by its isoforms*. Biochem Biophys Res Commun, 2007. **360**(3): p. 621-6.
15. Genetta, T., D. Ruezinsky, and T. Kadesch, *Displacement of an E-box-binding repressor by basic helix-loop-helix proteins: implications for B-cell specificity of the immunoglobulin heavy-chain enhancer*. Mol Cell Biol, 1994. **14**(9): p. 6153-63.
16. Fontemaggi, G., et al., *The transcriptional repressor ZEB regulates p73 expression at the crossroad between proliferation and differentiation*. Mol Cell Biol, 2001. **21**(24): p. 8461-70.
17. Jethanandani, P. and R.H. Kramer, *Alpha7 integrin expression is negatively regulated by deltaEF1 during skeletal myogenesis*. J Biol Chem, 2005. **280**(43): p. 36037-46.
18. Higashi, Y., et al., *Impairment of T cell development in deltaEF1 mutant mice*. J Exp Med, 1997. **185**(8): p. 1467-79.
19. Yasui, D.H., et al., *Transcriptional repression of the IL-2 gene in Th cells by ZEB*. J Immunol, 1998. **160**(9): p. 4433-40.
20. Shirakihara, T., M. Saitoh, and K. Miyazono, *Differential regulation of epithelial and mesenchymal markers by deltaEF1 proteins in epithelial mesenchymal transition induced by TGF-beta*. Mol Biol Cell, 2007. **18**(9): p. 3533-44.

21. Hlubek, F., et al., *Tip60 is a cell-type-specific transcriptional regulator*. J Biochem, 2001. **129**(4): p. 635-41.
22. Wang, J., et al., *Opposing LSD1 complexes function in developmental gene activation and repression programmes*. Nature, 2007. **446**(7138): p. 882-7.
23. Wang, J., et al., *The transcription repressor, ZEB1, cooperates with CtBP2 and HDAC1 to suppress IL-2 gene activation in T cells*. Int Immunol, 2009. **21**(3): p. 227-35.
24. Papadopoulou, V., et al., *ZEB1 and CtBP form a repressive complex at a distal promoter element of the BCL6 locus*. Biochem J, 2010. **427**(3): p. 541-50.
25. Lazarova, D.L., M. Bordonaro, and A.C. Sartorelli, *Transcriptional regulation of the vitamin D(3) receptor gene by ZEB*. Cell Growth Differ, 2001. **12**(6): p. 319-26.
26. Pena, C., et al., *The expression levels of the transcriptional regulators p300 and CtBP modulate the correlations between SNAIL, ZEB1, E-cadherin and vitamin D receptor in human colon carcinomas*. Int J Cancer, 2006. **119**(9): p. 2098-104.
27. Sanchez-Tillo, E., et al., *ZEB1 and TCF4 reciprocally modulate their transcriptional activities to regulate Wnt target gene expression*. Oncogene, 2015. **34**(46): p. 5760-70.
28. Takagi, T., et al., *DeltaEF1, a zinc finger and homeodomain transcription factor, is required for skeleton patterning in multiple lineages*. Development, 1998. **125**(1): p. 21-31.
29. Funahashi, J., et al., *Delta-crystallin enhancer binding protein delta EF1 is a zinc finger-homeodomain protein implicated in postgastrulation embryogenesis*. Development, 1993. **119**(2): p. 433-46.
30. Hurt, E.M., et al., *Expression of the ZEB1 (deltaEF1) transcription factor in human: additional insights*. Mol Cell Biochem, 2008. **318**(1-2): p. 89-99.
31. Murray, D., et al., *The transcription factor deltaEF1 is inversely expressed with type II collagen mRNA and can repress Col2a1 promoter activity in transfected chondrocytes*. J Biol Chem, 2000. **275**(5): p. 3610-8.
32. Terraz, C., et al., *delta Ef1 binds to a far upstream sequence of the mouse pro-alpha 1(I) collagen gene and represses its expression in osteoblasts*. J Biol Chem, 2001. **276**(40): p. 37011-9.
33. Postigo, A.A. and D.C. Dean, *ZEB, a vertebrate homolog of Drosophila Zfh-1, is a negative regulator of muscle differentiation*. Embo j, 1997. **16**(13): p. 3935-43.
34. Ponticos, M., et al., *Regulation of collagen type I in vascular smooth muscle cells by competition between Nkx2.5 and deltaEF1/ZEB1*. Mol Cell Biol, 2004. **24**(14): p. 6151-61.
35. Brabletz, T., et al., *Negative regulation of CD4 expression in T cells by the transcriptional repressor ZEB*. Int Immunol, 1999. **11**(10): p. 1701-8.
36. Comijn, J., et al., *The two-handed E box binding zinc finger protein SIP1 downregulates E-cadherin and induces invasion*. Mol Cell, 2001. **7**(6): p. 1267-78.
37. Eger, A., et al., *DeltaEF1 is a transcriptional repressor of E-cadherin and regulates epithelial plasticity in breast cancer cells*. Oncogene, 2005. **24**(14): p. 2375-85.
38. Krafchak, C.M., et al., *Mutations in TCF8 cause posterior polymorphous corneal dystrophy and ectopic expression of COL4A3 by corneal endothelial cells*. Am J Hum Genet, 2005. **77**(5): p. 694-708.
39. Sekido, R., et al., *Organization of the gene encoding transcriptional repressor deltaEF1 and cross-species conservation of its domains*. Gene, 1996. **173**(2): p. 227-32.
40. Clark, S.G. and C. Chiu, *C. elegans ZAG-1, a Zn-finger-homeodomain protein, regulates axonal development and neuronal differentiation*. Development, 2003. **130**(16): p. 3781-94.
41. Gregory, P.A., et al., *An autocrine TGF-beta/ZEB/miR-200 signaling network regulates establishment and maintenance of epithelial-mesenchymal transition*. Mol Biol Cell, 2011. **22**(10): p. 1686-98.

42. Burk, U., et al., *A reciprocal repression between ZEB1 and members of the miR-200 family promotes EMT and invasion in cancer cells*. EMBO Rep, 2008. **9**(6): p. 582-9.
43. Brabletz, S. and T. Brabletz, *The ZEB/miR-200 feedback loop--a motor of cellular plasticity in development and cancer?* EMBO Rep, 2010. **11**(9): p. 670-7.
44. Gregory, P.A., et al., *The miR-200 family and miR-205 regulate epithelial to mesenchymal transition by targeting ZEB1 and SIP1*. Nat Cell Biol, 2008. **10**(5): p. 593-601.
45. Park, S.M., et al., *The miR-200 family determines the epithelial phenotype of cancer cells by targeting the E-cadherin repressors ZEB1 and ZEB2*. Genes Dev, 2008. **22**(7): p. 894-907.
46. Long, J., D. Zuo, and M. Park, *Pc2-mediated sumoylation of Smad-interacting protein 1 attenuates transcriptional repression of E-cadherin*. J Biol Chem, 2005. **280**(42): p. 35477-89.
47. Costantino, M.E., et al., *Cell-specific phosphorylation of Zfhep transcription factor*. Biochem Biophys Res Commun, 2002. **296**(2): p. 368-73.
48. Llorens, M.C., et al., *Phosphorylation Regulates Functions of ZEB1 Transcription Factor*. J Cell Physiol, 2016. **231**(10): p. 2205-17.
49. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *Hallmarks of cancer: the next generation*. Cell, 2011. **144**(5): p. 646-74.
50. Jemal, A., et al., *Global cancer statistics*. CA Cancer J Clin, 2011. **61**(2): p. 69-90.
51. Lorusso, G. and C. Rugg, *New insights into the mechanisms of organ-specific breast cancer metastasis*. Semin Cancer Biol, 2012. **22**(3): p. 226-33.
52. Wooster, R. and B.L. Weber, *Breast and ovarian cancer*. N Engl J Med, 2003. **348**(23): p. 2339-47.
53. Kaminska, M., et al., *Breast cancer risk factors*. Prz Menopauzalny, 2015. **14**(3): p. 196-202.
54. Perou, C.M., et al., *Molecular portraits of human breast tumours*. Nature, 2000. **406**(6797): p. 747-52.
55. Prat, A. and C.M. Perou, *Deconstructing the molecular portraits of breast cancer*. Mol Oncol, 2011. **5**(1): p. 5-23.
56. Thiery, J.P. and J.P. Sleeman, *Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2006. **7**(2): p. 131-42.
57. Thiery, J.P., et al., *Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease*. Cell, 2009. **139**(5): p. 871-90.
58. Kokkinos, M.I., et al., *Cadherins in the human placenta--epithelial-mesenchymal transition (EMT) and placental development*. Placenta, 2010. **31**(9): p. 747-55.
59. Lim, J. and J.P. Thiery, *Epithelial-mesenchymal transitions: insights from development*. Development, 2012. **139**(19): p. 3471-86.
60. Liao, T.T. and M.H. Yang, *Revisiting epithelial-mesenchymal transition in cancer metastasis: the connection between epithelial plasticity and stemness*. Mol Oncol, 2017. **11**(7): p. 792-804.
61. Lamouille, S., J. Xu, and R. Derynck, *Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2014. **15**(3): p. 178-96.
62. Thiery, J.P., *Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression*. Nat Rev Cancer, 2002. **2**(6): p. 442-54.
63. Zhang, P., Y. Sun, and L. Ma, *ZEB1: At the crossroads of epithelial-mesenchymal transition, metastasis and therapy resistance*. Cell Cycle, 2015. **14**(4): p. 481-487.
64. Lambert, A.W., D.R. Pattabiraman, and R.A. Weinberg, *Emerging Biological Principles of Metastasis*. Cell, 2017. **168**(4): p. 670-691.
65. Shibue, T. and R.A. Weinberg, *EMT, CSCs, and drug resistance: the mechanistic link and clinical implications*. Nat Rev Clin Oncol, 2017.
66. Kalluri, R. and R.A. Weinberg, *The basics of epithelial-mesenchymal transition*. J Clin Invest, 2009. **119**(6): p. 1420-8.

67. Peinado, H., F. Portillo, and A. Cano, *Transcriptional regulation of cadherins during development and carcinogenesis*. *Int J Dev Biol*, 2004. **48**(5-6): p. 365-75.
68. Huang, R.Y., P. Guilford, and J.P. Thiery, *Early events in cell adhesion and polarity during epithelial-mesenchymal transition*. *J Cell Sci*, 2012. **125**(Pt 19): p. 4417-22.
69. Moreno-Bueno, G., F. Portillo, and A. Cano, *Transcriptional regulation of cell polarity in EMT and cancer*. *Oncogene*, 2008. **27**(55): p. 6958-69.
70. Nieto, M.A., et al., *Emt: 2016*. *Cell*, 2016. **166**(1): p. 21-45.
71. Yilmaz, M. and G. Christofori, *Mechanisms of motility in metastasizing cells*. *Mol Cancer Res*, 2010. **8**(5): p. 629-42.
72. Wheelock, M.J., et al., *Cadherin switching*. *J Cell Sci*, 2008. **121**(Pt 6): p. 727-35.
73. Nistico, P., M.J. Bissell, and D.C. Radisky, *Epithelial-mesenchymal transition: general principles and pathological relevance with special emphasis on the role of matrix metalloproteinases*. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2012. **4**(2).
74. Graham, T.R., et al., *Insulin-like growth factor-I-dependent up-regulation of ZEB1 drives epithelial-to-mesenchymal transition in human prostate cancer cells*. *Cancer Res*, 2008. **68**(7): p. 2479-88.
75. Wellner, U., et al., *The EMT-activator ZEB1 promotes tumorigenicity by repressing stemness-inhibiting microRNAs*. *Nat Cell Biol*, 2009. **11**(12): p. 1487-95.
76. Spaderna, S., et al., *A transient, EMT-linked loss of basement membranes indicates metastasis and poor survival in colorectal cancer*. *Gastroenterology*, 2006. **131**(3): p. 830-40.
77. Spaderna, S., et al., *The transcriptional repressor ZEB1 promotes metastasis and loss of cell polarity in cancer*. *Cancer Res*, 2008. **68**(2): p. 537-44.
78. Krebs, A.M., et al., *The EMT-activator Zeb1 is a key factor for cell plasticity and promotes metastasis in pancreatic cancer*. *Nat Cell Biol*, 2017. **19**(5): p. 518-529.
79. Lorenzatti, G., et al., *CCN6 (WISP3) decreases ZEB1-mediated EMT and invasion by attenuation of IGF-1 receptor signaling in breast cancer*. *J Cell Sci*, 2011. **124**(Pt 10): p. 1752-8.
80. Aigner, K., et al., *The transcription factor ZEB1 (deltaEF1) promotes tumour cell dedifferentiation by repressing master regulators of epithelial polarity*. *Oncogene*, 2007. **26**(49): p. 6979-88.
81. Aigner, K., et al., *The transcription factor ZEB1 (deltaEF1) represses Plakophilin 3 during human cancer progression*. *FEBS Lett*, 2007. **581**(8): p. 1617-24.
82. Liu, Y., et al., *Zeb1 links epithelial-mesenchymal transition and cellular senescence*. *Development*, 2008. **135**(3): p. 579-88.
83. Sanchez-Tillo, E., et al., *EMT-activating transcription factors in cancer: beyond EMT and tumor invasiveness*. *Cell Mol Life Sci*, 2012. **69**(20): p. 3429-56.
84. Chen, T., et al., *Epithelial-mesenchymal transition (EMT): A biological process in the development, stem cell differentiation, and tumorigenesis*. *J Cell Physiol*, 2017.
85. Witsch, E., M. Sela, and Y. Yarden, *Roles for growth factors in cancer progression*. *Physiology (Bethesda)*, 2010. **25**(2): p. 85-101.
86. Foulstone, E., et al., *Insulin-like growth factor ligands, receptors, and binding proteins in cancer*. *J Pathol*, 2005. **205**(2): p. 145-53.
87. Li, H., et al., *IGF-IR signaling in epithelial to mesenchymal transition and targeting IGF-IR therapy: overview and new insights*. *Mol Cancer*, 2017. **16**(1): p. 6.
88. Laviola, L., A. Natalicchio, and F. Giorgino, *The IGF-I signaling pathway*. *Curr Pharm Des*, 2007. **13**(7): p. 663-9.
89. Sivakumar, R., et al., *Autocrine loop for IGF-I receptor signaling in SLUG-mediated epithelial-mesenchymal transition*. *Int J Oncol*, 2009. **34**(2): p. 329-38.

90. Taliaferro-Smith, L., et al., *FAK activation is required for IGF1R-mediated regulation of EMT, migration, and invasion in mesenchymal triple negative breast cancer cells*. *Oncotarget*, 2015. **6**(7): p. 4757-72.
91. Kim, H.J., et al., *Constitutively active type I insulin-like growth factor receptor causes transformation and xenograft growth of immortalized mammary epithelial cells and is accompanied by an epithelial-to-mesenchymal transition mediated by NF-kappaB and snail*. *Mol Cell Biol*, 2007. **27**(8): p. 3165-75.
92. Li, H., et al., *Ubiquitin ligase Cbl-b represses IGF-I-induced epithelial mesenchymal transition via ZEB2 and microRNA-200c regulation in gastric cancer cells*. *Mol Cancer*, 2014. **13**: p. 136.
93. Griner, E.M. and M.G. Kazanietz, *Protein kinase C and other diacylglycerol effectors in cancer*. *Nat Rev Cancer*, 2007. **7**(4): p. 281-94.
94. Urtreger, A.J., M.G. Kazanietz, and E.D. Bal de Kier Joffe, *Contribution of individual PKC isoforms to breast cancer progression*. *IUBMB Life*, 2012. **64**(1): p. 18-26.
95. Garg, R., et al., *Protein kinase C and cancer: what we know and what we do not*. *Oncogene*, 2014. **33**(45): p. 5225-37.
96. Cooke, M., et al., *Protein kinase C in cancer: The top five unanswered questions*. *Mol Carcinog*, 2017. **56**(6): p. 1531-1542.
97. Tam, W.L., et al., *Protein kinase C alpha is a central signaling node and therapeutic target for breast cancer stem cells*. *Cancer Cell*, 2013. **24**(3): p. 347-64.
98. Parekh, D.B., W. Ziegler, and P.J. Parker, *Multiple pathways control protein kinase C phosphorylation*. *Embo j*, 2000. **19**(4): p. 496-503.
99. Newton, A.C., *Regulation of the ABC kinases by phosphorylation: protein kinase C as a paradigm*. *Biochem J*, 2003. **370**(Pt 2): p. 361-71.
100. Huang, H.D., et al., *KinasePhos: a web tool for identifying protein kinase-specific phosphorylation sites*. *Nucleic Acids Res*, 2005. **33**(Web Server issue): p. W226-9.
101. Blom, N., et al., *Prediction of post-translational glycosylation and phosphorylation of proteins from the amino acid sequence*. *Proteomics*, 2004. **4**(6): p. 1633-49.
102. Blom, N., S. Gammeltoft, and S. Brunak, *Sequence and structure-based prediction of eukaryotic protein phosphorylation sites*. *J Mol Biol*, 1999. **294**(5): p. 1351-62.
103. Miettinen, P.J., et al., *TGF-beta induced transdifferentiation of mammary epithelial cells to mesenchymal cells: involvement of type I receptors*. *J Cell Biol*, 1994. **127**(6 Pt 2): p. 2021-36.
104. Horiguchi, K., et al., *TGF-beta drives epithelial-mesenchymal transition through deltaEF1-mediated downregulation of ESRP*. *Oncogene*, 2012. **31**(26): p. 3190-201.
105. Malanchi, I., et al., *Cutaneous cancer stem cell maintenance is dependent on beta-catenin signalling*. *Nature*, 2008. **452**(7187): p. 650-3.
106. Niehrs, C., *The complex world of WNT receptor signalling*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2012. **13**(12): p. 767-79.
107. Jinga, D.C., et al., *MMP-9 and MMP-2 gelatinases and TIMP-1 and TIMP-2 inhibitors in breast cancer: correlations with prognostic factors*. *J Cell Mol Med*, 2006. **10**(2): p. 499-510.
108. Taddei, M.L., et al., *Anoikis: an emerging hallmark in health and diseases*. *J Pathol*, 2012. **226**(2): p. 380-93.
109. Mazzone, E., et al., *Immortalized mammary epithelial cells overexpressing protein kinase C gamma acquire a malignant phenotype and become tumorigenic in vivo*. *Mol Cancer Res*, 2003. **1**(10): p. 776-87.
110. Fukagawa, A., et al., *deltaEF1 associates with DNMT1 and maintains DNA methylation of the E-cadherin promoter in breast cancer cells*. *Cancer Medicine*, 2015. **4**(1): p. 125-135.

111. Tryndyak, V.P., F.A. Beland, and I.P. Pogribny, *E-cadherin transcriptional down-regulation by epigenetic and microRNA-200 family alterations is related to mesenchymal and drug-resistant phenotypes in human breast cancer cells*. *Int J Cancer*, 2010. **126**(11): p. 2575-83.
112. Díaz, V.M., R. Viñas-Castells, and A. García de Herreros, *Regulation of the protein stability of EMT transcription factors*. *Cell Adhesion & Migration*, 2014. **8**(4): p. 418-428.
113. Ways, D.K., et al., *MCF-7 breast cancer cells transfected with protein kinase C-alpha exhibit altered expression of other protein kinase C isoforms and display a more aggressive neoplastic phenotype*. *J Clin Invest*, 1995. **95**(4): p. 1906-15.
114. Tonetti, D.A., et al., *Stable transfection of protein kinase C alpha cDNA in hormone-dependent breast cancer cell lines*. *Br J Cancer*, 2016. **115**(9): p. e12.
115. Abera, M.B. and M.G. Kazanietz, *Protein kinase Calpha mediates erlotinib resistance in lung cancer cells*. *Mol Pharmacol*, 2015. **87**(5): p. 832-41.
116. Christiansen, J.J. and A.K. Rajasekaran, *Reassessing epithelial to mesenchymal transition as a prerequisite for carcinoma invasion and metastasis*. *Cancer Res*, 2006. **66**(17): p. 8319-26.
117. Zheng, X., et al., *Epithelial-to-mesenchymal transition is dispensable for metastasis but induces chemoresistance in pancreatic cancer*. *Nature*, 2015. **527**(7579): p. 525-530.
118. Zhang, P., et al., *ATM-mediated stabilization of ZEB1 promotes DNA damage response and radioresistance through CHK1*. *Nat Cell Biol*, 2014. **16**(9): p. 864-75.
119. Tomono, T., K. Yano, and T. Ogihara, *Snail-Induced Epithelial-to-Mesenchymal Transition Enhances P-gp-Mediated Multidrug Resistance in HCC827 Cells*. *J Pharm Sci*, 2017.
120. Nieto, M.A., *The ins and outs of the epithelial to mesenchymal transition in health and disease*. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2011. **27**: p. 347-76.
121. Garcia de Herreros, A. and J. Baulida, *Cooperation, amplification, and feed-back in epithelial-mesenchymal transition*. *Biochim Biophys Acta*, 2012. **1825**(2): p. 223-8.
122. Dave, N., et al., *Functional cooperation between Snail1 and twist in the regulation of ZEB1 expression during epithelial to mesenchymal transition*. *J Biol Chem*, 2011. **286**(14): p. 12024-32.
123. Peinado, H., D. Olmeda, and A. Cano, *Snail, Zeb and bHLH factors in tumour progression: an alliance against the epithelial phenotype?* *Nat Rev Cancer*, 2007. **7**(6): p. 415-28.
124. Zhou, B.P., et al., *Dual regulation of Snail by GSK-3beta-mediated phosphorylation in control of epithelial-mesenchymal transition*. *Nat Cell Biol*, 2004. **6**(10): p. 931-40.
125. Sundararajan, V., et al., *The ZEB1/miR-200c feedback loop regulates invasion via actin interacting proteins MYLK and TKS5*. *Oncotarget*, 2015. **6**(29): p. 27083-96.
126. Bae, G.Y., et al., *Loss of E-cadherin activates EGFR-MEK/ERK signaling, which promotes invasion via the ZEB1/MMP2 axis in non-small cell lung cancer*. *Oncotarget*, 2013. **4**(12): p. 2512-22.
127. Brabletz, T., et al., *Opinion: migrating cancer stem cells - an integrated concept of malignant tumour progression*. *Nat Rev Cancer*, 2005. **5**(9): p. 744-9.
128. Garcia de Herreros, A., *Epithelial to mesenchymal transition in tumor cells as consequence of phenotypic instability*. *Front Cell Dev Biol*, 2014. **2**: p. 71.
129. Collins, G.A. and A.L. Goldberg, *The Logic of the 26S Proteasome*. *Cell*, 2017. **169**(5): p. 792-806.
130. Du, C., et al., *Protein Kinase D1 Suppresses Epithelial-to-Mesenchymal Transition through Phosphorylation of Snail*. *Cancer Research*, 2010. **70**(20): p. 7810-7819.
131. Hong, J., et al., *Phosphorylation of serine 68 of Twist1 by MAPKs stabilizes Twist1 protein and promotes breast cancer cell invasiveness*. *Cancer Res*, 2011. **71**(11): p. 3980-90.
132. Serrano-Gomez, S.J., M. Maziveyi, and S.K. Alahari, *Regulation of epithelial-mesenchymal transition through epigenetic and post-translational modifications*. *Mol Cancer*, 2016. **15**: p. 18.
133. Chen, A., et al., *The ubiquitin ligase Siah is a novel regulator of Zeb1 in breast cancer*. *Oncotarget*, 2015. **6**(2): p. 862-73.

134. Zhang, J., et al., *ZEB1 induces ER-alpha promoter hypermethylation and confers antiestrogen resistance in breast cancer*. *Cell Death Dis*, 2017. **8**(4): p. e2732.
135. Yamamoto, M., et al., *Intratumoral bidirectional transitions between epithelial and mesenchymal cells in triple-negative breast cancer*. *Cancer Sci*, 2017. **108**(6): p. 1210-1222.
136. Erbacher, P., et al., *Genuine DNA/polyethylenimine (PEI) complexes improve transfection properties and cell survival*. *J Drug Target*, 2004. **12**(4): p. 223-36.