

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA



**ANÁLISIS DEL EFECTO AUTOFÁGICO DE LA PROTEÍNA E2F-1 TRUNCADA
EN CÉLULAS DE MELANOMA HUMANO**

Por

M.C. ARACELY GARCÍA GARCÍA

**Como requisito parcial para obtener el Grado de
DOCTOR EN CIENCIAS con Orientación Terminal en Morfología**

Febrero, 2010

**ANÁLISIS DEL EFECTO AUTOFÁGICO DE LA PROTEÍNA E2F-1 TRUNCADA
EN CÉLULAS DE MELANOMA HUMANO**

APROBACIÓN DE TESIS

**DR. ROBERTO MONTES DE OCA LUNA.
DIRECTOR INTERNO**

**DR. KELLY M. McMASTERS.
DIRECTOR EXTERNO**

**DR. ARTURO CHÁVEZ REYES.
CO-DIRECTOR**

**DR. JULIO SEPÚLVEDA SAAVEDRA.
COMISIÓN DE TESIS**

**DR. SANTOS GUZMÁN LÓPEZ.
COMISIÓN DE TESIS**

**DR. MED. DIONICIO ÁNGEL GALARZA DELGADO.
SUBDIRECTOR DE ESTUDIOS DE POSGRADO**

MONTERREY, NUEVO LEÓN

FEBRERO 2010

**ANÁLISIS DEL EFECTO AUTOFÁGICO DE LA PROTEÍNA E2F-1 TRUNCADA
EN CÉLULAS DE MELANOMA HUMANO**

Por

ARACELY GARCÍA GARCÍA

El presente trabajo fue realizado en el Departamento de Histología de la Facultad de Medicina de la U.A.N.L. y en el Departamento de Cirugía de la Universidad de Louisville, KY, bajo la dirección del Dr. Roberto Montes de Oca y el Dr. Kelly M. McMasters.

Monterrey, Nuevo León

Febrero 2010

AGRADECIMIENTOS

A mis papas y a mi familia, por apoyarme de manera incondicional aquí y en la distancia en esta etapa de mi vida, así como por preocuparse tanto por mí..

A Humberto que sin él no hubiera sido posible este trabajo en particular de la autofagia, por ser quien me alentó a hacer esta propuesta, y por aprender y discutir conmigo sobre el tema más que nadie..

Al Dr. Roberto Montes de Oca Luna por aceptarme de nuevo como estudiante, por brindarme la oportunidad de realizar una estancia en el extranjero, y porque la formación que adquirí en su laboratorio ha facilitado mi desarrollo profesional en el extranjero.

I would like to thank Dr. Kelly M. McMasters for the opportunity he gave me and for trusting me about this project and new line of investigation.

Al Dr. Arturo Chávez Reyes por todo el apoyo que me dio desde el comienzo, por los seminarios que me sirvieron tanto, en particular los de autofagia, y por su valiosa amistad..

Thanks to Dr. Heshan Sam Zhou for providing helpful suggestions for improving this research.

Al Dr. Julio Sepúlveda Saavedra por aceptarme en el Departamento de Histología y por formar parte de la comisión de tesis.

Al Dr. Santos Guzmán López por formar parte de la comisión de tesis.

Al Dr. Jorge G. Gómez Gutiérrez por brindarme su ayuda en la ciudad de Louisville y en mis comienzos en el laboratorio con los adenovirus.

A mis compañero de Histología Laura, Arnulfo, Cristian, Cecilia, Mary, Julio, Lalo, y Adolfo, por su gran amistad.

My thanks to Penny, my sister in study, to cheer me up every time I need it..

A la Dra. Elsa Merit Reyes Reyes por ser una gran amiga, por sus consejos y sus charlas tan agradables, y por ser la única que se dio cuenta que estaba enferma.. Gracias por preocuparte!

My thanks to Dr. Hongying Hao and Dr. Xiaomei Rao for their suggestions and patience.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el otorgamiento de la beca de doctorado.

TABLA DE CONTENIDO

Resumen	
Abstract	
Introducción	3
Antecedentes	4
Cáncer de piel	4
Tipos de cáncer de piel	4
Factores de riesgo	5
Melanoma	5
Tratamiento del melanoma	7
Mecanismos moleculares	8
E2F-1	8
Autofagia	11
Justificación	14
Hipótesis	15
Objetivo General	16
Objetivos Específicos	16
Material Biológico	17
Líneas celulares de melanoma	17
Plásmidos	17
Metodología	18
Condiciones de cultivo	18
Modelo animal de melanoma xenográfico	18
Inmunohistoquímica	19
Proliferación celular	19
Tinción fluorescente con Hoechst	20
Tinción con anexina-V	20
Inhibición de la apoptosis	20
Transfección de las células SK-MEL-2	21
Actividad de luciferasa	21
Muerte celular	21
Análisis por Western blot	22
Distribución de GFP-LC3	23
Microscopía de luz	23
Microscopía electrónica de transmisión (MET)	23
Resultados	25
Descripción de los adenovirus empleados	25
Determinación de la expresión de la proteína E2F-1 mutante (E2Ftr)	25
El adenovirus recombinante que expresa E2Ftr inhibe el crecimiento tumoral en un modelo in vivo.	26
La sobreexpresión de E2Ftr induce la activación de caspasa-3 en un modelo in vivo.	28
La sobreexpresión de E2Ftr mediada por adenovirus induce muerte celular por la vía de apoptosis en un modelo in vitro.	30

El adenovirus Ad-E2Ftr induce un mecanismo de muerte celular independiente de caspasas.	32
La sobreexpresión de E2Ftr mediada por adenovirus induce la activación del mecanismo de autofagia.	34
La proteína E2Ftr induce un mecanismo de muerte celular independiente de caspasas.	36
La proteína E2Ftr induce la activación de autofagia.	38
La proteína E2Ftr induce un incremento del marcador de autofagia Atg5.	40
La proteína E2Ftr induce un incremento del marcador de autofagia LC3.	41
La proteína E2Ftr induce la localización de la proteína LC3 en los autofagosomas.	42
La proteína E2Ftr induce la formación de vesículas de doble membrana.	43
Discusiones	47
Conclusiones	50
Perspectivas	51
Literatura Citada	52
<i>Curriculum Vitae</i>	
Artículos Publicados	

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. 1. Desarrollo de melanoma.

Fig. 2. Regulación transcripcional del ciclo celular mediada por E2F-1.

Fig. 3. Representación esquemática de E2F-1 y E2Ftr.

Fig. 4. Mecanismo de autofagia.

Fig. 5. Representación esquemática de las construcciones adenovirales y comparación de la migración de las proteínas E2F-1 y E2Ftr mediante el ensayo de Western Blot.

Fig. 6. Efecto antitumoral del Ad-E2Ftr en un modelo *in vivo*.

Fig. 7. Transducción e inmunohistoquímica tumoral.

Fig. 8. Evaluación del mecanismo de apoptosis inducido por el Ad-E2Ftr.

Fig. 9. La muerte celular inducida por el Ad-E2Ftr es independiente de las caspasas.

Fig. 10. Activación de los mecanismos de autofagia y apoptosis por E2Ftr mediada por adenovirus.

Fig. 11. La muerte celular inducida por la proteína E2Ftr es independiente de las caspasas.

Fig. 12. La proteína E2Ftr induce la activación de autofagia y apoptosis.

Fig. 13. La autofagia inducida por E2Ftr está asociada con la expresión de Atg5.

Fig. 14. E2Ftr induce la expresión del marcador de autofagia LC3.

Fig. 15. Inducción de la formación de autofagosomas con la incorporación

de GFP-LC3 inducida por E2Ftr.

Fig. 16. Análisis ultraestructural de la morfología celular inducida por E2Ftr en las células SK-MEL-2.

Fig.17. Análisis ultraestructural de la morfología celular inducida por E2Ftr en las células DM6.

LISTA DE ABREVIATURAS

%	Por ciento
CO ₂	Dióxido de carbono
°C	Grados centígrados
Ad	Adenovirus
CMV	Citomegalovirus
DAPI	4',6-DiAmidina-2-FenilIndol
DNA	(ADN) Ácido desoxirribonucleico
EGFP	Proteína verde fluorescente (del inglés Enhanced Green Fluorescent Protein)
E2Ftr	E2F-1 truncado
FBS	Suero fetal bovino (del inglés Fetal bovine serum)
HCl	Ácido clorhídrico
h, hrs	Hora, horas
H&E	Hematoxilina y Eosina
ILP	Perfusión aislada en las extremidades (del inglés Isolated limb perfusión)
kDa	Kilo Dalton
LITR	Secuencias terminales repetidas e invertidas en el extremo izquierdo
M	Molar
mAb	Anticuerpo monoclonal
MET	Microscopía Electrónica de Transmisión
mg	Miligramo
min	Minutos
mm	Milimetro
mM	Milimolar
ml	Mililitro
MOI	Multiplicidad de Infección
µg	Microgramo
µm	Micrómetro
µl	Microlitro
NaCl	Cloruro de Sodio

ng	Nanogramo
nm	Nanómetros
OMS	Organización Mundial de la Salud
pAb	Anticuerpo policlonal
PBS	Buffer de Fosfato Salino
pfu	Unidad formadora de placa (del inglés Plaque forming unit)
pRb	Proteína Retinoblastoma
PS	Fosfatidilserina
PVDF	Polivinilideno fluoruro
RITR	Secuencias terminales repetidas e invertidas en el extremo derecho
ROS	Especies reactivas de oxígeno (del inglés Reactive oxygen species)
SDS	Dodecil Sulfato de Sodio
Tet	Tetraciclina
TRE	Elemento de respuesta a tetraciclina
Tris	Trizma base
tTA	Transactivador
UV α	Ultravioleta alfa
UV β	Ultravioleta beta
X	Veces
~	Aproximadamente
7AAD	7-Amino-Actinomicina

RESUMEN

M.C. Aracely García García

Fecha de Graduación: Febrero 2010

Universidad Autónoma de Nuevo León

Facultad de Medicina

Título:

Análisis del efecto autofágico de la proteína E2F-1 truncada en células de melanoma humano

Número de páginas: 57

Candidato para el grado de Doctor en Ciencias con Orientación Terminal en Morfología

Área de Estudio: Morfología

Propósito y Método del Estudio. E2F-1 es un factor de transcripción que puede inducir muerte celular en células de cáncer. Su aplicación clínica en terapia génica es controversial debido a su potencial oncogénico, ya que transcribe genes involucrados en la activación del ciclo celular y proliferación. Nosotros investigamos una versión mutante de E2F-1 (E2Ftr) que carece del dominio de transactivación y por lo tanto del potencial oncogénico.

Contribuciones y Conclusiones. Aquí mostramos que la expresión de E2Ftr mediada por adenovirus (Ad-E2Ftr) induce la muerte de células de cáncer a través del mecanismo de apoptosis en un modelo *in vitro*. La expresión de E2Ftr tuvo una fuerte supresión tumoral a través de la inducción de apoptosis en un modelo animal de melanoma xenográfico. Además, descubrimos una nueva función de E2Ftr, esta versión mutante de E2F-1 activó el mecanismo de autofagia en las células de melanoma. Este descubrimiento se concluyó con los siguientes experimentos: (a) se demostró que la expresión de E2Ftr incrementa los marcadores moleculares de autofagia ATG5 y LC3-II; (b) E2Ftr indujo la incorporación del marcador LC3-II a los autofagosomas; (c) E2Ftr activó la autofagia medido mediante un ensayo de liberación de luciferasa dependiente del corte proteolítico del marcador de autofagia LC3, y (d) E2Ftr indujo la morfología celular característica de vesículas de doble membrana observada por microscopía electrónica. Finalmente, comparamos la expresión de E2Ftr con E2F-1 y encontramos que E2Ftr puede inducir apoptosis y autofagia tan eficientemente como E2F-1 silvestre. Por lo tanto, en adición a la apoptosis, la autofagia puede ser un mecanismo alternativo, por el cual E2Ftr induzca la muerte de células de cáncer resistentes a apoptosis. El conocimiento del mecanismo de autofagia mediado por E2Ftr ayudará a establecer mejores terapias clínicas.

Dr. Roberto Montes de Oca Luna

Kelly M. McMasters M.D. PhD.

Director Interno

Director Externo

ABSTRACT

E2F-1 is a transcription factor that can induce cancer cell death. The clinical application of E2F-1 in cancer gene therapy remains controversial because of its oncogenic potential related to transactivation and promoting cell proliferation. We are now investigating an E2F-1 truncated version (E2Ftr), which lacks the properties of transactivation and proliferation. We show here that an adenovirus expressing E2Ftr is still able to induce apoptotic cancer cell death *in vitro* as well as *in vivo*. Ad-E2Ftr exhibited an ~80% decrease in tumor size compared with a control in a mouse melanoma xenograft model. Besides, we studied another mechanism of E2Ftr-mediated cancer cell death — autophagy. Herein we show that E2Ftr expression upregulates the autophagic markers ATG5 and LC3-II. Cells expressing E2Ftr showed a fluorescent punctuated pattern using GFP-tagged LC3, representing the LC3-II incorporation into the autophagosomes. A luciferase assay, based on the cleavage of LC3 and the luciferase release into the medium, confirmed the activation of autophagy. These results are consistent with cellular morphology change with exhibition of autophagic vesicles. Finally, we compared E2Ftr with E2F-1 for autophagy induction and showed that E2Ftr can induce autophagy as efficiently as wt E2F-1. Thus, in addition to apoptosis, autophagy could be a novel cancer cell killing mechanism of E2Ftr. Elucidation of autophagy pathway mediated by E2Ftr may improve the potential clinical utility.

Dr. Roberto Montes de Oca Luna

Supervisor/Chair

Kelly M. McMasters M.D. PhD.

Supervisor/Chair

Introducción

El cáncer de piel ha adquirido gran importancia en la salud pública a nivel mundial. Es inducido tanto por factores genéticos como ambientales. Entre los factores ambientales, la radiación ultravioleta es la principal causante puesto que se le atribuye más del 90% de la incidencia de esta enfermedad. La protección que tenemos contra la radiación ultravioleta que llega a la Tierra, es la capa de ozono, que actúa como un filtro natural absorbiendo dicha radiación. Sin embargo, en los últimos años la capa de ozono se ha deteriorado de manera progresiva y alarmante, por lo que actualmente se considera amenazada y se cree que provocará el aumento de los casos de melanoma (cáncer de piel), cataratas oculares, y supresión del sistema inmunitario en humanos y en otras especies. Los últimos registros indican que el cáncer de piel se ha triplicado en los últimos 40 años.

Recientemente, en la investigación contra el cáncer de piel, se han generado substanciales avances preclínicos que han permitido un mejor entendimiento de la biología del melanoma, es decir, de su desarrollo, progresión, y resistencia a terapia médica. Sin embargo, la implementación clínica de la medicina molecular aún se encuentra en fase temprana y con muchos estudios por realizar con el fin de desarrollar una terapia más eficiente.

Una de las principales desventajas de las terapias contra el cáncer es la resistencia de los tumores a la apoptosis. Puesto que la quimioterapia y radioterapia actúan principalmente a través de la inducción de apoptosis, es necesario desarrollar terapias contra el cáncer que activen mecanismos alternativos de muerte celular

Antecedentes

El incremento en la incidencia del melanoma maligno en los últimos años y su estrecha relación con los factores genéticos y ambientales, así como la importancia de un buen diagnóstico, son datos que justifican la enorme trascendencia del desarrollo de nuevas terapias contra esta enfermedad y su tratamiento en fases más avanzadas.

Cáncer de piel

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS), la Sociedad Americana de Cáncer (American Cancer Society), y la Fundación de Cáncer de Piel (Skin Cancer Foundation), en los Estados Unidos de América el cáncer de piel es la forma más común de este tipo de enfermedad. Anualmente se diagnostican más de un millón de casos, y más de 66,000 muertes por esta causa. Se predice que uno de cada tres casos de cáncer diagnosticados corresponde al cáncer de piel, uno de cada cinco norteamericanos, y uno de cada tres caucásicos desarrollará cáncer de piel en algún momento de su vida. Además, se calculan más de 20 muertes diarias por causa del cáncer de piel, principalmente melanoma. En el mundo cada año se generan más de 132,000 casos de melanoma maligno. Se estima que durante el 2008 en EUA se diagnosticaron aproximadamente 62,480 casos de melanoma, y 8,420 muertes por esta causa.

Tipos de cáncer de piel

El cáncer de piel se divide principalmente en dos tipos: cáncer de piel no melanoma, y melanoma maligno. Dentro del cáncer de piel no melanoma se pueden distinguir el carcinoma de células basales, que es el más común, y el carcinoma de células escamosas, el

segundo más común. Por lo general, el cáncer de piel no melanoma puede curarse cuando se detecta oportunamente, y no implica mayor riesgo ya que presenta un bajo rango de metástasis. El melanoma maligno comprende el melanoma de extensión superficial, el léntigo maligno de melanoma, el melanoma lentiginoso acro, y el melanoma nodular. El melanoma es la forma más peligrosa de cáncer de piel, ya que puede causar la muerte si se detecta y trata de forma tardía (*Skin Cancer Foundation, American Cancer Society*).

Factores de riesgo

Los factores genéticos y ambientales son causa de riesgo para el desarrollo del cáncer de piel, siendo el principal la exposición a la radiación ultravioleta. Los rayos UV α penetran la piel y junto con los rayos UV β que producen el bronceado de la piel, contribuyen al desarrollo de cáncer de piel en el 90% de los casos. El uso de camas de bronceado incrementa el riesgo de desarrollar cáncer de piel. El color de la piel y de los ojos también contribuye al desarrollo de cáncer de piel, siendo los colores de piel y ojos más claros los que tienen mayor riesgo, ya que poseen menor pigmentación y menor protección de la radiación solar. Por otro lado, la presencia de un número elevado de lunares en la piel aumenta el riesgo de desarrollar este tipo de cáncer, así como la herencia, predisposición genética y un sistema inmune comprometido. Sin embargo, el 50% de los casos de melanoma se originan de novo (*Skin Cancer Foundation, American Cancer Society*).

Melanoma

El melanoma se desarrolla a partir de una transformación maligna de los melanocitos, las células productoras de pigmento que residen en la capa basal de la

epidermis en la piel humana. Estas células transformadas pueden presentar un crecimiento radial o vertical, este último es el que da origen a la metástasis del melanoma hacia diversos órganos del organismo (Chudnovsky *et al.*, 2005) como se observa en la figura 1. Se pueden distinguir cinco etapas durante el desarrollo del melanoma. En la etapa 0 las células anormales están localizadas en la epidermis sin afectar la dermis. En la etapa I las células cancerosas se encuentran en la epidermis y/o en la parte superior de la dermis, sin afectar a los nódulos linfáticos cercanos. En la etapa II el tumor se extiende a la dermis sin afectar al tejido subcutáneo ni a los nódulos linfáticos. En la etapa III el tumor se extiende al tejido subcutáneo y a los nódulos linfáticos. En la etapa IV el tumor se extiende a otros órganos y/o a los nódulos linfáticos más alejados del tumor original (Nestle *et al.*, 2003).

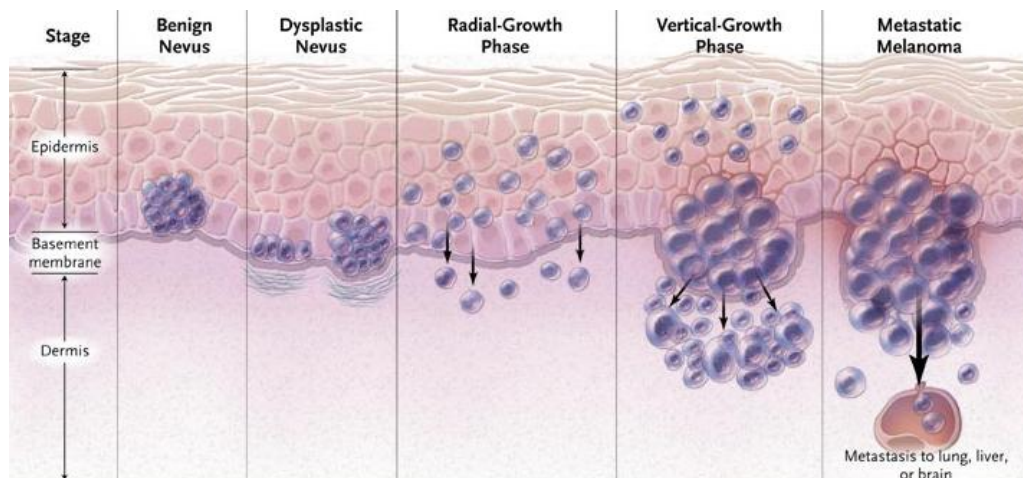


Fig. 1. Desarrollo de melanoma. En la fase de crecimiento radial se puede observar como algunas células transformadas traspasan la membrana basal de la epidermis. En la fase de crecimiento vertical este efecto se ve aumentado dando origen a la metástasis del melanoma a diversos órganos (Imagen de Alegre de Miquel, V).

La detección temprana del melanoma facilita su erradicación y curación; sin embargo, las etapas más tardías del desarrollo del melanoma (III y IV) son difíciles de tratar. A medida que el melanoma progresa de la fase de crecimiento radial a la fase de

crecimiento vertical las opciones de tratamiento, los rangos de supervivencia y cura decrecen dramáticamente, ya que se genera metástasis hacia los nódulos linfáticos y diversos órganos (Chudnovsky *et al.*, 2005).

Tratamiento del melanoma

Dentro de los tratamientos del melanoma se encuentra la cirugía como primera opción. Ésta se puede realizar por escisión local, linfadenectomía o biopsia de nódulos linfáticos centinela (*Skin Cancer Foundation, American Cancer Society*).

Posterior a la cirugía, así como en las etapas más avanzadas de melanoma, es recomendable una terapia adyuvante como la quimioterapia para incrementar las posibilidades de cura. La quimioterapia puede tener un efecto sistémico si se administra vía intravenosa u oral, o bien puede administrarse directamente sobre el área afectada para tener un efecto más específico y localizado. Para el tratamiento del melanoma, la quimioterapia se administra en forma de perfusión hipertérmica aislada únicamente en las extremidades donde se ubica el cáncer. De esta manera se interrumpe temporalmente el flujo sanguíneo de la extremidad afectada con un torniquete, lo cual permite recibir dosis altas del fármaco en la región afectada (*National Cancer Institute*).

La radioterapia es otra opción de tratamiento de melanoma, en ésta se utilizan rayos X de alta energía u otros tipos de radiación para eliminar las células cancerosas o impedir que crezcan (*National Cancer Institute*).

La inmunoterapia cuenta con algunas vacunas en etapa experimental, cuya finalidad es estimular al sistema inmune para que reaccione con mayor fuerza contra las células de melanoma y las destruya (*National Cancer Institute*).

Más recientemente, la terapia génica ha surgido como una herramienta prometedora para tratar enfermedades que presentan algún defecto genético. La terapia génica consiste en la inserción de un gen, con el fin de reparar un defecto genético que se vea reflejado en alteraciones metabólicas, enzimáticas, etc. Esto se puede realizar mediante la inserción aleatoria de un gen funcional, por reemplazamiento del gen defectuoso por uno funcional, la corrección del gen defectuoso, o a través de la modulación de la actividad de un gen. Estas modificaciones se realizan dentro de las células o tejido a tratar y son introducidas principalmente a través de vectores virales, de los cuales los más utilizados son los vectores adenovirales.

Mecanismos moleculares

Para desarrollar una terapia génica efectiva contra el melanoma, es de vital importancia la identificación de las principales alteraciones genéticas que inducen el desarrollo de melanoma. El desarrollo de cáncer en general, es debido a la acumulación de mutaciones en genes críticos para la proliferación, diferenciación y muerte celular (DeGregori *et al.*, 1997; Hanahan *et al.*, 2000). Por lo tanto, en una terapia génica se pueden utilizar genes involucrados en estos mecanismos. Uno de los inductores de muerte celular más estudiados es el factor de transcripción E2F-1.

E2F-1

El gen E2F-1 es miembro de la familia de factores de transcripción E2F. Estos factores de transcripción se asocian con miembros de la familia DP. Los heterodímeros E2F/DP pueden activar o reprimir la expresión de genes involucrados en la regulación del ciclo celular, diferenciación, desarrollo, proliferación, y apoptosis (DeGregori *et al.*, 1997;

Muller *et al.*, 2001; Crosby *et al.*, 2004). La actividad transcripcional de E2F es controlada por pRb, p107 y p130. Las proteínas E2F se inactivan en la fase G1 temprana del ciclo celular a través de la formación de un complejo con pRb hipofosforilada (Fig. 2). Cuando las cinasas dependientes de ciclina D fosforilan pRb a mediación de G1, se libera y activa E2F (Dyson, 1998; Johnson *et al.*, 1998; Attwooll *et al.*, 2004). En particular, E2F-1 tiene la capacidad de promover tanto la progresión del ciclo celular como la apoptosis (Pierce *et al.*, 1999; Bell *et al.*, 2004).



Fig. 2. Regulación transcripcional del ciclo celular mediada por E2F-1. El heterodímero E2F-1/DP es reprimido en G0 y al inicio de G1 por acción de pRb hipofosforilada. La fosforilación de pRb por cdk4/6 dependiente de ciclina D permite su disociación de E2F-1/DP en G1 tardía y S. E2F-1/DP activa sus diversos blancos para promover la progresión del ciclo celular. En las fases S, G2 y M el heterodímero se inactiva al ser fosforilado por cdk2 dependiente de ciclina A (Johnson *et al.*, 1998).

Diversos estudios han demostrado el papel de E2F-1 como oncogén así como sus propiedades como gen supresor de tumor. Así pues, se han logrado establecer tres vías de apoptosis inducida por E2F-1. Una de las vías muestra dependencia de p53 (Rogoff *et al.*, 2002; Powers *et al.*, 2004), mientras que otra muestra independencia, y se lleva a cabo a través del incremento en la expresión de genes involucrados en la apoptosis por medio de E2F-1 (Nahle *et al.*, 2002; Stanelle *et al.*, 2002; Hershko *et al.*, 2004). La inhibición o

disminución de moléculas antiapoptóticas comprende la tercera vía documentada (Phillips *et al.*, 1999).

Otro estudio demostró que E2F-1 regula la expresión de las proteínas proapoptóticas PUMA, Noxa, Bim y Hrk/DP5 (proteínas BH-3). Esta regulación se lleva a cabo por la unión de E2F-1 a la región promotora de los integrantes de la familia BH-3 (Hershko *et al.*, 2004).

Por otro lado, existen reportes que han demostrado que la transactivación y la apoptosis son funciones separadas de E2F-1. Una mutante de E2F-1 (E2Ftr), en donde se deletó la región carboxilo-terminal que contiene el dominio de transactivación (Fig. 3), tiene la capacidad de inducir apoptosis sin estimular la síntesis de DNA. Además, esta mutante tiene menor potencial oncogénico (Hsieh *et al.*, 1997; Phillips *et al.*, 1997).

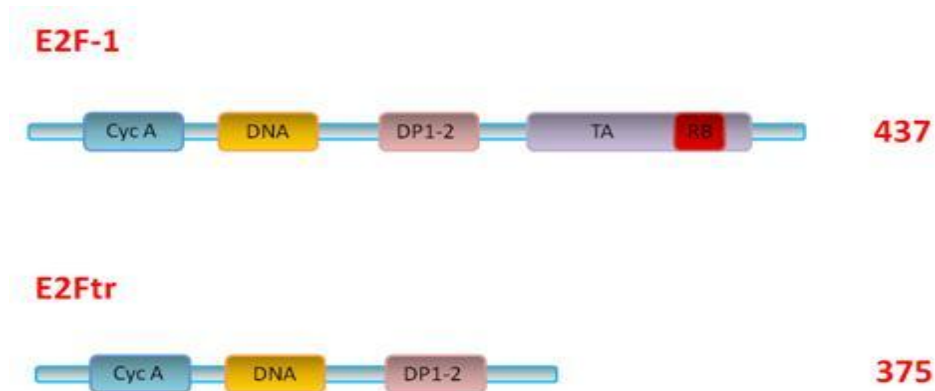


Fig. 3. Representación esquemática de E2F-1 y E2Ftr. E2Ftr conserva sus dominios de unión a DNA, ciclina A, DP-1, pero tiene deletados los dominios de transactivación y de unión a pRb.

En base a estos estudios, se ha expresado la proteína E2Ftr (1-375) y se ha demostrado que es más potente en la inducción de apoptosis en células de cáncer que la proteína E2F-1 silvestre. Además, se ha comprobado que la sobreexpresión de E2Ftr no se encuentra asociada a la progresión del ciclo celular, y no incrementa la expresión de los genes blanco de E2F-1, involucrados en la progresión del ciclo celular (McMasters *et al.*,

en proceso). Por lo tanto, E2Ftr puede ser un transgen útil para el desarrollo de una terapia génica.

Recientemente, se reportó que E2F-1 no solo induce apoptosis sino también autofagia. En ese estudio demostraron que E2F-1 regula la transcripción de genes de autofagia uniéndose al promotor de los mismos. Los genes de autofagia inducidos directamente por E2F-1 fueron LC3, ATG1 y DRAM, mientras que ATG5 fue regulado indirectamente (Polager *et al.*, 2008). Sin embargo, en ese trabajo se utilizó una línea celular en donde E2F-1 tiene un promotor inducible por tamoxifen, y tamoxifen es un conocido inductor de autofagia. Por lo tanto, ese modelo no es conveniente para analizar el efecto de E2F-1 sobre la inducción de autofagia.

Autofagia

La autofagia es un proceso catabólico altamente conservado en eucariotas, en el cual el citoplasma, incluyendo el exceso de organelos o aquellos deteriorados o aberrantes, es secuestrado en vesículas de doble membrana llamadas autofagosomas. Posteriormente, se lleva a cabo la fusión de autofagosoma y lisosoma (o vacuola en el caso de levaduras) para la descomposición del contenido por medio de enzimas hidrolíticas. Una vez que los autofagosomas se han fusionado con los lisosomas, las vesículas resultantes (ya de membrana simple) se denominan autolisosomas (Fig. 4). Las macromoléculas resultantes son recicladas para el mantenimiento celular. Este proceso desempeña un papel esencial en la adaptación a la ausencia de nutrientes y a las condiciones ambientales adversas, a la remodelación celular en el desarrollo y acumulación de organelos alterados generadores de especies reactivas de oxígeno (ROS) en las células en envejecimiento. En mamíferos, la autofagia es un evento constitutivo que regula crecimiento celular, desarrollo y

homeostasis. Los estudios más recientes indican que la autofagia, además de constituir un proceso reparativo, está implicada en fenómenos de muerte celular. Estos fenómenos han sido denominados "procesos de muerte tipo II" (no apoptótica) (Klionsky *et al.*, 2000; Klionsky *et al.*, 2008; Polager *et al.*, 2008).

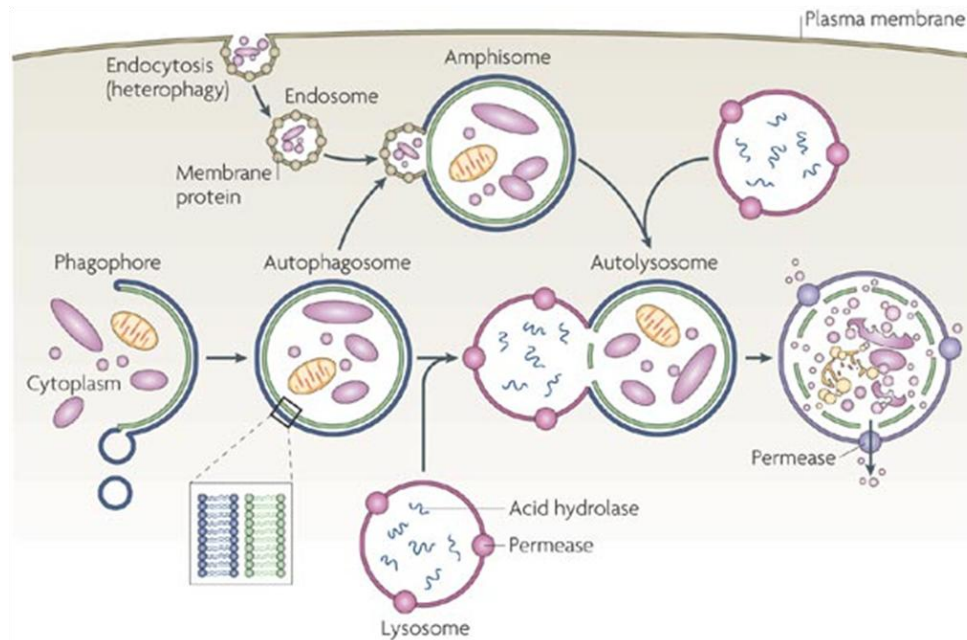


Fig. 4. Mecanismo de autofagia. En la autofagia se forma una estructura llamada fagóforo que se expande alrededor de una porción de citoplasma para formar el autofagosoma que se caracteriza por su doble membrana. El autofagosoma se fusiona con un lisosoma, lo que origina un compartimento conocido como autolisosoma, en donde las enzimas hidrolíticas degradan el contenido. Las macromoléculas generadas son liberadas a través de permeasas y recicladas en el citosol.

Recientemente se reportó la inducción del mecanismo de autofagia por E2F-1, sin embargo, aún no se describe si el papel que desempeña es de supervivencia o de inducción de muerte celular. Además, puesto que la proteína E2F-1 posee potencial oncogénico, se ha propuesto el uso de una versión truncada que carece del dominio de transactivación y que conserva su habilidad de inducir muerte celular. Puesto que el único reporte a la fecha sobre el efecto de E2F-1 sobre la inducción de autofagia es mediante el uso de una línea celular

en donde el promotor de E2F-1 es inducido por tamoxifen, un inductor de autofagia, en el presente trabajo analizamos directamente el efecto de la sobre-expresión de E2F-1 y E2Ftr sobre la inducción de muerte celular por autofagia.

Justificación

Actualmente se requiere de nuevas estrategias para el tratamiento de melanomas resistentes a apoptosis, y una de ellas es utilizando genes que induzcan autofagia.

Por lo tanto, es posible que una proteína E2F-1 que carece del dominio de transactivación y del potencial oncogénico induzca mecanismos de muerte celular alternos a la apoptosis.

Hipótesis

La proteína E2F-1 que carece del dominio de transactivación (E2Ftr) tiene una potente actividad antitumoral en un modelo de melanoma tanto *in vitro* como *in vivo*.

Objetivo General

Determinar si la proteína E2Ftr tiene actividad antitumoral *in vitro* e *in vivo* mediante los mecanismos de apoptosis y autofagia.

Objetivos Específicos

1. Analizar el efecto antitumoral de la proteína E2Ftr en un modelo de melanoma *in vivo* e *in vitro*.
2. Analizar el efecto de la proteína E2Ftr sobre el mecanismo de apoptosis.
3. Analizar el efecto de la proteína E2Ftr sobre el mecanismo de autofagia.

Material Biológico

Líneas celulares de melanoma

Línea celular	Descripción	Fuente
SK-MEL-2	Melanoma metastásico humano	ATCC HTB-68
SK-MEL-28	Melanoma maligno	ATCC HTB-72
A2058	Melanoma metastásico humano	ATCC 11147
DM6	Melanoma nodular	Dr Hilliard F. Seigier (Duke University Medical Center, Durham, North Carolina)

Plásmidos

El Dr. Brian Seed (Center for Computational and Integrative Biology, Massachusetts General Hospital, Boston, MA, Department of Genetics, Harvard Medical School, Boston, MA) donó los plásmidos pEAK12-Actin-LC3-dNGLUC y pEAK12-Actin-flagDEV2-dNGLUC; y el Dr. Tamotsu Yoshimori (Department of Cellular Regulation, Research Institute for Microbial Diseases, Osaka University, Japan; CREST, Japan Science and Technology Agency, Japan) donó el plásmido GFP-LC3.

Metodología

Condiciones de cultivo

Las líneas celulares de melanoma SK-MEL-2 y SK-MEL-28 se cultivaron en medio α -MEM (α -Minimal Essential Medium). La línea celular A2058 de melanoma se cultivó en medio DMEM (Dulbecco's Modification of Eagles Medium). Las células de la línea DM6 se cultivaron en medio IMDM (Iscove's Modified Dulbecco's Medium). Todos los medios de cultivo fueron suplementados con 10% de suero bovino fetal (FBS) inactivado por calor, y penicilina/estreptomicina (100 U/ml). Las células se cultivaron en una atmósfera de 5% de CO₂ a 37°C y el medio se reemplazó cada 3 días. Los reactivos para cultivo celular fueron de Gibco BRL (Bethesda, MD).

Modelo animal de melanoma xenográfico

Los tumores fueron inducidos a través de la inyección subcutánea de células A2058 de cáncer de melanoma a una concentración de 5×10^6 en el flanco bilateral derecho de ratones machos atímicos BALB/c *nu/nu* (6 a 8 semanas de edad; Charles River Laboratories, Wilmington, MA). Seis días después, cuando los tumores fueron palpables, se realizaron tratamientos al azar con el Ad-E2Ftr (1×10^9 pfu) o Ad-GFP (1×10^9 pfu; $n = 6$ ratones por cada grupo). Las inyecciones fueron realizadas de manera intratumoral, una dosis cada tercer día con un total de 4 dosis. Cada inyección de virus purificado fue diluido en un volumen total de 100 μ l en una solución al 0.9% de NaCl. Los tumores se midieron cada tercer día y el volumen fue determinado midiendo el tumor en dos dimensiones con un calibrador vernier, usando la siguiente fórmula: $V = (L \times W^2)/2$, donde L es lo largo y W lo

ancho del tumor. Los experimentos en los animales fueron realizados de acuerdo con el protocolo aprobado por: The University of Louisville Institutional Animal Care and Use Committee.

Inmunohistoquímica

Los estudios de inmunohistoquímica se hicieron a partir de los tumores que fueron extraídos 24 horas después de la última inyección adenoviral. Los tumores se fijaron con formalina al 10% y se embebieron en parafina. Posteriormente se realizaron cortes histológicos, los cuales fueron usados en la inmunotinción para detectar la expresión de E2Ftr y caspasa-3 activada. Se utilizaron anticuerpos contra E2F-1 humano (KH95) sc-125 (Santa Cruz Biotechnology) para detectar la expresión de E2Ftr, y contra caspase-3 humana (Asp175) (5A1E) (Cell Signaling, Danvers, MA) para detectar la activación de caspasa-3. Las microfotografías fueron tomadas a 20X y analizadas con el software NIS-Elements BR 3.0 (Nikon Instruments, Melville, NY).

Proliferación celular

La proliferación celular se analizó tres días después de la infección adenoviral mediante un método colorimétrico basado en la capacidad de las células vivas en cultivo para reducir la sal de tetrazolio MTT (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN), que es de color amarillo, a su derivado formazán. Se adicionó 1/10 (del volumen del cultivo) de la solución de MTT (5 mg/ml) al cultivo celular. Después de 4 hrs se agregó ½ (del volumen del cultivo) del buffer de lisis (10% p/v SDS en 0.01 M HCl) y se homogenizó. Posteriormente, se colocaron 150 µl del homogenizado en una placa de 96 pozos para

determinar las lecturas de absorbancia en un espectrofotómetro automático a una longitud de onda de 570 nm. Los resultados fueron expresados como porcentaje de células vivas.

Tinción fluorescente con Hoechst

Las células fueron fijadas en una solución de formalina al 10% durante 5 min y se lavaron 3 veces con PBS. Los núcleos fueron teñidos con Hoechst 33258 a una concentración final de 10 μ M durante 10 min a 37°C. Después se lavaron tres veces con PBS. La morfología del núcleo se observó en un microscopio de fluorescencia Olympus Microsystems usando el filtro azul (DAPI).

Tinción con anexina-V

El procedimiento se realizó de acuerdo a las indicaciones de la compañía (Pharmingen, San Diego CA) utilizando el kit de Anexina V-PE para Apoptosis. Las células fueron analizadas en un citómetro de flujo (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ) y el software FlowJo (Tree Star Inc., Ashland, OR).

Inhibición de la apoptosis

Para determinar si el efecto de muerte celular inducido por E2F era debido al mecanismo de apoptosis, se utilizó un inhibidor general de caspasas (z-VAD.fmk). Como control positivo de inducción de apoptosis se utilizó la Cisplatina (25 μ M). El inhibidor z-VAD.fmk (100 μ M) se adicionó después del tratamiento de las células con cisplatina, de la infección adenoviral o de la transfección con plásmidos.

Transfección de las células SK-MEL-2

La transfección de las células se realizó de acuerdo a las especificaciones del proveedor utilizando el reactivo Lipofectamina 2000 (Invitrogen). Se sembraron 5×10^4 , 1.5×10^5 ó 2×10^6 células en placas de 24 y 12 pozos, y platos de 60 mm respectivamente. La transfección se realizó cuando las células presentaron una confluencia de aproximadamente el 70%. Para analizar el efecto de E2F se utilizaron los plásmidos pGL3-E2F1 o pGL3-E2Ftr, que expresan los genes E2F-1 y E2Ftr respectivamente. Como control se utilizó el plásmido vacío, pGL3.

Actividad de luciferasa

Para el monitoreo de la activación de la autofagia por E2F-1 y E2Ftr, las células SK-MEL-2 fueron transfectadas con 4 ng/ μ l del plásmido pEAK12-Actin-LC3-dNGLUC e infectadas con el Ad-EGFP, Ad-E2F-1 o Ad-E2Ftr a 100 MOI; o bien, co-transfectadas con 4 ng/ μ l de los plásmidos pGL3, pGL3-E2F1 o pGL3-E2Ftr. Para el monitoreo de la activación de la apoptosis por E2F-1 y E2Ftr, las células fueron transfectadas con 4 ng/ μ l del plásmido pEAK12-Actin-flagDEV2G2-dNGLUC (DEV2G2F) e infectadas/transfectadas como se describe. Los sobrenadantes fueron colectados a diferentes tiempos y analizados para la actividad de luciferasa con el kit Renilla Luciferase (Promega, E2810).

Muerte celular

En el ensayo de exclusión por Azul tripano, las células viables (no teñidas) conservan un citoplasma translúcido, mientras que las células no viables tiñen su citoplasma de azul. En una placa de 12 pozos, 1.5×10^5 células SK-MEL-2 fueron

transfectadas con los plásmidos pGL3-E2F1 o pGL3-E2Ftr a una concentración de 5 ng/ μ l en una solución con medio Optimem. El plásmido pGL3 (vector vacío) fue utilizado como control. Las células fueron cultivadas por 48 horas y posteriormente se cuantificó la muerte celular. Las células se tiñeron por 5 min a una concentración final del colorante de 0.2%, y se contaron en una cámara de Neubauer. Los experimentos se realizaron por triplicado.

Análisis por Western blot

Para la detección de proteínas expresadas por los plásmidos y proteínas celulares se realizó lo siguiente: 1×10^6 células de la línea celular, fueron transfectadas, después de 6, 12, 24, 36, 48 y 72 horas de la transfección se cosecharon y lavaron con PBS 1X. Los lisados celulares se resuspendieron en 100 μ l de amortiguador RIPA (50 mM de Tris-HCl, 150 mM de NaCl, 1% de NP-40, 0.5% de desoxicolato de sodio y 0.1% de SDS) con una mezcla de inhibidores de proteasas, la cual contiene 4-(2-aminoetil)-benzenesulfonil fluoruro (AEBSF), pepstatina A, transepoxisuccinil-leucilamida(4-guanidina)butano (E-64), bestatina, leupeptina y aprotinina (10 ml/ 1×10^6 células: Sigma, St.). Las células resuspendidas en el amortiguador RIPA se incubaron en hielo por 30 min y se agitaron en vórtex cada 10 min, el sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo, y la concentración se cuantificó mediante un ensayo de proteínas conocido BIO-RAD DC (BIO RAD, Hercules, CA). Cantidades iguales de proteínas se corrieron en geles desnaturalizantes de poli(acrilamida). Posteriormente las proteínas fueron transferidas a una membrana Hybond-PVDP (Amershan, Arlington Heights, IL.), la cual se incubó con un anticuerpo primario por 1 hora, se realizaron lavados por 5 min con PBS 1X y posteriormente se incubó con un anticuerpo secundario unido a peroxidasa. Se realizaron lavados por 5 min con PBS 1X.

Finalmente la detección se hizo utilizando el kit de quimioluminiscencia “ECL” de acuerdo a las instrucciones de la compañía Amershan, Arlington Heights, IL.

Distribución de GFP-LC3

Este método consiste en detectar la conversión de LC3-I a LC3-II a través del monitoreo de la fusión GFP-LC3 por microscopía de fluorescencia. La proteína LC3-I es la forma citosólica y se observa como un patrón de fluorescencia difusa, mientras que la proteína LC3-II, que es la que se incorpora a los autofagosomas, presenta una distribución punteada de GFP-LC3. Para realizar este análisis las células SK-MEL-2 fueron co-transfectadas con los plásmidos pGL3, pGL3-E2F1 o pGL3-E2Ftr y con el plásmido pGFP-LC3.

Microscopía de luz

Para analizar la morfología celular inducido por la sobreexpresión de E2F-1 y E2Ftr las células SK-MEL-2 fueron infectadas con el Ad-E2F1 o el Ad-E2Ftr como previamente se describe, y se hizo la tinción Wright-Giemsa (Gomez-Gutierrez *et al.*, 2006) para su observación al microscopio de luz.

Microscopía electrónica de transmisión (MET)

Para realizar el análisis ultraestructural inducido por la sobreexpresión de E2F-1 y E2Ftr las células SK-MEL-2 fueron infectadas con el Ad-E2F1 o el Ad-E2Ftr como previamente se describe, y se siguió el protocolo para MET. Primeramente se realizó un lavado con PBS y se fijó con gluteraldeído al 1% durante 1 h. Se lavó tres veces durante 10 min con PBS y se realizó un post-fijación con tetraóxido de osmio al 2% durante 1 h a

temperatura ambiente. Se realizaron tres lavado de 5 min cada uno con cocodilatos 0.2 M a temperatura ambiente. Se deshidrató 5 min en etanol al 50, 70 y 80%, 15 min al 95% realizando tres cambios, y finalmente 5 min al 100% de etanol. Se realizó la inclusión y se analizaron los cortes semi-finos y posteriormente los cortes ultra-finos, los cuales fueron contrastados con acetato de uranilo y citrato de plomo.

Resultados

Descripción de los adenovirus empleados.

En la figura 5A se muestra y describe el esquema de los adenovirus que se utilizaron en el presente trabajo. Como control negativo se utilizó un adenovirus que expresa la proteína verde fluorescente (Ad-EGFP). Como control positivo se usó un adenovirus que expresa la proteína E2F-1 (Ad-E2F-1) silvestre. Se analizó un adenovirus que expresa una versión truncada de la proteína E2F-1 (Ad-E2Ftr) que carece del dominio de transactivación, y por ende del potencial oncogénico que tiene la proteína silvestre.

Determinación de la expresión de la proteína E2F-1 mutante (E2Ftr)

Se comparó la expresión entre el Ad-E2Ftr y el Ad-E2F-1, este último expresa la proteína E2F-1 completa y ha sido extensamente usado en la terapia génica contra el cáncer (Dong *et al.*, 1999; Dong *et al.*, 2002; Elliott *et al.*, 2001; Itoshima *et al.*, 2000; y Kuhn *et al.*, 2002). Los adenovirus se probaron en dos líneas celulares de melanoma, las líneas A2058 y DM6, las cuales son usadas en modelos xenográfico de melanoma para su estudio *in vivo*. Las células A2058 pueden inducir tumores en ratones desnudos BALB/c y las células DM6 son usadas en modelos de melanoma en ratas para perfusión de extremidades aislada [isolated limb perfusion “ILP”, por sus siglas en inglés] (Bauer *et al.*, 2003; Canter *et al.*, 2004). Las células A2058 fueron infectadas con el Ad-EGFP, Ad-E2F-1 o Ad-E2Ftr a 100 MOI [“Multiplicity of Infection”, por sus siglas en inglés]. Se confirmó por medio de un análisis de Western Blot la delección del dominio de transactivación de la proteína E2F-1 que generó un producto de 60 kDa para la proteína E2Ftr, en comparación con la versión completa de E2F-1 que tiene un tamaño de 66 kDa (Fig. 5B).

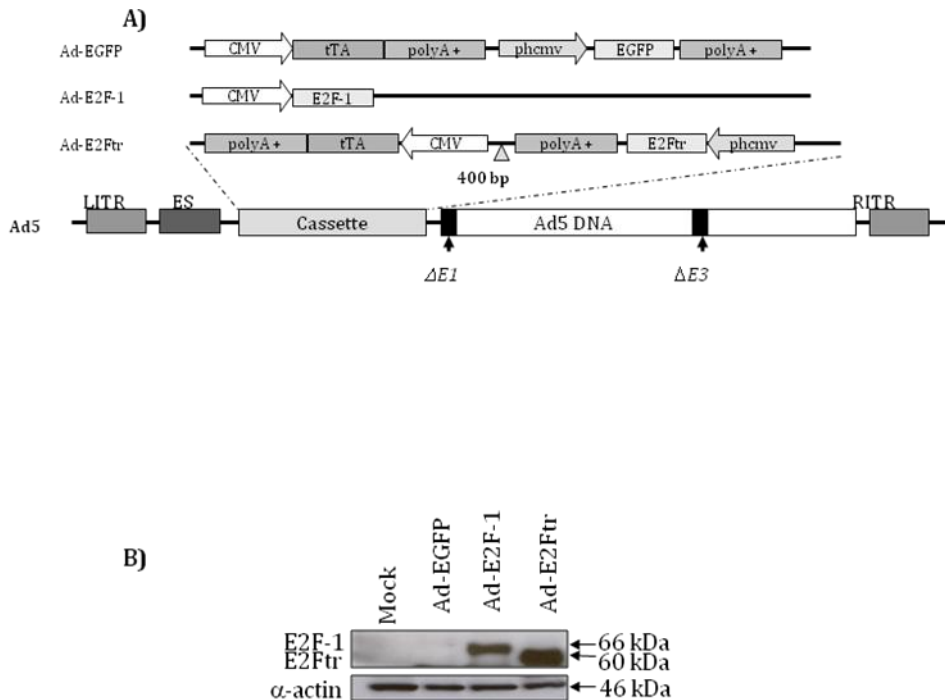


Fig. 5. Representación esquemática de las construcciones adenovirales y comparación de la migración de las proteínas E2F-1 y E2Ftr mediante el ensayo de Western Blot. A) Esquema de los adenovirus Ad-EGFP, Ad-E2F-1 y Ad-E2Ftr. A) Los adenovirus Ad-EGFP y Ad-E2Ftr son bicistrónicos. El promotor CMV dirige la expresión del transactivador tTA. EGFP o E2Ftr se encuentran bajo el control de un promotor mínimo sintético que contiene un elemento de respuesta a tetraciclina (Tet) (TRE) y un mini-promotor CMV (phcmv), el cual es activado únicamente por la expresión del tTA. En ausencia de Tet, el tTA se une al phcmv para activar la expresión de EGFP o E2Ftr. En presencia de tetraciclina, tTA se une a Tet por lo que no puede unirse al phcmv para activar la expresión de EGFP o E2Ftr. Las secuencias repetidas terminales invertidas derecha e izquierda, RITR o LITR, respectivamente; la señal de encapsidación, ES; y la deleción de los genes E1/E3 en la estructura del adenovirus, es mostrado en el esquema. B) Células SK-MEL-2 sin infectar o infectadas con el Ad-EGFP, Ad-E2F-1, or Ad-E2Ftr durante 36 hrs a una MOI de 100. Se aisló la proteína total y se sometió al ensayo de Western Blot. Se utilizó el anticuerpo mAb E2F-1 anti-humano para detectar ambas proteínas, E2F-1 y E2Ftr. Como control de carga se detectó la proteína α -Actin.

El adenovirus recombinante que expresa E2Ftr inhibe el crecimiento tumoral en un modelo *in vivo*.

El Ad-E2Ftr fue probado en un modelo de melanoma en ratón. Las células A2058 fueron inyectadas en los muslos de un ratón desnudo. Después de seis días, los tumores fueron palpados y al azar se inyectó de manera directa el Ad-E2Ftr o el Ad-EGFP. Las dosis fueron inyectadas de manera antitumoral cada tres días para un total de cuatro dosis

totales. Se evaluó la actividad antitumoral siguiendo el protocolo descrito en materiales y métodos. Los 6 ratones inyectados con el Ad-E2Ftr mostraron supresión tumoral (100%) después de 27 días. (Fig. 6A). La reducción del tamaño del tumor en los ratones inyectados con el Ad-E2Ftr fue de ~80% comparado con el control (Ad-EGFP), lo cual fue estadísticamente significativo ($P < 0.05$). A 27 días después de la primera inyección con los adenovirus, los tumores fueron extraídos. En la figura 6B se muestran los tumores de los ratones tratados con el Ad-EGFP, que fueron significativamente más grandes que los tumores de los ratones que fueron inyectados con el Ad-E2Ftr. Los tumores de los ratones del grupo tratado con el Ad-EGFP fueron 1.2 ± 0.4 g, mientras que los tumores de los ratones que fueron inyectados con el Ad-E2Ftr fueron 0.2 ± 0.04 g (Fig. 6C). El tratamiento con el Ad-E2Ftr resultó en una fuerte disminución del tumor y la diferencia entre los tratamientos fue significativa ($P < 0.05$). Estos resultados claramente muestran que el adenovirus que expresa la proteína E2Ftr inhibe el crecimiento tumoral de manera significativa y por lo cual tiene una potente actividad antitumoral.

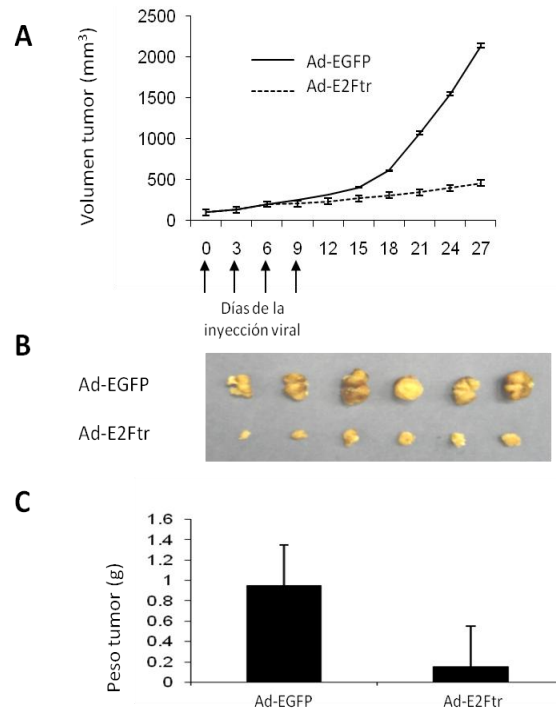


Fig. 6. Efecto antitumoral del Ad-E2Ftr en un modelo *in vivo*. A) La administración s.c. de 5×10^6 células de la línea A2058 indujo la formación de tumores palpables a los 6 días de la aplicación. Se seleccionaron ratones al azar para recibir una inyección local de Ad-EGFP o Ad-E2Ftr los días 0, 3, 6, y 9 (flechas). La dosis total de virus fue $4 \times 2 \times 1 \times 10^9$ ufp de partículas virales. El volumen del tumor fue graficado contra el tiempo y determinado por la fórmula: $V = (L \times W^2)/2$. B) El día 27 se extrajeron los tumores, de los cuales la masa relativa es mostrada. C) El peso tumoral se obtuvo al día 27. Los resultados son expresados como la media de cada grupo de tratamiento \pm el error estándar (ES; *bars*). Las diferencias en el tamaño o peso tumoral que resultaron del tratamiento con el Ad-E2Ftr fueron estadísticamente significativas comparado con el control Ad-EGFP (day 27, $P < 0.05$).

La sobreexpresión de E2Ftr induce la activación de caspasa-3 en un modelo *in vivo*.

Los tumores de los ratones que recibieron las dosis intratumorales de Ad-E2Ftr o Ad-EGFP fueron extraídos 24 horas después de la última inyección y se realizaron análisis histológicos. El análisis inmunohistológico detectó una fuerte expresión de la proteína E2Ftr en los tumores de los ratones inyectados con el Ad-E2Ftr. Al mismo tiempo se realizó la inmunohistoquímica para detectar la proteína caspasa-3 activada, tanto en los tumores inyectados con el Ad-EGFP o Ad-E2Ftr. La activación de caspasa-3 solo fue

detectada en los tumores que fueron inyectados con el Ad-E2Ftr, por lo cual fue asociado con la sobreexpresión de la proteína E2Ftr (Fig. 7). Por el contrario, no se detectó la expresión de E2F-1 o caspasa-3 en los tumores inyectados con el Ad-EGFP. Los tumores que fueron inyectados con el Ad-EGFP mostraron una alta expresión de la proteína EGFP cuando se observaron en el microscopio de fluorescencia, lo cual indicó que el nivel de transducción en los tumores fue alto. Estos resultados indicaron que el Ad-E2Ftr fue altamente transducido y que la caspasa-3 fue activada por la expresión de E2Ftr.

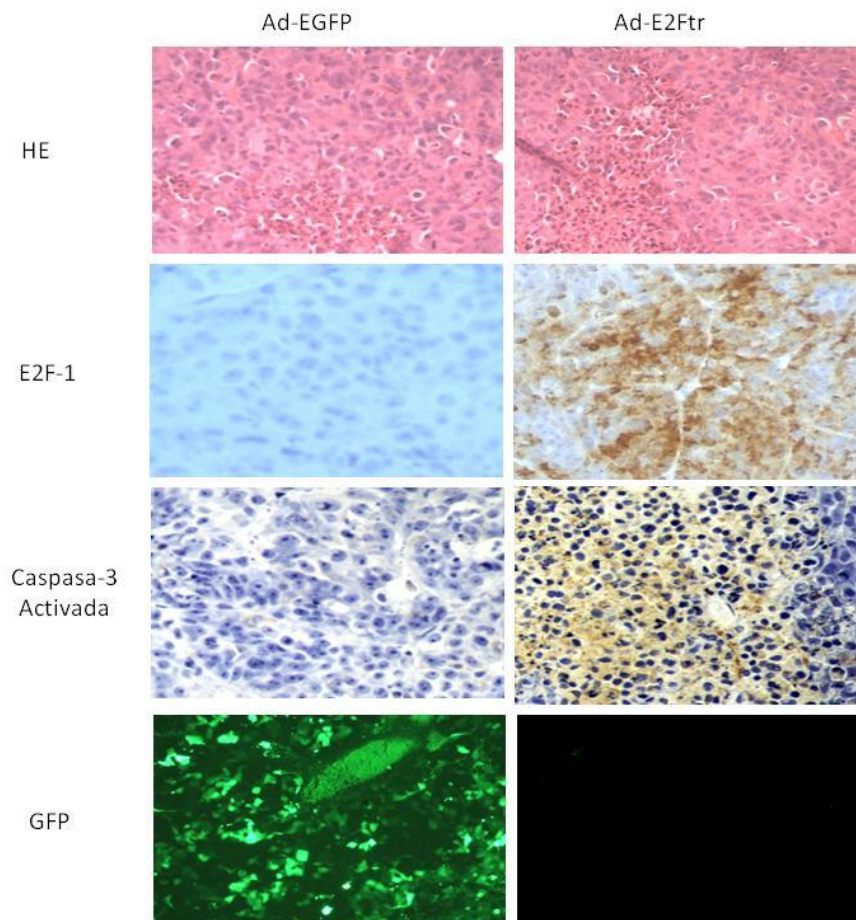


Fig. 7. Transducción e inmunohistoquímica tumoral. Los tumores fueron extraídos 24 hrs después del último tratamiento con el Ad-EGFP o el Ad-E2Ftr. Se muestra una tinción con hematoxilina y eosina (H&E), amplificación 20X. La expresión de la proteína EGFP se observó en un microscopio de fluorescencia. Se utilizó el anticuerpo mAb E2F-1 anti-humano para detectar la proteína E2Ftr y un anticuerpo pAb caspasa-3 activada anti-humano (Asp175) (5A1E) para confirmar la activación de la vía de apoptosis.

La sobreexpresión de E2Ftr mediada por adenovirus induce muerte celular por la vía de apoptosis en un modelo *in vitro*.

Al mismo tiempo que se realizaban los estudios *in vivo* se analizó el efecto del Ad-E2Ftr en un modelo *in vitro* en la línea celular SK-MEL-28 de melanoma y se comparó con el efecto del Ad-E2F-1. Se analizó el efecto citotóxico el tercer día después de la infección con los adenovirus Ad-LacZ, Ad-E2F-1 y Ad-E2Ftr mediante el ensayo de MTT. Las células sin tratamiento o infectadas con el Ad-LacZ no presentaron efecto citotóxico (Fig. 8A). Mientras que en las células infectadas con el Ad-E2F-1 o el Ad-E2Ftr se observó un fuerte efecto citotóxico que disminuyó la viabilidad en un 50 y 70% respectivamente.

Para determinar si el efecto citotóxico inducido por la proteína E2Ftr era a través de la vía de apoptosis se analizó la activación de marcadores de apoptosis mediante el ensayo de Western blot. Como se observa en la figura 8B las proteínas E2F-1 y E2Ftr indujeron la disminución de la procaspasa-3 y el corte proteolítico de PARP, el cual es un sustrato de la caspasa-3 activada. El corte proteolítico de PARP generó una banda adicional a la de 115 kDa, con un tamaño de 85-90 kDa. Las células sin tratamiento o infectadas con el Ad-LacZ no presentaron activación de PARP ni disminución de procaspasa-3.

Una vez que se demostró la activación de marcadores de apoptosis se analizó la morfología nuclear inducida por la sobreexpresión de la proteína E2Ftr. La fragmentación del núcleo es una característica del mecanismo de apoptosis. Para su análisis las células se tiñeron con el colorante Hoechst. En la figura 8C se observa la morfología de núcleos normales en las células sin tratamiento o infectadas con el adenovirus control (Ad-LacZ). En contraste, el núcleo de las células infectadas con el Ad-E2F-1 o el Ad-E2Ftr se observa fragmentado lo cual es consistente con el mecanismo de apoptosis.

Una de las características más tempranas del mecanismo de apoptosis es la pérdida de la integridad de la membrana plasmática. En las células apoptóticas el fosfolípido fosfatidilserina (PS) que se encuentra en el interior de la membrana celular es translocado y expuesto hacia la superficie celular. La anexina-V es una proteína que tiene una alta afinidad a la PS y se utiliza conjugada a fluorocromos, para identificar células en apoptosis. Por lo tanto, realizamos este análisis de citometría de flujo detectando la proteína anexina-V acoplada al fluorocromo FITC y la tinción celular con 7-AAD. La tinción con anexina-V normalmente se utiliza junto con un colorante vital como el 7-AAD (7-Amino-Actinomicina) para identificar las células en apoptosis temprana. Las células viables con una membrana intacta excluyen el colorante 7-AAD, mientras que la membrana de células dañadas o muertas es permeable al colorante.

Se analizaron células sin tratamiento o infectadas con los adenovirus Ad-LacZ, Ad-E2F-1 o Ad-E2Ftr. Como resultado, en la figura 8D se observa que las células sin tratamiento o infectadas con el Ad-LacZ presentaron un bajo porcentaje de apoptosis correspondiente a la apoptosis basal con un 11 y 10% respectivamente. Las células infectadas con el Ad-E2F-1 o el Ad-E2Ftr indujeron un 87 y 86% de apoptosis respectivamente. Por lo tanto, se confirmó que la sobreexpresión de la proteína E2Ftr mediada por adenovirus induce muerte celular por el mecanismo de apoptosis tan eficientemente como la proteína E2F-1.

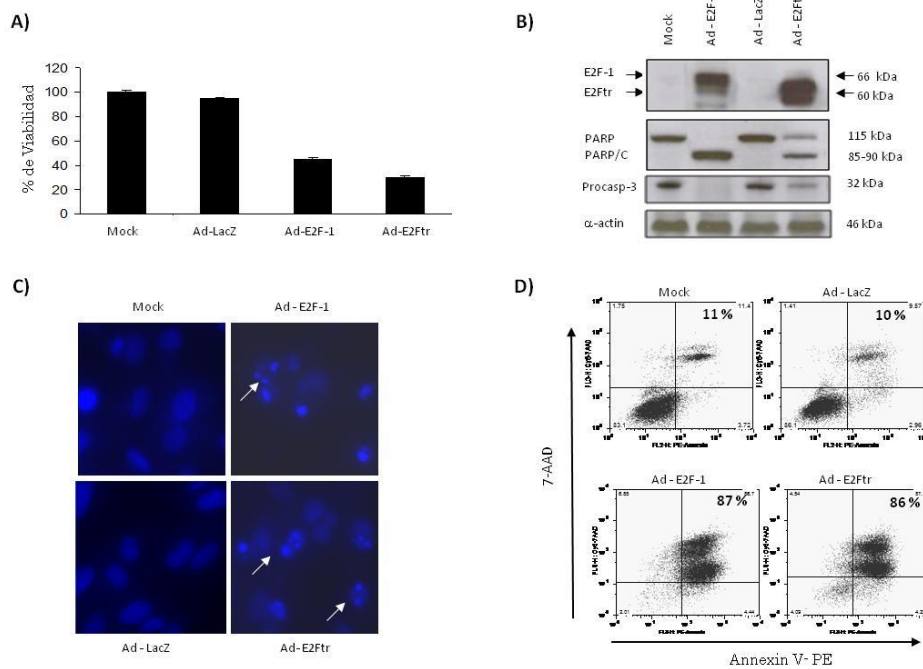


Fig. 8. Evaluación del mecanismo de apoptosis inducido por el Ad-E2Ftr. A) Células SK-MEL-28 sin infectar o infectadas con el Ad-LacZ, Ad-E2F-1 o Ad-E2Ftr a una MOI de 100. La viabilidad celular se analizó a las 72 hrs por un ensayo de MTT. B) Detección de la activación de la vía de las caspasas por Western Blot. Se utilizaron los anticuerpos mAb E2F-1 anti-humano, mAb PARP anti-humano, y mAb caspase-3/ CPP3 anti-humano. La detección de α -Actina se utilizó como control de carga. C) Tinción del núcleo con Hoechst 33258 (10 μ M). La fragmentación del núcleo es indicada por flechas blancas (Amplificación, 20X). D) Tinción con anexina V-PE y 7-Aminoactinomicina D (7-AAD). Las células se analizaron por citometría de flujo con el software FlowJo. Se obtuvieron resultados similares en tres experimentos independientes.

El adenovirus Ad-E2Ftr induce un mecanismo de muerte celular independiente de caspasas.

Un estudio preliminar en donde se realizó una tinción Wright-Giemsa mostró una morfología celular diferente a la característica de apoptosis. Se observó un citoplasma con apariencia vesiculada, lo cual sugirió la existencia de algún mecanismo de muerte celular diferente a la apoptosis. Por lo tanto, para descartar que la apoptosis fuera el único mecanismo de muerte celular inducido por la sobreexpresión de E2Ftr, se utilizó un inhibidor general de las caspasas, conocido como z-VAD-fmk. El inhibidor z-VAD-fmk es

un inhibidor general de caspasas irreversible, que se une al sitio catalítico de las proteasas caspasas e inhibe la inducción de apoptosis.

Mediante un ensayo de MTT se analizó la viabilidad de células SK-MEL-2 sin tratamiento o infectadas con el Ad-LacZ o Ad-E2Ftr en ausencia o presencia del inhibidor z-VAD-fmk a las 72 hrs. La cisplatina es un conocido inductor de apoptosis y se utilizó como control positivo a una concentración de 25 μ M. En la figura 9A se observa que la viabilidad de las células sin tratamiento o infectadas con el Ad-LacZ no es afectada en ausencia o presencia del inhibidor z-VAD-fmk. En contraste, las células tratadas con cisplatina muestran alrededor de 35% de viabilidad, la cual se incrementó a 70% en presencia del inhibidor z-VAD-fmk. A diferencia del control positivo en donde hubo un 50% de rescate de muerte celular, en las células infectadas con el Ad-E2Ftr no hubo rescate. Este resultado sugiere la existencia de un mecanismo de muerte celular diferente a la apoptosis dependiente de las caspasas.

Para confirmar que el inhibidor z-VAD-fmk no tenía efecto sobre la muerte celular inducida por el Ad-E2Ftr analizamos su efecto por citometría de flujo mediante la tinción con anexina-V. Como se observó previamente, el inhibidor z-VAD-fmk no tuvo efecto sobre las células sin tratamiento (Fig. 9B). En las células infectadas con el Ad-LacZ se observó un 16% de células en apoptosis que se redujo a 5% en presencia del inhibidor. Las células tratadas con cisplatina mostraron un 62% de células apoptóticas que se redujo a 28% en presencia del inhibidor z-VAD-fmk. El Ad-E2Ftr indujo un 78% de apoptosis, la cual no se vio afectada en presencia del inhibidor de caspasas. Cabe señalar que estos experimentos se realizaron a las 72 hrs de tratamiento, lo cual corresponde a una fase tardía de muerte celular en donde puede haber ruptura o permeabilidad de la membrana celular con exposición de lípido PS de manera independiente del tipo de muerte celular. En base a

los resultados se concluye que el Ad-E2Ftr induce un mecanismo de muerte celular independiente de la apoptosis por la vía clásica de las caspasas.

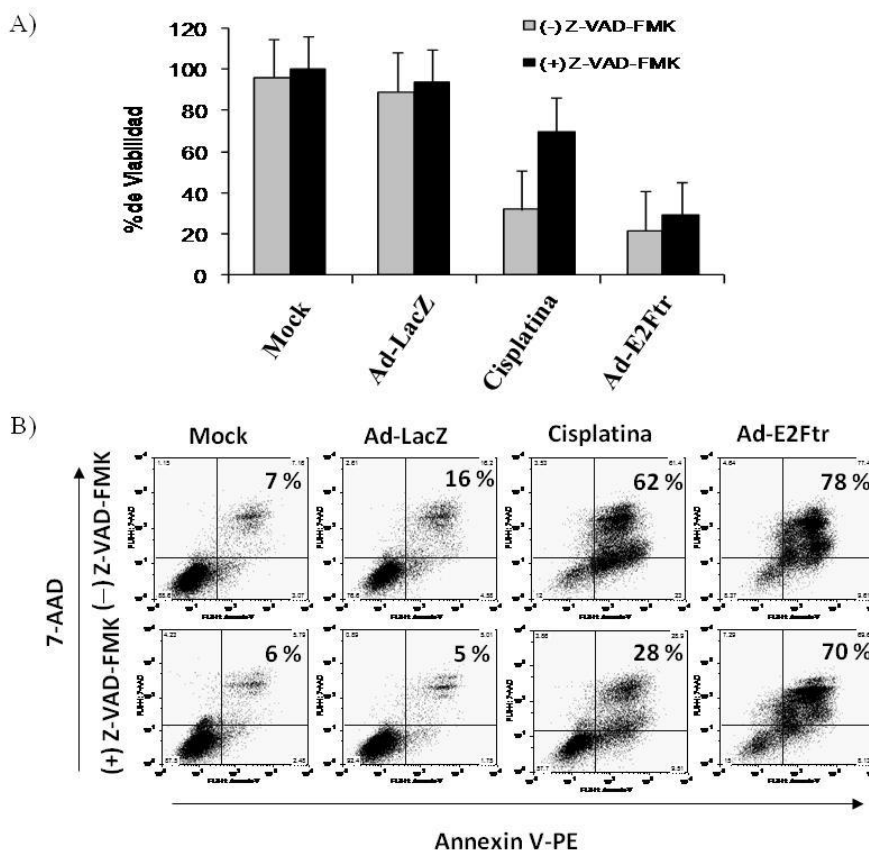


Fig. 9. La muerte celular inducida por el Ad-E2Ftr es independiente de las caspasas. Células SK-MEL-2 sin infectar o infectadas con el Ad-LacZ o Ad-E2Ftr a una MOI de 100 en ausencia o presencia de z-VAD-fmk. La cisplatina se utilizó como inductor de apoptosis a una concentración de 25 μ M. Las células se analizaron a las 72 hrs. A) La viabilidad celular se analizó por un ensayo de MTT. B) Tinción con anexina V-PE y 7-Aminoactinomicina D (7-AAD); Las células se analizaron por citometría de flujo con el software FlowJo. Se obtuvieron resultados similares en tres experimentos independientes.

La sobreexpresión de E2Ftr mediada por adenovirus induce la activación del mecanismo de autofagia.

Una vez que se determinó que la apoptosis por la vía de las caspasas no era el único mecanismo de muerte celular inducido por E2Ftr y en base a los estudios preliminares en donde se observó una morfología con apariencia vesiculada, se evaluó si el mecanismo de autofagia era activado por E2Ftr.

Para determinar la activación de autofagia se utilizó un sistema que consiste en el corte proteolítico del marcador de autofagia LC3 por la proteasa endógena Atg4B. En este sistema el marcador LC3 se encuentra fusionado entre la β -actina y la *Gaussia luciferasa* (dNGLUC). El corte proteolítico de LC3 libera a la luciferasa al medio de cultivo la cual es cuantificada en un luminómetro. Este mismo sistema se utilizó para detectar la activación de la apoptosis, pero en lugar del marcador de autofagia se encuentra el sitio FDEVDG2 entre la β -actina y dNGLUC, el cual sufre un corte proteolítico por la caspasa 8 (vía extrínseca) y caspasa 9 (vía intrínseca), y de igual manera la apoptosis puede monitorearse detectando los niveles de luciferasa en el sobrenadante del cultivo celular (Ketteler *et al.*, 2008).

Las células SK-MEL-2 se transfectaron con el plásmido pEAK12-Actin-LC3-dNGLUC (sensor de autofagia) e infectaron con los adenovirus Ad-EGFP, Ad-E2F-1 o Ad-E2Ftr y se analizó la actividad de luciferasa como se describió previamente. La rapamicina, un conocido inductor de autofagia, se utilizó como control positivo. Como se observa en la figura 10A el Ad-EGFP no indujo actividad de luciferasa, mientras que la rapamicina indujo un ligero incremento a través del tiempo. El Ad-E2F-1 indujo mayor actividad de luciferasa que la rapamicina. Sin embargo, el efecto más notorio fue inducido por el Ad-E2Ftr, con un incremento de casi el doble de la actividad de luciferasa inducida por el Ad-E2F-1.

Por otro lado, se monitoreó la activación del mecanismo de apoptosis usando este mismo sistema, pero con el plásmido pEAK12-Actin-flagDEVDG2-dNGLUC (DEVDG2F, sensor de apoptosis). Se transfectaron las células de melanoma con el plásmido e infectaron con los adenovirus Ad-EGFP, Ad-E2F-1 o Ad-E2Ftr y se analizó la actividad de luciferasa como se describió previamente. La cisplatina se utilizó como control positivo de apoptosis.

Como se observa en la figura 10B el Ad-EGFP no indujo actividad de luciferasa, mientras que el Ad-E2F-1 indujo un ligero incremento a través del tiempo. La cisplatina indujo mayor actividad de luciferasa que el Ad-E2F-1, pero la actividad de luciferasa más pronunciada fue inducida por el Ad-E2Ftr con un incremento de aproximadamente el doble de la actividad inducida por el control positivo.

El uso de este sistema nos permitió determinar que la sobreexpresión de E2F-1 y E2Ftr mediada por adenovirus puede activar los mecanismos de autofagia y apoptosis. Sin embargo, el mecanismo de autofagia presentó una mayor activación que el mecanismo de apoptosis.

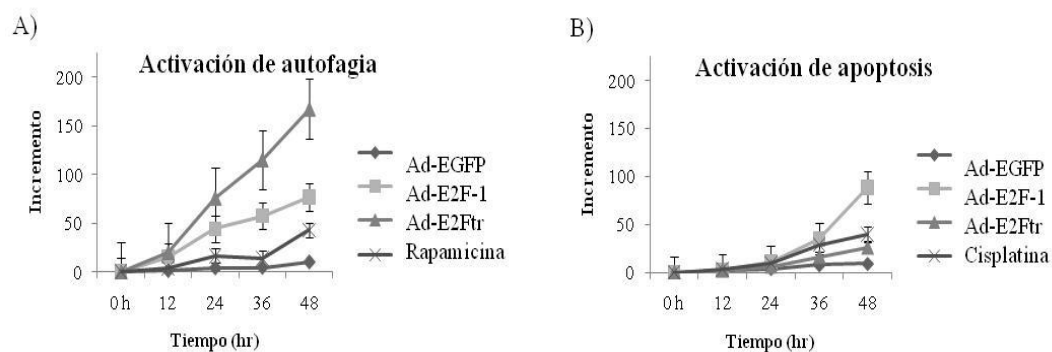


Fig. 10. Activación de los mecanismos de autofagia y apoptosis por E2Ftr mediada por adenovirus. **A)** Activación de autofagia por E2F-1 y E2Ftr. Las células SK-MEL-2 fueron transfectadas con 4 ng/ μ l del plásmido pEAK12-Actin-LC3-dNGLUC (sensor de autofagia) e infectadas con el Ad-EGFP, Ad-E2F-1 o Ad-E2Ftr. La rapamicina se utilizó como control positivo. **B)** Activación de FDEVDG2 (sensor de apoptosis) por E2F1 y E2Ftr. Las células fueron transfectadas con 4 ng/ μ l del plásmido pEAK12-Actin-flagDEVDG2-dNGLUC (DEVDG2F) e infectadas como se menciona previamente. La cisplatina se utilizó como control positivo. Los sobrenadantes fueron colectados a diferentes tiempos y analizados para la actividad de luciferasa. E2F1 y E2Ftr indujeron la liberación de GLUC (Gaussia luciferasa) de manera dependiente del tiempo. El mecanismo de autofagia presentó una mayor activación que el mecanismo de apoptosis.

La proteína E2Ftr induce un mecanismo de muerte celular independiente de caspasas.

Para descartar que la activación del mecanismo de autofagia fuera por un efecto sinérgico de la proteína E2Ftr y el adenovirus, se analizó el efecto de la proteína mediante su expresión transitoria. Se utilizaron los plásmidos pGL3-E2F1 o pGL3-E2Ftr, que

expresan los genes E2F-1 y E2Ftr respectivamente. Como control se utilizó el plásmido vacío, pGL3. Se transfectaron las células SK-MEL-2 de melanoma humano y a las 48 hrs se analizó el efecto de muerte celular por medio de un ensayo de exclusión por azul tripano. El resultado de este experimento muestra que el nivel basal de muerte celular fue de 13.7%, éste fue tomado de células a las cuales se les dio un tratamiento sin DNA plasmídico, Las células transfectadas con el vector vacío mostraron un 16.6% de muerte celular, similar a los niveles basales. En contraste, en las células transfectadas con los plásmidos que expresan E2F-1 o E2Ftr se observó un marcado incremento de muerte celular de un 38% y 35.8% respectivamente (Fig. 11A). El ensayo de exclusión por Azul Tripano confirmó que la expresión transitoria de E2F-1 and E2Ftr es suficiente para inducir muerte celular.

Posteriormente, se prosiguió a determinar si la inhibición de la apoptosis mediante el inhibidor general de caspasas z-VAD-fmk, podía proteger de la muerte celular inducida por la expresión transitoria de E2F-1 o E2Ftr. Se transfectaron las células, como se describe previamente, en ausencia o presencia del inhibidor z-VAD-fmk (100 μ M). El ensayo de exclusión con azul tripano se realizó a las 48 hrs y demostró que la muerte celular inducida por cisplatina disminuyó notablemente del 34.7% al 5.95%. En contraste, la muerte celular inducida por E2F-1 o E2Ftr fue resistente al inhibidor z-VAD-fmk, presentando una disminución de muerte celular del 40.4% al 35.2% y del 37.3% al 29.6%, respectivamente (Fig. 11B). Este resultado sugiere que el principal mecanismo de muerte celular inducido por la sobre-expresión de E2F-1 y E2Ftr es diferente a la apoptosis.

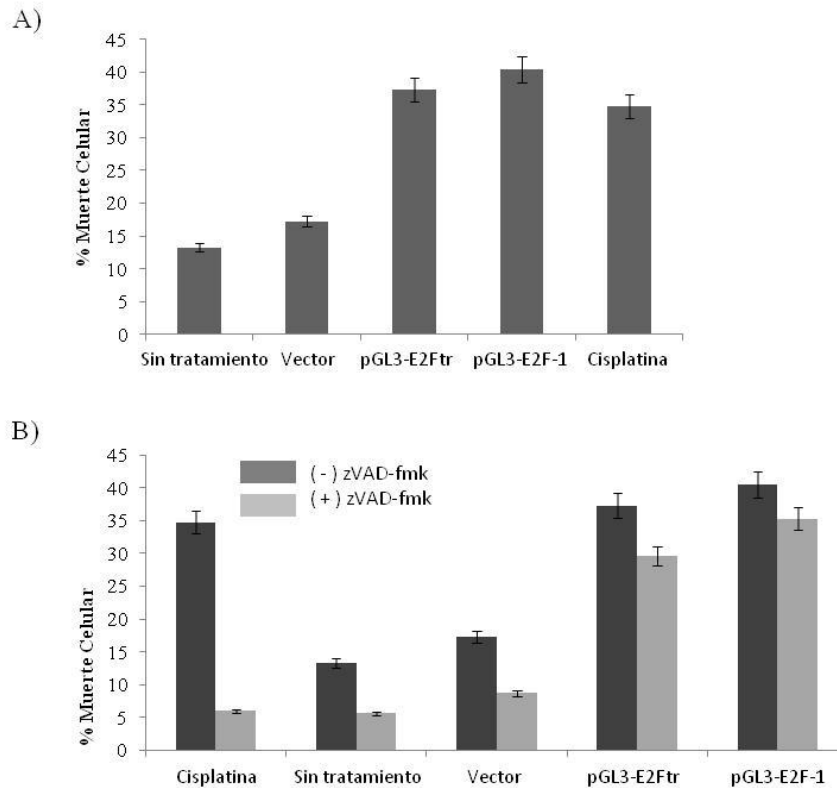


Fig. 11. La muerte celular inducida por la proteína E2Ftr es independiente de las caspasas. **A)** Las células SK-MEL-2 de melanoma humano fueron transfectadas con 5 ng/ μ l de los plásmidos pGL3 (plásmido vacío), pGL3-E2F-1 o pGL3-E2Ftr. Las células se incubaron durante 48 horas y se determinó la muerte celular por exclusión con azul tripano. **B)** Efecto del inhibidor de caspasas z-VAD-fmk sobre la muerte celular inducida por cisplatina (25 μ M), pGL3-E2F-1 o pGL3-E2Ftr. Después de la adición de la cisplatina o de la transfección con los plásmidos que expresan E2F-1 o E2Ftr, las células fueron tratadas con el inhibidor z-VAD-fmk (100 μ M) durante 48 horas y analizadas por exclusión con azul tripano.

La proteína E2Ftr induce la activación de autofagia.

Una vez que se demostró que la proteína E2Ftr puede causar muerte celular por sí sola, y que el mecanismo de muerte es diferente a la apoptosis por la vía de las caspasas, se analizó si era capaz de activar el mecanismo de autofagia. Por lo tanto, se llevó a cabo el ensayo de liberación de luciferasa en donde las células SK-MEL-2 fueron co-transfectadas con 4 ng/ μ l del plásmido pEAK12-Actin-LC3-dNGLUC (sensor de autofagia) y 4 ng/ μ l de los plásmidos pGL3, pGL3-E2F-1 o pGL3-E2Ftr. La actividad de luciferasa se analizó como se describe previamente. En la figura 12A se observa que el vector vacío no indujo

actividad de luciferasa, mientras que la rapamicina indujo un marcado incremento a través del tiempo. La expresión de E2F-1 y E2Ftr mostró un patrón de actividad de luciferasa muy similar con un incremento de 20 a 25 veces en comparación con el control.

Para monitorear la activación de apoptosis las células fueron co-transfectadas con 4 ng/μl del plásmido pEAK12-Actin-flagDEVDG2-dNGLUC (DEVDG2F) y 4 ng/μl de los plásmidos pGL3-E2F-1 o pGL3-E2Ftr y se analizó como descrito anteriormente. Como se observa en la figura 12B el vector vacío no indujo actividad de luciferasa, mientras que la cisplatina indujo una alta actividad de luciferasa. E2F-1 y E2Ftr mostraron un ligero incremento en la activación de luciferasa.

El uso de este sistema nos permitió determinar que la expresión de las proteínas E2F-1 y E2Ftr por sí sola es suficiente para activar los mecanismos de autofagia y apoptosis. Al igual que en el estudio con adenovirus, se observó que el mecanismo de autofagia presentó una mayor activación que el mecanismo de apoptosis.

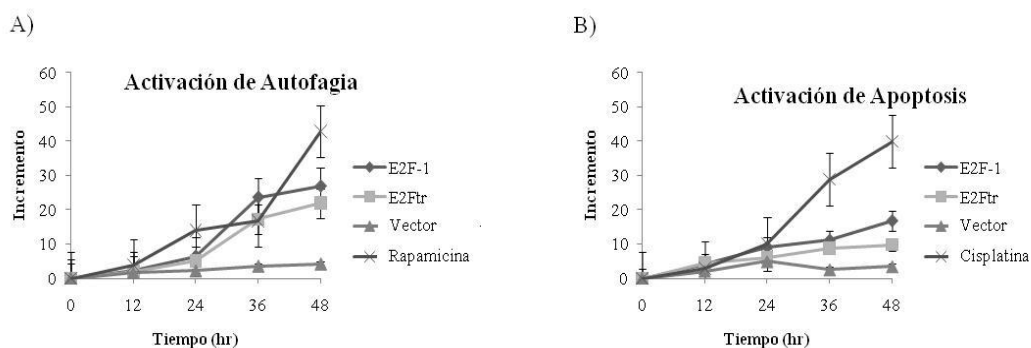


Fig. 12. La proteína E2Ftr induce la activación de autofagia y apoptosis. (A) Activación de autofagia por E2F-1 y E2Ftr. Las células SK-MEL-2 fueron co-transfectadas con 4 ng/μl del plásmido pEAK12-Actin-LC3-dNGLUC (sensor de autofagia) y 4 ng/μl de los plásmidos pLG3, pLG2E2F1 o pLFE2Ftr. E2F1 y E2Ftr indujeron la liberación de GLUC (Gaussia luciferasa). (B) Activación de FDEVDG2 (sensor de apoptosis) por E2F1 o E2Ftr. Las células fueron co-transfectadas con 4 ng/μl del plásmido pEAK12-Actin-flagDEVDG2-dNGLUC (DEVDG2F) y 4 ng/μl de los plásmidos pLG2E2F1 o pLFE2Ftr. Los sobrenadantes fueron colectados a diferentes tiempos y analizados para la actividad de luciferasa.

La proteína E2Ftr induce un incremento del marcador de autofagia Atg5.

Para establecer el mecanismo por el cual la proteína E2Ftr activa la vía de autofagia se analizó la proteína de autofagia Atg5. La proteína Atg5 es parte de un sistema parecido al sistema de ubiquitinación; es conjugada con Atg12 para formar el complejo Atg5-Atg12 que es esencial en la etapa temprana de autofagia para la elongación del fagóforo durante la formación del autofagosoma. Para determinar si esta proteína de autofagia era inducida por E2Ftr, se transfectaron las células SK-MEL-2 con los plásmidos que expresan E2F-1 o E2Ftr y se analizó su expresión a través del tiempo mediante el ensayo de Western Blot. Como resultado, se encontró que tanto E2F-1 como E2Ftr inducen una ligera expresión de Atg5 a las 12 hrs después de la transfección (Fig. 13). Se observó un incremento gradual en la expresión de Atg5 de manera dependiente del tiempo con una máxima expresión a las 54 hrs de la transfección. Estos resultados muestran que E2F-1 y E2Ftr tienen un comportamiento similar sobre la inducción de Atg5, y sugieren que la autofagia puede ser un mecanismo de muerte celular independiente de caspasas activado por E2F-1 y E2Ftr.

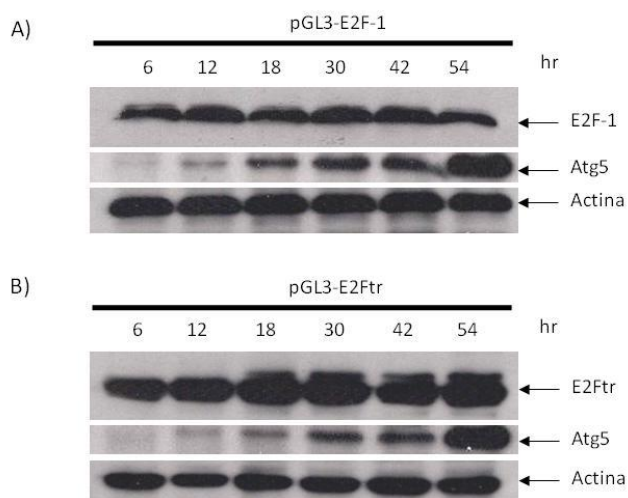


Fig. 13. La autofagia inducida por E2Ftr está asociada con la expresión de Atg5. Las células SK-MEL-2 se transfectaron con 1 µg/ml de A) pGL3-E2F1 o B) pGL3-E2Ftr. La autofagia se asoció con la aparición de la proteína Atg5 de 33 kDa. E2F-1 y E2Ftr indujeron el incremento de Atg5 de manera dependiente del tiempo. Las muestras proteicas fueron extraídas y resueltas por SDS-PAGE. Las membranas fueron incubadas con los anticuerpos anti-E2F1, anti-Atg5, y anti-actina como control de carga.

La proteína E2Ftr induce un incremento del marcador de autofagia LC3.

La conversión de LC3-I a LC3-II es considerada como el principal marcador proteico de autofagia. La proteína LC3-I es una proteína citosólica mientras que la proteína LC3-II se localiza específicamente en la membrana de los autofagosomas, se encuentra asociada con la membrana limitante interna y es atrapada dentro de las vesículas autofágicas. La conversión de LC3-I a LC3-II se analiza a través de Western blot, LC3-II presenta una migración de banda más rápida que LC3-I. Por lo tanto, analizamos la expresión de este marcador en respuesta a diferentes dosis de DNA plasmídico codificante para E2F-1 (pGL3-E2F-1) o E2Ftr (pLGL3-E2Ftr). Como resultado, encontramos la máxima expresión de LC3 cuando las células se transfectaron con 0.5-2 μg de pGL3-E2F-1 (Fig. 14A). En contraste, la máxima expresión de LC3 inducida por pLGL3-E2Ftr se alcanzó cuando se transfectó con 0.25-0.5 μg de DNA (Fig. 14B). Este resultado muestra que tanto E2F-1 como E2Ftr son capaces de inducir el incremento en la expresión de LC3.

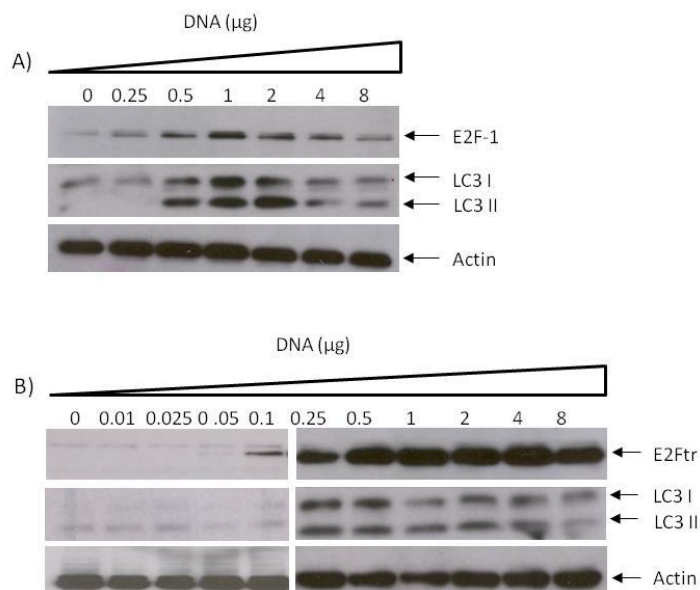


Fig. 14. E2Ftr induce la expresión del marcador de autofagia LC3. Las células SK-MEL-2 fueron transfectadas con diferentes concentraciones de DNA de los plásmidos codificantes para A) E2F1 o B) E2Ftr. Los extractos de proteína se aislaron a las 24 h y se analizaron por Western blot con el anticuerpo anti-LC3. Las membranas se rehibridaron con los anticuerpos anti-E2F1 y anti-actina.

La proteína E2Ftr induce la localización de la proteína LC3 en los autofagosomas.

LC3 es un marcador de autofagia esencial para la formación de los autofagosomas. Previamente se detectó mediante Western Blot la inducción de LC3-I y LC3-II por E2F-1 y E2Ftr en las células SK-MEL-2. Por lo tanto, utilizamos otro método basado en el marcador LC3 para confirmar la activación de autofagia. Este método consiste en analizar el patrón de fluorescencia de la fusión GFP-LC3 inducido por E2F-1 y E2Ftr. Se co-transfectaron las células de melanoma con el plásmido GFP-LC3 y el vector vacío, el pGL3-E2F-1 o el pGL3-E2Ftr. La distribución de GFP-LC3 se monitoreó por microscopía de fluorescencia a las 48 hrs después de la transfección. En la figura 15 se observa un patrón de fluorescencia difusa en las células transfectadas con el vector vacío. La fluorescencia difusa corresponde a la localización citoplasmática de la proteína LC3-I, mientras que la fluorescencia localizada (punteada) corresponde a la proteína LC3-II que se incorpora a los autofagosomas. Los plásmidos pGL3-E2F-1 y pGL3-E2Ftr indujeron una distribución punteada de la fusión GFP-LC3, lo cual corresponde a la inducción de la formación de autofagosomas. La rapamicina se usó como control positivo de la distribución punteada. Mediante este ensayo se confirmó que E2F-1 y E2Ftr activan el mecanismo de autofagia.

Para descartar que los resultados observados fueran efecto de una deficiencia en el flujo de autofagia o que el marcador LC3-II fuera blanco de degradación lisosomal se utilizó la cloroquina, un inhibidor de la fusión del autofagosoma con el lisosoma (Tanida *et al.*, 2005). Como resultado se observó un incremento en la fluorescencia punteada inducida por E2F-1, E2Ftr y la rapamicina. Por lo tanto, la acumulación del patrón de fluorescencia punteado de GFP-LC3 y el flujo de autofagia inducidos por E2F-1 y E2Ftr fueron eficientes. Estos resultados confirmaron la inducción de autofagia por E2F-1 y E2Ftr.

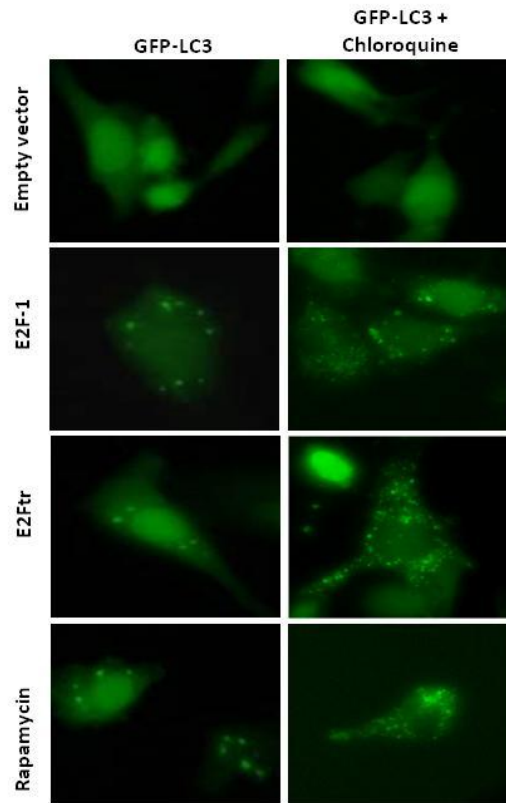


Fig. 15. Inducción de la formación de autofagosomas con la incorporación de GFP-LC3 inducida por E2Ftr. Las células SK-MEL-2 fueron co-transfectadas con 4 ng/ μ l del plásmido pGFP-LC3 y 4 ng/ μ l de los plásmidos pGL3, pGL3-E2F-1 o pGL3-E2Ftr. Se analizó la incidencia de la distribución punteada de GFP-LC3. La rapamicina (200 nM) se utilizó como control positivo de inducción de autofagia. La cloroquina (10 μ M) se utilizó para analizar el flujo de autofagia.

La proteína E2Ftr induce la formación de vesículas de doble membrana.

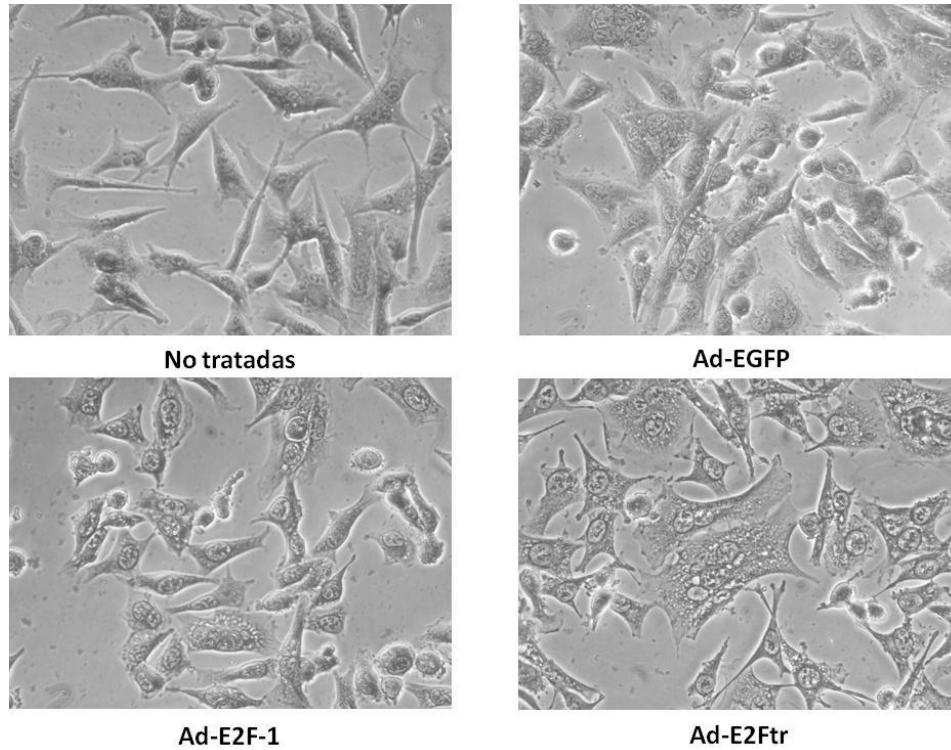
El estudio morfológico a través de microscopía electrónica de transmisión (MET) es el método más sensible y confiable para identificar la inducción del mecanismo de autofagia. Las vesículas autofágicas son estructuras de doble membrana que contienen citoplasma, ribosomas, membranas de retículo endoplásmico, mitocondrias o cualquier otro organelo. Las estructuras que no cumplan este criterio no deben ser clasificadas como vesículas autofágicas.

Para analizar el efecto de la sobreexpresión de E2F-1 y E2Ftr sobre la morfología celular se utilizaron los adenovirus Ad-E2F-1 o Ad-E2Ftr para infectar las células SK-MEL-2 a un MOI de 100. La morfología celular se analizó a las 24 hrs después de la infección por microscopía de luz. El Ad-EGFP se utilizó como control negativo y no indujo diferencia en la morfología celular al ser comparado con las células sin tratamiento. Sin embargo, la sobreexpresión de E2F-1 indujo cambios en la morfología celular, presentando un citoplasma con apariencia vesiculada. El Ad-E2Ftr también indujo una apariencia vesiculada, además de una apariencia celular aplanada (Fig. 16A).

Para determinar si las estructuras que se observaron en el citoplasma con apariencia de vesículas se trataban de vesículas autofágicas se realizó un análisis ultraestructural mediante microscopía electrónica de transmisión.

Las células SK-MEL-2 fueron infectadas de igual manera y procesadas como se describió previamente. En la figura 16B se observa la presencia de vesículas de doble membrana (autofagosomas) inducida por la sobreexpresión de E2F-1 o E2Ftr. En la parte inferior se observa una amplificación de las vesículas en donde se observa más claramente la doble membrana. De esta manera se confirmó por el estándar de oro, la microscopía electrónica de transmisión, la formación de vesículas de doble membrana inducida por E2F-1 y E2Ftr.

A)



B)

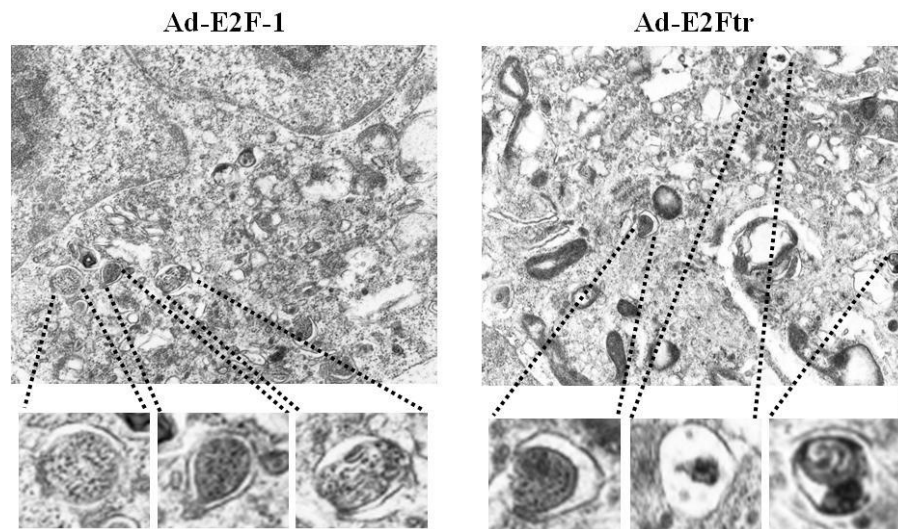


Fig. 16. Análisis ultraestructural de la morfología celular inducida por E2Ftr en las células SK-MEL-2. A) Microscopía de luz. Las células SK-MEL-2 sin tratamiento o infectadas con el Ad-EGFP, Ad-E2F-1 o Ad-E2Ftr a una MOI de 100 se analizaron a las 24 hrs por microscopía de luz. Amplificación, 40X. B) Las células SK-MEL-2 infectadas con el Ad-E2F-1 o Ad-E2Ftr a una MOI de 100 se analizaron a las 24 hrs por MET.

Para determinar que la formación de vesículas de doble membrana por E2F no fuera un efecto específico de línea celular, analizamos la línea DM6 de melanoma nodular. Las células se infectaron y procesaron como descrito previamente, y se analizaron por microscopía electrónica de transmisión. En la figura 17 se observa la formación de un autofagosoma de doble membrana inducida por la sobreexpresión de E2F-1. La sobreexpresión de E2Ftr indujo la formación de un gran número de vesículas autofágicas. Por lo tanto, se demostró que la inducción de autofagia por E2F-1 y E2Ftr no es específica de línea celular.

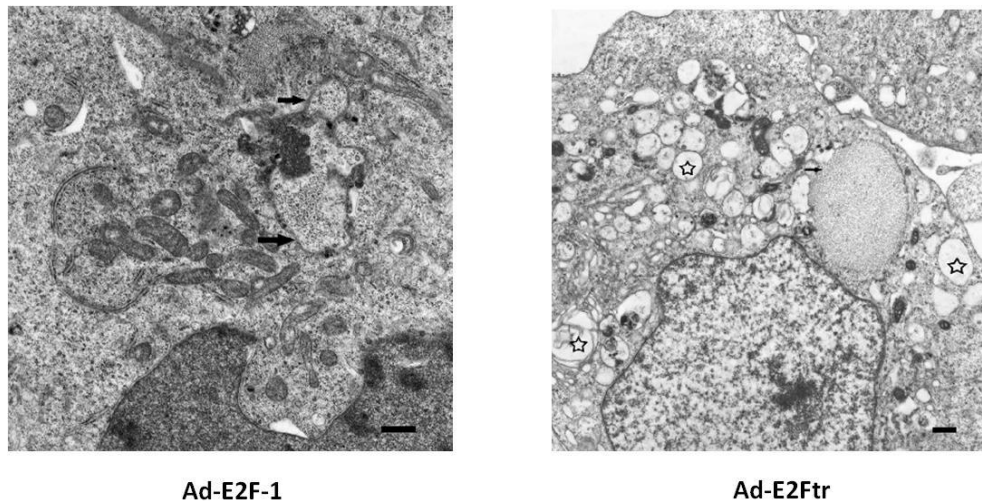


Fig.17. Análisis ultraestructural de la morfología celular inducida por E2Ftr en las células DM6. Las células DM6 de melanoma se infectaron con el Ad-E2F-1 o Ad-E2Ftr a una MOI de 100. A las 24 h después de la infección las células fueron procesadas y analizadas por MET. Las flechas indican la doble membrana del autofagosoma, las estrellas señalan la formación de vesículas de autofagia, escala barra=1 μ m. Nótese el gran tamaño del lisosoma en las células que sobreexpresan E2Ftr.

Discusiones

Muchos estudios han demostrado la habilidad de E2F-1 para promover la progresión del ciclo celular y la proliferación (Bandara *et al.*, 1993; Sala *et al.*, 1994; Shan *et al.*, 1994; Yang *et al.*, 1995). En contraste, su capacidad para inducir muerte celular por apoptosis ha sido usada para combatir varios tipos de cáncer (Dong *et al.*, 1999; Jamshidi-Parsian *et al.*, 2005; Dong *et al.*, 2007; Evangelou *et al.*, 2008; Xie *et al.*, 2009). Sin embargo, a pesar de que la sobreexpresión de E2F-1 induce muerte celular, aún conserva su potencial oncogénico (Johnson *et al.*, 1994; Yang *et al.*, 1995).

En algunos estudios se ha descrito que una versión mutante de E2F-1 que carece del dominio de transactivación conserva su actividad apoptótica y no así su potencial oncogénico (Bell *et al.*, 2006). Además, se ha demostrado que la actividad apoptótica de E2F-1 reside en el dominio de unión a DNA (Hsieh *et al.*, 1997; Bell *et al.*, 2006). Sin embargo, el mecanismo por el cual E2F-1 mutante (E2Ftr) induce muerte celular no está claro.

Aquí reportamos que la expresión de E2Ftr mediada por adenovirus (Ad-E2Ftr) induce una fuerte supresión tumoral por apoptosis en un modelo animal de melanoma xenográfico así como en cultivo celular.

Un estudio que se realizó en nuestro laboratorio previamente mostró el efecto de la sobreexpresión de E2F-1 mediada por adenovirus en un modelo animal de melanoma xenográfico. En ese estudio se determinó que el Ad-E2F-1 redujo el tamaño de los tumores aproximadamente un 37% (Dong *et al.*, 2002). En el presente trabajo reportamos una reducción en el tamaño del tumor de ratones tratados con el Ad-E2Ftr de ~80%. La transducción tumoral fue muy eficiente y presentó una alta expresión de E2Ftr y activación

de caspasa-3. Por consiguiente, el uso de Ad-E2Ftr en terapia génica es una opción más segura y eficiente para inhibir el crecimiento tumoral.

En este trabajo no solo demostramos el papel antitumoral de E2Ftr sino que también identificamos una nueva función en la inducción del mecanismo de autofagia en células de melanoma.

Mientras que la contribución de E2F-1 en la progresión del ciclo celular e inducción de apoptosis (Johnson *et al.*, 1994; Sala *et al.*, 1994; Shan *et al.*, 1994; Yang *et al.*, 1995; Xu *et al.*, 1995) ha sido bien estudiada, existen muy pocos estudios sobre el papel de E2F-1 en la autofagia (Tracy *et al.*, 2007; Polager *et al.*, 2008). En este estudio, nosotros encontramos un nuevo modo de regulación de la autofagia por E2F-1 que ocurre de manera independiente del dominio de transactivación.

Como se mencionó previamente, confirmamos la muerte celular inducida por E2Ftr. Puesto que el mecanismo de apoptosis se encuentra bien estudiado utilizamos un inhibidor de caspasas de amplio espectro (z-VAD-fmk) para bloquear la muerte celular inducida por E2Ftr. Inesperadamente, el inhibidor de apoptosis no bloqueó significativamente la muerte celular inducida por E2Ftr, sugiriendo la existencia de un mecanismo de muerte celular diferente a la apoptosis mediada por caspasas.

Un estudio reciente mostró la inducción directa de los genes de autofagia LC3, ATG1 y DRAM, y la inducción indirecta de ATG5 por E2F-1 (Polager *et al.*, 2008). Sin embargo, en ese estudio utilizaron una línea celular en donde el promotor de E2F-1 es regulado por tamoxifen, un inductor de autofagia, por lo que no es un modelo adecuado. En el presente trabajo analizamos directamente el efecto de la sobre-expresión de E2F-1 y E2Ftr sobre la inducción de autofagia.

Por lo tanto, nos propusimos el determinar si E2Ftr también podía inducir genes de autofagia. Utilizamos una herramienta nueva para la detección de autofagia basada en la liberación de luciferasa. Este método se caracteriza por ser muy sensible y fácil de realizar (Ketteler *et al.*, 2008). Así pues, nos permitió detectar que tanto la vía de autofagia como la vía de apoptosis fueron activadas por E2Ftr. Sin embargo, la autofagia mostró mayor activación que la apoptosis.

A pesar de que se había reportado una activación directa de los genes de autofagia ATG5 y LC3 por E2F-1 (Polager *et al.*, 2008), nosotros encontramos que E2Ftr también puede inducir la expresión de Atg5 y LC3 pero a través de un mecanismo independiente del dominio de transactivación, que puede ser a través de interacciones proteína-proteína pero aún se desconoce.

Por otro lado, el monitoreo de la distribución de GFP-LC3, una de las técnicas más utilizadas para detectar autofagia (Kabeya *et al.*, 2000), nos permitió detectar la formación de autofagosomas inducida por E2Ftr. Además, mediante el uso de cloroquina analizamos el flujo de autofagia y establecimos que la distribución de fluorescencia punteada inducida por E2Ftr no era por un defecto en la degradación lisosomal. Asimismo, mostramos por primera vez la morfología inducida por E2Ftr que fue la presencia de vesículas de doble membrana consistentes con autofagia.

Así pues, nuestros datos proveen evidencia de que la autofagia no solo es regulada a nivel transcripcional por E2F-1 sino que también a través de un mecanismo independiente de la transcripción mediada por E2F-1.

Conclusiones

La proteína E2Ftr tiene una potente actividad antitumoral en un modelo de melanoma *in vitro* e *in vivo*.

La proteína E2Ftr induce los mecanismos de apoptosis y autofagia en células de melanoma humano.

Perspectivas

- ✓ Analizar el efecto de E2Ftr sobre la muerte celular en células knock-out para genes de autofagia o la inhibición de los mismos.
- ✓ Estudiar el mecanismo por el cual E2Ftr activa el mecanismo de autofagia.

Literatura Citada

American Cancer Society

Attwooll C, Denchi EL, Helin K. 2004. The E2F family: specific functions and overlapping interests. *EMBO J*, 23(24): 4709-4716.

Bandara LR, Buck VM, Zamanian M, Johnston LH, La Thangue NB. 1993. Functional synergy between DP-1 and E2F-1 in the cell cycle-regulating transcription factor DRTF1/E2F. *EMBO J*, 12:4317-24.

Baron U, Bujard H. 2000. Tet Repressor-Based System for Regulated Gene Expression in Eukaryotic Cells: Principles and Advances. *Methods in Enzymology*, 327: 401-421.

Bauer TW, Gutierrez M, Dudrick DJ. 2003. A human melanoma xenograft in a nude rat responds to isolated limb perfusion with TNF plus melphalan. *Surgery*, 133:420-8.

Bell LA, Ryan KM. 2004. Life and death decisions by E2F-1. *Cell Death and Differentiation*, 11: 137-142.

Bell LA, O'Prey J, Ryan KM. 2006. DNA-binding independent cell death from a minimal proapoptotic region of E2F-1. *Oncogene*, 25:5656-63.

Bouillet P, Strasser A. 2002. Bax and Bak: back-bone of T cell death. *Nat Immunol*, 3(10): 893-894.

Chudnovsky Y, Khavari PA, Adams AE. 2005. Melanoma genetics and the development of rational therapeutics. *The Journal of Clinical Investigation*, 115(4):813-824.

Crosby ME, Almasan A. 2004. Opposing roles of E2Fs in cell proliferation and death. *Cancer Biology & Therapy*, 3(12):1208-1211.

Danthinne X, Imperiale MJ. 2000. Production of first generation adenovirus vectors: a Review. *Gene Therapy*, 7: 1707-1714.

- DeGregori J, Leone G, Miron A, Jakoi L, Nevins JR. 1997. Distinct roles for E2F proteins in cell growth control and apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94: 7245-7250.
- Dong YB, Yang HL, Elliott MJ. 1999. Adenovirus-mediated E2F-1 gene transfer efficiently induces apoptosis in melanoma cells. *Cancer*, 86:2021-33.
- Dong YB, Yang HL, Elliott MJ, McMasters KM. 2002. Adenovirus-mediated E2F-1 gene transfer sensitizes melanoma cells to apoptosis induced by topoisomerase II inhibitors. *Cancer Res*, 62:1776-83.
- Dong YB, Phelps AM, Yang HL, Jamshidi-Parsian A, Chen C, Hao H, Gomez-Gutierrez JG, Zhou HS, McMasters KM. 2007. Induction of apoptosis signal-regulating Kinase 1 by E2F-1 may not be essential for E2F-1-mediated apoptosis in melanoma cells. *Tumour Biol*, 28:111-22.
- Dyson N. 1998. The regulation of E2F by pRB-family proteins. *Genes Dev*, 12: 2245-2262.
- Elliott MJ, Dong YB, Yang H, McMasters KM. 2001. E2F-1 up-regulates c-Myc and p14(ARF) and induces apoptosis in colon cancer cells. *Clin Cancer Res*, 7:3590-7.
- Evangelou K, Kotsinas A, Mariolis-Sapsakos T, Giannopoulos A, Tsantoulis PK, Constantinides C, Troupis TG, Salmas M, Kyroudis A, Kittas C, Gorgoulis VG. 2008. E2F-1 overexpression correlates with decreased proliferation and better prognosis in adenocarcinomas of Barrett oesophagus. *J Clin Pathol*, 61:601-5.
- Evans CH, Ghivizzani SC, Oligino TA, Robbins PD. 2001. Future of adenoviruses in the gene therapy of arthritis. Commentary. *Arthritis Res*, 3:142-146.
- Gossen M, Bujard H. 1992. Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 5547-5551.
- Greber UF, Willetts M, Webster P, Helenius A. 1993. Stepwise dismantling of adenovirus 2 during entry into cells. *Cell*, 5, 75(3): 477-86.

- Hanahan D, and Weinberg RA. 2000. The hallmarks of cancer. *Cell*, 100:57–70.
- Hershko T, Ginsberg D. 2004. Up-regulation of Bcl-2 homology 3 (BH3)-only proteins by E2F1 mediates apoptosis. *J Biol Chem*, 279(10): 8627-8634.
- Hsieh JK, Fredersdorf S, Kouzarides T, Martin K, Lu X. 1997. E2F-1-induced apoptosis requires DNA binding but not transactivation and is inhibited by the retinoblastoma protein through direct interaction. *Genes Dev*, 11:1840-1852.
- Itoshima T, Fujiwara T, Waku T. 2000. Induction of apoptosis in human esophageal cancer cells by sequential transfer of the wild-type p53 and E2F-1 genes: involvement of p53 accumulation via ARF-mediated MDM2 down-regulation. *Clin Cancer Res*, 6:2851-9.
- Jamshidi-Parsian A, Dong Y, Zheng X, Zhou HS, Zacharias W, McMasters KM. 2005. Gene expression profiling of E2F-1-induced apoptosis. *Gene*, 344:67-77.
- Johnson DG, Cress WD, Jakoi L, Nevins JR. 1994. Oncogenic capacity of the E2F1 gene. *Proc Natl Acad Sci USA*, 91:12823-7.
- Johnson DG, Schneider-Broussard R. 1998. Role of E2F in cell cycle control and cancer. *Frontiers in Bioscience*, 3: 447-458.
- Kabeya Y, Mizushima N, Ueno T, Yamamoto A, Kirisako T, Noda T. 2000. LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. *EMBO J*, 19: 5720–5728.
- Ketteler R, Seed B. 2008. Quantitation of autophagy by luciferase release assay. *Autophagy*, 4:801-6.
- Ketteler R, Sun Z, Kovacs KF, He WW, Seed B. 2008. A pathway sensor for genome-wide screens of intracellular proteolytic cleavage. *Genome Biol*, 9:R64.

Klionsky DJ, Abeliovich H, Agostinis P, Agrawal DK, Aliev G, Askew DS, Baba M, Baehrecke EH, Bahr BA, Ballabio A, Bamber BA, Bassham DC, Bergamini E, Bi X, Biard-Piechaczyk M, Blum JS, Bredesen DE, Brodsky JL, Brumell JH, Brunk UT, Bursch W, Camougrand N, Cebollero E, Cecconi F, Chen Y, Chin LS, Choi A, Chu CT, Chung J, Clarke PG, Clark RS, Clarke SG, Clave C, Cleveland JL, Codogno P, Colombo MI, Coto-Montes A, Cregg JM, Cuervo AM, Debnath J, Demarchi F, Dennis PB, Dennis PA, Deretic V, Devenish RJ, Di Sano F, Dice JF, Difulgia M, Dinesh-Kumar S, Distelhorst CW, Djavaheri-Mergny M, Dorsey FC, Droge W, Dron M, Dunn WA, Jr., Duszenko M, Eissa NT, Elazar Z, Esclatine A, Eskelinen EL, Fesus L, Finley KD, Fuentes JM, Fueyo J, Fujisaki K, Galliot B, Gao FB, Gewirtz DA, Gibson SB, Gohla A, Goldberg AL, Gonzalez R, Gonzalez-Estevez C, Gorski S, Gottlieb RA, Haussinger D, He YW, Heidenreich K, Hill JA, Hoyer-Hansen M, Hu X, Huang WP, Iwasaki A, Jaattela M, Jackson WT, Jiang X, Jin S, Johansen T, Jung JU, Kadowaki M, Kang C, Kelekar A, Kessel DH, Kiel JA, Kim HP, Kimchi A, Kinsella TJ, Kiselyov K, Kitamoto K, Knecht E, Komatsu M, Kominami E, Kondo S, Kovacs AL, Kroemer G, Kuan CY, Kumar R, Kundu M, Landry J, Laporte M, Le W, Lei HY, Lenardo MJ, Levine B, Lieberman A, Lim KL, Lin FC, Liou W, Liu LF, Lopez-Berestein G, Lopez-Otin C, Lu B, Macleod KF, Malorni W, Martinet W, Matsuoka K, Mautner J, Meijer AJ, Melendez A, Michels P, Miotto G, Mistiaen WP, Mizushima N, Mograbi B, Monastyrska I, Moore MN, Moreira PI, Moriyasu Y, Motyl T, Munz C, Murphy LO, Naqvi NI, Neufeld TP, Nishino I, Nixon RA, Noda T, Nurnberg B, Ogawa M, Oleinick NL, Olsen LJ, Ozpolat B, Paglin S, Palmer GE, Papassideri I, Parkes M, Perlmutter DH, Perry G, Piacentini M, Pinkas-Kramarski R, Prescott M, Proikas-Cezanne T, Raben

- N, Rami A, Reggiori F, Rohrer B, Rubinsztein DC, Ryan KM, Sadoshima J, Sakagami H, Sakai Y, Sandri M, Sasakawa C, Sass M, Schneider C, Seglen PO, Seleverstov O, Settleman J, Shacka JJ, Shapiro IM, Sibirny A, Silva-Zacarin EC, Simon HU, Simone C, Simonsen A, Smith MA, Spanel-Borowski K, Srinivas V, Steeves M, Stenmark H, Stromhaug PE, Subauste CS, Sugimoto S, Sulzer D, Suzuki T, Swanson MS, Tabas I, Takeshita F, Talbot NJ, Talloczy Z, Tanaka K, Tanida I, Taylor GS, Taylor JP, Terman A, Tettamanti G, Thompson CB, Thumm M, Tolkovsky AM, Tooze SA, Truant R, Tumanovska LV, Uchiyama Y, Ueno T, Uzcategui NL, van der Klei I, Vaquero EC, Vellai T, Vogel MW, Wang HG, Webster P, Wiley JW, Xi Z, Xiao G, Yahalom J, Yang JM, Yap G, Yin XM, Yoshimori T, Yu L, Yue Z, Yuzaki M, Zabirnyk O, Zheng X, Zhu X, Deter RL. 2008. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy in higher eukaryotes. *Autophagy*, 4:151-75.
- Klionsky DJ, Emr SD. 2000. Autophagy as a regulated pathway of cellular degradation. *Science*, 290:1717-21.
- Kuhn H, Liebers U, Gessner C. 2002. Adenovirus-mediated E2F-1 gene transfer in nonsmall-cell lung cancer induces cell growth arrest and apoptosis. *Eur Respir J*, 20:703-9.
- Muller H, Bracken AP, Vernell R, Moroni MC, Christians F, Grassilli E, Prosperini E, Vigo E, Oliner JD, Helin K. 2001. E2Fs regulate the expression of genes involved in differentiation, development, proliferation and apoptosis. *Genes Dev.*, 15: 267–285.
- Nahle Z, Polakoff J, Davuluri RV, McCurrach ME, Jacobson MD, Narita M, Zhang MQ, Lazebnik Y, Bar-Sagi D, Lowe SW. 2002. Direct coupling of the cell cycle and cell death machinery by E2F. *Nat Cell Biol*, 4: 859-864.

National Cancer Institute

Nestle M, and Carol H. 2003. Melanoma. In *Dermatology*. J. Bologna, J. Jorizzo, R. Rapini, editors. Mosby. New York, New York, USA. 1789–1815.

Organización Mundial de la Salud (OMS).

Phillips AC, Bates S, Ryan KM, Helin K, Vousden KH. 1997. Induction of DNA synthesis and apoptosis are separable functions of E2F-1. *Genes Dev*, 11(14):1853-63.

Phillips AC, Ernst MK, Bates S, Rice NR, Vousden KH. 1999. E2F-1 potentiates cell death by blocking antiapoptotic signaling pathways. *Molecular Cell*, 4(5):771-81.

Pierce AM, Schneider-Broussard R, Gimenez-Conti IB, Russell JL, Conti CJ, Johnson DG. 1999. E2F1 has both oncogenic and tumor-suppressive properties in a transgenic model. *Mol Cell Biol*, 19: 6408-6414.

Polager S, Ofir M, Ginsberg D. 2008. E2F1 regulates autophagy and the transcription of autophagy genes. *Oncogene*, 27:4860-4864.

Powers JT, Hong S, Mayhew CN, Rogers PM, Knudsen ES, Johnson DG. 2004. E2F1 uses the ATM signaling pathway to induce p53 and Chk2 phosphorylation and apoptosis. *Mol Cancer Res*, 2: 203-214.

Rogoff HA, Pickering MT, Debatis ME, Jones S, Kowalik TF. 2002. E2F1 induces phosphorylation of p53 that is coincident with p53 accumulation and apoptosis. *Mol Cell Biol*, 22: 5308-5318.

Sala A, Nicolaidis NC, Engelhard A, Bellon T, Lawe DC, Arnold A, Grana X, Giordano A, Calabretta B. 1994. Correlation between E2F-1 requirement in the S phase and E2F-1 transactivation of cell cycle-related genes in human cells. *Cancer Res*, 54:1402-6.

Skin Cancer Foundation

- Shan B, Lee WH. 1994. Deregulated expression of E2F-1 induces S-phase entry and leads to apoptosis. *Mol Cell Biol*, 14:8166-73.
- Stanelle J, Stiewe T, Theseling CC, Peter M, Putzer BM. 2002. Gene expression changes in response to E2F1 activation. *Nucleic Acids Res*, 30: 1859-1867.
- Tanida I, Minematsu-Ikeguchi N, Ueno T, Kominami E. 2005. Lysosomal turnover, but not a cellular level, of endogenous LC3 is a marker for autophagy. *Autophagy*, 1:84-91.
- Tracy K, Dibling BC, Spike BT, Knabb JR, Schumacker P, Macleod KF. 2007. BNIP3 is an RB/E2F target gene required for hypoxia-induced autophagy. *Mol Cell Biol*, 27:6229-42.
- Xie Y, Wang C, Li L, Ma Y, Yin Y, Xiao Q. 2009. Overexpression of E2F-1 inhibits progression of gastric cancer in vitro. *Cell Biol Int*, 33:640-9.
- Xu G, Livingston DM, Krek W. 1995. Multiple members of the E2F transcription factor family are the products of oncogenes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 92:1357-61.
- Yang XH, Sladek TL. 1995. Overexpression of the E2F-1 transcription factor gene mediates cell transformation. *Gene Expr*, 4:195-204.
- Yousefi S, Perozzo R, Schmid I, Ziemiecki A, Schaffner T, Scapozza L. 2006. Calpain-mediated cleavage of Atg5 switches autophagy to apoptosis. *Nat Cell Biol*, 8: 1124–1132.

Cancer

Adenovirus-mediated Expression of Truncated E2F-1 Suppresses Tumor Growth *in vitro* and *in vivo*

Journal:	Cancer
Manuscript ID:	CNCR-09-2186
Wiley - Manuscript type:	Original Article
Date Submitted by the Author:	16-Sep-2009
Complete List of Authors:	Gomez-Gutierrez, Jorge; University of Louisville, of Surgery Garcia-Garcia, Aracely; University of Louisville, Surgery; Universidad Autonoma de Nuevo Leon, Histologia Hao, Hongying; University of Louisville, Surgery Rao, Xiao-Mei; University of Louisville, Surgery Montes de Oca Luna, Roberto; Universidad Autonoma de Nuevo Leon, Histologia Zhou, H. Sam; University of Louisville, James Brown Cancer Center McMasters, Kelly; University of Louisville, Surgery
Keywords:	Adenovirus, E2F-1, truncated, apoptosis, cancer



09-Feb-2010

Dear Dr. Gomez-Gutierrez,

I am pleased to inform you that "Adenovirus-mediated Expression of Truncated E2F-1 Suppresses Tumor Growth *in vitro* and *in vivo*" (CNCR-09-2186.R1) has been accepted for publication in Cancer.

Once your manuscript has been processed and sent to the publisher, you will receive e-mail page proofs directly from the publisher at Wiley.

In order to ensure smooth processing of your proofs, please take a moment to log in to your ScholarOne Manuscripts account at <http://mc.manuscriptcentral.com/cancer> and confirm that your contact information is up-to-date.

We look forward to the publication of your article in the journal and hope you will consider us for future submissions.

Thank you for your contribution.

Sincerely,

Raphael E. Pollock, MD, PhD
Editor-in-Chief, Cancer
canceredoff@cancer.org

Adenovirus-mediated Expression of Truncated E2F-1 Suppresses Tumor Growth *in vitro* and *in vivo*

Running title: Truncated E2F-1 cancer gene therapy

Jorge G. Gomez-Gutierrez Ph.D ¹, Aracely Garcia-Garcia M.Sc ^{1,4}, Hongying Hao Ph.D ¹, Xiao-Mei Rao M.D ², Roberto Montes de Oca-Luna⁴, Heshan Sam Zhou Ph.D ^{1,2,3}, Kelly M. McMasters M.D, Ph.D ^{1,2, *}

¹ Department of Surgery, ² James Graham Brown Cancer Center, and ³ Department of Microbiology and Immunology, University of Louisville School of Medicine, Louisville, Kentucky (USA). ⁴ Departamento de Histología, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, N.L., (Mex).

* Correspondence to K. M. M.: Dr. Kelly M. McMasters, Department of Surgery, University of Louisville, Louisville, KY 40292 USA, Tel: +1 502 852 5447, Fax: +1 502 852 1704. Email: mcmasters@louisville.edu

This work was supported by Award Numbers R01CA129975 (HSZ) and R01CA90784 (KMM) from the National Cancer Institute and GMB081410 (KMM & HSZ) and G030983 (HSZ) from the Kentucky Lung Cancer Research Program. AGG is recipient of a scholarship from the National Council of Science and Technology (CONACYT) of Mexico. We thank to Chuanlin Ding for Annexin V analysis, and Andrew Marsh and Margaret Abby for editing.

RESUMEN CURRICULAR

Aracely García García

Candidato para el Grado de

Doctor en Ciencias con Orientación Terminal en Morfología

Tesis: ANÁLISIS DEL EFECTO AUTOFÁGICO DE LA PROTEÍNA E2F-1 TRUNCADA EN CÉLULAS DE MELANOMA HUMANO

Campo de Estudio: Morfología

Datos Personales: Nacida en Monterrey, Nuevo León el 24 de Marzo de 1978, hija de Rafael Abel García Leal y María de Jesús García Coronado.

Educación: Egresada de la Facultad de Ciencias Biológicas, de la Universidad Autónoma de Nuevo León, grado obtenido de Biólogo en el 2001. Egresada del Posgrado de la Facultad de Ciencias Biológicas, de la Universidad Autónoma de Nuevo León, grado obtenido de Maestro en Ciencias con Especialidad en Microbiología en el 2005.

Experiencia Profesional: Profesionista de apoyo de la Unidad de Manipulación Genética, de la Facultad de Ciencias Biológicas, de la Universidad Autónoma de Nuevo León del 2002-2004, Profesionista en el Laboratorio de Biología Molecular en el Comité para el Fomento y Protección Pecuaria del Estado de Nuevo León, A.C. del 2004-2006. Research Fellow en la Universidad de Louisville, en Louisville, KY, del 2007-2010.