

FRECUENCIA DE ISOFORMAS DE GKN1 EN PACIENTES CON GASTRITIS CRÓNICA Y CÁNCER GÁSTRICO

Merlin Itsel Cruz de la Rosa^a, Javier Florencio Martínez Santiago^a, Francisco Israel Torres Rojas^b, Julio Ortiz Ortiz^b, Berenice Illades Aguiar^b, Adolfo Román Román^c, Gloria Fernández Tilapa^a, Hilda Jiménez Wences^a, Dinorah Nashely Martínez Carrillo^a†.

^a Laboratorio de Investigación Clínica,

itsel_cruz@hotmail.com, jams_9512@hotmail.com, gferti@hotmail.com,
hjimenez@uagro.mx,

^b Laboratorio de Biomedicina Molecular,

trisrael@yahoo.com.mx, julioortiz771210@gmail.com, billades@uagro.mx,

^c Laboratorio de Investigación en Bacteriología,

arroman6046@gmail.com,

Facultad de Ciencias Químico Biológicas-Universidad Autónoma de Guerrero.
Chilpancingo, Guerrero.

† Autor de correspondencia: dinomtzcar@outlook.com

RESUMEN

Gastroquina 1 (GKN1), contiene un dominio BRICHOS, un segmento COOH-terminal y una región NH₂-terminal hidrofóbica. Se ha reportado la presencia de dos isoformas de GKN1, las cuales difieren en el primer aminoácido de la región NH₂-terminal, GKN1-D y GKN1-N. La isoforma que contiene asparagina (GKN1-N) se ha encontrado disminuida e incluso ausente en muestras de pacientes positivos a *Helicobacter pylori* (*H. pylori*). El objetivo de este trabajo fue analizar la frecuencia de las isoformas de GKN1 en muestras de pacientes con gastritis crónica y cáncer gástrico. No se encontraron mutaciones en la posición 2971, (N → D), sin embargo, en siete muestras se localizó una mutación de A → T en la región 2967. En conclusión, la isoforma GKN1-N fue la más frecuentemente encontrada en los grupos de estudio. Se identificó una mutación que no involucra un cambio aminoacídico.

Palabras claves: Gastroquina 1, Región NH₂-terminal hidrofóbica, Isoformas.

ABSTRACT

Gastrokeine 1 (GKN1), contains a BRICHOS domain, a COOH-terminal segment and a NH₂-terminal hydrophobic region. The presence of two isoforms of GKN1 have been reported, which differ in the first amino acid of the NH₂-terminal region, GKN1-D and GKN1-N. The isoform containing asparagine (GKN1-N) has been found diminished and even absent in samples of patients positive for *Helicobacter pylori* (*H. pylori*). The objective of this work was to analyze the frequency of GKN1 isoforms in samples from patients with chronic gastritis and gastric cancer. No mutations were found at position 2971, (N → D), however, in seven samples an A → T mutation was located in the 2967 region. In conclusion, the GKN1-N isoform was the most frequently found in the groups study. A mutation was identified that does not involve an amino acid change.

Keywords: Gatrokine1; NH₂-terminal hydrophobic region; Isoforms

1. INTRODUCCIÓN

GKN1 es importante para mantener la función fisiológica de la mucosa gástrica. Se ha reportado que, en tejidos de cáncer gástrico y lesiones precancerosas, tales como metaplasia intestinal hay pérdida de la expresión de GKN1 [5], y que en líneas celulares de cáncer gástrico su sobreexpresión induce apoptosis, sugiriendo un posible papel de la proteína como un supresor de tumor [1,6]. GKN1 pertenece a la superfamilia de proteínas con dominio BRICHOS y se le ha atribuido la regulación de células epiteliales gástricas infectadas por *H. pylori* [6]. Por otra parte, GKN1 juega un papel importante en la progresión de los cánceres gástricos esporádicos a través de la inhibición de la EMT y la migración de células cancerosas [7].

La proteína y el ARNm de GKN1 se localizan en las células mucosas superficiales del antro y el fondo gástrico en humanos. GKN1, contiene un dominio BRICHOS, un segmento COOH-terminal y una región NH₂-terminal hidrofóbica que actúa como péptido señal y/o de anclaje transmembranal [2,4]. Se han identificado dos isoformas de GKN1 que solo difieren en el aminoácido asparagina (N) por ácido aspártico (D) en el codón 13 del dominio NH₂-terminal. La implicación funcional de estas dos isoformas no se ha establecido. Sin embargo, la isoforma con N se encuentra en abundancia en estómago libre de enfermedad, mientras que en los individuos infectados por *H. pylori* la isoforma predominante es la isoforma con D. Estas dos isoformas de GKN1 podrían desempeñar papeles diferenciales en la respuesta al daño de la mucosa gástrica por *H. pylori* [3,5]. El objetivo de esta investigación fue analizar la frecuencia de las isoformas de GKN1 en muestras de pacientes con gastritis crónica y cáncer gástrico.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

Muestras

Se seleccionaron 30 muestras del Biobanco de DNA del Laboratorio de Investigación Clínica, obtenidas de pacientes originarios del Estado de Guerrero con diagnóstico endoscópico e histopatológico de gastritis crónica y cáncer gástrico y de personas asintomáticas, con resultado de la identificación de *H. pylori*.

Amplificación de la secuencia del gen que codifica la región NH₂-terminal de GKN1

La amplificación de la secuencia que codifica la región NH₂-terminal de GKN1, se realizó mediante PCR punto final, bajo las siguientes condiciones de reacción: 5Ul de Amplitaq Gold Master Mix (Applied Biosystems, MA, USA), 1pM de cada iniciador (F 5'-GAT TGT CTT TGC TGG ACT TCT T-3'; R 5'-GCA CGT TGA CTA CCT ACA TTT C-'), 100 ng de DNA, en un volumen final de 15µL. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes; desnaturalización inicial a 95°C por 10 min, 40 ciclos de desnaturalización a 95°C por 30 seg, alineamiento a 53.4°C por 30 seg, extensión a 72°C por 30 seg y un paso de extensión final a 72°C por 7 min. Se incluyó un control negativo en el que se sustituyó el

DNA por agua desionizada estéril, los productos de PCR fueron sometidos a electroforesis en gel de agarosa al 1.5% y visualizados con luz UV en un trasluminador M-20E (UVP, CA, USA) observándose una banda de 230pb (Figura. 1A).

Análisis de la secuencia del gen que codifica para la región NH₂-terminal de GKN1

Para realizar el análisis de la secuencia del gen que codifica la región NH₂-terminal de GKN1 el producto de PCR fue marcado utilizando el kit BIG DYE Terminator 3.1 (Applied Biosystems, UK, USA) utilizando las condiciones de reacción sugeridas por el fabricante. Las condiciones de marcaje fueron las siguientes; desnaturalización inicial de 95°C por 5 min, seguido de 25 ciclos de desnaturalización a 95°C por 30 seg, alineamiento a 51°C por 15 seg, extensión a 60°C por 3 min y una elongación final a 60°C por 10 min, posteriormente el producto fue purificado mediante el método de purificación manual con isopropanol al 75% y resuspendido en 20 µL de Hi-Di Formamida (Applied Biosystems, MA, USA) para su posterior secuenciación en el ABI PRISM 310 GENETIC ANALYZER (Applied Biosystems, CA, USA). El electroferograma de la secuencia obtenida fue analizado en el software Finch TV y alineada en el software online LALIGN (https://embnet.vital-it.ch/software/LALIGN_form.html), con la secuencia de referencia del gen *GKN1* (NC_000002.12) para identificar la presencia de mutaciones en la secuencia del gen que codifica para la región NH₂-terminal.

3. RESULTADOS

El 60% de los pacientes incluidos en el estudio fueron mujeres y el 40% hombres, 40% de los pacientes refirieron ser fumadores y el 66.6% consumidores de alcohol. La edad de los participantes fue de entre 20 y 90 años. Las características generales de la población estudiada se muestran en la tabla 1. Previamente los participantes de este estudio fueron diagnosticados con la infección de *H. pylori* mediante detección de anticuerpos o PCR (Figura 2).

Tabla 1. Características generales de personas asintomáticas y pacientes con gastritis crónica y cáncer gástrico

Características	Asintomáticos		Gastritis crónica		Cáncer gástrico	
	n = 10	%	n = 10	%	n = 10	%
Edad						
< 20 años			1	10		
20-40 años	9	90	1	10	3	30
41-60 años	1	10	3	30	1	10
61-80 años			5	50	5	50
81-90 años					1	10
Género						
Femenino	6	60	6	60	6	60
Masculino	4	40	4	40	4	40
Escolaridad						
Sin estudio	1	10			4	40
Primaria			3	30	5	50
Secundaria	1	10	2	20		

Bachillerato	6	60	1	10		
Licenciatura y más	2	20	2	20		
Sin dato			2	20	1	10
Antecedentes familiares						
Sí	6	60	3	30	5	50
No	4	40	7	70	5	50
Fuma						
Si	6	60	3	30	3	30
No	4	40	7	70	7	70
Alcohol						
Si	9	90	8	80	3	30
No	1	10	2	20	7	70
Café						
Si	4	40	8	80	9	90
No	6	60	2	20	1	10
Refresco						
Si	10	100	7	70	7	70
No	0	0	1	10	3	30
Sin dato			2	20		

Identificación de mutaciones y frecuencia de las isoformas de GKN1

El análisis de las secuencias de las muestras incluidas en el estudio permitió la identificación de una mutación en la posición 2,967 que implica un cambio de A por T en 7 muestras; 4 de personas asintomáticas, 2 de gastritis crónica y 1 de cáncer gástrico (Figura. 1C y Figura 3). En la población analizada no se observaron cambios nucleotídicos en el codón AAC de la región NH₂-terminal de GKN1 (Figura 1B y 1C) encontrando por lo tanto que la isoforma predominante en esta población fue la GKN1-N (Figura.3).

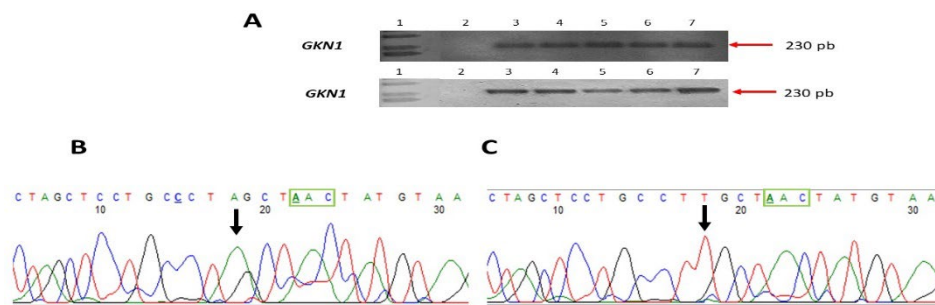


Figura 1. Amplificación y secuencias de GKN1. A) Electroforesis de los productos de PCR en gel de agarosa al 1.5%; Carril 1: marcador de peso molecular, Carril 2: control negativo, Carril 3-7 banda de 230 pb correspondiente a la secuencia amplificada de GKN1. B) Electroferograma de muestra clínica en la que no se encontraron mutaciones, se puede observar que no hay cambios en la secuencia de la región NH₂-terminal de GKN1. C) Electroferograma de muestra con mutación, se puede observar el cambio A→T en la posición 2967, marcado con la flecha negra. Cuadrado verde: Indica el codón AAC que codifica para N (no se observan cambios).

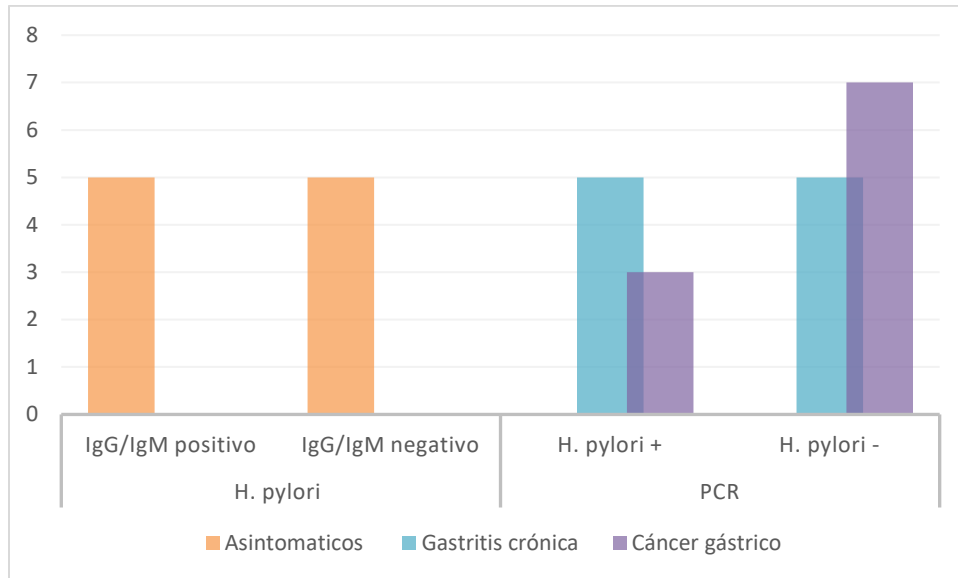


Figura 2. Diagnóstico de *H. pylori* en la población estudiada. Se muestra el diagnóstico de la población estudiada; asintomáticos (Diagnóstico serológico; IgG e IgM); pacientes con gastritis crónica y cáncer gástrico (Diagnóstico molecular, mediante PCR).

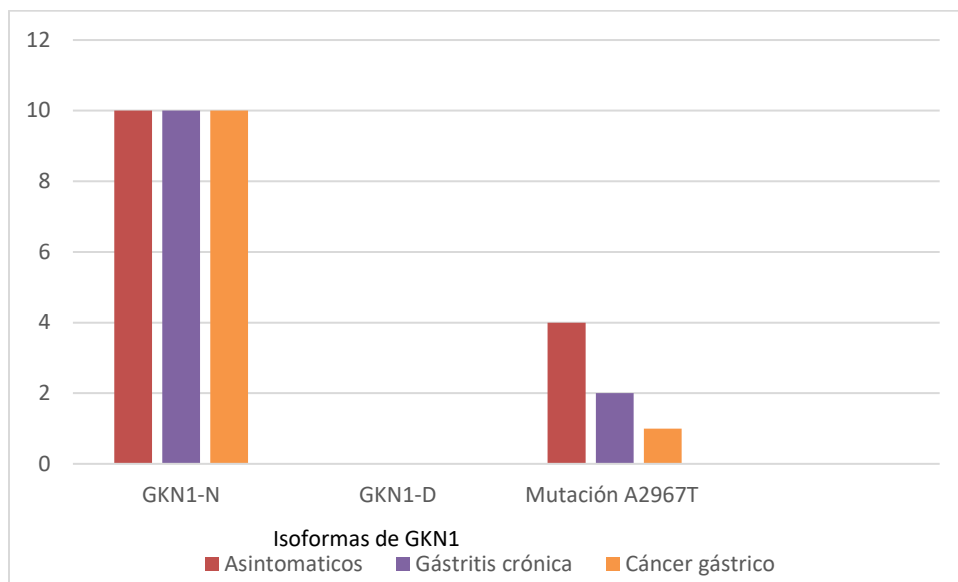


Figura 3. Isoformas y mutaciones de GKN1. Se muestra la frecuencia de la isoforma GKN1-N y GKN1-D en las muestras analizadas, así como la frecuencia de la mutación en la posición 2,967 de GKN.

4. CONCLUSIÓN

La isoforma GKN1-N fue la más frecuentemente encontrada en pacientes con gastritis crónica, cáncer gástrico y personas asintomáticas. Se identificó una mutación en la posición 2967 (A→T), la cual no involucra un cambio aminoacídico. Sin embargo, es posible que esta mutación provoque cambios en la proteína, debido a esto es necesario realizar estudios que analicen el efecto de esta mutación sobre la función de GKN1.

AGRADECIMIENTOS

La investigación se realizó con financiamiento otorgado por el CONACyT Convocatoria Ciencia Básica CB-2015-01 y por la Secretaría de Educación Pública, a través del programa para el Apoyo a la incorporación de nuevos/as profesores/as de tiempo completo, convocatoria 2017.

5. BIBLIOGRAFÍA

- [1] Altieri, F., Di Stadio, C. S., Federico, A., Miselli, G., De Palma, M., Rippa, E. and Arcari, P., “Epigenetic alterations of gastrokine 1 gene expression in gastric cancer”, *Oncotarget*. 8, 16899-16911 (2017).
- [2] Hedlund, J., Johansson, J. and Persson, B. “BRICHOS - a superfamily of multidomain proteins with diverse functions”, *BMC Res Notes*. 2, 180 (2009).
- [3] Menheniott, T. R., Kurklu, B. and Giraud, A. S., “Gastrokines: stomach-specific proteins with putative homeostatic and tumor suppressor roles”, *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 304, G109-21 (2013).
- [4] Menheniott, T. R., Peterson, A. J., O'connor, L., Lee, K. S., Kalantzis, A., Kondova, I., Bontrop, R. E., Bell, K. M. and Giraud, A. S., “A novel gastrokine, Gkn3, marks gastric atrophy and shows evidence of adaptive gene loss in humans”, *Gastroenterology*. 138, 1823-35 (2010).
- [5] Nardone, G., Rippa, E., Martin, G., Rocco, A., Siciliano, R. A., Fiengo, A., Cacace, G., Malorni, A., Budillon, G. and Arcari, P., “Gastrokine 1 expression in patients with and without *Helicobacter pylori* infection”, *Dig Liver Dis*. 39, 122-9 (2007).
- [6] Yoon, J. H., Choi, Y. J., Choi, W. S., Nam, S. W., Lee, J. Y. and Park, W. S., “Functional analysis of the NH₂-terminal hydrophobic region and BRICHOS domain of GKN1”, *Biochem Biophys Res Commun*. 440, 689-95 (2013).
- [7] Yoon, J. H., Kang, Y. H., Choi, Y. J., Park, I. S., Nam, S. W., Lee, J. Y., Lee, Y. S. and Park, W. S., “Gastrokine 1 functions as a tumor suppressor by inhibition of epithelial-mesenchymal transition in gastric cancers”, *J Cancer Res Clin Oncol*. 137, 1697-704 (2011).