

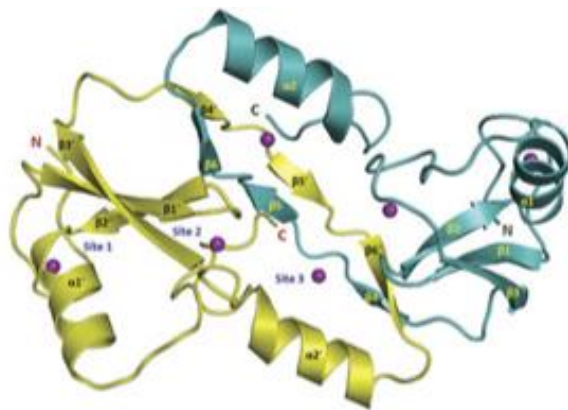
Máster en Biología Molecular, Celular y Genética

## Memoria del Trabajo de Fin de Máster

**Búsqueda de nuevos reguladores de la expresión de  
la E3 ubiquitina-ligasa Hakai**

**Búsqueda de novos reguladores da expresión da E3  
ubiquitina-ligasa Hakai**

**Search for new regulators of E3 ubiquitin-ligase Hakai**



**Marta Pardo Piñón**

Julio, 2018

*Directoras: Angélica Figueroa Conde-Valvís*

*Olaia Martínez Iglesias*

La Dra. Angélica Figueroa Conde-Valvis, directora del grupo de investigación de Plasticidad Epitelial y Metástasis del Instituto de Investigación Biomédica de A Coruña (INIBIC) y la Dra. Olaia Martínez Iglesias, investigadora postdoctoral en el mismo grupo, autorizan la presentación del Trabajo de Fin de Máster “Búsqueda de nuevos reguladores de la expresión de la E3 ubiquitina-ligasa Hakai” presentado por Marta Pardo Piñón para su defensa ante el tribunal calificador.

En A Coruña a 18 de Julio del 2018

**FIGUEROA  
CONDE-VALVIS  
ANGELICA -  
52988974X**

Firmado digitalmente  
por FIGUEROA CONDE-  
VALVIS ANGELICA -  
52988974X  
Fecha: 2018.07.16  
12:58:26 +02'00'

Dra. Angélica Figueroa Conde-Valvis  
Group Leader  
Epithelial Plasticity and Metastasis Group  
INIBIC-CHUAC

Dra. Olaia Martínez Iglesias  
Postdoctoral Fellow  
Epithelial Plasticity and Metastasis Group  
INIBIC-CHUAC

Asdo: Marta Pardo Piñón

## **AGRADECIMIENTOS**

En primer lugar, quisiera dar las gracias a mi tutora Angélica por abrirme las puertas de su grupo de investigación y confiar en mí desde el primer momento para llevar a cabo este trabajo. Quisiera agradecerle también su dedicación, su seguimiento y su entera disposición a lo largo de todo el año y más aún en la recta final, cuando la fecha de entrega se acerca y surgen las dudas de última hora.

Quisiera agradecerle también a Olaia su entrega para enseñarme todas las técnicas que he aprendido a lo largo de todo este año y darme autonomía a la hora de desenvolverme en el laboratorio. Además, quisiera agradecerle especialmente su apoyo en los momentos de frustración, cuando los resultados obtenidos no son los esperados y las dudas comenzaban a acumularse en mi cabeza.

A mis compañeros de laboratorio, Andrea, Alba, Dani y Giovanni, gracias por dedicar buena parte de vuestro tiempo en enseñarme, ayudarme y resolver todas mis dudas. Aun cuando vuestra agenda acumulaba mil cosas que hacer, nunca habéis dudado un solo momento en tenderme la mano para todo lo que fuese necesario y resolver mis pequeños desperfectos. Pero el gracias más grande de todos, es por haberme integrado en el grupo desde el primer día y hacer que me sintiese cómoda trabajando con vosotros. Muchísimas gracias por ello.

Por último, gracias a mis padres y a mi hermana por apoyarme tanto en los momentos buenos como en los no tan buenos. Pero más aún, por haberme dado la libertad de elegir mi propio camino y hacer de mí una persona tremendamente feliz y agradecida con lo que tiene.

## ÍNDICE

<b>1. RECOPIACIÓN DE ABREVIATURAS.....</b>	<b>04</b>
<b>2. RESÚMENES.....</b>	<b>05</b>
<b>3. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>08</b>
3.1. Vías de señalización y su implicación en la progresión tumoral.....	08
3.1.1. Factor de crecimiento epidérmico (EGF).....	09
3.1.2. Factor de crecimiento de hepatocitos (HGF).....	10
3.1.3. Factor de crecimiento transformante (TGF $\beta$ ).....	11
3.2. Transición epitelio a mesénquima (TEM).....	12
3.3. La transición epitelio a mesénquima durante la progresión tumoral.....	13
3.3.1. Transición epitelio a mesénquima: E-cadherina.....	14
3.3.2. Transición epitelio a mesénquima: E3 ubiquitina-ligasa Hakai.....	16
<b>4. OBJETIVOS.....</b>	<b>17</b>
<b>5. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>18</b>
5.1. Anticuerpos y materiales.....	18
5.2. Líneas celulares y cultivo celular.....	18
5.2.1. Tratamiento de los cultivos.....	18
5.3. Western Blotting.....	19
5.3.1. Extracción de proteínas de células en cultivo.....	19
5.3.2. Cuantificación de la concentración de proteínas por el método de BCA.....	20
5.3.3. Preparación de las muestras.....	20
5.3.4. Preparación de los geles de poliacrilamida con SDS.....	20
5.3.5. Electroforesis en gel de acrilamida con SDS (SDS-PAGE).....	21
5.3.6. Transferencia de las proteínas del gel a la membrana.....	21
5.3.7. Inmunodetección.....	22
5.4. Extracción de ARN y PCR cuantitativa a tiempo real.....	22
5.4.1. Extracción de ARN.....	22
5.4.2. Realización de la retrotranscripción (RT).....	23
5.4.3. PCR cuantitativa a tiempo real.....	24
5.5. Inmunofluorescencia.....	25

5.5.1. Fijación de las células.....	25
5.5.2. Incubación con los anticuerpos y el colorante nuclear.....	25
5.5.3. Visualización de la inmunofluorescencia.....	26
<b>6. RESULTADOS.....</b>	<b>26</b>
6.1. Análisis de los cambios fenotípicos inducidos por EGF, HGF y TGF $\beta$ en la línea celular LoVo.....	27
6.2. Efecto del tratamiento con EGF, HGF y TGF $\beta$ sobre los niveles de expresión de Hakai en la línea celular LoVo.....	28
6.3. Análisis de los cambios fenotípicos inducidos por EGF y HGF en la línea celular HT-29.....	31
6.4. Efecto del tratamiento con EGF y HGF sobre los niveles de expresión de Hakai en la línea celular HT-29.....	31
6.5. Efecto de EGF y HGF sobre la localización celular de Hakai en la línea celular HT-29.....	32
6.6. Análisis del efecto de EGF y HGF sobre los niveles de ARN mensajero en la línea celular HT-29.....	33
6.7. Efecto de EGF y HGF sobre los niveles de expresión de Hakai en la línea celular HT-29 con menor concentración de suero.....	34
<b>7. DISCUSIÓN.....</b>	<b>35</b>
<b>8. CONCLUSIONES.....</b>	<b>37</b>
<b>9. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>37</b>

## 1. RECOPIACIÓN DE ABREVIATURAS

A: amperios

ADNc: ácido desoxirribonucleico  
complementario

ARN: ácido ribonucleico

ARNm: ácido ribonucleico mensajero

BCA: ácido bicinconínico

BSA: albúmina sérica bovina

CRC: cáncer colorrectal

CREB: *c-AMP response element-binding*

CT: carboxilo terminal

DAPI: diamidino-fenil-indol

DMSO: dimetil sulfóxido

EGF: factor de crecimiento epitelial

EGFR: receptor del factor de crecimiento  
epitelial

FBS: suero fetal bovino

GAPDH: gliceraldehido-3-fosfato  
deshidrogenasa

HGF: factor de crecimiento de hepatocitos

HYB: *Hakai pTyr-binding*

HRP: peroxidasa de rábano

HRS: sustrato de tirosina quinasa regulado  
por el factor de crecimiento de hepatocitos

IAP: proteína inhibidora de la apoptosis

JAK: janus quinasa

mTOR: *mammalian Target of Rapamycin*

PBS: tampón fosfato salino

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

PFA: paraformaldehido

PMSF: fenilmetilsulfonil fluoruro

pTyr: fosfotirosina

PVDF: fluoruro de polivinilideno

rpm: revoluciones por minuto

RTK: receptor tirosina quinasa

RT-PCR: PCR a tiempo real

RT-qPCR: PCR cuantitativa a tiempo real

SDS: dodecilsulfato sódico

SDS-PAGE: electroforesis en gel de  
poliacrilamida con dodecilsulfato sódico

STAT: señal de transducción y activación  
de la transcripción

TBS-T: *tris-buffered saline tween*

TEM: transición epitelio a mesénquima

TGF- $\beta$ : factor de crecimiento  
transformante beta

TME: transición mesénquima a epitelio

TK: tirosina quinasa

V: voltios

## RESUMEN

El cáncer engloba un conjunto de enfermedades que se originan a partir de alteraciones genéticas que dan lugar a la transformación progresiva de células normales en células cancerosas malignas. Entre ellas, los carcinomas son el tipo de cáncer más frecuente de todos. Estos afectan a las células epiteliales, que pierden sus características epiteliales y adquieren un fenotipo mesenquimal e invasivo, dando lugar a la formación de metástasis. En las primeras etapas de la metástasis tiene lugar la activación del programa de transición epitelio a mesénquima (TEM), un conjunto de procesos biológicos que conducen a la transición de células epiteliales inmóviles hacia células mesenquimales con capacidad de migración e invasión de nuevos tejidos. Durante la TEM, la E3 ubiquitina-ligasa Hakai actúa como regulador posttraduccional de la estabilidad de la E-cadherina presente en las uniones adherentes célula-célula, siendo responsable de su endocitosis y degradación vía lisosomas y promoviendo así el desensamblaje de estas uniones intercelulares y la consiguiente diseminación de las células cancerosas hacia nuevos tejidos a través del torrente circulatorio.

El objetivo del presente trabajo consiste en estudiar el efecto de diferentes factores de crecimiento, como son EGF, HGF y TGF $\beta$ , sobre la activación de la TEM y determinar si dicha regulación puede ser mediada a través de la regulación posttraduccional de E-cadherina por Hakai. Para ello, se trataron dos líneas tumorales de colon, LoVo y HT29, con los tres estímulos a diferentes tiempos y se analizó el efecto de dichos factores sobre el fenotipo celular mediante microscopía de contraste de fases y sobre la expresión de los marcadores E-cadherina y Hakai, mediante western-blotting, qRT-PCR e inmunofluorescencia. Los resultados obtenidos indican que los factores de crecimiento EGF, HGF y TGF $\beta$  no regulan de forma clara la expresión y localización celular tanto de E-cadherina como de Hakai, en las líneas celulares LoVo y HT-29.

**Palabras clave:** E-cadherina, EGF, Hakai, HGF, TEM, TGF $\beta$

## ABSTRACT

Cancer includes a group of diseases that originate from genetic alterations that lead to the progressive transformation of normal cells into malignant cancer cells. Among them, carcinomas are the most common type of cancer. Carcinoma arise from epithelial cells, which lose their epithelial characteristics and acquire a mesenchymal and invasive phenotype,

leading the formation of metastasis. At the early stages of metastasis, the activation of the epithelial to mesenchymal transition (EMT) program takes place. EMT, a biological process that lead to the transition of immobile epithelial cells into mesenchymal cells with the ability to migrate and invade new tissues. During EMT, the E3 ubiquitin-ligase Hakai acts as a post-translational regulator of the stability of E-cadherin, which is present in the adherent cell-cell junctions. Hakai is responsible for E-cadherin endocytosis and degradation via lysosomes, promoting the disassembly of these intercellular junctions and the consequent dissemination of cancer cells into new tissues through the bloodstream.

The aim of the present work is to study the effect of different growth factors, such as EGF, HGF and TGF $\beta$ , on the activation of EMT. It will be determined whether EMT regulation can be mediated through Hakai posttranslational regulation of E-cadherin. For this purpose, two different colon epithelial tumor lines, LoVo and HT29, were treated with the three stimuli at different times and the effect on the cellular phenotype was analyzed by phase contrast microscopy. Moreover, the expression of the E-cadherin and Hakai, were analyzed by western blotting, qRT-PCR and immunofluorescence. The results obtained indicate that EGF, HGF and TGF $\beta$  growth factors do not clearly regulate the cellular expression and localization of both E-cadherin and Hakai, in LoVo and HT-29 cell lines.

**Key words:** E-cadherina, EGF, Hakai, HGF, TEM, TGF $\beta$

## RESUMO

O cancro engloba a un conxunto de enfermidades que se orixinan a partir de alteracións xenéticas que dan lugar á transformación progresiva de células normais en células cancerosas malignas. Entre elas, os carcinomas son o tipo de cancro máis frecuente de todos. Estes afectan ás células epiteliais, que perden as súas características epiteliais e adquiren un fenotipo mesenquimal e invasivo, dando lugar á formación de metástase. Nas primeiras etapas da metástase, ten lugar a activación do programa de transición epitelio a mesénquima (TEM), un conxunto de procesos biolóxicos que conducen á transición de células epiteliais inmóviles cara células mesenquimais con capacidades de migración e invasión de novos texidos. Durante a TEM, a E3 ubiquitina-ligasa Hakai actúa como reguladora posttraduccional da estabilidade de E-cadherina presente nas unións adherentes célula-célula, sendo responsable da súa endocitose e degradación vía lisosomas e promovendo así a desensamblaxe destas



uniões intercelulares e a conseguinte diseminación das células cancerosas cara novos texidos a través do torrente circulatorio.

O obxectivo do presente traballo consiste en estudar o efecto de diferentes factores de crecemento, como son EGF, HGF e TGF $\beta$ , sobre a activación da TEM e determinar se dita regulación pode ser mediada a través da regulación posttraduccional de E-cadherina por Hakai. Para elo, tratáronse dúas líneas tumorais de cancro de colon, LoVo e HT-29, cos tres estímulos a diferentes tempos e analizouse o efecto de ditos factores sobre o fenotipo celular mediante microscopía de contraste de fases e sobre a expresión dos marcadores E-cadherina e Hakai, mediante western-blotting, RT-qPCR e inmunofluorescencia. Os resultados obtidos indican que os factores de crecemento EGF, HGF e TGF $\beta$  non regulan de forma clara a expresión e localización celular tanto de E-cadherina como de Hakai nas líneas celulares LoVo e HT-29.

**Palabras clave:** E-cadherina, EGF, Hakai, HGF, TEM, TGF $\beta$

### **3. INTRODUCCIÓN**

El cáncer engloba un conjunto de enfermedades que se originan a partir de alteraciones genéticas que dan lugar a la transformación progresiva de células normales en células cancerosas malignas, en un proceso conocido como tumorigénesis. Durante la tumorigénesis, las células cancerosas acumulan mutaciones en el genoma que conducen a una ganancia de función de los oncogenes y la disminución de la misma en los genes supresores de tumores. Esto provoca finalmente la alteración de los circuitos que regulan la proliferación y la homeostasis celular (Greenburg & Hay, 1982; Hanahan & Weinberg, 2000).

Los carcinomas son el tipo de cáncer más frecuente de todos. Estos afectan a las células epiteliales, que pierden sus características epiteliales y adquieren un fenotipo mesenquimal e invasivo, permitiendo la diseminación del tumor y la formación de metástasis (Rodríguez-Rigueiro *et al.*, 2011). Concretamente, el cáncer colorrectal (CRC) es uno de los carcinomas de mayor incidencia a nivel mundial y el de mayor incidencia en España, donde se diagnostican más de 40.000 nuevos casos al año (Duraes *et al.*, 2018; Sociedad Española de Oncología Médica (SEOM), 2018).

Desde un punto de vista clínico, la metástasis es el aspecto más crítico del desarrollo tumoral, siendo responsable de más del 90% de la mortalidad en pacientes con cáncer. Si el proceso de metástasis resulta exitoso, tiene lugar la colonización y proliferación de las células metastáticas procedentes de la masa tumoral primaria en nuevos tejidos, donde originan nuevos tumores (Grivennikov, Greten & Karin, 2010; Hanahan & Weinberg, 2011).

#### **3.1. Vías de señalización y su implicación en la progresión tumoral**

En los organismos vivos, el ambiente extracelular controla el balance entre la supervivencia y la muerte celular. La capacidad de las células de responder al ambiente circundante y decidir su destino depende de la activación de vías de señalización intracelulares. Las más de 300 vías de señalización descritas hasta la fecha, se basan en un conjunto de proteínas que mediante una secuencia de reacciones bioquímicas, dan lugar a una respuesta celular a un estímulo tanto externo como interno. En los procesos de progresión tumoral, existe una desregulación en el ciclo celular como resultado de alteraciones en la transducción de señales. Los factores de crecimiento son las moléculas de señalización extracelular de mayor relevancia en el mantenimiento de la supervivencia celular y cuya

sobreexpresión conforma una de las causas que contribuyen al desarrollo del cáncer (Henson & Gibson, 2006; Valdespino-Gómez, Valdespino-Castillo & Valdespino-Castillo, 2015).

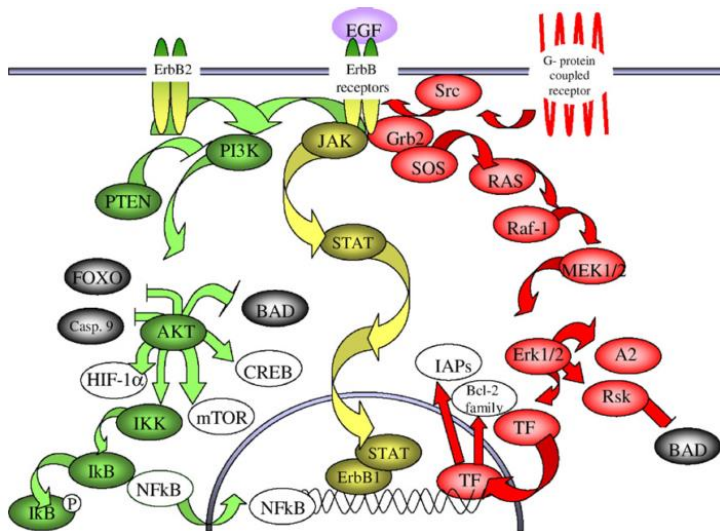
En este trabajo nos centraremos en el estudio de tres factores de crecimiento distintos, el factor de crecimiento epidérmico (EGF), el factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) y el factor de crecimiento transformante (TGF $\beta$ ), aportando una visión general de las vías de señalización que activan y de su relevancia en la progresión del CRC.

### **3.1.1. Factor de crecimiento epidérmico (EGF)**

Uno de los factores de crecimiento clave en la regulación de la supervivencia celular es el denominado factor de crecimiento epidérmico (EGF). EGF es una citoquina soluble presente en el ambiente extracelular, que induce la activación de vías de señalización específicas en el interior celular a través de su unión al receptor de EGF (EGFR). EGFR es un receptor tirosina quinasa (RTK) perteneciente a la familia de receptores ErbB. Este receptor es una proteína transmembrana localizada en la membrana plasmática, constituida por dos dominios: un dominio extracelular de unión específica al ligando, conectado mediante una región peptídica hidrofóbica transmembrana a un dominio intracelular con función tirosina quinasa (TK). En ausencia de ligando, EGFR se encuentra en su forma monomérica inactiva en la superficie celular. Sin embargo, la unión del ligando al dominio extracelular promueve su dimerización, que resulta en la activación de su dominio TK y en la autofosforilación de varios residuos de tirosina presentes en él. Además, otras tirosinas quinasas como las proteínas de la familia Src, son también capaces de fosforilar residuos de tirosina del dominio TK de EGFR. Este evento de fosforilación provoca el reclutamiento de proteínas de unión a fosfotirosina por el dominio citoplasmático de EGFR, que mediante la activación de una cascada de quinasas, activan a tres vías de transducción distintas: la vía PI3K/AKT, la vía JAK/STAT y la vía RAS/ERK (Henson and Gibson, 2006; Zhang *et al.*, 2006; Tomas, Futter and Eden, 2014; Di Domenico & Giordano, 2017; Chen *et al.*, 2018).

La activación de las vías de transducción por la unión de EGFR a su ligando, induce la proliferación celular y la evasión de la señal de apoptosis. Así, la activación de la vía PI3K/AKT conduce a la inhibición de la actividad de las proteínas apoptóticas Caspasa 9, BAD y FOXO. Por el contrario, actúa induciendo la activación de los factores de transcripción NF $\kappa$ B y CREB, que dan lugar a un incremento de la transcripción de genes anti-apoptóticos, así como a la proteína mTOR, una serín-treonín quinasa implicada en la supervivencia celular (Figura 1). Por su parte, en la vía de transducción JAK/STAT, la unión

de EGFR a su ligando, provoca que la tirosina quinasa JAK fosforile a la proteína STAT, induciendo su translocación desde la membrana plasmática hacia el núcleo. En el núcleo, STAT se une a ErbB1, que actúa activando la transcripción génica (Figura 1). Por último, la activación de la vía RAS/ERK, conduce a un incremento en los niveles de proteínas de la familia Bcl-2 y de las proteínas inhibidoras de la apoptosis (IAPs) e inactiva a la proteína antiapoptótica BAD (Figura 1) (Henson & Gibson, 2006; Di Domenico & Giordano., 2017).



**Figura 1. Vías de señalización activadas por la unión de EGF a EGFR.** La unión de EGFR a su ligando conduce la activación de las vías de transducción PI3K/AKY (en verde), JAK/STAT (en amarillo) y RAS/ERK (en rojo). Estas vías inducen inhibición de proteínas apoptóticas (en gris) y la activación de proteínas anti-apoptóticas (en blanco). Figura tomada de Henson & Gibson, 2006.

### 3.1.2. Factor de crecimiento de hepatocitos (HGF)

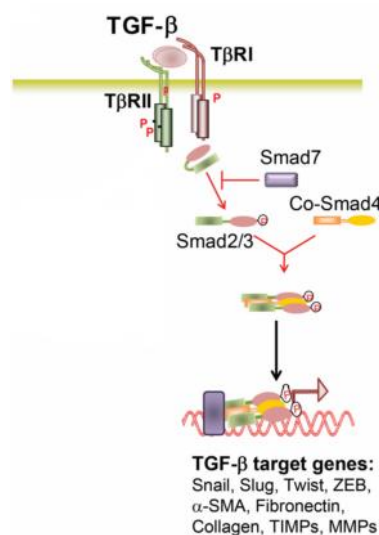
Del mismo modo que EGF, el factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) es una proteína soluble que a través de un mecanismo de señalización paracrino, activa a un conjunto de vías de transducción en las células donde se une a su receptor. El receptor de HGF, denominado factor de transición mesénquima-epitelio (c-Met), es un receptor de tipo RTK situado en la superficie celular de varios tipos de células epiteliales. El receptor c-Met es un heterodímero compuesto por una cadena  $\alpha$  y una cadena  $\beta$ . Esta última, a su vez, está constituida por un dominio SEMA (región de homología a sema), un dominio PSI (plexina-semaforina-integrina), cuatro dominios IPT (regiones *immunoglobulin-like*), un dominio transmembrana, un dominio yuxtamembrana, un dominio TK (tirosina quinasa) y un dominio CT (carboxilo terminal). Cuando HGF se une a c-Met, lo hace a través de su dominio SEMA y el dominio PSI actúa estabilizando esta interacción. La unión de HGF a c-Met promueve su dimerización en la membrana plasmática y la autofosforilación de varios residuos de tirosina en su dominio intracelular. Esta fosforilación da lugar al reclutamiento en el dominio CT de moléculas efectoras intracelulares que conducen a la activación de las vías de señalización

(Matsumoto *et al.*, 2017; Anestis, Zoi & Karamouzis, 2018; Demkova & Kucerova, 2018; Zhang *et al.*, 2018).

Entre las rutas de señalización activadas a partir de la interacción HGF/c-Met, se encuentran las vías PI3K/AKT, JAK/STAT, Ras/MAPK, SRC y Wnt/ $\beta$ -catenina, entre otras. Estas vías promueven la regulación de procesos biológicos como la proliferación celular, la invasión, la metástasis, la angiogénesis y la inhibición de la apoptosis.

### 3.1.3. Factor de crecimiento transformante $\beta$ (TGF $\beta$ )

El factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF $\beta$ ) es una citoquina dimérica implicada en múltiples procesos biológicos como la proliferación y diferenciación celular, la apoptosis o el inicio y progresión del cáncer. TGF $\beta$  induce la activación o represión transcripcional de genes diana a través de la activación de vías de señalización como PI3K/AKT y JAK/STAT. Sin embargo, la vía de transducción de mayor relevancia es la conocida como vía de señalización SMAD. La vía SMAD se activa con la unión de TGF $\beta$  al receptor de TGF $\beta$  tipo II (T $\beta$ RII), una proteína transmembrana situada en la membrana celular, constituida por un dominio extracelular glicosilado y rico en iones disulfuro, una región transmembrana y un dominio citoplasmático con función TK. La unión de la citoquina a T $\beta$ RII, provoca la fosforilación de este en su dominio TK, lo que desencadena el reclutamiento y fosforilación del receptor de TGF $\beta$  tipo I (T $\beta$ RI), estructuralmente igual al primero. El heterodímero constituido por ambos receptores fosforila a Smad2/3, que junto a Smad4 conforma un complejo heterodimérico capaz de trasladarse al núcleo, donde media funciones de regulación transcripcional. La proteína Smad 7 antagoniza la señalización inducida por TGF $\beta$  mediante su unión a T $\beta$ RI, inhibiendo el reclutamiento y fosforilación de Smad2/3 (Figura 2) (Pardali *et al.*, 2017; Zhang, 2018; Zhao, Mishra & Deng, 2018).



**Figura 2. Vía de señalización SMAD inducida por TGF $\beta$ .** La unión de TGF $\beta$  al receptor T $\beta$ RII provoca la fosforilación de su dominio TK, que conduce al reclutamiento y activación de T $\beta$ RI. A través de su dominio TK, T $\beta$ RI fosforila a Smad2/3, que forma complejo con Smad4. Smad2/3/4 se traslocan al núcleo, donde promueve la activación de factores de transcripción. Smad7 actúa inhibiendo la fosforilación de Smad2/3 por el receptor. Figura tomada de Pardali *et al.*, 2017.

Resulta especialmente interesante el papel de TGF $\beta$  durante la tumorigénesis, donde exhibe una doble función induciendo la parada del ciclo celular en etapas tempranas de la progresión del cáncer y ejerciendo el efecto contrario en etapas tardías. Así, en los estadios iniciales de la tumorigénesis, TGF $\beta$ /SMAD4 actúa como punto de control en la transición G1/S del ciclo celular, y promueve la transcripción de genes inhibidores del ciclo celular como p15, p21 o p27. Por el contrario, en etapas tardías de la progresión tumoral, TGF $\beta$  actúa induciendo procesos de angiogénesis, invasión y metástasis (Furler, Nixon & Uittenbogaart, 2018; Zhao, Mishra & Deng, 2018).

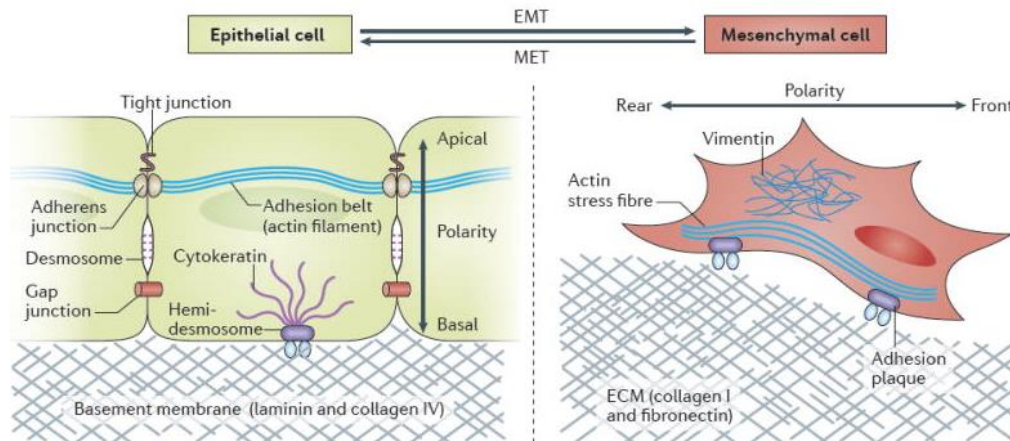
### **3.2. Transición epitelio a mesénquima (TEM)**

El programa de transición epitelio a mesénquima (TEM), es un conjunto de procesos biológicos altamente conservados que dan lugar a la conversión de células epiteliales inmóviles en células mesenquimales con capacidad de migración e invasión de nuevos tejidos. La TEM fue descrita por primera vez como un programa celular implicado en etapas críticas del desarrollo embrionario (Greenburg & Hay, 1982). Sin embargo, la similitud entre la plasticidad epitelial durante el desarrollo embrionario y la que tiene lugar durante la progresión de procesos inflamatorios y tumorales, evidenció que la TEM también se activaba en estos casos. Así, atendiendo a su función y al entorno biológico donde se produce, se diferencian tres tipos de TEM: TEM de tipo I, asociada a la embriogénesis y al desarrollo de órganos, TEM de tipo II, asociada a la regeneración tisular, y TEM de tipo III, implicada en procesos patológicos como la fibrosis o la progresión tumoral (Thiery, 2002; Smith & Bhowmick, 2016).

La activación del programa TEM da lugar a la reconfiguración de los patrones de expresión de al menos 400 genes distintos. A nivel celular, esto se traduce en una serie de cambios moleculares que conducen a la pérdida de la integridad estructural propia del tejido epitelial y a la adquisición progresiva de atributos mesenquimatosos. Así, se produce la pérdida de los contactos célula-célula y la reorganización del citoesqueleto de actina (que incrementa su contenido en vimentina), la pérdida de la morfología epitelial cuboidal (en pro de una morfología mesenquimal alargada y con protusiones), la pérdida de la polaridad ápico-basal y la ganancia de la capacidad de migración e invasión de la membrana extracelular (Figura 3) (Kalluri & Weinberg, 2009; Shibue & Weinberg, 2017).

La variación entre ambos fenotipos no es una transformación binaria entre dos estados alternativos, sino que se trata de una transición que da lugar a un amplio espectro de estados

fenotípicos intermedios. Además, la TEM no es un proceso irreversible, sino que puede darse la transición inversa, conocida como *transición mesénquima a epitelio* o *TME* (Figura 3) (Nieto *et al.*, 2016; Shibue & Weinberg, 2017).



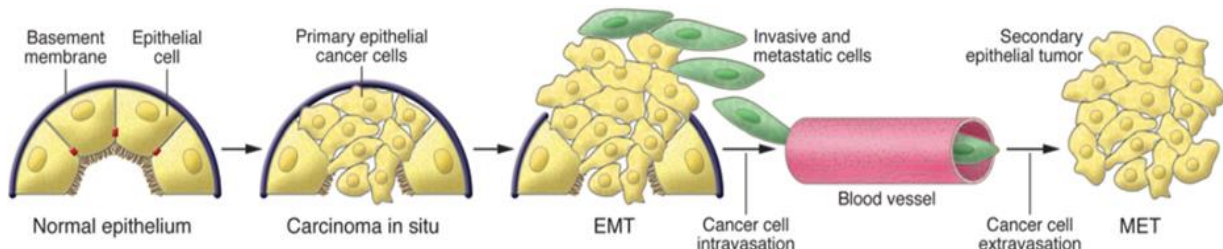
**Figura 3. Cambios a nivel celular y molecular que ocurren durante la activación del programa TEM.** Figura tomada de Shibue & Weinberg, 2017.

En el proceso de TEM, existe un grupo de factores de transcripción, conocidos como *factores de transcripción inductores de la TEM* (FT-TEM), que regulan la transcripción de los genes relacionados con este programa. Los FT-TEM se pueden clasificar en tres familias distintas (Snail, ZEB y TWIST), que suprimen la expresión de los genes asociados a un fenotipo epitelial y regulan positivamente aquellos genes asociados al fenotipo mesenquimal. A su vez, los FT-TEM están modulados por miRNAs, que actúan regulando negativamente su expresión (ejemplo de ello es la regulación negativa que ejerce miR-200 sobre ZEB1 y miR-34 sobre SNAI1). Además, las proteínas pueden sufrir modificaciones posttraduccionales tales como la fosforilación, glicosilación o proteólisis, que regulen su estabilidad y actividad biológica (Nieto *et al.*, 2016; Smith & Bhowmick, 2016; Santamaria *et al.*, 2017; Yeung & Yang, 2017; Brabletz *et al.*, 2018).

### 3.3. TEM durante la progresión tumoral

La activación de la TEM durante la progresión tumoral se relaciona con las primeras etapas de la metástasis, donde las células cancerosas procedentes de la masa tumoral primaria adquieren capacidad de migración y son capaces de disociarse de la misma, diseminándose hacia nuevos tejidos a través del torrente sanguíneo. Una vez las células tumorales diseminadas son extravasadas y se asientan en órganos distantes estableciendo micrometástasis, se produce la activación de la TME, que induce la proliferación celular en el órgano distal favoreciendo tanto el crecimiento del tumor como la formación de nuevos

tumores en los tejidos colonizados (Figura 4) (Nieto *et al.*, 2016; Shibue & Weinberg, 2017). Cabe mencionar que en las células cancerosas, al contrario de lo que ocurre durante el desarrollo de las células embrionarias, se produce una TEM parcial y por tanto, las células tumorales pueden presentarse con características fenotípicas intermedias, epiteliales y mesenquimales (Santamaria *et al.*, 2017).



**Figura 4. Relación entre TEM y progresión tumoral.** En las primeras etapas de la progresión tumoral, la activación de la TEM da lugar a células mesenquimales con capacidad de migración a través de la membrana extracelular. Estas pueden incorporarse al torrente circulatorio y colonizar tejidos distantes de la masa tumoral primaria. La activación del TME, induce el cese de la migración y la proliferación celular en los tejidos colonizados. Figura tomada de Kalluri & Weinberg, 2009.

### 3.3.1. Transición epitelio a mesénquima: E-cadherina

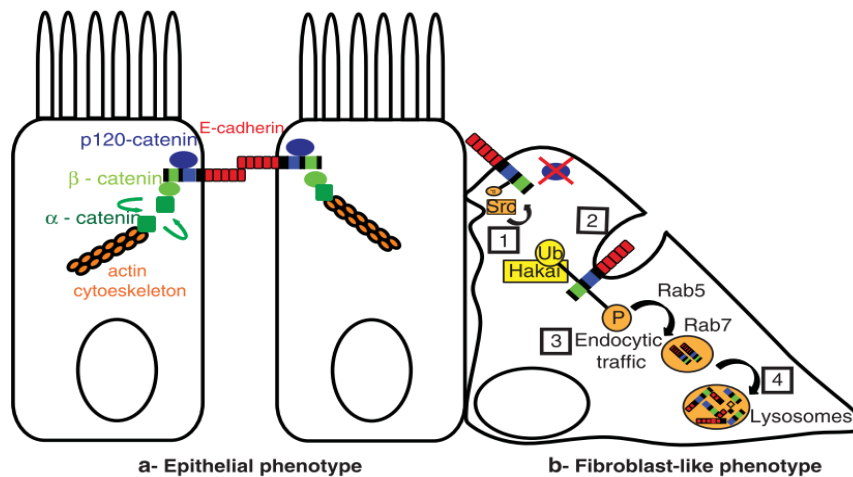
La E-cadherina es una proteína transmembrana de tipo I perteneciente a la superfamilia de las cadherinas, un grupo de 20 proteínas integrales de membrana involucradas en el establecimiento de uniones célula-célula dependientes de calcio. En función de su distribución tisular, se distinguen tres tipos distintos de cadherinas: E-cadherina (epitelial, Cdh1), N-cadherina (neuronal, Cdh2) y P-cadherina (placentaria, Cdh3). Concretamente, la E-cadherina media el establecimiento de uniones adherentes entre células epiteliales (Takeichi, 1988; Aparicio *et al.*, 2012).

Estructuralmente, la E-cadherina consta de un dominio extracelular y un dominio citoplasmático, separados entre sí por una región hidrofóbica transmembrana. El dominio extracelular está compuesto a su vez por cinco subdominios que contienen secuencias específicas de unión a calcio ( $\text{Ca}^{+2}$ ). Este ion posibilita la interacción homofílica entre los dominios extracelulares de E-cadherina de dos células contiguas, dando lugar a dímeros laterales de E-cadherina. Por otra parte, el dominio citoplasmático interactúa con cateninas, unas proteínas citosólicas que unen la E-cadherina a los filamentos de actina del citoesqueleto. Estas son la  $\alpha$ -catenina,  $\beta$ -catenina y catenina p120 (Figura 4a) (Takeichi, 1988; Aparicio *et al.*, 2012).



La disponibilidad de la E-cadherina presente en la membrana plasmática se regula mediante un ciclo de reciclaje endosomal, responsable del mantenimiento de la dinámica del tejido epitelial. Así, el tráfico endosómico da lugar a la internalización constitutiva de la E-cadherina presente en la superficie celular en endosomas tempranos (provocando el desensamblaje de las uniones adherentes) y a su reciclaje en la membrana plasmática basolateral para formar nuevos contactos intercelulares. En condiciones normales existe un balance entre la E-cadherina que se internaliza en el citoplasma y la que se encuentra formando parte de los contactos intercelulares que mantienen la estructura epitelial. Sin embargo, durante procesos patológicos como la carcinogénesis, se produce la regulación negativa de la expresión de la E-cadherina, ya sea mediante mecanismos transcripcionales, posttranscripcionales o posttraduccionales (Palacios *et al.*, 2005).

Uno de los mecanismos de regulación posttranscripcional descritos es a través de la endocitosis y degradación de la E-cadherina mediante la vía lisosomal, dando lugar al desensamblaje de las uniones adherentes, impidiendo su restablecimiento (Figura 5b) (Palacios *et al.*, 2005). La vía lisosomal de la E-cadherina está inducida por la expresión de v-Src, una proteína perteneciente a la familia de tirosinas quinasas Src. Esta familia, derivada del oncogén *src*, regula una gran variedad de funciones biológicas asociadas a cambios en la morfología y plasticidad celular, así como la regulación de la adhesión célula-célula durante la TEM (Irby & Yeatman, 2002). v-Src actúa fosforilando residuos de tirosina del dominio citoplasmático de la E-cadherina, provocando su internalización en los lisosomas. En este proceso de tráfico lisosomal participan otras proteínas como HRS, que recluta la carga destinada a la degradación lisosomal y las GTPasas Rab5 y Rab7, que regulan el tráfico de proteínas de membrana de la superficie celular al lisosoma (Figura 5b) (Palacios *et al.*, 2005). La proteína responsable de la ubiquitinización y posterior internalización de E-cadherina en los lisosomas en respuesta a la activación de v-Src es la E3 ubiquitina ligasa Hakai (Figura 5b).



**Figura 5. Esquema comparativo de la disposición de la E-cadherina en células epiteliales y células que adquieren un fenotipo mesenquimal durante la activación de la TEM.** a. El dominio extracelular de dos E-cadherinas situadas en la superficie celular de dos células epiteliales contiguas media una interacción homofílica que mantiene a las células unidas entre sí. A su vez, mediante su dominio citoplasmático, la E-cadherina se une a los filamentos de actina del citoesqueleto mediante las cateninas alfa, beta y p120. b. Tras la fosforilación por *v-Src* de los residuos de tirosina presentes en el dominio citoplasmático de la E-cadherina, esta es marcada para su degradación por la E3 ubiquitina ligasa Hakai. Mediante el tráfico lisosomal, regulado por las GTPasas Rab5 y Rab7, la E-cadherina es degradada en los lisosomas, alterando así la integridad de las uniones adherentes. Figura tomada de Aparicio *et al.*, 2012.

### 3.3.3. Transición epitelio a mesénquima: E3 ubiquitina ligasa Hakai

En el año 2002, el grupo de investigación liderado por Yasuyuki Fujita descubre una nueva proteína que recibe el nombre de Hakai (*destrucción* en japonés). Hakai, también conocida como CBL1, se definió entonces como una nueva E3 ubiquitina ligasa implicada en la regulación de la adhesión y migración celular, al ser el primer regulador posttraduccional conocido de la estabilidad de la E-cadherina, y en consecuencia, responsable de su internalización y degradación en los lisosomas. Por ello, Hakai adquiere gran relevancia durante las etapas iniciales de la carcinogénesis donde promueve la activación de la TEM (Fujita *et al.*, 2002; Kotani *et al.*, 2009; Aparicio *et al.*, 2012; Castosa *et al.*, 2018).

Hakai es una proteína de tipo *RING-finger* compuesta por tres dominios distintos: un dominio RING-finger en la región N-terminal, un dominio corto pTyr-B de unión a fosfotirosina y un dominio rico en prolina en la región C-terminal (Figura 6a). La similitud estructural y funcional de Hakai con la familia de ubiquitina-ligasas de mamífero Cbl-c, llevó a establecer una relación de homología entre ambas. Sin embargo, el análisis cristalográfico de Hakai determinó que el dominio pTyr-B era estructuralmente distinto al resto de dominios de unión a fosfotirosina conocidos y recibió el nombre de HYB (*Hakai pTyr-binding*). HYB es un homodímero compuesto por dos dominios de unión a fosfotirosina (pTyr) de dos

monómeros distintos de Hakai dispuestos de forma antiparalela. Cada uno de estos monómeros consta de un dominio RING-finger y de un dominio pTyr-B corto (Figura 6b). Esta configuración da lugar a una estructura en forma de bolsillo que reconoce y se une específicamente a residuos pTyr de la E-cadherina (previamente fosforilados por v-Src) y a los aminoácidos ácidos circundantes, siendo el responsable del reconocimiento específico de sustrato (Aparicio *et al.*, 2012; Mukherjee *et al.*, 2012).



**Figura 6. Representación esquemática de la estructura de Hakai y de su dominio HYB.** 4a. Disposición espacial de los tres dominios que conforman la estructura de la E3 ubiquitina ligasa Hakai. 4b. Estructura del dominio HYB, resultado de la dimerización de dos monómeros de Hakai. Figuras tomadas de Mukherjee *et al.*, 2012

#### 4. OBJETIVOS

Los objetivos perseguidos en la ejecución de este Trabajo de Fin de Máster son los que siguen:

1. Estudio de los posibles cambios a nivel fenotípico en líneas celulares de colon tras su tratamiento con EGF, HGF y TGF $\beta$ , mediante microscopía óptica.
2. Determinación del efecto de los factores EGF, HGF y TGF $\beta$  sobre la expresión de las proteínas E-cadherina y Hakai, mediante ensayos de Western Blotting.
3. Determinación del efecto de EGF y HGF sobre la expresión y localización celular de Hakai, mediante inmunofluorescencia.
4. Análisis del efecto de EGF y HGF sobre los niveles de ARN mensajero de E-cadherina y Hakai, mediante RT-qPCR.

## **5. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **5.1. Anticuerpos y materiales**

Para western blotting, los anticuerpos primarios empleados fueron el anticuerpo anti-E-Cadherina (BD Biosciences 610404, Estados Unidos), anti-GAPDH (Invitrogen ZG003, Estados Unidos), ambos purificados de ratón, y anti-Hakai (Novus Biologicals NBP1-83589, Estados Unidos), purificado de conejo, los tres en una dilución 1:1000. Los anticuerpos secundarios fueron el anticuerpo anti-ratón (NA931V) y el anticuerpo anti-conejo (NA934), ambos de la casa comercial GE Healthcare Life Sciences (Reino Unido) y se utilizaron en una dilución 1:10.000. Para la inmunofluorescencia, se utilizaron los mismos anticuerpos primarios anti-E-Cadherina y anti-Hakai que para western blotting en una dilución 1:100. Como anticuerpos secundarios se emplearon el anticuerpo anti-ratón conjugado con Alexa Fluor<sup>®</sup> 488 (Sigma-Aldrich SAB4600387, Estados Unidos) y el anticuerpo anti-conejo conjugado con Alexa Fluor<sup>®</sup> 568 (Invitrogen A10042, Estados Unidos), a una dilución 1:400.

### **5.2. Líneas celulares y cultivo celular**

En este estudio fueron empleadas dos líneas celulares distintas, LoVo y HT-29, ambas procedentes de adenocarcinomas de colon humano.

Los cultivos celulares se iniciaron a partir de las líneas celulares congeladas en viales a -196°C en medio de congelación que contiene un 90% de FBS (suero fetal bovino, de Life Technologies, Estados Unidos) y 10% de DMSO (Sigma-Aldrich, Alemania). La línea celular HT-29 se cultivó en medio McCoy's 5A 1X (ThermoFisher, Estados Unidos) suplementado con un 10% de FBS y un 1% de penicilina (100 U/mL) y streptomicina (100 µg/mL). La línea LoVo se sembró y cultivó en medio F12 (ThermoFisher, Estados Unidos) suplementado con idénticas condiciones de FBS y penicilina/streptomicina. Ambas líneas fueron cultivadas en placas de cultivo de 100 mm (Sigma-Aldrich, Estados Unidos) y los cultivos se mantuvieron a 37°C en una atmósfera al 5% en CO<sub>2</sub> y un 95% de humedad, realizando pases cada vez que estas alcanzaban una confluencia de entre el 80 y el 90% del total de la placa.

#### **5.2.1. Tratamiento de los cultivos**

Para llevar a cabo los ensayos de western blotting y RT-PCR cuantitativa, las líneas celulares fueron sembradas en placas de seis pocillos (Thermo Scientific, Dinamarca), sembrándose 5x10<sup>5</sup> células por pocillo en el caso de la línea celular LoVo y 3x10<sup>5</sup> células por pocillo en el caso de la línea HT-29. Las células se cultivaron durante 24 horas con el objetivo

de que se adhiriesen a la placa y transcurrido este tiempo, se cambió el medio de cultivo reduciendo la concentración de suero en el medio de cultivo de un 10% a un 0,5% con el fin de reducir los factores de crecimiento del FBS para reducir la interferencia en los resultados obtenidos. Tras 24 horas en cultivo en estas condiciones las células fueron tratadas con los distintos factores de crecimiento: EGF a 25ng/ml y 100 ng/ml, TGFβ a 10 ng/ml y 25 ng/ml y con HGF a 40ng/ml y 120 ng/ml, según se indica en cada experimento.

Los ensayos de inmunofluorescencia se llevaron a cabo empleando la línea celular HT-29. Para ello se sembraron  $2 \times 10^5$  células por pocillo en cristales de 18 mm de diámetro dispuestos en el interior de placas de doce pocillos (Thermo Scientific, Dinamarca). Una vez adheridas se cultivaron tal y como se indica anteriormente. En este caso, la línea HT-29 fue tratada con EGF a 25 ng/ml y HGF a 120 ng/ml.

Los tratamientos para los tres ensayos se mantuvieron durante 6, 24 o 48 horas y las células se recogieron y procesaron tal y como se indica para cada metodología experimental. Las condiciones de incubación en todos los casos fueron de 37°C, en una atmósfera al 95% de humedad y 5% de CO<sub>2</sub>.

### **5.3. Western Blotting**

#### **5.3.1. Extracción de proteínas de células en cultivo**

Para la extracción de proteínas de las células en cultivo, se retiró el medio de cultivo y las células se lavaron dos veces con tampón fosfato salino (PBS) 1X pH 7.6 (MPBiomedicals, Estados Unidos). Para levantar las células se añadió 1 mL de PBS y se procedió al levantamiento mediante *scraping*, obteniéndose una suspensión celular que se centrifugó a 5.000 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente. El sobrenadante obtenido fue descartado y sobre el pellet se añadieron 40 µL de tampón de lisis 1X TritónX-100 (20mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl y 1% de TritónX-100), suplementado con apoproteína en una dilución 1:1.000 y leupeptina y PMSF 1X en una dilución 1:100. Los extractos proteicos se incubaron 20 minutos a 4°C, agitando cada cinco minutos para asegurar la correcta mezcla entre todos los componentes. Transcurrido el tiempo de incubación, se centrifugó a 12.000 rpm durante 10 minutos a 4°C en una centrífuga refrigerada (*Microfuge® 22R Centrifuge*, Beckman Coulter™, Estados Unidos), se recuperó el sobrenadante en un nuevo tubo Eppendorf y se procedió a la cuantificación de la concentración de proteína. Toda la etapa de extracción se realizó en hielo para evitar la degradación de las proteínas de la muestra.

### **5.3.2. Cuantificación de la concentración de proteínas por el método de BCA**

La cuantificación de proteínas de las muestras analizadas a lo largo de todo este proyecto se realizó empleando el kit *Pierce™ BCA protein assay* (Thermo Scientific, Estados Unidos). Este método se basa en la reducción del  $\text{Cu}^{+2}$  a  $\text{Cu}^{+}$  en presencia de proteínas y en un medio con pH elevado. Los iones de  $\text{Cu}^{+}$  generados se unen al ácido bicinconínico (BCA) que actúa como quelante y como resultado se forma un compuesto de color púrpura. La unión entre  $\text{Cu}^{+}$  y BCA provoca que estos iones cambien su estructura electrónica y sean capaces de absorber luz a 562 nm, por lo que el compuesto violáceo formado puede ser cuantificado colorimétricamente. En las condiciones de la reacción, la absorbancia del compuesto es proporcional a la concentración de proteína presente. La concentración proteica presente en las muestras en estudio se determinó en función de las absorbancias obtenidas en la recta patrón construida a partir de concentraciones conocidas y crecientes de albúmina sérica bovina (BSA) frente a sus respectivas absorbancias. Las medidas de absorbancia se tomaron 570 nm en el lector *Nanoquant Infinite M200* (Tecan, Suiza).

### **5.3.3. Preparación de las muestras**

Una vez conocida la concentración de proteína total presente en las muestras se calculó el volumen necesario para obtener 20  $\mu\text{g}$  de proteína por muestra. Tras ello, estos valores se enrasaron a 10  $\mu\text{L}$  de volumen final con agua destilada, a los cuales se añadieron 2  $\mu\text{L}$  de Loading Buffer 5X (4% de SDS, 20% de glicerol, 10% de 2-mercaptoetanol, 0,004% de azul de bromofenol, 0.125 M de Tris-HCl). A continuación, las muestras se hirvieron a 95°C durante 5 minutos en termobloque (*Thermoleader*, UniEquip, Alemania) con el objetivo de desnaturalizar las proteínas, quedando las muestras preparadas para cargar en el gel o para ser conservadas a -20°C hasta su posterior uso.

### **5.3.4. Preparación de los geles de poliacrilamida con SDS**

En el sistema SDS-PAGE, las proteínas son desnaturalizadas mediante el uso de SDS (dodecilsulfato sódico), un detergente aniónico que desnaturaliza las proteínas eliminando sus estructuras secundaria y terciaria y que además, confiere una carga negativa a todas las proteínas, lo que hace que el criterio de separación final sea el tamaño de la proteína en lugar de su relación carga/masa. Esto se lleva a cabo mediante sistemas discontinuos con un primer gel concentrador (“*stacking*”) y un segundo gel separador (“*resolving*”). El gel separador se

preparó a un 10% de acrilamida, concentración adecuada para la separación por tamaño de las proteínas en estudio. Su composición consta de Tris/HCl 375 mM pH 8.8 (Trizma base - Sigma-Aldrich, Estados Unidos- 1,5 M), glicerol al 10% (Sigma-Aldrich, Estados Unidos), Acrilamida/Bis-Acrilamida al 10% (NZYTech, Portugal), SDS al 0,1% (Sigma-Aldrich, Estados Unidos), de TEMED al 0,15% (NZYTech, Portugal) y APS al 0,03% (Sigma-Aldrich, Estados Unidos). Esta solución se añadió entre los cristales del equipo de electroforesis empleado (*Criterion™ Vertical Electrophoresis Cell, BioRad, Estados Unidos*) previamente limpios y montados, cubriendo aproximadamente un 80% de su capacidad total. El volumen restante se llenó con una alícuota de isopropanol, que además de proporcionar las condiciones de anoxia necesarias para la correcta polimerización del gel, impide el agrietamiento que se produce en su superficie cuando se oxida.

Por su parte, el gel concentrador o *stacking gel* se preparó a un 4% de acrilamida y su composición consta de Tris/HCl 125 mM pH 6.8 (Trizma Base 0,5 M), Acrilamida/Bisacrilamida al 40%, SDS al 0.1%, TEMED al 0,1% y APS al 0,1%. Una vez polimerizado el gel separador, se eliminó el isopropanol por decantación y se añadió la solución del gel concentrador hasta el límite de los cristales. Por último, se colocó un peine de diez pocillos y se aguardó hasta su total polimerización.

### **5.3.5. Electroforesis en gel de acrilamida con SDS (SDS-PAGE)**

Para la separación de proteínas en nuestras muestras, la electroforesis se llevó a cabo con el equipo *Criterion™ Vertical Electrophoresis Cell* (BioRad, Estados Unidos), llenando por completo la cubeta con tampón de electroforesis (Trizma base 0.025 mM, glicina 0.192 M y un 0.1% de SDS) y estableciendo las siguientes condiciones de electroforesis: 180V durante una hora y cincuenta minutos a temperatura ambiente. El marcador de peso molecular utilizado fue *NZYColour Protein Marker I* (NZYTech, Portugal).

### **5.3.6. Transferencia de las proteínas del gel a la membrana**

Para la transferencia de las proteínas del gel a membrana, se utilizaron membranas de PVDF (fluoruro de polivinilideno, Millipore Immobion-P, Estados Unidos) previamente activadas durante 15 segundos en metanol y a continuación lavadas 5 minutos en agua destilada. Tras ello se procedió al montaje de la transferencia según las indicaciones del equipo *Criterion™ blotter* (BioRad, Estados Unidos), teniendo especial cuidado en la eliminación de posibles burbujas de aire que pudiesen distorsionar el resultado final del

western blotting. La transferencia se llevó a cabo durante una hora a 0,2 A y en humedad, llenando por completo la cubeta del equipo con tampón de transferencia 1X (Trizma Base 25 mM, glicerol 195 mM y metanol al 20%). Durante todo el proceso de transferencia, la cubeta se mantuvo en hielo para evitar el incremento de temperatura que provoca el proceso.

### **5.3.7. Inmunodetección**

Una vez concluido el proceso de transferencia, las membranas se sometieron a tres lavados sucesivos de 10 minutos en agitación en TBS-T 1X (10% *Tris-buffered saline* 10X + 0,05% Tween 20) para eliminar los restos de sales dejados por el tampón de transferencia. Acto seguido, las membranas se bloquearon durante una hora en agitación en TBS-T en leche al 5% (*Skim Milk Powder*, Sigma-Aldrich, Estados Unidos), tiempo tras el cual, se incubaron con los anticuerpos primarios específicos de las proteínas que se desean identificar. Se emplearon los anticuerpos E-Cadherina, Hakai y GAPDH, diluidos en tampón de bloqueo, preparándose un volumen final de 2,5 ml de esta dilución por membrana. La proteína GAPDH se empleó como control de carga con el fin de confirmar que la carga proteica había sido la misma en todos los pocillos y que por tanto las posibles variaciones en la expresión de proteínas entre las muestras no se debían a errores metodológicos. Las membranas fueron incluidas dentro de una bolsa plástica sellada por calor e incubadas en una noria durante 16 horas a 4°C.

Transcurrido el tiempo de incubación con el anticuerpo primario, las membranas se sometieron de nuevo a 3 lavados de 10 minutos en agitación en TBS-T. Tras ello fueron incubadas con los respectivos anticuerpos secundarios previamente diluidos en TBS-T en leche durante una hora a temperatura ambiente. Los anticuerpos secundarios llevan conjugada la enzima peroxidasa de rábano (HRP), que posibilita la detección de las proteínas inmunorreactivas mediante una reacción de quimioluminiscencia. Para llevar a cabo esta detección, las membranas se revelaron siguiendo el protocolo *Amersham ECL<sup>TM</sup> Western Blotting Analysis System* (GE Healthcare Life Sciences, Reino Unido) y empleando la cámara de revelado Amersham Imager 600 (GE Healthcare Life Sciences, Reino Unido).

## **5.4. Extracción de ARN y PCR cuantitativa en tiempo real**

### **5.4.1. Extracción del ARN**



Para llevar a cabo la extracción del ARN de las muestras, el pellet celular se obtuvo tal y como se describe en el apartado 2.2.1. y se homogenizó con 250  $\mu$ L del reactivo de aislamiento *TriPure Isolation Reagent* (Roche Diagnostics GmbH, Estados Unidos). Este reactivo permite el aislamiento simultáneo de ARN, ADN y proteína mediante su separación en tres fases orgánicas distintas que pueden ser purificadas. Tras agitar efusivamente hasta hacer desaparecer el pellet, la suspensión celular se centrifuga a 10 minutos 12.000 rpm a 4°C y se incuba 5 minutos a temperatura ambiente. A continuación se añaden 75  $\mu$ L de cloroformo, se incuba 5 minutos a temperatura ambiente y se centrifuga 15 minutos a 12.500 rpm a 4°C, tras lo cual se obtienen tres fases orgánicas: una fase inferior rosada que contiene a las proteínas, una intermedia blanca correspondiente al ADN celular y una fase superior transparente en la que se encuentra el ARN total. Esta última fase es traspasada a un Eppendorf nuevo al cual se añade la décima parte del volumen tomado de isopropanol, que producirá la precipitación del ARN. Se centrifuga 10 minutos a 12.500 rpm a 4°C y se incuba 5 minutos a temperatura ambiente. A continuación se añaden nuevamente 125  $\mu$ L de isopropanol, se incuba 10 minutos a temperatura ambiente y se centrifuga 10 minutos a 12.500 rpm, tras lo cual se decanta el sobrenadante. Por último, con el objetivo de lavar el ARN aislado, se añaden 250  $\mu$ L de etanol al 70% refrigerado a 4°C, se centrifuga 5 minutos a 13.000 rpm a 4°C y se elimina rigurosamente el sobrenadante dejándolo evaporar en un termobloque precalentado a 56°C. Finalmente, el pellet de ARN se resuspende en 15  $\mu$ L de agua destilada y se procede a su cuantificación.

La cuantificación de la concentración del ARN total extraído de cada muestra se llevó a cabo con en el espectrofotómetro NanoDrop (*Spectrophometer ND-100*, ThermoFisher Scientific, Estados Unidos) realizando la medición a una longitud de onda de 260 nm. Para verificar la pureza de la extracción, se observaron los valores de los ratios 260/280 y 260/230, que confirman la pureza del ARN extraído cuando los valores de los ratios están entre 1,7 y 2,0. En caso contrario, indicarían contaminación por proteínas, fenoles o por cualquier otro contaminante que se encuentre en estos valores de absorbancia.

#### **5.4.2. Realización de la retrotranscripción (RT)**

El proceso de retrotranscripción del ARN extraído para la obtención de ADNc, se llevó a cabo con el kit *NZY First-Strand cDNA Synthesis Kit* (NZYTech, Portugal) partiendo de 1  $\mu$ g de ARN. El volumen de la solución de ARN se añade en un nuevo Eppendorf junto con 10  $\mu$ L de *Master Mix* (que contiene los dNTPs, MgCl<sub>2</sub> como catalizador de la reacción de retrotranscripción y tampón de retrotranscripción) y 2  $\mu$ L de *Enzyme Mix* (que incluye la

transcriptasa reversa y el inhibidor de la ribonucleasa, que evita la degradación del ARN), enrasándose esto a un volumen de 20 µl con agua. Esta mezcla se incubaba en un termociclador seleccionándose el programa siguiente: un ciclo de incubación de 10' a 25°C seguido de un ciclo de 30' a 50°C y de la inactivación de la reacción mediante el incremento de la temperatura a 85°C durante 5'. A continuación el Eppendorf se deposita en hielo y a la mezcla se le añade 1 µl de RNasa H, que degrada la hebra del ARN en los híbridos de ADNc:ARN. Esto se incubaba 20' a 37°C. Finalmente, el ADNc obtenido como producto de la retrotranscripción puede almacenarse a -20°C hasta su empleo o bien ser utilizado a continuación en la ejecución de la RT-qPCR.

### 5.4.3. PCR cuantitativa a tiempo real (RT-qPCR)

La RT-PCR permite la amplificación del ARN previamente extraído y retrotranscrito a su ADN complementario o ADNc. Además, al ser a tiempo real, el marcaje con compuestos fluorescentes permite la recopilación de los datos a medida que la PCR avanza.

La amplificación del cDNA se realizó en el Light Cycler® 480 II (Roche, Alemania), partiendo de 1 µL de ADNc y utilizando Light Cycler® 480 SYBR Green I Master (Roche Diagnostics GmbH, Alemania).

La PCR se realizó para los genes de interés E-cadherina y Hakai, empleando como genes normalizadores RPLPO y HPRT1. Los oligonucleótidos empleados, todos ellos procedentes de la casa comercial Sigma-Aldrich (Estados Unidos), fueron:

E-cadherina	E-cadherina <i>forward</i>	5'- AGTGTCCCCCGGTATCTTCC - 3'
	E-cadherina <i>reverse</i>	5'- CAGCCGCTTTCAGATTTTCAT - 3'
Hakai	Hakai <i>forward</i>	5'- CGCAGACGAATTCCTATAAAGC - 3'
	Hakai <i>reverse</i>	5'- CCTTCTTCATCACCAGGTGG - 3'
RPLPO	RPLPO <i>forward</i>	5'- TCTACAACCCTGAAGTGCTTGAT - 3'
	RPLPO <i>reverse</i>	5'- CAATCTGCAGACAGACACTGG - 3'
HPRT1	HPRT1 <i>forward</i>	5'- TGACCTTGATTTATTTTGCATACC - 3'
	HPRT1 <i>reverse</i>	5'- CGAGCAAGACGTTTCAGTCCT - 3'

El análisis estadístico de los datos obtenidos de la RT-qPCR se llevó a cabo con el programa informático qbase+ (Biogazelle, Bélgica), exportando los resultados obtenidos a

Microsoft Excell (Microsoft Corporation, Estados Unidos) para la construcción de las gráficas representativas de los resultados.

## **5.5. Inmunofluorescencia**

La inmunofluorescencia es un ensayo de inmunodetección de determinadas moléculas en el interior celular mediante el empleo de anticuerpos unidos químicamente a una molécula fluorescente que son reconocidas como antígenos y se unen a ellas, permitiendo visualizar su localización celular. En este caso se lleva a cabo una inmunofluorescencia indirecta, para la cual se emplean dos anticuerpos: un anticuerpo primario que reconoce y se une a una determinada molécula que reconoce como antígeno y un anticuerpo secundario que reconoce y se une al primario y que a su vez lleva acoplado un fluoróforo que emite fluorescencia cuando es excitado con luz ultravioleta. Para el desarrollo de este ensayo, el cultivo y tratamiento de las líneas celulares se realizó tal y como se describe en el apartado 2.2.1.

### **5.5.1. Fijación de las células**

Con el objetivo de conservar la distribución y composición biomolecular de las células, se procedió a llevar a cabo una fijación con paraformaldehído (PFA) al 4% en PBS (USB, Estados Unidos). Tras la eliminación del medio de cultivo y haber realizado un lavado con PBS 1X pH 7.6, las células se fijaron con 500  $\mu$ l de PFA atemperado por pocillo, incubando 15 minutos a temperatura ambiente, tiempo tras el cual el PFA fue eliminado y las células fueron lavadas de nuevo 3 veces con PBS 1X pH 7.6 para eliminar cualquier posible resto del fijador.

### **5.5.2. Incubación con los anticuerpos y el colorante nuclear**

Tras la fijación de las células se procedió a su permeabilización incubándolas durante 15 minutos a temperatura ambiente con 500  $\mu$ L de PBS al 0,25% en TritónX-100, un detergente no iónico que permeabiliza las membranas celulares mediante la desnaturalización de sus proteínas. Transcurrido el tiempo de incubación, la solución de permeabilización fue descartada y las células se bloquearon con 500  $\mu$ L de medio McCoy's al 10% en suero durante una hora a temperatura ambiente.

Tras ello, las células fueron incubadas durante dos horas a temperatura ambiente con los anticuerpos primarios indicados en el apartado 2.1. diluidos en medio McCoy's al 10% en suero. Transcurrido el período de incubación con los anticuerpos primarios, las células se

lavaron 3 veces con PBS 1X pH 7.6 antes de proceder a la incubación durante una hora a temperatura ambiente con los anticuerpos secundarios previamente descritos, que de nuevo, fueron diluidos en medio McCoy's al 10% en suero. Como estos anticuerpos llevan acoplados un fluoróforo que permite su detección cuando es excitado a una longitud de onda característica, la incubación se realizó en oscuridad para evitar el fotoblanqueo de los fluoróforos por efecto de la luz. Finalizada la incubación, las células se lavaron de nuevo tres veces con PBS 1X pH 7.6. Tanto en el caso de los anticuerpos primarios como de los secundarios, la incubación se realizó depositando volúmenes de 100  $\mu$ l de las soluciones de los anticuerpos sobre una bandeja forrada con parafilm y colocando los cristales sobre dichos volúmenes, situando la cara del cristal con las células adheridas en contacto con el anticuerpo.

Para la visualización de los núcleos celulares, se empleó el colorante fluorescente de ADN Hoechst 33342 (Life Technologies, Estados Unidos), preparado en PBS 1X pH 7.6 en una dilución 1:5.000 y se incubó durante 3 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad, tiempo tras el cual fue eliminado y las células fueron sometidas a un lavado con PBS 1X pH 7.6 y a un último lavado con agua destilada para eliminar el exceso de sales dejadas por el tampón.

### **5.5.3. Visualización de la inmunofluorescencia**

Para la visualización de los resultados de la fluorescencia, se procedió al montaje de los cristales cubreobjetos con las células adheridas sobre cristales portaobjetos, utilizando el medio de montaje *ProLong<sup>®</sup> Gold Antifade Mountant* (Thermo Fisher Scientific, Estados Unidos), dejándolo secar a temperatura ambiente y en oscuridad. El resultado fue visualizado con el microscopio de fluorescencia Olympus BX61 (Olympus, Japón), tomando todas las fotografías con la cámara digital de microscopio Olympus DP71 (Olympus, Japón).

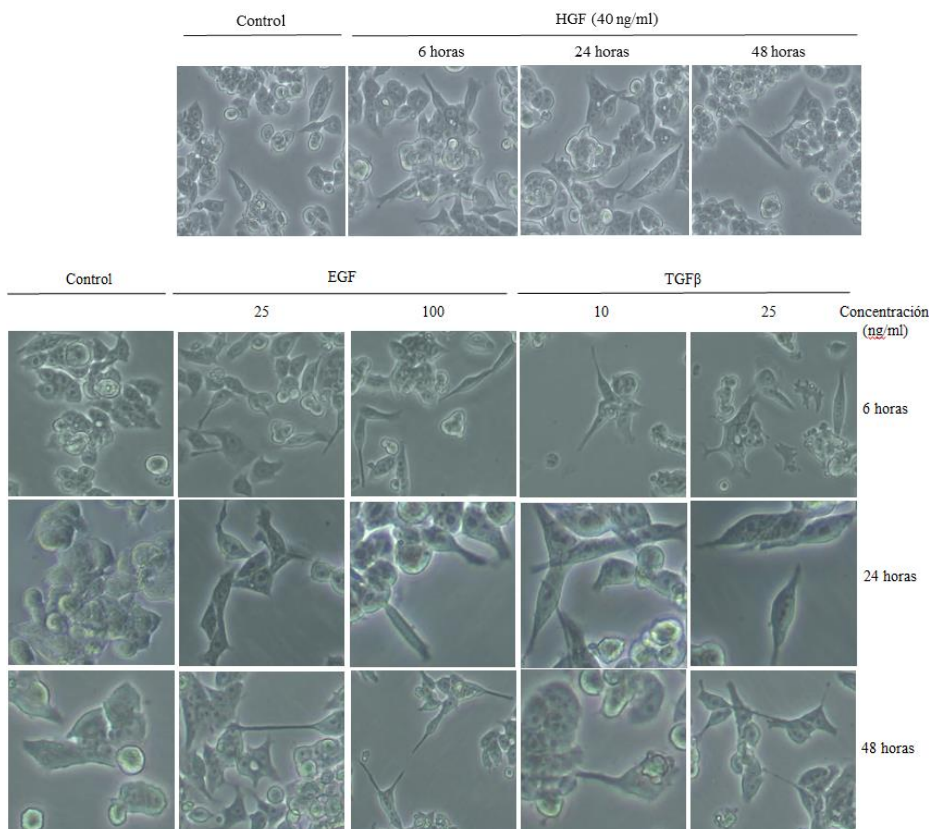
## **6. RESULTADOS**

Dado que se ha descrito que el tratamiento con EGF, HGF o TGF $\beta$  induce la TEM durante la progresión tumoral, pretendemos determinar si su efecto es mediado sobre la disminución en la expresión de E-cadherina a través de su acción sobre su regulador posttraduccional Hakai. Para ello, analizamos el efecto de dichos tratamientos sobre dos líneas celulares de cáncer de colon (LoVo y HT-29). Tanto las cinéticas de los tratamientos como las concentraciones utilizadas de EGF, HGF y TGF $\beta$  (empleadas como inductores de la

TEM), fueron seleccionadas a partir de la revisión bibliográfica previa (Wajih, Walter & Sane, 2002; Yang *et al.*, 2004; Feng *et al.*, 2012; Ji *et al.*, 2015).

### 6.1. Análisis de los cambios fenotípicos inducidos por EGF, HGF y TGF $\beta$ en la línea celular LoVo.

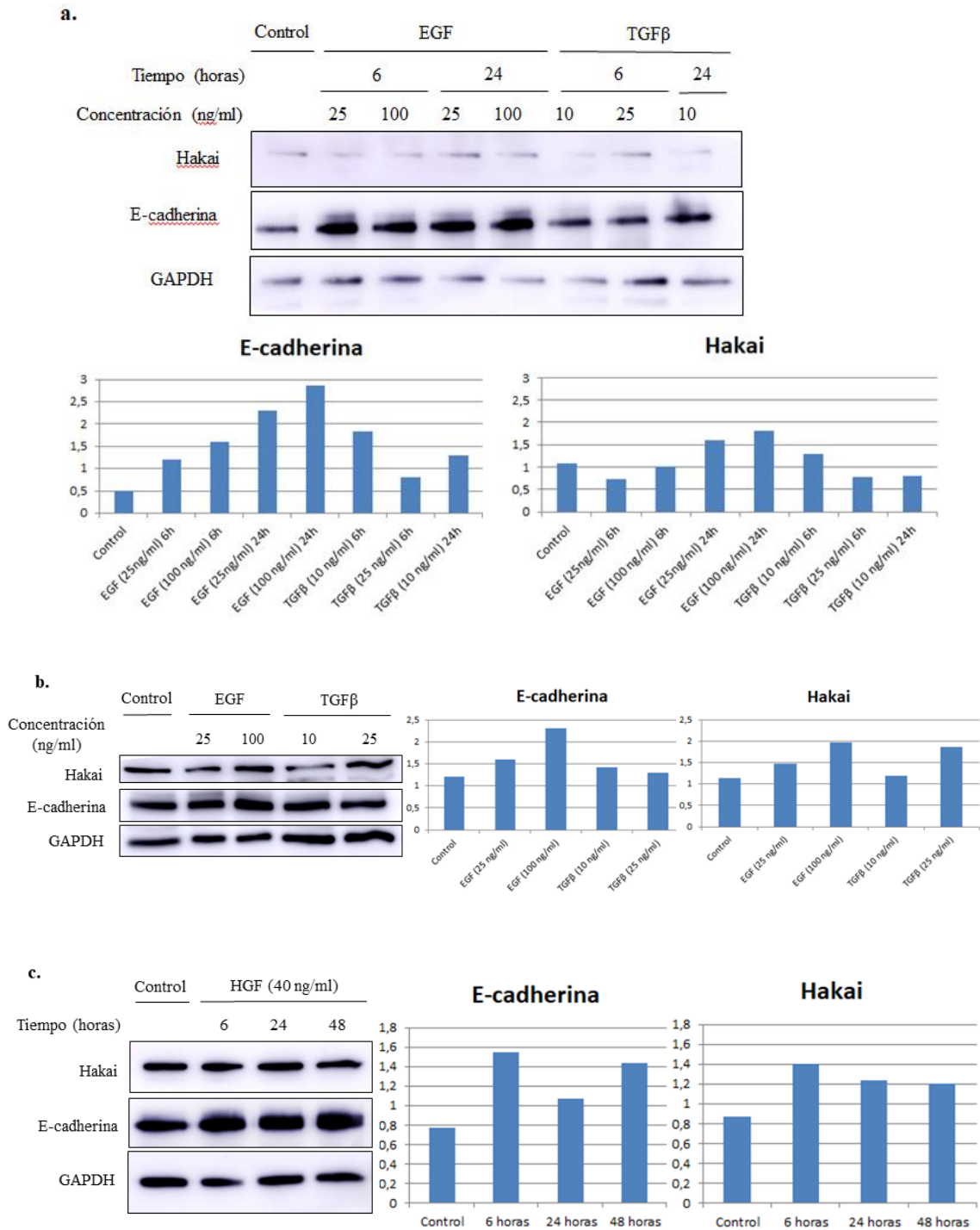
Este trabajo comienza con el estudio de los posibles cambios que EGF, HGF y TGF $\beta$  pueden inducir sobre la morfología de la línea celular LoVo. La línea celular LoVo fue inmortalizada en 1971 a partir de un nódulo metastático de un adenocarcinoma colorrectal en un hombre caucásico de 56 años de edad. Esta línea celular de morfología epitelial, cultivada *in vitro* crece en una monocapa de células cuboidales que retienen la capacidad de establecer complejos de unión entre ellas, dando lugar a estructuras acinares o glandulares (Drewinko *et al.*, 1976). La visualización de su morfología mediante microscopía óptica (Figura 7), muestra que el tratamiento de las células LoVo con EGF, HGF y TGF $\beta$ , induce la alteración de las uniones celulares dando lugar a células individualizadas. Esto va acompañado de un cambio en la morfología de las células, que adoptan una apariencia más aplanada y extendida y desarrollan protusiones que no están presentes en las células sin tratar utilizadas como control (Figura 7).



**Figura 7. Análisis de los cambios morfológicos que se producen en la línea celular LoVo al ser tratada con HGF, EGF y TGFβ.** El estudio morfológico se realizó tratando a las células con HGF (a 40 ng/ml), EGF (a 25 y 100 ng/ml) y TGFβ (a 10 y 25 ng/ml) y durante 6, 24 y 48 horas. Las fotografías fueron tomadas bajo microscopio óptico con el objetivo de 20X.

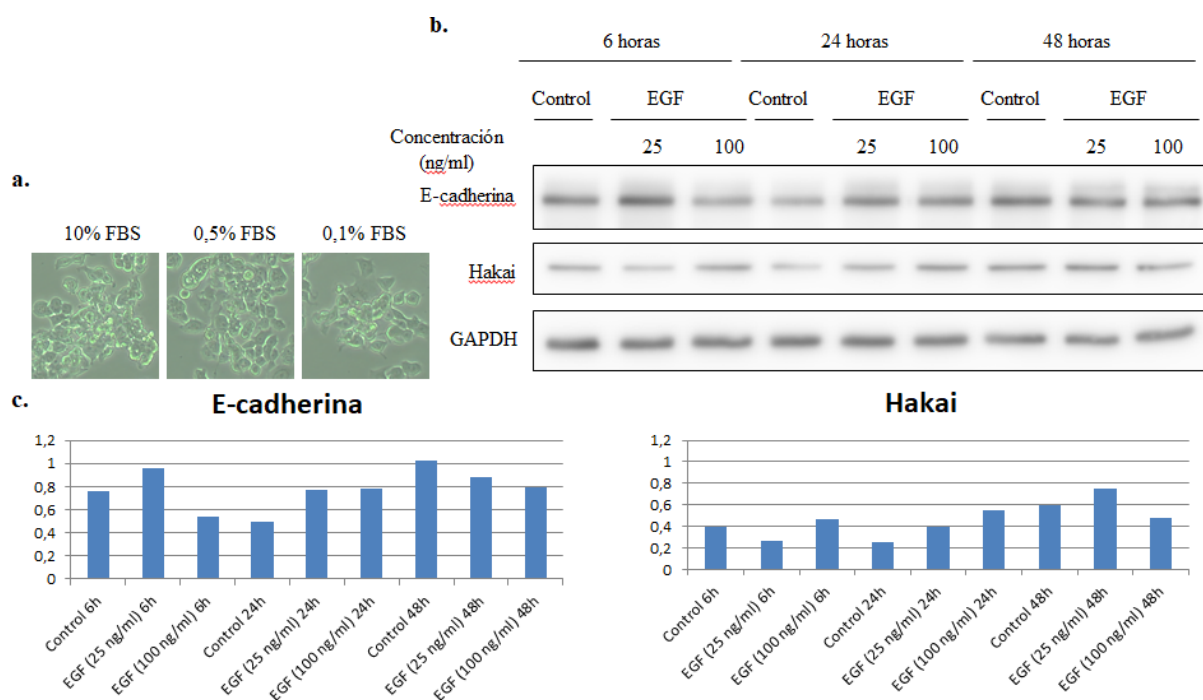
## **6.2. Efecto del tratamiento con EGF, HGF y TGFβ sobre los niveles de expresión de la E3 ubiquitina ligasa Hakai en la línea celular LoVo**

A continuación quisimos determinar si el tratamiento con EGF, HGF o TGFβ podría afectar a los niveles de expresión de la E3 ubiquitina-ligasa Hakai y de E-cadherina al actuar como inductores de la proliferación celular y la TEM. Para ello se estudió el efecto de dichos tratamientos sobre la expresión de Hakai y de E-cadherina mediante Western Blotting en la línea celular LoVo. Se llevaron a cabo tres cinéticas distintas (6, 24 y 48 horas) empleando distintas concentraciones de los tratamientos: EGF (a 25 y 100 ng/ml), TGFβ (a 10 y 25 ng/ml) y HGF (a 40 ng/ml). Los resultados obtenidos de los niveles de las proteínas mediante Western Blotting fueron cuantificados (Figura 8). Las células tratadas durante 6 y 24 horas con EGF y TGFβ (Figura 8a) no parecen mostrar cambios significativos en la expresión de Hakai. Además, al contrario de lo que cabría esperarse, la expresión de E-cadherina aumenta con ambos tratamientos (más con EGF que con TGFβ). Este mismo experimento fue llevado a cabo realizando los tratamientos durante 48 horas (Figura 8b). En este caso, los niveles de expresión de E-cadherina y Hakai no parecen sufrir cambios significativos durante los tratamientos. El tratamiento con HGF (Figura 8c) tampoco produce cambios en la expresión de Hakai y se observa una sutil regulación positiva en la expresión de E-cadherina. No obstante, estos resultados son preliminares y deberían hacerse réplicas para un análisis estadístico adecuado.



**Figura 8. Análisis de los niveles de expresión de E-cadherina y Hakai tras tratar la línea celular LoVo con EGF, TGF $\beta$  y HGF.** a. Western blotting (izquierda) y cuantificación (derecha) de los niveles de proteína de las células LoVo tratadas con EGF (a 25 y 100 ng/ml) y TGF $\beta$  (a 10 y 25 ng/ml) durante 6 y 24 horas. b. Igual que a durante 48 horas. c. Igual que a en células LoVo tratadas con HGF (a 40 ng/ml) durante 6, 24 y 48 horas.

A la vista de que los resultados obtenidos no se ajustaban a los esperados, planteamos la posibilidad de que la causa de ello pudiese ser que las células no estuviesen siendo suficientemente estimuladas por los tratamientos con los factores de crecimiento. Esto podría estar motivado por el gran número de factores de crecimiento que presenta en su composición el FBS con el que está suplementado el medio de cultivo y que son esenciales para el mantenimiento y crecimiento de las células *in vitro*. Como estos factores de crecimiento presentes de forma intrínseca en el suero podrían estar distorsionando los resultados, decidimos reducir la concentración de FBS del 0,5% al 0,1%. Para ello, primero comprobamos que la reducción de la concentración de suero en el medio no comprometía la supervivencia de las células (Figura 9a) y a continuación analizamos el efecto del factor de crecimiento EGF (a 25 y 100 ng/ml) durante 6, 24 y 48 horas. De nuevo, el análisis del efecto de EGF sobre los niveles de expresión de E-cadherina y Hakai se llevó a cabo mediante un Western Blotting (figura 9b) y su correspondiente cuantificación (Figura 9c). Sin embargo, los resultados obtenidos no resultan ser demasiado reveladores. En este caso, a cinéticas de 24 horas puede dilucidarse un muy leve aumento de los niveles de expresión de Hakai y la E-cadherina.

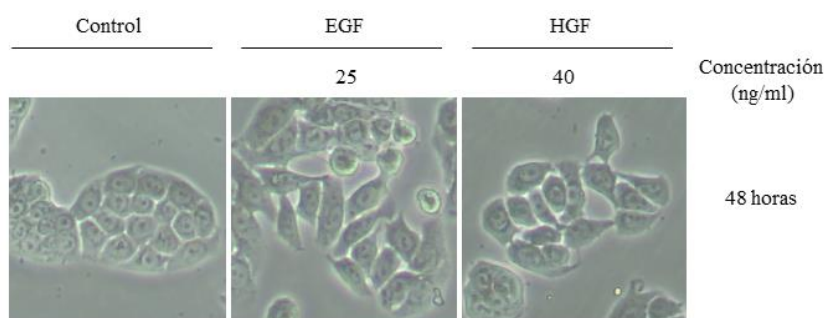


**Figura 9. Análisis de los niveles de expresión de E-cadherina y Hakai tras el tratamiento de células LoVo con EGF, TGF $\beta$  y HGF, empleando una concentración de suero en el medio del 0,1%. a. Efecto de la disminución de la concentración de FBS (0,1%) en el medio sobre la línea celular LoVo. b. Western blotting de las células LoVo tratadas con EGF (a 25 y 100 ng/ml) durante 6, 24 y 48 horas en medio de cultivo al 0,1% en suero. c. Cuantificación de los niveles de Hakai y E-cadherina en células LoVo tratadas igual que en B.**



### 6.3. Análisis de los cambios fenotípicos inducidos por EGF y HGF en la línea celular HT-29.

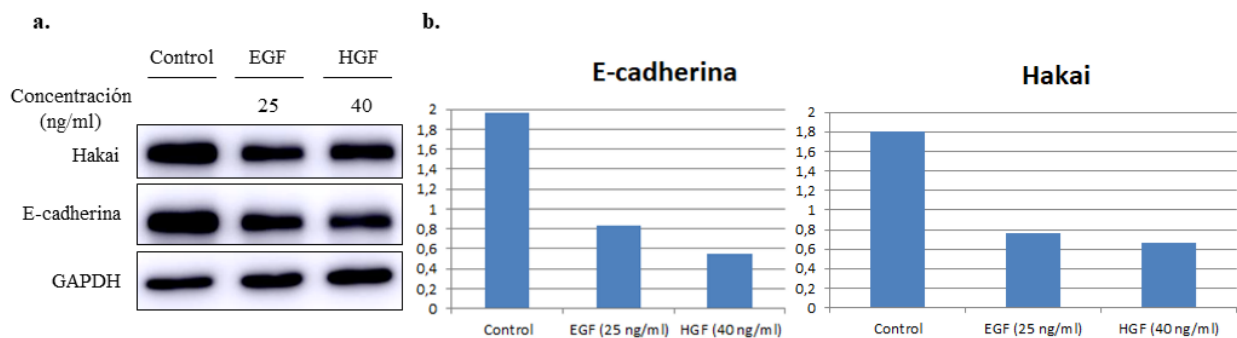
A la vista de que los resultados obtenidos en la línea celular LoVo, decidimos comprobar los efectos del tratamiento con los factores de crecimiento en otra línea celular epitelial de colon: la línea HT-29. La línea celular HT-29 fue establecida en 1964 a partir de un tumor primario de un adenocarcinoma colorrectal de una mujer caucásica de 44 años de edad (Cohen, Ophir & Shaul, 1999). En comparación a la línea LoVo, HT-29 es una línea de fenotipo y características más epiteliales, por lo que los efectos de la inducción de la TEM podrían ser más fácilmente detectables. El análisis fenotípico bajo microscopía óptica de la línea HT-29 en cultivo, muestra que en condiciones normales, esta línea crece formando una monocapa de células que se agrupan y establecen uniones intercelulares entre sí, dando lugar a estructuras de apariencia globular (Figura 10). El tratamiento con los factores de crecimiento EGF y HGF altera esta estructura, dando lugar a un fenotipo más mesenquimal que en condiciones control (Figura 10).



**Figura 10. Análisis de los cambios morfológicos en la línea celular HT-29 al ser tratada con EGF y HGF.** El estudio morfológico se realizó tratando a las células con EGF (a 25 ng/ml) y HGF (a 40 ng/ml) durante 48 horas. Las fotografías fueron tomadas bajo microscopio óptico con el objetivo de 20X.

### 6.4. Efecto del tratamiento con EGF y HGF sobre los niveles de expresión de Hakai en la línea celular HT-29

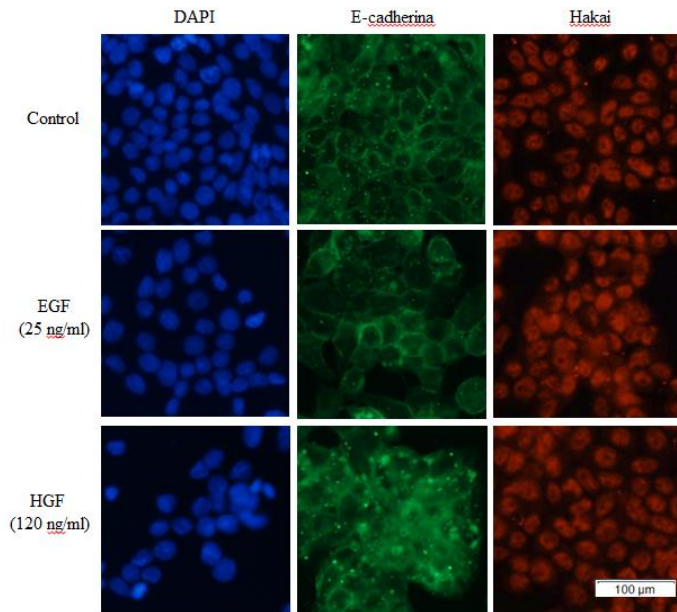
Tras comprobar que EGF y HGF inducían efectos a nivel fenotípico en HT-29, decidimos analizar si estos factores de crecimiento afectaban a los niveles de expresión de Hakai y E-cadherina. Para ello, tras tratar las células durante 48 horas con EGF (25 ng/ml) y HGF (40 ng/ml), se realizó un Western Blotting (Figura 11a) y se cuantificaron los niveles de ambas proteínas (Figura 11b). Los resultados muestran una bajada evidente de la expresión de E-cadherina, resultados esperados tras el tratamiento con EGF y HGF dada su acción en la inducción de la TEM. Sin embargo, al contrario de lo que cabría esperarse, la expresión de Hakai también disminuye con los tratamientos.



**Figura 11. Efecto de EGF y HGF sobre los niveles de expresión de E-cadherina y Hakai mediante Western Blotting.** a. Expresión de E-cadherina y Hakai en la línea HT-29 tratada con EGF (25 ng/ml) y HGF (40 ng/ml) durante 48 horas. b. Cuantificación de los niveles de proteína de E-cadherina y Hakai.

### 6.5. Efecto de EGF y HGF sobre la localización celular de Hakai en la línea celular HT-29

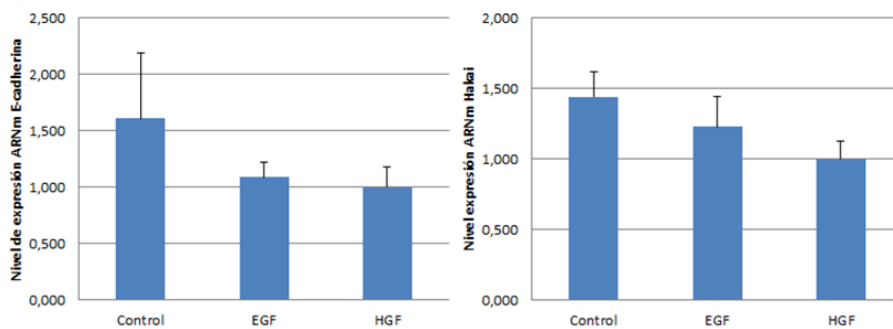
A la vista de que los resultados obtenidos por Western Blotting no son concluyentes, propusimos determinar si los factores de crecimiento pudiesen estar actuando sobre la localización de las proteínas en estudio en lugar de sobre su expresión. Para comprobar esto, se llevó a cabo un ensayo de inmunofluorescencia mediante el cual comprobamos la localización de E-cadherina y de Hakai en células tratadas durante 48 horas con EGF (a 25 ng/ml) y HGF (a 40 ng/ml). Los resultados obtenidos muestran una localización similar tanto de Hakai como de E-cadherina en las células tratadas con EGF respecto a las células control (Figura 12). La E-cadherina se encuentra mayoritariamente en los contactos intercelulares mientras que Hakai se encuentra fundamentalmente localizado en el núcleo (Figura 12). El tratamiento con HGF provoca una ligera desaparición de la expresión de E-cadherina en los contactos celulares, aumentando su expresión en el citoplasma, lo que coincidiría con el efecto de HGF descrito sobre la alteración de las uniones adherentes dependientes de E-cadherina durante la TEM, a través de su internalización y posterior degradación vía lisosomas. Sin embargo, la localización de Hakai no parece verse afectada por el factor de crecimiento HGF.



**Figura 12. Efecto de EGF y HGF sobre la expresión y localización de E-cadherina y Hakai en la línea HT-29.** La línea HT-29 se trató con EGF (25 ng/ml) y HGF (120 ng/ml) durante 48 horas, tras lo cual se realizó un ensayo de inmunofluorescencia. Las imágenes se obtuvieron mediante microscopía de fluorescencia empleando el objetivo de 20X.

### 6.6. Análisis del efecto de EGF y HGF sobre los niveles de ARN mensajero en la línea celular HT-29

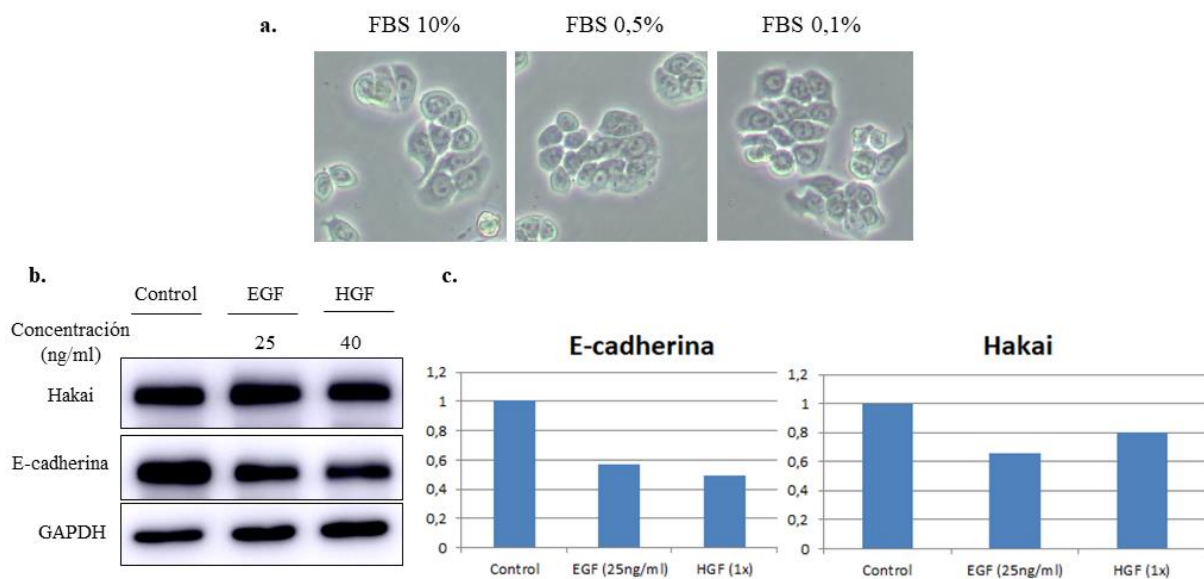
A continuación, quisimos determinar si EGF y HGF podrían regular el nivel de expresión de E-cadherina y Hakai a nivel de ARNm. Para ello, realizamos una RT-qPCR con el fin de determinar el efecto del tratamiento con EGF y HGF sobre la línea HT-29 (Figura 13). Las células fueron de nuevo tratadas durante 48 horas con EGF (25 ng/ml) y HGF (120 ng/ml) y los resultados obtenidos de la RT-qPCR se normalizaron en base a los genes de expresión constitutiva o *housekeeping* RPLP0 y HPRT1. De nuevo, los cambios en los niveles de ARNm de E-cadherina y Hakai no parecen ser relevantes, puesto que las desviaciones obtenidas son muy grandes (sobre todo en el control de E-cadherina) y las variaciones en los niveles de ARNm no son significativos (Figura 13).



**Figura 13. Representación gráfica del efecto de EGF y HGF sobre los niveles de expresión del ARNm de E-cadherina y Hakai en HT-29 mediante RT-qPCR.** En las gráficas se representan los niveles de ARNm de E-cadherina (izquierda) y Hakai (derecha) en células de la línea celular HT-29 tratadas durante 48 horas con EGF (25 ng/ml) y HGF (120 ng/ml). Los niveles de expresión de las proteínas analizadas fueron normalizados mediante los genes de expresión constitutiva RPLP0 y HPRT1.

## 6.7. Efecto de EGF y HGF sobre los niveles de expresión de E-cadherina y Hakai en la línea celular HT-29 con una menor concentración de suero

Finalmente, nos planteamos de nuevo determinar si el efecto de los factores de crecimiento incluidos en la composición del FBS con el que está suplementado el medio de cultivo, podría estar interfiriendo con el efecto de los tratamientos con EGF y HGF. Igual que realizamos en la línea celular LoVo, analizamos si la reducción de FBS del 0,5% al 0,1% en el medio de cultivo comprometía la viabilidad de las células (Figura 14a). Una vez comprobamos que la reducción de la concentración de suero no afectaba a la viabilidad celular, llevamos a cabo un Western Blotting para analizar los niveles de expresión de Hakai y E-cadherina en estas condiciones de menor concentración de suero en el medio de cultivo (Figuras 14b y 14c). Los resultados obtenidos mediante Western Blotting y su cuantificación apuntan a una sutil disminución de la expresión de E-cadherina, sin embargo, los niveles de expresión de Hakai no aumentan, tal y como cabría esperar (Figuras 14 b y 14c).



**Figura 14. Análisis del efecto de EGF y HGF en la línea celular HT-29 con una concentración de suero en el medio del 0,1%.** a. Análisis de efecto de diferentes concentraciones de suero en el medio (10%, 0,5% y 0,1%) sobre la línea celular HT-29. b. Western blotting de las células HT-29 tratadas con EGF (a 25 y 100 ng/ml) y HGF (a 40 ng/ml) durante 48 horas en medio de cultivo al 0,1% en suero. c. Cuantificación de los niveles de Hakai y E-cadherina en células LoVo.

## 7. DISCUSIÓN

El programa de transición epitelio a mesénquima (TEM) es el proceso biológico que conduce al desensamblaje de las uniones intercelulares entre las células epiteliales, provocando la pérdida de su polaridad ápico-basal característica y dotándolas de la capacidad de migración e invasión de nuevos tejidos. El engranaje molecular que se activa durante la TEM provoca la desregulación del ciclo celular, lo que desemboca en un proceso de progresión tumoral y metástasis. Entre los cambios celulares inducidos por la TEM, la pérdida de la E-cadherina, que se encuentra formando parte de la arquitectura de las uniones adherentes entre dos células epiteliales contiguas, se postula como uno de los eventos de mayor relevancia en la transición de las células epiteliales hacia un fenotipo más mesenquimal. Uno de los mecanismos de regulación que da lugar a la disminución de los niveles de expresión de E-cadherina, es su endocitosis y posterior degradación vía lisosomas tras ser ubiquitinizada por la E3 ubiquitina-ligasa Hakai. A la vista de la importancia que la regulación tiene sobre la activación de la TEM y ante los numerosos estudios que demuestran la disminución de los niveles de expresión de E-cadherina durante la carcinogénesis como resultado del efecto de Hakai, decidimos estudiar el efecto de los factores EGF, HGF y TGF $\beta$  sobre la expresión y localización de E-cadherina y Hakai en dos líneas celulares de cáncer de colon (LoVo y HT-29), mediante ensayos de western blotting, inmunofluorescencia y RT-qPCR. Sin embargo, los resultados obtenidos no parecen mostrar una regulación clara de E-cadherina y Hakai por parte de EGF, HGF y TGF $\beta$ . Pese a los cambios fenotípicos inducidos por los tres factores en ambas líneas celulares, ninguno de ellos parece afectar de forma significativa a los niveles de expresión de E-cadherina y Hakai en ninguna de las dos líneas celulares. Tampoco parecen tener efecto sobre la localización celular ni sobre los niveles de ARNm de las proteínas en estudio. Pese a que los resultados obtenidos son preliminares y asumimos que deben hacerse réplicas para realizar un análisis estadístico adecuado que avale la falta de efecto de EGF, HGF y TGF $\beta$  sobre E-cadherina y Hakai, cabe estudiar los posibles mecanismos moleculares que podrían estar actuando detrás de los resultados obtenidos.

Dada la importancia de la E-cadherina como molécula de adhesión en las uniones intercelulares entre células epiteliales, esta proteína ha sido ampliamente caracterizada como un potente supresor de tumores por su rol como agente anti-invasivo y anti-metastático (Wheelock *et al.*, 2008; Berx & van Roy, 2009). Además de la regulación posttraduccional ampliamente descrita en este trabajo, la expresión de la E-cadherina puede ser regulada negativamente en los distintos tipos de carcinomas mediante numerosos mecanismos que

incluyen mutaciones somáticas, la metilación de su promotor, el procesamiento aberrante de la proteína o el control transcripcional. Entre ellos, la represión transcripcional de la E-cadherina es el mecanismo que opera con mayor frecuencia durante la TEM. Los represores transcripcionales de la E-cadherina de mayor relevancia son los factores de transcripción pertenecientes a las familias Snail, TWIST y ZEB, agrupados bajo la denominación de *factores de transcripción inductores de la TEM* (FT-TEM). Los FT-TEM actúan uniéndose de forma específica a las denominadas secuencias E-box de los promotores de la E-cadherina, impidiendo su transcripción (Wheelock *et al.*, 2008; Berx & van Roy, 2009). Se ha demostrado ampliamente el efecto de EGF, HGF y TGF $\beta$  sobre la represión transcripcional de E-cadherina en modelos celulares como en células de cáncer de páncreas (Vogelmann, 2005), células LoVo (Tashiro *et al.*, 2016), células de carcinoma de pecho (Xu *et al.*, 2015) o en la línea celular MDCK de cáncer de colon (Kamei *et al.*, 1999), entre otras. Además, estos mismos resultados fueron comprobados en modelos animales de ratón (Zavadil & Böttinger, 2005). Por tanto, es posible que EGF, HGF y TGF $\beta$  medien su acción sobre la regulación de la E-cadherina a nivel transcripcional y no a nivel posttraduccional a través de Hakai. No obstante, sería importante reproducir en nuestro sistema de trabajo en las líneas celulares LoVo y HT-29, que estos estímulos son capaces de disminuir los niveles de expresión de E-cadherina en los contactos intercelulares, antes de concluir que realmente Hakai no se encuentra implicado en esta regulación.

Pese a que los resultados obtenidos no muestran una regulación posttraduccional clara de E-cadherina a través de la acción de Hakai en líneas celulares a las que se les ha inducido la activación de la TEM por medio de EGF, HGF y TGF $\beta$ , este estudio abre las puertas a futuras investigaciones en lo que respecta a la determinación de nuevos estímulos capaces de regular tanto a E-cadherina como a Hakai. Este campo de estudio tendría un enorme impacto ante la posibilidad de descubrir nuevas estrategias terapéuticas contra el cáncer.

## 8. CONCLUSIONES

1. Los factores EGF, HGF y TGF $\beta$  inducen un fenotipo mesenquimal en las líneas celulares de cáncer de colon LoVo y HT-29 tras 6, 24 y 48 horas de tratamiento.

2. El factor de crecimiento EGF no regula los niveles de expresión del ARNm ni de las proteínas E-cadherina y Hakai, así como tampoco induce cambios en la localización celular de dichas proteínas en las líneas celulares de cáncer de colon empleadas, LoVo y HT-29.

3. El factor de crecimiento HGF no altera la expresión de E-cadherina y Hakai en las líneas celulares LoVo y HT-29, pero provoca una ligera disminución de los niveles de expresión de E-cadherina presente en los contactos intercelulares.

4. El tratamiento de las líneas celulares LoVo y HT-29 con el factor TGF $\beta$  no provoca cambios significativos en la expresión de E-cadherina y Hakai.

## 9. BIBLIOGRAFÍA

Anestis, A., Zoi, I. & Karamouzis, M. V (2018) ‘Current advances of targeting HGF / c-Met pathway in gastric cancer’, 6(7), pp. 1–10.

Aparicio, L. A., Valladares, M., Blanco, M., *et al.* (2012) ‘Biological influence of Hakai in cancer: A 10-year review’, *Cancer and Metastasis Reviews*, 31(1–2), pp. 375–386.

Berx, G. & van Roy, F. (2009) ‘Involvement of members of the cadherin superfamily in cancer.’, *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 1(6).

Brabletz, T., Kalluri, R., Nieto, A. & Weinberg, R. A. (2018) ‘EMT in cancer’, *Nature Reviews Cancer*, 18(2), pp. 128–134.

Castosa, R., Martínez, O., Roca, D. *et al.* (2018) ‘Hakai overexpression effectively induces tumour progression and metastasis in vivo’, *Scientific Reports*, 8(1), pp. 1–10.

Chen, Z., Oh, D., Dubey, A.K. *et al.* (2018) ‘EGFR family and Src family kinase interactions: mechanics matters?’, *Current Opinion in Cell Biology*. Elsevier Ltd, 51, pp. 97–102.

Cohen, E., Ophir, I. & Shaul, Y. B. (1999) ‘Induced differentiation in HT29, a human colon adenocarcinoma cell line.’, *Journal of cell science*, 2666(16), pp. 2657–66.

Demkova, L. & Kucerova, L. (2018) ‘Role of the HGF/c-MET tyrosine kinase inhibitors in metastatic melanoma’, *Molecular Cancer*. Molecular Cancer, 17(1), pp. 1–14.

Di Domenico, M. & Giordano, A. (2017) ‘Signal transduction growth factors: the effective

governance of transcription and cellular adhesion in cancer invasion', *Oncotarget*, 8(22), pp. 36869–36884.

Drewinko, B., Romsdahl, M. M. & Yang, L. Y. (1976) 'Establishment of a Human Carcinoembryonic Antigen-producing Colon Adenocarcinoma Cell Line Establishment of a Human Carcinoembryonic Antigen-producing Colon Adenocarcinoma Cell Line1', pp. 467–475.

Duraes, R. O., Reis, R., Guimaraes, D. *et al.* (2018) 'Epidemiologic, clinical-pathologic, and therapeutic characterization and its correlation with ethnic ancestry in patients with colorectal cancer of the Barretos Cancer Hospital', *Clinical Cancer Research*, 24(1 Supplement), p. A69 LP-A69.

Feng, Y., Dai, X., Li, X. *et al.* (2012) 'EGF signalling pathway regulates colon cancer stem cell proliferation and apoptosis', *Cell Proliferation*, 45(5), pp. 413–419.

Furler, R. L., Nixon, D. F. & Uittenbogaart, C. H. (2018) 'TGF-  $\beta$  Sustains Tumor Progression through Biochemical and Mechanical Signal Transduction', pp. 1–18.

Fujita, Y., Krause, G., Scheffner, M. *et al.*, (2002) "Hakai, a c-Cbl-like protein, ubiquitinates and induces endocytosis of the E-cadherin complex", *Nature Cell Biology*, 4, pp. 222-231.

Greenburg, G. & Hay, E. D. (1982) 'Epithelia suspended in collagen gels can lose polarity and express characteristics of migrating mesenchymal cells', *Journal of Cell Biology*, 95(1), pp. 333–339.

Grivennikov, S. I., Greten, F. R. & Karin, M. (2010) 'Immunity, Inflammation, and Cancer', *Cell*. Elsevier Inc., 140(6), pp. 883–899.

Hanahan, D. & Weinberg, R. A. (2000) 'The Hallmarks of Cancer Review University of California at San Francisco', 100, pp. 57–70.

Henson, E. S. & Gibson, S. B. (2006) 'Surviving cell death through epidermal growth factor (EGF) signal transduction pathways: Implications for cancer therapy', *Cellular Signalling*, 18(12), pp. 2089–2097.

Irby, R. B. & Yeatman, T. J. (2002) 'Increased Src Activity Disrupts Cadherin / Catenin-mediated Homotypic Adhesion in Human Colon Cancer and Transformed Rodent Cells 1', pp. 2669–2674.

Ji, Q., Liu, X., Han, Z. *et al.* (2015) 'Resveratrol suppresses epithelial-to-mesenchymal transition in colorectal cancer through TGF- $\beta$ 1/Smads signaling pathway mediated Snail/E-cadherin expression', *BMC Cancer*, 15(1), pp. 1–12.

Kalluri, R. & Weinberg, R. a (2009) 'Review series The basics of epithelial-mesenchymal transition', *Journal of Clinical Investigation*, 119(6), pp. 1420–1428.

Kamei, T., Matozaki, T., Sakisaka, T. *et al.* (1999) 'Coendocytosis of cadherin and c-Met coupled to disruption of cell-cell adhesion in MDCK cells - regulation by Rho, Rac and Rab



small G proteins', *Oncogene*, 18(48), pp. 6776–6784.

Matsumoto, K., Umitsu, M., De Silva, D. *et al.* (2017) 'Hepatocyte growth factor/MET in cancer progression and biomarker discovery', *Cancer Science*, 108(3), pp. 296–307.

Mukherjee, M., Chow, S., Yusoff, P. *et al.* (2012) 'Structure of a novel phosphotyrosine-binding domain in Hakai that targets E-cadherin', *EMBO Journal*. Nature Publishing Group, 31(5), pp. 1308–1319.

Nieto, M. A., Huang, R., Jackson, R. *et al.* (2016) 'Emt: 2016', *Cell*, 166(1), pp. 21–45.

Palacios, F., Tushir, J., Fujita, Y. *et al.* (2005) 'Lysosomal Targeting of E-Cadherin: a Unique Mechanism for the Down-Regulation of Cell-Cell Adhesion during Epithelial to Mesenchymal Transitions', *Molecular and Cellular Biology*, 25(1), pp. 389–402.

Pardali, E., Sanchez-Duffhues, G., Gomez-Puerto, M. A. *et al.* (2017) 'TGF- $\beta$ -induced endothelial-mesenchymal transition in fibrotic diseases', *International Journal of Molecular Sciences*, 18(10).

Rodríguez-Rigueiro, T., Valladares-Ayerbes, M., Haz-Conde, M. *et al.* (2011) 'Hakai reduces cell-substratum adhesion and increases epithelial cell invasion', *BMC Cancer*. BioMed Central Ltd, 11(1), p. 474.

Santamaria, P. G., Moreno-Bueno, G., Portillo, F. *et al.* (2017) 'EMT: Present and future in clinical oncology', *Molecular Oncology*, 11(7), pp. 718–738.

Shibue, T. & Weinberg, R. A. (2017) 'EMT, CSCs, and drug resistance: the mechanistic link and clinical implications', *Nature Reviews Clinical Oncology*, 14(10), pp.611-629.

Smith, B. & Bhowmick, N. (2016) 'Role of EMT in Metastasis and Therapy Resistance', *Journal of Clinical Medicine*, 5(2), p. 17.

Sociedad Española de Oncología Médica (SEOM). (2018) 'Las cifras del Cáncer en España. 2018', *Las cifras del cáncer en España 2018*, p. 24.

Takeichi, M. (1988) 'The cadherins: cell-cell adhesion molecules controlling animal morphogenesis.', *Development (Cambridge, England)*, 102(4), pp. 639–655.

Tashiro, E., Henmi, S., Odake, H. *et al.* (2016) 'Involvement of the MEK/ERK pathway in EGF-induced E-cadherin down-regulation', *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 477(4), pp. 801–806.

Thiery, J. P. (2002) 'Epithelial–mesenchymal transitions in tumour progression', *Nature Reviews Cancer*. Nature Publishing Group, 2, p. 442.

Tomas, A., Futter, C. E. & Eden, E. R. (2014) 'EGF receptor trafficking: Consequences for signaling and cancer', *Trends in Cell Biology*. Elsevier Ltd, 24(1), pp. 26–34.

Valdespino-Gómez, V. M., Valdespino-Castillo, P. M. & Valdespino-Castillo, V. E. (2015)

‘Cell signalling pathways interaction in cellular proliferation: Potential target for therapeutic interventionism’, *Cirugía y Cirujanos (English Edition)*. Academia Mexicana de Cirugía A.C., 83(2), pp. 165–174.

Vogelmann, R. (2005) ‘TGF- $\beta$ -induced downregulation of E-cadherin-based cell-cell adhesion depends on PI3-kinase and PTEN’, *Journal of Cell Science*, 118(20), pp. 4901–4912.

Wajih, N., Walter, J. & Sane, D. C. (2002) ‘Vascular origin of a soluble truncated form of the hepatocyte growth factor receptor (c-met)’, *Circulation Research*, 90(1), pp. 46–52.

Wheelock, M. J., Shintani, Y., Maeda, M. *et al.* (2008) ‘Cadherin switching’, *Journal of Cell Science*, 121(6), pp. 727–735.

Xu, R., Zhang, Y., Gu, L. *et al.* (2015) ‘Arf6 regulates EGF-induced internalization of E-cadherin in breast cancer cells’, *Cancer Cell International*, 15(1), pp. 3–11.

Yang, J.-L., Qu, X., Russell, P. *et al.* (2004) ‘Regulation of epidermal growth factor receptor in human colon cancer cell lines by interferon  $\alpha$ ’, *Gut*, 53(1), pp. 123–129.

Yeung, K. T. & Yang, J. (2017) ‘Epithelial-mesenchymal transition in tumor metastasis’, *Molecular oncology*, 11(1), pp. 28–39.

Zavadil, J. & Böttinger, E. P. (2005) ‘TGF- $\beta$  and epithelial-to-mesenchymal transitions’, *Oncogene*, 24(37), pp. 5764–5774.

Zhang, X., Gureasko, J., Shen, K. *et al.* (2006) ‘An Allosteric Mechanism for Activation of the Kinase Domain of Epidermal Growth Factor Receptor’, *Cell*, 125(6), pp. 1137–1149.

Zhang, Y. *et al.* (2018) ‘Function of the c-Met receptor tyrosine kinase in carcinogenesis and associated therapeutic opportunities’, *Molecular Cancer*. *Molecular Cancer*, 17(1), pp. 1–14.

Zhang, Y. E. (2018) ‘Mechanistic insight into contextual TGF- $\beta$  signaling’, *Current Opinion in Cell Biology*. Elsevier Ltd, 51, pp. 1–7.

Zhao, M., Mishra, L. & Deng, C. X. (2018) ‘The role of TGF- $\beta$ /SMAD4 signaling in cancer’, *International Journal of Biological Sciences*, 14(2), pp. 111–123.