



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

MÁSTER EN BIOLOGÍA MOLECULAR, CELULAR Y GENÉTICA

Curso académico 2014-2015

TRABAJO FIN DE MÁSTER

**Identificación de nuevas dianas moleculares de la
E3 ubiquitina-ligasa Hakai**

Adrián Pérez Pérez

Junio 2015

Relación de directores

Dra. Angélica Figueroa Conde-Valvís

Tabla de contenido

1. Lista de abreviaturas.....	5
2. Resumen	6
3. Introducción	7
3.1 Cáncer epitelial.....	7
3.2 Transición epitelio-mesénquima (TEM)	7
3.3 Importancia de Hakai durante la TEM.....	10
3.4 Nuevos substratos de Hakai: Cortactina	11
3.5 Modo de actuación de Hakai y vías oncogénicas involucradas.....	11
4. Objetivos	14
5. Materiales y Métodos	15
5.1 Cultivo Celular	15
5.2 Microscopía de contraste de fases.....	15
5.3 Western Blot.....	15
5.3.1 Extracción de proteínas de células en cultivo.....	15
5.3.1.1 Cuantificación	16
5.3.2 Preparación de muestras.....	16
5.3.3 Electroforesis en gel de poliacrilamida en dodecil sulfato sódico (SDS- PAGE).....	16
5.3.4 Transferencia de las proteínas a membrana de inmunodetección.....	17
5.4 Inmunofluorescencia	18
5.5 Estudio Proteómico	19
5.5.1 Extracción proteica	19
5.5.2 Limpieza (o <i>Clean up</i>) de las muestras	19
5.5.3 Cuantificación.....	20
5.5.3.1 Método colorimétrico basado en Ácido Bicinonínico (BCA)	20
5.5.3.2 Tinción de Plata de geles de acrilamida	20
5.5.4 iTRAQ (<i>Isobaric Tag for Relative and Absolute Quantitation</i>).....	21
5.5.4.1 Procedimiento de marcaje.....	21
5.5.4.2 Reducción y bloqueo de cisteína	21

5.5.4.3 Digestión con tripsina	21
5.5.4.4 Marcaje peptídico	21
5.5.4.5 Limpieza	22
5.5.5 Fraccionamiento de péptidos mediante HPLC	23
5.5.6 Fraccionamiento de péptidos mediante nano-HPLC	23
5.5.7 Adquisición de los espectros de MS y MS/MS.....	24
5.5.8 Búsqueda en bases de datos e identificación proteica.....	24
6. Resultados.....	25
6.1 Análisis de posibles cambios fenotípicos, en las líneas de estudio (MDCK, MDCK-HA4 y MDCK-HA11), mediante microscopía de contraste de fases.....	25
6.2 Determinación de la expresión diferencial de nuestra proteína de interés, Hakai, y de sus sustratos, E-Cadherina y Cortactina, en las diferentes líneas de estudio (MDCK, MDCK-HA4 y MDCK-HA11), mediante ensayo Western-Blot.	26
6.3 Análisis mediante inmunofluorescencia de la localización celular de E-Cadherina en las diferentes líneas celulares de estudio.	27
6.4 Análisis proteómico diferencial de proteínas expresadas en líneas epiteliales que sobreexpresan Hakai de forma estable (MDCK-HA4 y MDCK-HA11) con líneas epiteliales normales MDCK.....	28
7. Discusión	39
8. Conclusiones.....	42
9. Agradecimientos	43
10. Bibliografía.....	44

1. Lista de abreviaturas

APS: persulfato amónico	iTRAQ: <i>isobaric tags for relative and absolute quantitation</i>
ARN: ácido ribonucleico	MDCK: <i>Madin-Darby canine kidney</i>
ARNm: ácido ribonucleico mensajero	MET: Transición Mesénquima-Epitelio
BCA: ácido bicinconíico	miARNs: micro ARNs
BSA: albúmina sérica bovina	MM: mieloma múltiple
CH2/CH3: cadherin homlogy 2,3	MS/MS: masas/masas
c-Met: receptor del factor de crecimiento hepatocítico	PBS: tampón fosfato salino
CMVs: cuerpos multivesiculares	PMSF: fenilmetilsulfonil fluoruro
DMEM: <i>Dulbecco's modified Eagles médium</i>	PSF: factor de <i>splicing</i> asociado a PTB
DTT: ditioneitol	PTB: polypyrimidine tract binding protein
EGFR: receptor del factor de crecimiento epidérmico	PVDF: membranas de polivinilideno de difluorido
FBS: suero bovino fetal	Rack1: receptor de protein-kinasa C activado
GAPDH: gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa	Robo: receptores <i>Roundabout</i>
HA11: MDCK-Hakai11	RP-LC: cromatografía líquida de fase reversa
HA4: MDCK-Hakai4	SDS: dodecilsulfato sódico
HGF: factor de crecimiento hipodérmico	SRC: receptor del factor de crecimiento fibroblástico
HPLC: cromatografía líquida de alta eficacia	TEM: Transición Epitelio-Mesénquima.
HRP: peroxidasa de rábano	TFA: ácido trifluoracético
HYB: dominio de unión a fosfotyrosina (pTyr-B) de Hakai	TGFβ: factor de crecimiento tumoral β

2. Resumen

Los carcinomas representan el tipo de cáncer más común (80% de tumores malignos) y son el resultado de la transformación de células epiteliales. Uno de los procesos clave en el desarrollo de adenoma a carcinoma es la transición epitelio mesénquima (TEM), que es el resultado de la movilidad y proliferación celular, así como la alteración de las uniones celulares y célula-matriz, promoviendo la actividad metastásica de las células tumorales. Uno de los miembros mejor caracterizados de las uniones célula-célula (unión adherente), es la E-Cadherinas, y su desaparición de los contactos celulares está considerada como un biomarcador de la TEM. El descubrimiento de la E3 ubiquitina-ligasa, Hakai, abrió un mundo de posibilidades a la hora del estudio de la TEM. La función de Hakai es la de la ubiquitinización de la E-Cadherina promoviendo su degradación vía lisosoma y fomentando, por tanto, la TEM. Además de la E-Cadherina, Hakai tiene otro sustrato descrito, el de la proteína citoesquelética Cortactina, la cual tiene un papel importante en la formación de prolongaciones celulares y el incremento de la motilidad celular en procesos carcinogénicos.

El objetivo de este trabajo fue el de identificar proteínas reguladas por Hakai que pueden ser sustratos de su acción como E3 ubiquitina-ligasa, así como, el de encontrar nuevas vías de señalización en las que Hakai pueda estar implicado.

Primero se llevaron a cabo estudios de Western Blot, microscopía de contraste de fases e inmunofluorescencia; a partir de células y extractos proteicos de 3 líneas tumorales distintas: una línea tumoral epitelial normal, MDCK (Madin-Darby canine kidney), y dos líneas que sobreexpresan Hakai de forma estable, MDCK-Hakai4 y MDCK-Hakai11.

A continuación se llevó a cabo un estudio proteómico basado en un marcaje iTRAQ (*Isobaric tags for relative and absolute quantification*), en el que se utilizaron estas mismas líneas celulares. Posteriormente, la detección de nuestras proteínas de interés se realizó mediante espectrometría de MS/MS.

Finalmente se analizaron los datos obtenidos mediante la utilización de distintos programas de análisis informático.

3. Introducción

3.1 Cancer epitelial

Las neoplasias malignas de origen epitelial se denominan carcinomas y representan el 80 % de los tumores malignos. El carcinoma es el tipo de cáncer más frecuente, y se origina a partir de la transformación de células epiteliales.

El epitelio es un tejido formado por una o varias capas de células unidas entre sí, que recubren las superficies del organismo, como es el caso de la piel, o las superficies que revisten un tubo o cavidad como en intestino, pulmones, riñón o vejiga. Las células epiteliales están altamente polarizadas, diferenciándose tres regiones: la apical, la basal y la lateral.

Fundamentalmente, la polarización depende de las uniones célula-célula y célula-matriz extracelular, que limitan la migración celular en el epitelio. Existen distintos tipos de uniones, incluyendo uniones adherentes, desmosomas y uniones estrechas, así como hemidesmosomas. Aunque, desde un punto de vista funcional, todos los tipos de uniones son importantes para la célula, las uniones adherentes juegan un papel crucial en la regulación de la dinámica y motilidad de las células epiteliales. De esta forma, la pérdida de componentes estructurales esenciales, puede dar pie a un fenómeno conocido como transición epitelio-mesénquima (TEM), clave en la iniciación del proceso metastásico.

3.2 Transición epitelio-mesénquima (TEM)

Durante el proceso de transformación de células epiteliales hacia fenotipo tumoral, se observa un aumento en la proliferación, en la motilidad celular, además de alteraciones en las uniones célula-célula y célula-matriz extracelular, lo que facilita la adquisición de la capacidad invasiva y metastásica (*Rodríguez-Rigueiro et al. 2011*).

Aunque el mantenimiento del fenotipo epitelial es necesario para llevar a cabo las diferentes funciones celulares, se ha demostrado que las células epiteliales diferenciadas pueden cambiar su fenotipo mediante la activación de un programa denominado transición epitelio-mesénquima (TEM), permitiendo por tanto, la conversión de células epiteliales en mesenquimales. La TEM es un paso temprano durante la metástasis de carcinoma que se asemeja a procesos típicos de los estados embrionarios como la formación del mesodermo o de la cresta neural (*Tsai y Yang 2013*). La TEM se caracteriza por un conjunto de eventos celulares que provocan la pérdida de la morfología epitelial y la adquisición de

características mesenquimales, de modo que las células se hacen móviles como resultado de la pérdida de la polaridad ápico-basal, la pérdida de los contactos célula-célula, y la reorganización del citoesqueleto de actina, así como la capacidad de invadir la matriz extracelular como célula individual (Zeisberg y Neilson 2009).

Diversos estudios han demostrado que muchas células tumorales siguen este camino durante el desarrollo metastásico adquiriendo una conformación similar a los fibroblastos que rodean el estroma, adquiriendo capacidad migratoria, extravasándose e invadiendo otros tejidos para posteriormente revertir el ciclo y fijarse en nuevas ubicaciones (**Figura 1**) (Heerboth et al. 2015).

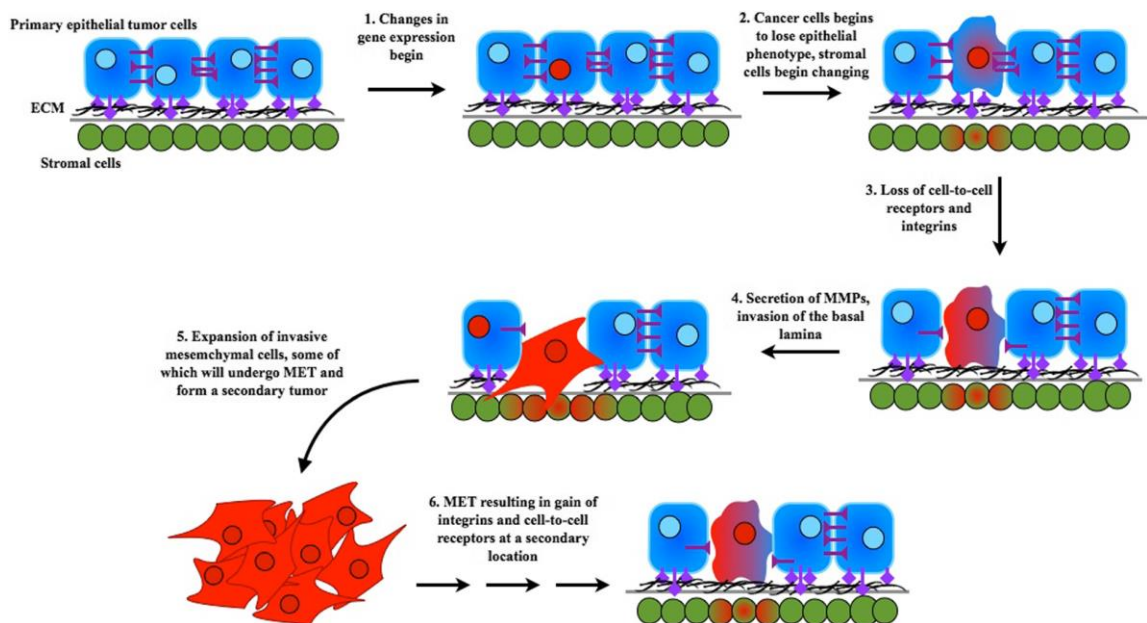


Figura 1. Cambios producidos en una célula tumoral sometida a TEM que metastatiza en otra localización. Imagen adaptada de Heerboth et al. 2015. Las células tumorales se muestran en azul, las estromales en verde, los receptores de unión celular en púrpura y el gradiente de azul a rojo y de verde a rojo, ejemplifica la transformación hacia el fenotipo mesenquimal. Todo comienza con la pérdida del fenotipo epitelial (**paso 2**) y de contactos celulares (**paso 3**). La célula tumoral bajo TEM provoca cambios fenotípicos en las células del estroma (**paso 4**) invadiendo la lámina basal. Finalmente termina por extravasarse (**paso 5**), de forma que ya está disponible para fijarse en una nueva posición (**paso 6**) y metastatizar a través de la transición mesénquima-epitelio.

Uno de los marcadores más estudiados de la TEM, es la pérdida de la E-Cadherina, considerada como un gen supresor de tumores. E-cadherina es una proteína transmembrana tipo-1 constituyente de las uniones adherentes.

Las uniones adherentes se tratan de un tipo de uniones Ca^{+2} -dependientes (Kowalczyk y Nanes 2012), que están constituidas por una proteína transmembrana tipo-1,

siendo la familia de las cadherinas las más representativas. Dentro de esta familia nos encontramos con más de 20 miembros que presentan una organización en común. Entre ellos destacamos las E-cadherinas (epiteliales, Cdh1), N-cadherinas (neuronaes, Cdh2) y P-cadherinas (placentarias, Cdh3), las cuales presentan una distribución tejido específica. La E-cadherina presenta la siguiente estructura (Brasch et al. 2012) (Figura 2):

- Un dominio extracelular dividido en 5 subdominios repetitivos, también llamados *cadherin repeats* que presentan dominios de unión a calcio. Estos mediante su unión a Ca^{+2} van a promover su unión con otros dominios extracelulares de E-Cadherina, formando uniones adherentes entre células vecinas.
- Un dominio citoplasmático que presenta dos secuencias: CH2 y CH3 denominados así (cadherin homology 2,3) debido a que se encuentran muy conservados entre las cadherinas clásicas. A estos dominios se van a unir algunas proteínas citosólicas, como las denominadas cateninas: α -catenina, β -catenina y p120-catenina, que están en contacto con el citoesqueleto de actina y que pueden estar implicadas en la señalización celular.

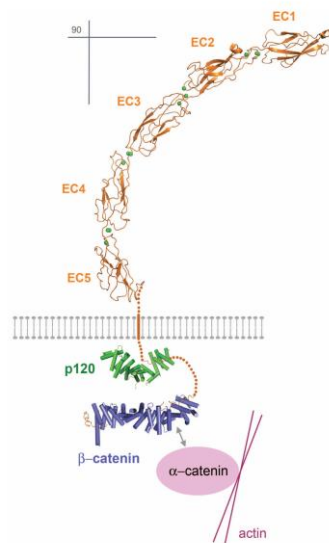


Figura 2. Estructura molecular de la E-Cadherina. Imagen adaptada de Brasch et al.2012. Se muestran los dominios extracelulares de E-Cadherina: EC1, EC2, EC3, EC4 Y EC5. Además aparecen los dominios transmembrana y citoplasmático, este último asociado a distintas proteínas citosólicas relacionadas con el reciclaje de E-Cadherina

El inicio de la TEM se corresponde con la pérdida de uniones adherentes, proceso que comienza con la activación de tirosin-kinasas como el EGFR, el receptor del factor de crecimiento hepatocítico c-Met, o Src (receptor del factor de crecimiento fibroblástico). En concreto c-Met y Src juegan un papel fundamental en la endocitosis de E-cadherina, pues van a fosforilar los residuos tyrosina de CH2 en el dominio citoplasmático de la E-cadherina.

3.3 Importancia de Hakai durante la TEM

Dada la enorme importancia adquirida de la pérdida de la proteína E-cadherina durante el proceso de EMT en la progresión tumoral de la mayoría de los cánceres epiteliales humanos, se han estudiado extensamente, los mecanismos implicados en su inactivación funcional. Uno de los procesos que media la degradación de E-cadherina durante la TEM, es promovido por la proteína, Hakai. Hakai es una E3 ubiquitina-ligasa, descubierta por *Fujita et al. 2002.*, que reconoce los dominios fosforilados de la E-Cadherina antes descritos y promueve su ubiquitinización, lo que tiene como resultado final, su degradación vía lisosoma (*Palacios et al. 2005*).

Aunque Hakai fue descrito inicialmente como una E3 ubiquitina-ligasa de tipo *RING finger* (*Fujita et al. 2002*) conocidas como Cbl, que van a presentar una estructura con cierta homología a la de Hakai (también se conoce como Cbl1), recientemente se ha sugerido que Hakai y c-Cbl no son verdaderamente homólogas, pero que pueden ser el resultado de un proceso de intercambio de exones, a partir de precursores distantes que hayan dado lugar a su similitud estructural. Como consecuencia de esta diferencia, un estudio reciente, va más allá y evidencia diferencias en el dominio de unión a fosfotyrosina (pTyr-B) de Hakai con respecto a la estructura de Cbl, que se denomina *HYB* (*Hakai pTyr-B*) (*Mukherjee et al. 2012*). Este dominio HYB consiste en una par de monómeros dispuestos en una configuración anti-paralela, donde cada monómero consta de dos dominios de *Zn-finger*: un dominio *RING-finger* y un dominio corto pTyr-B que incorpora una nuevo modelo atípico de coordinación Zn-finger (**Figura 3**).

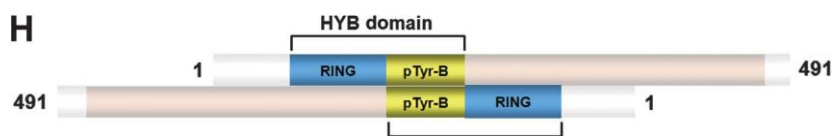


Figura 3. Representación esquemática del dímero de Hakai y su dominio HYB. Imagen adaptada de *Mukherjee et al. 2012*

Por lo tanto cada HYB está constituido por cuatro dominios de unión a Zn que participan en la unión de residuos de tyrosina fosforilados alrededor de aminoácidos ácidos. En base a este nuevo dominio descrito para Hakai, se ha propuesto que puede ser una buena diana terapéutica contra el cáncer.

3.4 Nuevos sustratos de Hakai: Cortactina

Además del ya descrito sustrato de Hakai, E-cadherina, recientemente se ha publicado que la proteína denominada Cortactina es también sustrato de Hakai. Cortactina está implicada en la reorganización del citoesqueleto de actina, promoviendo así, la formación de estructuras, como pseudópodos, durante la invasión y migración de células cancerígenas. Existen evidencias que demuestran que Hakai degrada la Cortactina por la misma vía que la E-Cadherina, aunque se está estudiando, aún, el significado funcional de esta degradación.

La Cortactina se trata de una proteína implicada críticamente en la reorganización y nueva polimerización del citoesqueleto de actina, en protuberancias celulares, durante la migración celular e invasión (*Kirkbride et al. 2011*). Se expresa ubicuamente como una proteína de unión a filamentos de actina que estabiliza las redes de F-actina y promueve la polimerización de la actina mediante la activación de la proteína relacionada con la actina Arp2/3 (*Hirakawa 2009*). La sobreexpresión de cortactina en células cancerígenas estimula la migración celular, invasión y metástasis; sin embargo, el mecanismo que explica el papel de la cortactina en la progresión tumoral no se entiende completamente.

Algunos estudios, muestran como los niveles de expresión de cortactina aumentan en células cancerígenas, y como se produce una deslocalización hacia los márgenes celulares, con la intención de promover la formación de estructuras móviles (*Xu et al. 2010; Hirakawa 2009*).

La estructura molecular de la Cortactina presenta un dominio ácido amino-terminal, un dominio de repetición en tándem, una región carboxy-terminal rica en prolina con puntos susceptibles de fosforilación y un dominio SH3. De esta forma, al igual que la E-Cadherina, la Cortactina ha de ser fosforilada por la quinasa Src en su región carboxy-terminal, para poder ser reconocida por nuestra proteína de interés.

3.5 Modo de actuación de Hakai y vías oncogénicas involucradas

Previamente se ha mencionado que las uniones adherentes, son un tipo de uniones Ca^{+2} -dependientes, y es de esta forma como se va a iniciar el proceso de endocitosis de E-Cadherina. Así, una reducción en los niveles de Ca^{+2} desencadena una activación de las GTPasas monoméricas de la familia rho/rac/cdc42 que da lugar a la activación de tirosin-quinazas específicas como EGFR y Src, que van a actuar sobre los residuos de tirosina del dominio CH2 de la E-Cadherina, fosforilándolos, de forma que ya puedan ser reconocidos

por los dominions HYB de Hakai, siendo así sustrato de ubiquitinización y posterior degradación en el lisosoma (Aparicio *et al.* 2012) (**Figura 4a**). Por otro lado se ha demostrado que Rack1 un receptor de protein-kinasa C activado (Liliental y Chang 1998), inducido por HGF, promueve la adhesión celular mediante la estabilización de E-cadherina. Su función es la de suprimir la fosforilación de E-cadherina promoviendo la unión de catenina e impidiendo de este modo el proceso de ubiquitinización (Aparicio *et al.* 2012) (**Figura 4a**).

Otro factor clave en el proceso metastásico es TGF β , que guarda relación con el inicio de la TEM y las proteínas efectoras de RAS (Raf/ERK/MAPK), que se encuentran relacionados con Hakai. Se ha demostrado que la E-cadherina puede ser regulada a nivel postraduccional por diversos mecanismos, como la fosforilación Raf-dependiente (**Figura 4b**) y TGF β . Pese a que Raf no puede fosforilar directamente los residuos Tyr de CH2 de la E-Cadherina, su activación genera una cascada de activación de otras tyrosin-kinasas como Src, que inicia entonces, el proceso de endocitosis de la E-Cadherina. Dicha regulación puede ser llevada a cabo, a través de mecanismos transcripción dependiente de TGF β que fomentan su ubiquitinización (**Figura 4b**).

Finalmente se ha demostrado que las proteínas de la familia *Slit* (**Figura 4c**) que guían la migración celular en neuronas y leucocitos a través de sus receptores *Roundabout* (Robo), reclutan Hakai promoviendo la ubiquitinación y degradación lisosomal de E-Cadherina, la transición epitelio-mesenquimal (TEM), y el crecimiento del tumor y la metástasis de hígado (Zhou *et al.* 2011). Estas proteínas *Slits* son secretadas en tumores sólidos y se unen a sus receptores Robo expresados en células endoteliales linfáticas y vasculares, promoviendo la angiogénesis característica de la metástasis.

Por último, en los últimos años se han descrito nuevas funcionalidades a Hakai, entre las que se destacan:

- La asociación de Hakai a una proteína de unión a al ARN, PSF (factor de splicing asociado a PTB). Este factor se asocia con ARNm, que codifican proteínas relacionadas con el cáncer. Diversos estudios (Figueroa, Fujita y Gorospe 2009) demuestran que Hakai afecta la capacidad del PSF para unir estos ARNm, regulando la proliferación celular por modulación de la actividad de PSF.
- Hakai se localiza en el extremo de las protuberancias de las células transformadas lo que sugiere que puede estar involucrado en la regulación de la extensión dinámica y retracción de estas estructuras e influir en la motilidad celular (Figueroa *et al.* 2009)

Por otro lado, se ha demostrado que Hakai es un importante regulador de la proliferación celular y que es un potencial oncogen siendo una futura diana molecular para el tratamiento del cáncer. El conocimiento de todos estos mecanismos en los que Hakai esta implicado, permite la búsqueda de nuevos substratos que puedan explicar todos los cambios fenotípicos observados por la acción de Hakai.

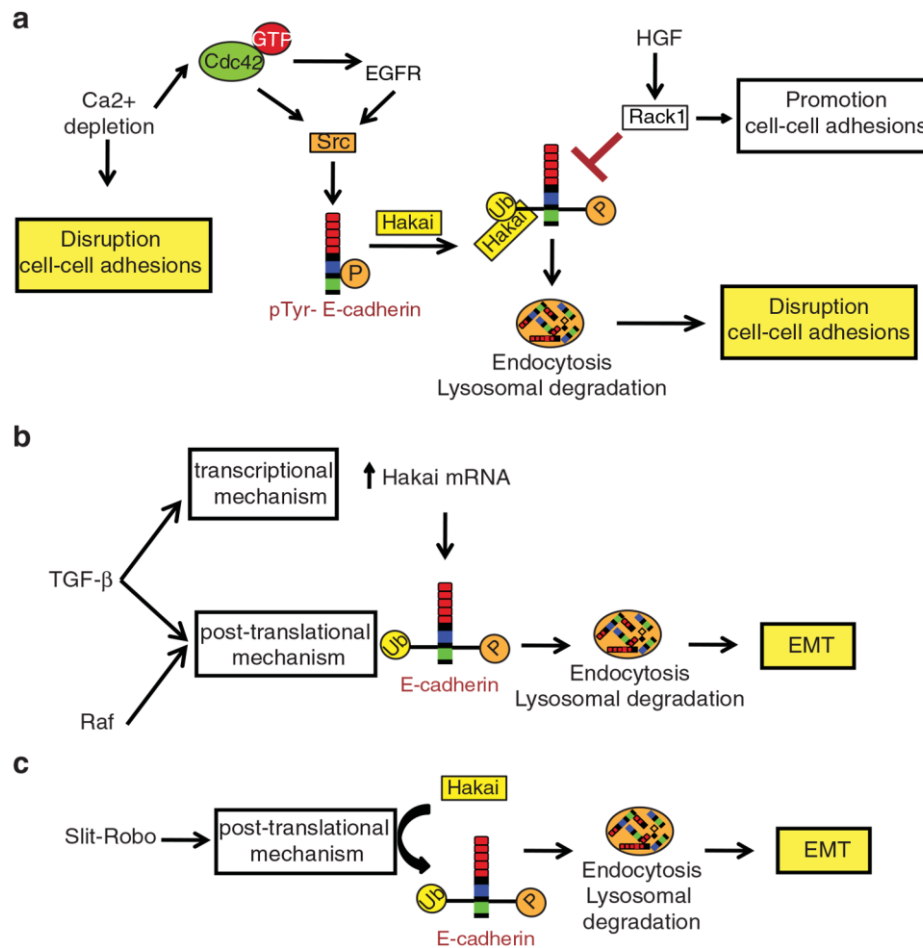


Figura 4. Vías de señalización *upstream* de Hakai. Imagen adaptada de Aparicio et al. 2012.

- A. Fosforilación de los residuos Tyr de las E-cadherinas como resultado de la activación de Src y EGFR por Cdc42. Inhibición de este proceso por Rack 1.**
- B. Mecanismo postraduccional y transcripcional que actúan sobre Hakai.**
- C. Mecanismo Slit-Robo genera angiogénesis y extravasación.**

4. Objetivos

Los objetivos del presente trabajo son:

1. Analizar posibles cambios fenotípicos, en las distintas líneas de estudio: líneas epiteliales normales MDCK y en dos líneas epiteliales que sobreexpresan de forma estable Hakai-MDCK (MDCK, MDCK-HA4 y MDCK-HA11, respectivamente), mediante microscopía de contraste de fases.
2. Determinación de la expresión diferencial de nuestra proteína de interés, Hakai, y de sus sustratos descritos, E-Cadherina y Cortactina, en las diferentes líneas de estudio (MDCK, MDCK-HA4 y MDCK-HA11), mediante ensayo Western-Blot.
3. Análisis mediante inmunofluorescencia de la localización celular de E-Cadherina en las diferentes líneas celulares de estudio.
4. Análisis proteómico diferencial de proteínas expresadas en líneas epiteliales que sobreexpresan Hakai de forma estable (MDCK-HA4 y MDCK-HA11) con líneas epiteliales normales MDCK.

5. Materiales y Métodos

5.1 Cultivo Celular

Las células de partida fueron Madin-Darby canine kidney (MDCK) y clones que expresan Hakai de forma estable, MDCK-Hakai4 (HA4) y MDCK-Hakai11 (HA11). Las líneas fueron cedidas por Yasuyuki Fujita. Los clones que expresan Hakai de forma estable fueron generados por transfección con Lipofectamina (*Figuroa et al. 2009*) (*Rodríguez-Rigueiro et al. 2011*)

El cultivo celular se inició a partir de líneas MDCK, HA4 Y HA11 previamente generadas y congeladas en viales con una proporción de 3×10^6 células/ml de Dulbecco's modified Eagles médium (DMEM)

Tras la descongelación de las líneas celulares, se sembraron y fueron cultivadas en DMEM conteniendo penicilina/streptomycin 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ al 1%, suero bovino fetal (FBS) al 10% y L-glutamina 100x al 1%. El cultivo se incubó en una estufa a 37°C y con un suplemento de 5% de CO_2 , hasta alcanzar la confluencia requerida para la extracción proteica (aprox. 80-90% del total).

5.2 Microscopía de contraste de fases

Las células MDCK, HA4 Y HA11 fueron cultivadas en placas de 6 pocillos (BD Biosciences, EE UU) a una concentración de $2 \cdot 10^5$ células/ml. Tras 48 horas de tratamiento, las células fueron lavadas con tampón fosfato salino (PBS) dos veces, fijadas con PFA (Paraformaldehído) 4% - PBS durante 15 minutos y a continuación, tras un nuevo lavado con PBS, se tomaron imágenes con microscopio de contraste de fases (Nikon Eclipse Ti, Japón).

5.3 Westen Blot

5.3.1 Extracción de proteínas de células en cultivo

Para la extracción proteica, las diferentes líneas se sembraron en placas p100 con una confluencia del 80-90. Se utilizó 1 ml de PBS con un pH de 7,6 y se llevó a cabo el "scrappeado" del cultivo, se recogió la suspensión en un tubo Eppendorf y se centrifugó (5000 rpm, 5min a RT), finalmente se retiró el sobrenadante obtenido.

A partir de los pellets obtenidos de cada línea se llevó a cabo la lisis celular, para lo cual se trató cada muestra con 100 µl de tampón de lisis 1% TritonX-100 (20mM Tris-HCl pH 7.5, 150mM NaCl, 1% TritonX-100), suplementado con fenilmetilsulfonil fluoruro (PMSF al 1x) y un cóctel inhibidor de proteasas 1x (Sigma-Aldrich, Alemania). Esta mezcla de reacción se incubó durante 20 min a 4°C y posteriormente se centrifugó a 12000 rpm durante 10 min, obteniendo un sobrenadante con el extracto proteico de cada línea que se guardó a -20°C hasta su posterior uso.

5.3.1.1 Cuantificación

A continuación se procedió a la determinación de la concentración proteica de cada muestra, mediante el método colorimétrico basado en Ácido Bicinconínico (BCA). Este método de basa en la reducción del ión Cu^{++} , en un medio alcalino, por acción de los enlaces peptídicos de las proteínas a cuantificar. Los iones Cu^+ producidos, se unen a dos moléculas de BCA y al hacerlo, varían su estructura electrónica siendo capaces de absorber luz a 562 nm. En las condiciones de la reacción, la absorbancia del compuesto es proporcional a la concentración de proteína presente. Se siguió el protocolo tal y como indica el *kit Pierce BCA Protein Assay* (Thermo Scientific, EE UU).

5.3.2 Preparación de muestras

Tras realizar la cuantificación de proteínas de las muestras, se tomaron 20 µg de proteína por muestra, y se añadió Laemmli Buffer 5x (4% de SDS, 20% de glicerol, 10% de 2-mercaptoetanol, 0.004% de azul de bromofenol, 0.125M de Tris-HCl) y tampón de lisis 1% TritonX-100. Las muestras se hirvieron a 95°C durante 10 minutos, produciéndose así la desnaturalización de las proteínas, preparadas para cargar en un gel, o para ser conservadas congeladas a -20°C.

5.3.3 Electroforesis en gel de poliacrilamida en dodecil sulfato sódico (SDS-PAGE)

SDS-PAGE es un tipo de electroforesis desnaturalizante, en la que las proteínas se desnaturalizan en presencia de calor por la acción de beta-mercaptoetanol, ditioneitol (DTT) y dodecilsulfato sódico (SDS). Por un lado, el SDS rompe las interacciones no covalentes responsables de la estructura terciaria y cuaternaria, desnaturalizando por completo las proteínas. Por otro lado, el beta-mercaptoetanol y el DTT actúan reduciendo los puentes disulfuro entre dos residuos de cisteína. Las proteínas desnaturalizadas y acomplejadas con el SDS adquieren carga negativa, de forma que los complejos SDS-

proteína migran desde el ánodo hasta el cátodo proporcionalmente a la masa, pudiéndose determinar el peso molecular de la proteína si lo comparamos con un marcador de tamaño molecular.

Los geles utilizados para electroforesis fueron de poliacrilamida al 10%. Los geles concentrador y separador se prepararon de la siguiente forma: 1) Gel concentrador: 0.5M Tris/HCl (pH 6.8), 30% acrilamida/bisacrilamida (Sigma-Aldrich, Alemania), 10% SDS, 10 µl de TEMED y 10% de persulfato de amonio APS (Sigma-Aldrich, Alemania). 2) Gel separador: 1.5M Tris/HCl (pH 8.8), 50% de glicerol (Sigma), 30% acrilamida/bisacrilamida (Sigma-Aldrich, Alemania), 10% SDS (Sigma), 30 µl de TEMED (Sigma-Aldrich, Alemania) y APS al 10%. Se utilizó, además unos cristales separadores que dotan de un grosor de 1,5 mm al gel. La electroforesis se llevó a cabo con el equipo BioRad Mini Gel, utilizando tampón de electroforesis (Trizma base 0.025 mM, glicina 0.192 M y un 0.1% de SDS), utilizando como condiciones 80V durante 20 minutos y 200V durante 1 hora.

5.3.4 Transferencia de las proteínas a membrana de inmunodetección

Las proteínas se transfirieron a membranas de polivinilideno de difluorido PVDF (Millipore, EE UU), previamente activadas con metanol y humedecidas en agua. Se siguieron las indicaciones de uso del equipo Mini Trans-Blot (BioRad, EE UU) para llevar a cabo el proceso, utilizando tampón de transferencia (Trizma base 0.025 mM, glicina 0.192 M y 20% de metanol en agua), a 200mA durante 1 hora.

Para la inmunodetección de las proteínas, se incubaron las membranas en la solución de bloqueo: 5% de leche en tampón fosfato pH 7.6, durante 1 hora a temperatura ambiente. En primer lugar, se incubaron las membranas con el anticuerpo primario, específico frente a las proteínas de interés que se quieren detectar, diluido en la solución de bloqueo durante 1 hora a temperatura ambiente. Se utilizaron los siguientes anticuerpos primarios: anti-E-Cadherina purificada de ratón (610182-BD Bioscience), anti-Cortactina de conejo (05-180 clone 4F11-Millipore), anti-Hakai policlonal de conejo (36-2800-Life Technologies) y anti-GAPDH monoclonal de conejo (Invitrogen). Todos los anticuerpos primarios se utilizaron a una dilución 1:1000. Tras la incubación con los anticuerpos primarios, se realizaron 3 lavados de 5 minutos a las membranas con tampón de lavado (PBS, 0.05% de detergente Tween 20, (Sigma-Aldrich, Alemania) en agitación.

Posteriormente, las membranas se incubaron con el anticuerpo secundario, adecuado para cada caso, diluido 1:2000 en la solución de bloqueo durante 45 minutos a temperatura ambiente. Los anticuerpos secundarios utilizados fueron anti-mouse (GE Healthcare, Reino

Unido) y anti-rabbit (GE Healthcare, Reino Unido), ambos marcados con la peroxidasa de rábano (HRP) que permite su detección mediante luminiscencia. Tras la incubación de las membranas con el anticuerpo secundario, se realizaron 3 lavados de 5 minutos en agitación con el tampón de lavado. Por último, la proteínas inmunoreactivas se visualizaron siguiendo el protocolo de *Amersham ECL™ Western Blotting Analysis System* (GE Healthcare, Reino Unido) y utilizando la cámara LAS 3000 (Fujifilm, Japón).

5.4 Inmunofluorescencia

Para la inmunofluorescencia se sembraron en placas de 24 pocillos, sobre cubres de cristal, las líneas MDCK, HA4 Y HA11 por triplicado con una confluencia de 3×10^4 células/pocillo. Tras 24 horas de incubación en una estufa a 37°C con un 5% de CO₂, se llevaron a cabo dos lavados de cada pocillo con PBS (pH 7,4), para posteriormente fijar las células con acetona durante 10 min a 4°C. A continuación se elimina la acetona (evaporación) y se bloquean los pocillos con BSA al 5% durante 30 min, para evitar uniones inespecíficas antígeno(Ag)-anticuerpo(Ac). El siguiente paso consiste en la permeabilización de la membrana celular, para que los anticuerpos puedan penetrar, para lo que se utiliza 0,5% Triton X-100/PBS pH 7,4 durante 15 min a T^a ambiente. Una vez permeabilizadas las células, se lava cada pocillo con PBS y se incuban con los anticuerpos primarios correspondientes, en este caso anti-E-cadherina purificada de ratón (610182-BD Bioscience). La incubación se lleva a cabo a una dilución 1:300 con PBS pH 7,4 durante 1 hora a temperatura ambiente. Transcurrida esa hora se realizan 4 lavados con PBS en agitación suave, para, a continuación, incubar con los anticuerpos secundarios: anti-mouse (GE Healthcare, Reino Unido) para anti-E-Cadherina, que se encuentran conjugado con Alexa Fluor®-488 (Invitrogen, EE UU). Los anticuerpos se utilizaron a una dilución 1:500 durante 1 hora a temperatura ambiente y en oscuridad. A continuación se procede a 4 nuevos lavados con PBS y se realiza la incubación con DAPI (Sigma-Aldrich, Alemania) durante 3 minutos en oscuridad. Finalmente se realizó un lavado con PBS y se montó en medio de montaje *GlycerGel Mounting Medium* (Dako, Dinamarca). Los resultados se observaron el microscopio de fluorescencia *Monitorized reflected Fluorescence System* (Olympus, Japón).

5.5 Estudio Proteómico

La proteómica cuantitativa es una rama importante de la proteómica que se aplica para cuantificar e identificar todas las proteínas expresadas por un genoma entero o en una mezcla compleja. En este estudio, para dicha cuantificación, se utilizó el método de marcaje iTRAQ (Isobaric tags for relative and absolute quantitation), el cual nos permite realizar una cuantificación relativa del proteoma de 4 condiciones distintas simultáneamente (*Sun et al. 2011*). A continuación se explica el procedimiento utilizado para dicho ensayo experimental.

5.5.1 Extracción proteica

Se decidió partir de dos extractos proteicos de MDCK (duplicados que llamaremos MDCK1 Y MDCK2), y dos extractos de los clones previamente descritos HA4 y HA11, para obtener un resultado más significativo. Para el cultivo celular se partió de una placas p100 para cada muestra (MDCK1, MDCK2, HA4 Y HA11) con una confluencia del 80-90%, y se procedió a su lavado, obtención de pellet celular, lisado y extracción proteica como previamente se ha explicado (western blot, punto 5.3.1), obteniendo un sobrenadante con el extracto proteico de cada línea que se congeló a -20 °C hasta su posterior uso.

5.5.2 Limpieza (o *Clean up*) de las muestras

La precipitación con acetona se utiliza como método de limpieza de las muestras para la eliminación de sustancias que puedan interferir con el proceso de marcaje (ácidos nucleicos, lípidos, sales...). Para ello se midió el volumen del sobrenadante obtenido (60µl) y se le añadió una solución de acetona fría en una proporción 1:6 (v/v). Esta mezcla se incubó a -20°C *overnight*. Tras la incubación, se centrifugó la mezcla durante 20 minutos a 13000 rpm a 4°C, se descartó el sobrenadante por decantación y se dejó secar al aire. El precipitado obtenido se resuspendió en el mínimo volumen posible de “*dissolution buffer*” (iTRAQ Reagent application kit) mediante ciclos de 15 minutos de agitación y 5 minutos de sonicación. Una vez resuspendido todo el precipitado, las muestras se centrifugaron 10 minutos a 13.000 g a 4°C para eliminar restos insolubles. El sobrenadante se recuperó y se guardó a -20°C hasta su utilización.

5.5.3 Cuantificación

5.5.3.1 Método colorimétrico basado en Ácido Bicinconínico (BCA)

Se llevó a cabo tal y como se especifica en el punto 5.3.1.1 del ensayo de Western Blot.

5.5.3.2 Tinción de Plata de geles de acrilamida

5.5.3.2.1 Preparación de las muestras

Se tomaron 2 µl de cada muestra del extracto proteico precipitado, y se añadió Laemmli Buffer 5x (4% de SDS, 20% de glicerol, 10% de 2-mercaptoetanol, 0.004% de azul de bromofenol, 0.125M de Tris-HCl) y tampón de lisis 1% TritonX-100 hasta un volumen final de 10 µl. Las muestras se hirvieron a 95°C durante 10 minutos, produciéndose así la desnaturalización de las proteínas, preparadas para cargar en un gel de acrilamida.

5.5.3.3 Electroforesis en gel de poliacrilamida en dodecil sulfato sódico (SDS-PAGE)

El procedimiento, fundamento y reactivos de la técnica son iguales a los utilizados en el punto 5.3.3 del ensayo de Western Blot.

5.5.3.4 Tinción de Plata

Una vez acabada la electroforesis, el gel se tiñó con plata mediante el método de Rabilloud (1992). El gel se fijó sumergiéndolo en etanol al 40% y ácido acético al 10% durante 30 minutos 2 veces. Después se lavó 4 veces con agua durante 5 minutos. Posteriormente se incubó con una solución sensibilizadora que contenía tiosulfato sódico al 0,02% durante 1 minuto. A continuación, se realizaron 2 lavados de 1 minuto con agua y, seguidamente, se procedió a la tinción del gel con una solución de nitrato de plata al 0,02% y formaldehído al 0,075% durante 30 minutos. Se volvió a lavar el gel con agua durante 10 segundos y las proteínas se revelaron en una solución que contenía carbonato sódico al 3%, tiosulfato sódico al 0,00125% y formaldehído al 0,025%. Finalmente, la reacción se detuvo con una solución que contenía Tris al 3% y ácido acético al 10%. Los geles se preservaron en agua destilada hasta su análisis.

5.5.3.5 Escaneado de geles y densitometría

Los geles se escanearon empleando un equipo ImageScanner (Amersham Pharmacia Biotech) y el programa Photoshop Elements. La imagen se analizó por densitometría con el software Image Quant y los datos obtenidos se utilizaron para corregir las concentraciones proteicas calculadas mediante el método del BCA.

5.5.4 iTRAQ (Isobaric Tag for Relative and Absolute Quantitation)

5.5.4.1 Procedimiento de marcaje

Los reactivos de marcaje isotópico y de tratamiento de las muestras para su reducción y digestión, fueron aportados por AB Sciex (iTRAQ Reagent application kit). Tras la precipitación de las proteínas, se toman de partida 25 µg de extracto proteico precipitado de cada línea y se procede a su desnaturalización, digestión y marcaje.

5.5.4.2 Reducción y bloqueo de cisteína

A cada muestra se le añade 1 µl de reactivo desnaturalizante (SDS) y se mezcla. A continuación, se le añade 2 µl de reactivo reductor (MMTS), se mezcla y se centrifuga (spin). Se incuba a 60°C durante 1h. Una vez transcurrido este tiempo, se le añade a cada muestra 1 µl de “Cysteine Blocking Reagent”, se mezcla y se incuba a T^a ambiente 10 min.

5.5.4.3 Digestión con tripsina

Se añade a cada muestra 10 µl de solución de tripsina (1:20 enzima/sustrato), se mezclan (vortex-spin) y se incuba a 37° C 16 h. Es necesario medir el pH de la mezcla de reacción antes de añadir la enzima, ya que para que la digestión se lleve a cabo de forma correcta se han de dar unos valores de pH neutro (7,5).

5.5.4.4 Marcaje peptídico

Finalmente, se va a llevar a cabo el marcaje con los “isobaric tags”. En primer lugar, se llevan a temperatura ambiente a los reactivos de marcaje y se le añade a cada uno etanol, que sirve como disolvente, puesto que los marcadores están liofilizados. El etanol ha de estar presente, al menos, a una concentración del 60% en el volumen final, por lo que como partimos de 55 µl de cada muestra,

utilizamos 85µl por muestra. A continuación, se transfiere la mezcla de reactivos de iTRAQ y etanol a cada muestra, para lo que se decidió utilizar los marcadores del siguiente modo: la muestra procedente de la línea MDCK1, se marcó con el marcador isotópico 114,1; la procedente de la MDCK2 con el 115,1; la procedente de la HA4 con el 116,1 y la procedente de la HA11 con el 117,1.

Una vez realizada la mezcla (vortex-spin) se incubaba cada muestra con su marcador durante 1 hora. Pasado este tiempo, se comprueba si los péptidos se han marcado correctamente, para lo cual, se analiza una alícuota de cada muestra mediante espectrometría de masas y se corrobora si en los espectros de fragmentación (MS/MS) aparecen los picos correspondientes al marcaje de cada muestra.

Tras comprobar el marcaje, las 4 muestras se centrifugan a 13000 rpm a temperatura ambiente y se combinan los sobrenadantes en una única mezcla de reacción. Este mezcla de reacción se liofiliza en una “speedvac”, mediante un mecanismo de centrifugación en vacío y se guardan a -20°C hasta su utilización.

5.5.4.5 Limpieza

A continuación, los péptidos marcados y liofilizados se sometieron a una limpieza para eliminar sales mediante una cromatografía de fase reversa utilizando una columna PepClean™ C-18 Spin Columns (Pierce). Los péptidos se resuspendieron (vortex-sonicación) en 100 µL de TFA 0,5% y se comprobó que el pH de la mezcla fuera menor que 2. La resina C18 contenida en las columnas se activó con metanol 50% y se acondicionó mediante un lavado con buffer de elución (acetonitrilo 70% y TFA 0,1%) y tres lavados con buffer de lavado (TFA 0,5% en acetonitrilo 5%). Una vez acondicionada la columna, se añadieron los 100 µL de muestra a pH ácido, con lo que los péptidos quedaron retenidos en la resina. Seguidamente, la columna se lavó 3 veces con 100 µL de buffer de lavado para eliminar sales y otras impurezas. Finalmente, se llevó a cabo la elución de la muestra dos veces con 70 µL de buffer de elución. Las dos eluciones se juntaron y los péptidos tripticos se secaron en la “speedvac” y se guardaron a -20°C hasta su utilización.

5.5.5 Fraccionamiento de péptidos mediante HPLC.

Tras la limpieza, la mezcla de péptidos secos fue reconstituida en fase móvil (NH₄OH 10Mm, 5% acetonitrilo, 95% H₂O), para ser separada en primer lugar por cromatografía líquida de fase reversa (RP-LC) a pH básico (pH 10) para reducir su complejidad. La separación se realizó en un sistema HP 1200 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EE.UU.) empleando una columna de fase reversa C18 (Zorbax extenden C18, 100 3 2,1 mm ID, 3,5 mm, 300 Å; Agilent). La velocidad de flujo usada fue 0,2 mL / minuto y el gradiente empleado se detalla en la **tabla 1**. El cromatograma se produjo usando un detector UV a 214 nm. Varias fracciones se reunieron después de la recolección (FC203B fractio collection, Gilson, Middleton, WI, EE.UU.) en base a la intensidad máxima de la señal ultravioleta, dando un total de 60 fracciones. Cada fracción se secó en un concentrador de vacío y se almacenó a -20°C hasta el siguiente paso del análisis.

Time (min)	% Solvent B
0-10	0
10-50	0-60
50-52	60-100
52-58	100
58-60	100-0
60-80	0

Tabla 1.
Esquema del gradiente utilizado en la cromatografía.
El % de solvente B hace referencia a la concentración de acetonitrilo.

5.5.6 Fraccionamiento de péptidos mediante nano-HPLC

Tras el fraccionamiento anterior, los péptidos secos se reconstituyeron añadiendo 7 µL de una mezcla 0,1% TFA y 2% acetonitrilo. Las fracciones peptídicas se separaron por cromatografía líquida de fase reversa a pH ácido usando un equipo nanoLC (Tempo, Eksigent, Dublin, CA, USA). Las muestras se pasaron a través de una pre-columna y de una columna de sílica C18 (New Objective, Woburn MA, USA) con un diámetro interno de 300 Å. Para llevar a cabo la cromatografía se utilizaron las mezclas de solventes A, compuesta por TFA al 0,1% y acetonitrilo al 5%, y B, constituida por TFA al 0,1% y acetonitrilo al 70%. Los péptidos se eluyeron usando un flujo de 350 nL min⁻¹ durante 90 minutos de gradiente lineal de un 5% a un 50% de B, se mezclaron con matriz α-cyano (4 mg mL⁻¹ de α-cyano en TFA 0,1% y acetonitrilo 70% a un flujo de 1,2 µL min⁻¹) y se depositaron en una placa de MALDI usando un aplicador de gotas automático (SunCollect,

Sunchrome, Friedrichsdorf, Germany). Los cromatogramas correspondientes a cada sección de gel consistieron en 360 fracciones, comprendiendo cada una 15 segundos de deposición. La formación de gotas se llevó a cabo en oscuridad para impedir la degradación de la matriz.

5.5.7 Adquisición de los espectros de MS y MS/MS

Los espectros de MS se adquirieron y analizaron con un equipo MALDI-TOF/TOF (4800 ABSciex, Framingham, MA, USA). Se usó una intensidad fija de láser de 3400 kV y 1500 disparos por fracción. Una vez adquiridos los espectros de MS se realizó una selección automática de los precursores para el trabajo de fragmentación (MS/MS). En todos los casos la fragmentación de los péptidos se llevó a cabo con un voltaje de láser de 4400 kV y 2000 disparos por espectro. Los espectros de MS/MS se utilizaron para el procesamiento de datos y la identificación de proteínas.

5.5.8 Búsqueda en bases de datos e identificación proteica

Los datos completos de MS/MS se procesaron usando la plataforma Protein Pilot (ABSciex, Framingham, MA, USA). La identificación de péptidos se llevó a cabo contra la última versión de las bases de datos Uniprot/Swissprot para *Canis familiaris*. Los parámetros de búsqueda fueron alquilación de cisteínas con MMTS y digestión con tripsina.

6. Resultados

6.1 Análisis de posibles cambios fenotípicos, en las líneas de estudio (MDCK, MDCK-HA4 y MDCK-HA11), mediante microscopía de contraste de fases.

Los resultados obtenidos (**Figura 5**) demostraron que la línea epitelial normal (MDCK) mostraba un fenotipo epitelial típico. Se aprecia la formación de colonias en monocapa, donde se establecen contactos celulares, y no aparece ninguna célula con un fenotipo fibroblástico.

Por otro lado en las líneas celulares que sobreexpresan Hakai de forma estable (Figura 1. MDCK-HA4 y MDCK-HA11), adquieren una morfología mesenquimal, poniendo de relevancia el papel de esta E3 ubiquitín ligasa en la transición epitelio-mesenquima (TEM). Las células de estas dos líneas, comienzan a disgregarse unas de otras, adquiriendo además proyecciones celulares, características de la transición hacia el fenotipo mesenquimal (fibroblástico).

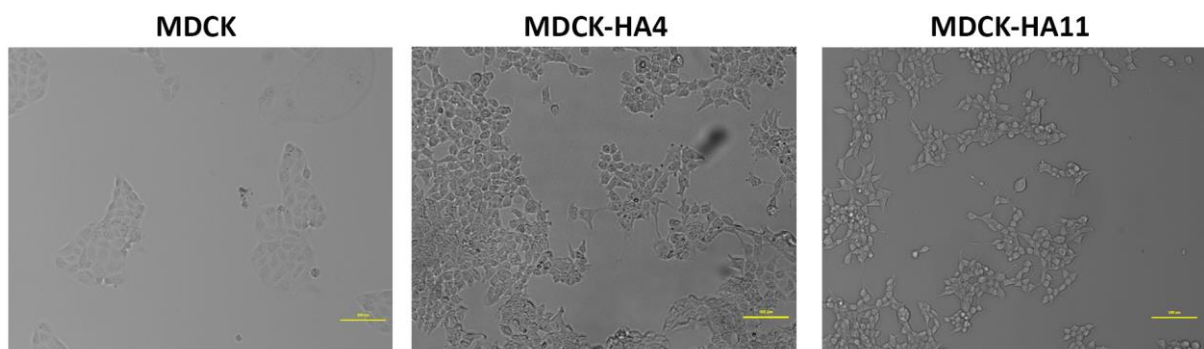


Figura 5. MDCK exhibe un fenotipo epitelial que con la sobreexpresión de Hakai (clones estables MDCK-HA4 y MDCK –HA11) cambia a fenotipo mesenquimal. Imágenes de microscopía de contraste de fases (10x). Barra de escala 100 μ m.

6.2 Determinación de la expresión diferencial de nuestra proteína de interés, Hakai, y de sus sustratos, E-Cadherina y Cortactina, en las diferentes líneas de estudio (MDCK, MDCK-HA4 y MDCK-HA11), mediante ensayo Western-Blot.

Para determinar los niveles de expresión de Hakai, y de sus sustratos, E-Cadherina y Cortactina, se llevó a cabo un ensayo Western Blot, de las líneas celulares MDCK, MDCK-HA4 Y MDCK-HA11; y se obtuvieron los siguientes resultados (**Figura 6**):

- Los niveles de expresión del sustrato de Hakai, Cortactina, se redujeron en las líneas celulares que expresan Hakai de forma estable (MDCK-HA4 y MDCK-HA11), con respecto a la línea celular epitelial normal.
- Los niveles de expresión del sustrato de Hakai y marcador de la TEM, E-Cadherina, se redujeron en las líneas celulares que expresan Hakai de forma estable (MDCK-HA4 y MDCK-HA11), con respecto a la línea celular epitelial normal (MDCK).
- Los niveles de expresión de la E3 ubiquitina-ligasa, Hakai, se vieron incrementados en las líneas que expresan Hakai de forma estable, como era de esperar.
- Como control de carga, se empleó los niveles de expresión de GAPDH, determinando que el ensayo se había llevado a cabo correctamente.

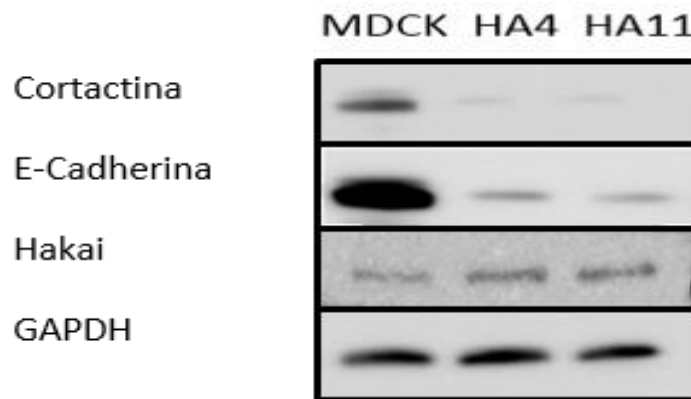


Figura 6. Niveles de expresión de los marcadores de la EMT. Se analizaron los niveles en las distintas líneas celulares de estudio (MDCK, MDCK-HA4, MDCK-HA11). Se empleó GAPDH como control de carga.

6.3 Análisis mediante inmunofluorescencia de la localización celular de E-Cadherina en las diferentes líneas celulares de estudio.

Tras la realización del ensayo de fluorescencia, los resultados obtenidos (**Figura 7**) fueron los correspondientes a la expresión y localización de E-Cadherina a nivel celular. Como se puede observar en la **Figura 7**, únicamente se observó E-Cadherina (tinción fluorescente verde) en la línea MDCK, la cual se disponía en los márgenes celulares. En cuanto a las líneas que sobreexpresaban Hakai de forma estable (HA4 y HA11), no se aprecia expresión de E-Cadherina y únicamente se observa la tinción basal de los núcleos (DAPI).

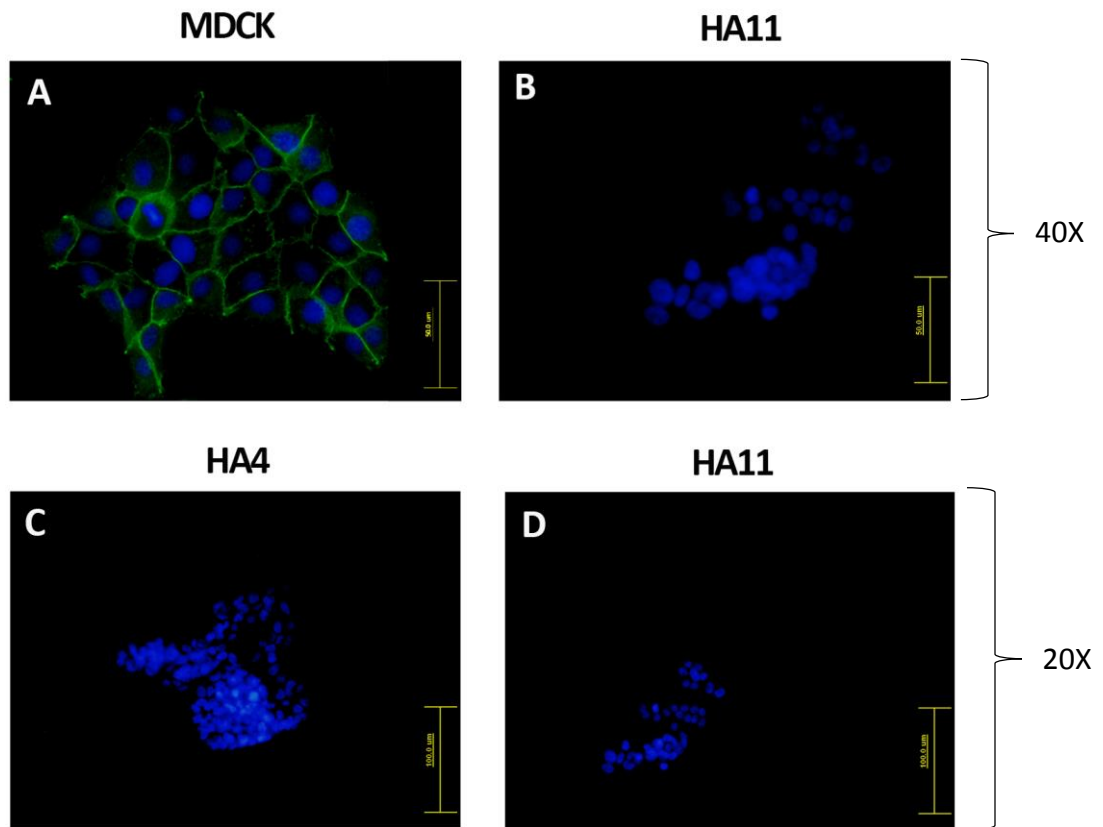


Figura 7. Inmunofluorescencia para E-Cadherina de las líneas MDCK, HA4 y HA11. La imagen A se corresponde con la línea MDCK, en ella se observa la E-Cadherina en verde, localizada en los bordes citoplasmáticos y el núcleo en azul. Las imágenes B, C y D se corresponden con las líneas HA11, HA4 y HA11, respectivamente. En ninguna de ellas se observa E-Cadherina dado que ha sido sustrato de la acción de Hakai, sobreexpresado en estas líneas.

6.4 Análisis proteómico diferencial de proteínas expresadas en líneas epiteliales que sobreexpresan Hakai de forma estable (MDCK-HA4 y MDCK-HA11) con líneas epiteliales normales MDCK.

El análisis proteómico, se basó en la utilización del método de marcaje iTRAQ (Isobaric Tags for Relative and Absolute Quantitation). Este tipo de marcaje se fundamenta en la utilización de unos reactivos de marcaje isotópico “*isobaric tags*” que nos permitirán realizar una cuantificación relativa de los distintos péptidos en las diferentes condiciones de análisis tras su ionización en un espectrómetro MS/MS. Los kits para realizar este tipo de marcaje nos permiten analizar 4 u 8 condiciones. En concreto, para este estudio, se ha utilizado la versión de análisis de 4 condiciones (iTRAQ Reagent application kit), aportada por AB Sciex (**Figura 8**).

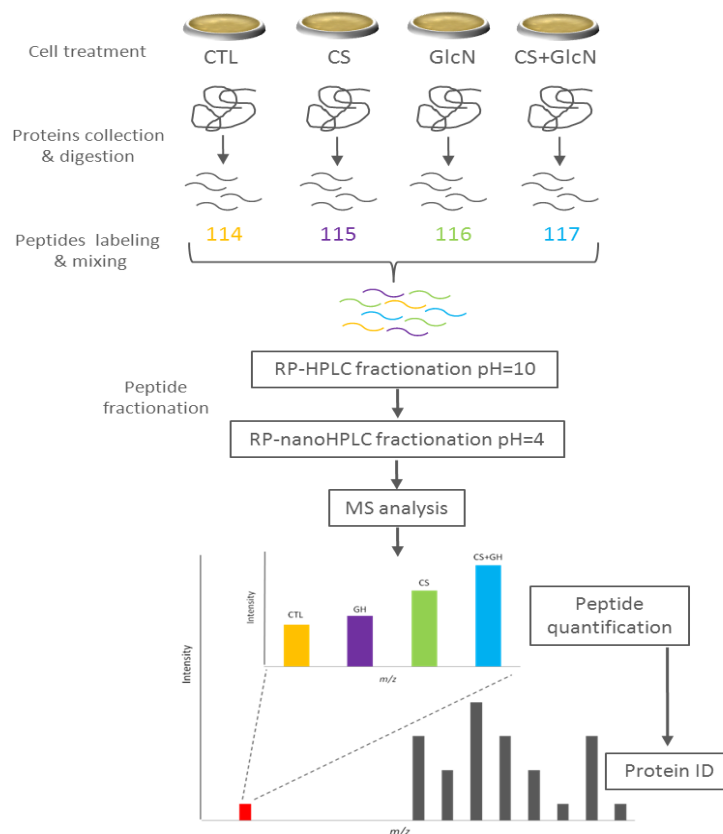


Figura 8. Flujo de trabajo llevado a cabo en el estudio proteómico (Calamia et al. 2014). Se toman 4 condiciones de partida, se obtiene los extractos proteicos correspondientes y se procede a la digestión en sus péptidos constituyentes, que ya pueden ser marcados. Una vez, marcadas cada muestra de cada condición, se pueden juntar y continuar con una única mezcla de reacción, lo que aumenta la eficiencia del proceso. A partir de ahí se procede al fraccionamiento de la muestra y a su análisis en un espectrómetro de MS/MS. para el posterior análisis de los datos obtenidos.

Lo que va a caracterizar a los reactivos de marcaje isotópico o “*isobaric tags*” es que van a estar constituidos por tres grupos peptídicos (**Figura 9**) con distinta función (Zieske 2006):

- Grupo reactivo: grupo derivado de la N-hidroxisuccimida, capaz de reaccionar con el extremo N-terminal y con las cadenas laterales de lisina, de todos los péptidos que se van a marcar.
- Grupo reportero: grupo derivado de la N- metilpiperacina que presenta una relación m/z que va de 114,1 a 117,1 Da. De esta forma se va a marcar cada condición con uno de estos marcadores isotópicos.
- Grupo compensador: compensa la diferencia que presentan entre sí los diferentes grupos reporteros, por lo que su masa va de 28 a 31 Da. De esta manera, la masa de la región isobárica de todos los reactivos se mantiene constante, siendo de 145 Da.

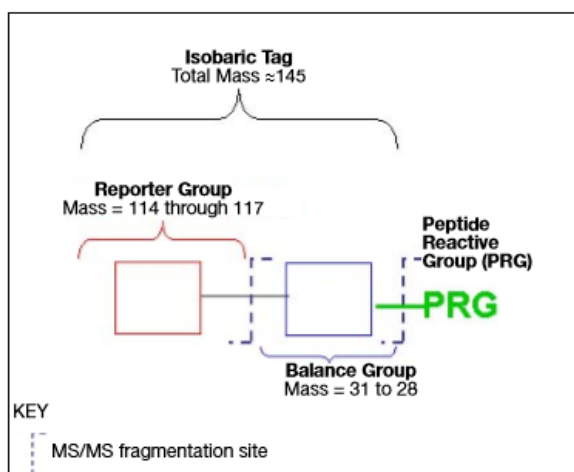


Figura 9. Grupos peptídicos de un *Isobaric Tag*.

Imagen extraída de Walorcyk 2008. La región roja hace referencia al grupo reportero, la región azul al grupo balanceador y la región verde al grupo reactivo. Las líneas de puntos son los puntos de fragmentación.

El grupo compensador ecualiza las masas de los distintos reactivos, de manera que la masa total de cada reactivo sea la misma. De esta manera, dado que la suma de los pesos moleculares de las tres partes de cada reactivo es constante, un péptido marcado es detectado como un pico único en el espectro MS, pero, como cada grupo reportero difiere en su peso molecular, durante la fragmentación de los péptidos marcados, los grupos reporteros se liberan de los mismos y pueden ser detectados en el espectro de MS/MS como distintos picos con una relación m/z de 113,1; 114,1; 115,1; 116,1; 117,1, utilizándolos en la cuantificación relativa de la concentración peptídica.

De esta forma, se partió de unos extractos proteicos de las líneas MDCK por duplicado (MDCK₁ y MDCK₂), MDCK-HA4 y MDCK-HA11, que previamente a su digestión se cuantificaron mediante tinción de plata (**Figura 10**). Así se pudo determinar, que la concentración proteica obtenida de cada muestra era similar e intuir además un patrón de bandeo distinto, entre las líneas que sobreexpresan Hakai de forma estable y las líneas epiteliales normales, lo que implica una constitución proteica distinta.

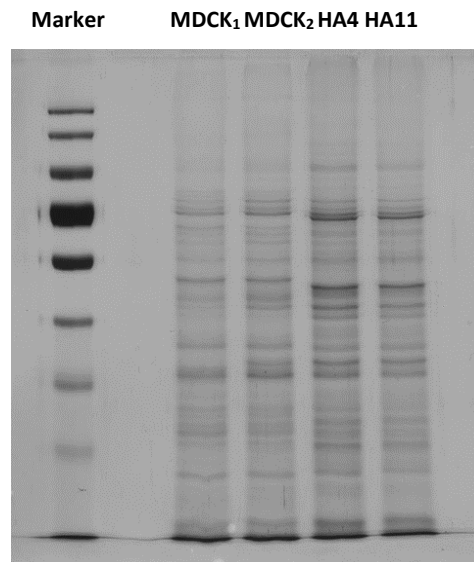


Figura 10. Expresión proteica diferencial en las líneas MDCK₁, MDCK₂, MDCK-HA4 y MDCK-HA11. 2 µg de extracto proteico fueron cargados.

Una vez corroborado que los extractos proteicos tenían una concentración equitativa se procedió a la digestión de los péptidos y al marcaje. Tras el marcaje, se realizó una comprobación, para determinar si cada línea se había marcado correctamente. Para ello, se ionizó y fragmentó en el espectrómetro de MS/MS, una muestra de cada línea marcada y se analizó si su espectro de MS/MS se correspondía con el marcaje peptídico asignado a cada línea celular. La línea MDCK₁ se marcó con el *Isobaric Tag* 114,1 y el espectro de MS/MS determinó que se había marcado correctamente (**Figura 11A**). La línea MDCK₂ se marcó con el *Isobaric Tag* 115,1 y el espectro de MS/MS determinó que se había marcado correctamente (**Figura 11B**). La línea MDCK-HA4 se marcó con el *Isobaric Tag* 116,1 y el espectro de MS/MS determinó que se había marcado correctamente (**Figura 11C**). Por último, la línea MDCK-HA11 se marcó con el *Isobaric Tag* 117,1 y el espectro de MS/MS determinó que se había marcado correctamente (**Figura 11D**).

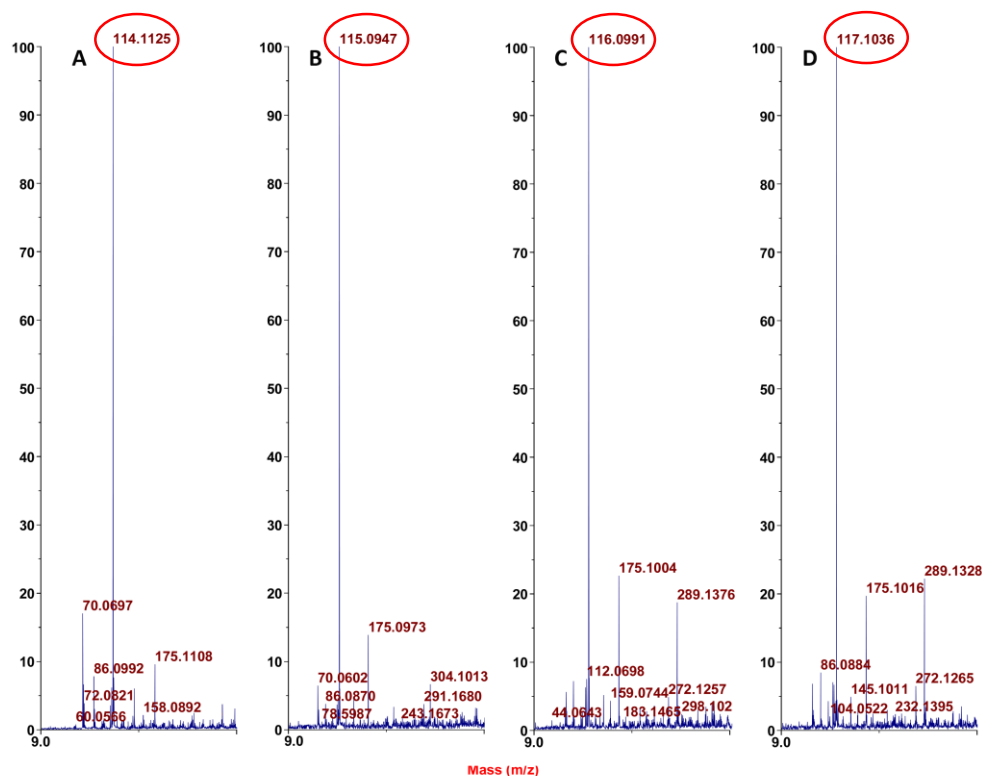


Figura 11. Imagen adaptada de los distintos espectros de MS/MS para la comprobación de los marcajes. En el eje X se representan los relación de masa/carga de cada partícula fragmentada, mientras que en el eje Y se muestra la intensidad que es variable en cada espectro. **A)** Espectro de los péptidos marcados con el *isobaric tag* 114,1 procedente del precursor 1355.83. **B)** Espectro de los péptidos marcados con el *isobaric tag* 115,1 procedente del precursor 1935.11. **C)** Espectro de los péptidos marcados con el *isobaric tag* 116,1 procedente del precursor 1819.94. **D)** Espectro de los péptidos marcados con el *isobaric tag* 117,1 procedente del precursor 1819.95.

Una vez contrastado el marcaje se pasó al fraccionamiento en el sistema HPLC y los resultados obtenidos para un total de 60 fracciones determinaron que las mayores concentraciones peptídicas se localizaron entre los minutos 30 y 60, seleccionando, en concreto las fracciones de la 20 a la 30. Posteriormente se realizó un nuevo fraccionamiento en un sistema nanoLC acoplado al espectrómetro de MS/MS y los resultados obtenidos tras la espectrometría de MS/MS se analizaron emplando diferentes bases de datos. Por un lado, se empleó una base de datos de transcriptoma de *Cannis familiaris* y por otro se enfrentó a una base de datos de proteoma de la misma especie. Los resultados obtenidos se indican a continuación:

A. Identificación de proteínas empleando una base de datos de transcriptoma.

Mediante la comparación de los datos obtenidos con la base de datos de transcriptoma se obtuvieron los siguientes resultados:

% Nivel de confianza	Proteínas detectadas	Péptidos distintos	Espectros identificados	% Espectro total
99	552	6513	12115	68
95	701	6847	12556	70.4
66	758	6955	12689	71.2

Tabla 2. Datos relativos a las proteínas identificadas mediante una base de datos de transcriptoma. Se muestran en verde los resultados más significativos.

Se consigue identificar con un 95% de confianza, 6847 péptidos distintos que constituyen un total de 701 proteínas identificadas. Para ello se identificaron en la base de datos de transcriptoma un total de 12556 espectros que se corresponde con un 70% del total de espectros existentes (**Tabla 2**).

A partir de aquí se trató de inferir en cuales de estas proteínas presentaban una expresión modulada en las líneas con sobreexpresión de Hakai (HA4 y HA11), es decir, cuales presentaban un incremento o disminución en su expresión con respecto a las líneas control (MDCK 1 y MDCK 2), en concreto muestran los resultados obtenidos de MDCK2, ya que ambos controles son duplicados y presentan ratios de expresión muy similares. Los resultados obtenidos fueron los siguientes (**Figura 12**):

- Un total de 568 (81%) proteínas no presentaban modulación o no era significativa.
- 133 (19%) proteínas presentaban modulación estadísticamente significativa, de las cuales:
 - 81 (12%) proteínas reducían su expresión en HA4 y HA11 con respecto a las líneas control MDCK1 y MDCK2.
 - 52 (7%) proteína aumentaban su expresión en HA4 y HA11 con respecto a las líneas control MDCK1 Y MDCK2.

Modulación de la expresión proteica

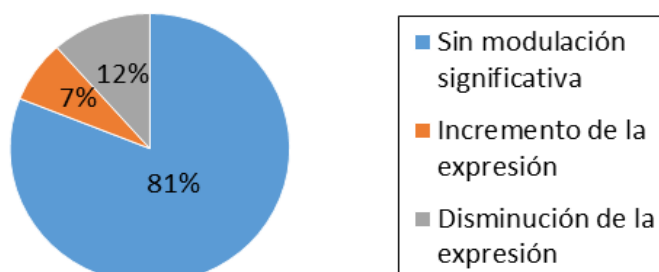


Figura 12. Modulación de la expresión proteica. La gráfica refleja los valores significativos de proteínas moduladas en las líneas MDCK-HA4 y MDCK-HA11, con respecto a la línea epitelial normal MDCK.

Por otro lado, se llevó a cabo una identificación de las partes celulares y funciones celulares de las que formaban parte las distintas proteínas, y se obtuvieron los siguientes resultados (**Figura 13 y 14**):

DISTRIBUCIÓN CELULAR PROTEICA

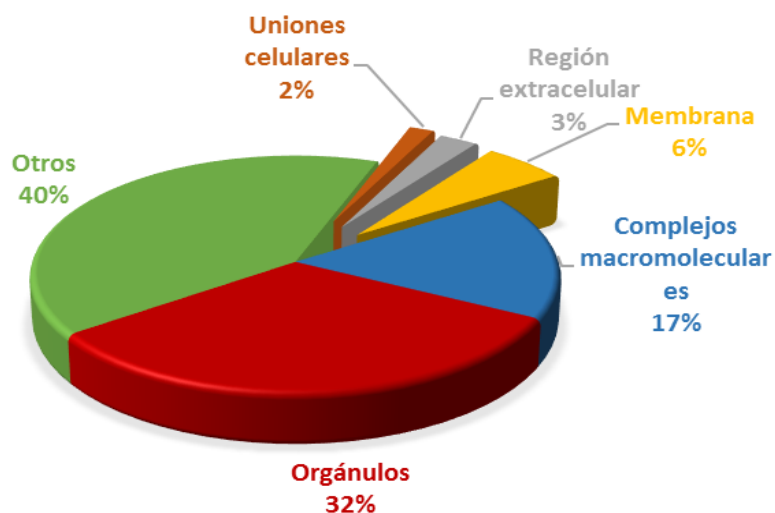


Figura 13. Distribución celular de las proteínas identificadas. Imagen adaptada a través de la utilización de la base de datos PANTHER (<http://www.pantherdb.org/>). Las principales funciones de interés para el estudio se encuentran agrupadas: **Uniones celulares**, **Región extracelular** y **Membrana**.

Funciones celulares de las proteínas

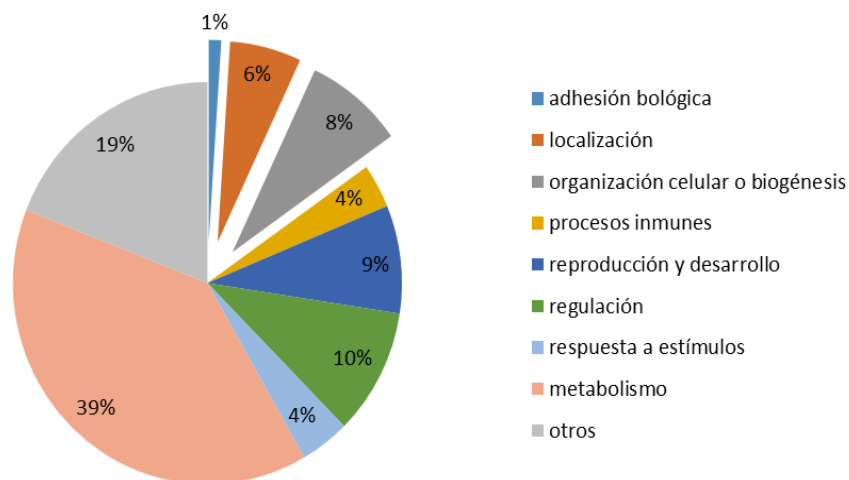


Figura 14. Distribución de las funciones de las proteínas identificadas. Imagen adaptada a través de la utilización de la base de datos PANTHER (<http://www.pantherdb.org/>) para *Canis familiaris*. Las principales funciones de interés para el estudio se encuentran agrupadas: Adhesión, Localización y Organización celular o Biogénesis .

Por último, se estudiaron las conexiones entre las distintas proteínas, y se obtuvieron los siguientes resultados (**Figura 15**):

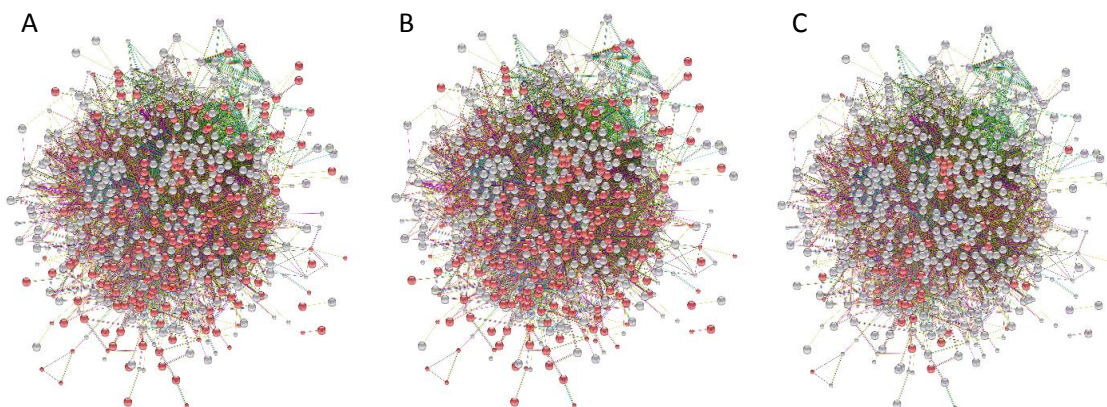


Figura 15. Red de interacción proteína-proteína. La base de datos STRING (http://string-db.org/newstring.cgi/show_network_section.pl) fue utilizada para analizar las interacciones entre las proteínas identificadas, se tomó como referencia la base genómica de *Canis lupus*. Las interacciones se producen entre los nodos (proteínas) marcadas en rojo. **A)** Hace referencia a la conexión entre las proteínas relacionadas con el la formación de **exosoma**. **B)** Hace referencia a la conexión entre proteínas relacionadas con la **región extracelular**. **C)** Hace referencia a la conexión entre las proteínas relacionadas con las uniones **adherentes**.

B. Identificación de proteínas empleando una base de datos proteómica.

Mediante la comparación de los datos obtenidos con la base de datos de proteínas validadas Uniprot/swissprot para *Cannis familiaris*, se obtuvieron los siguientes resultados:

% Nivel de confianza	Proteínas detectadas	Péptidos distintos	Espectros identificados	% Espectro total
99	75	5133	8339	46,8
95	92	5679	9048	50,8
66	104	6252	9728	54,6

Tabla 3. Datos relativos a las proteínas identificadas mediante una base de datos de proteómica. Se muestran en verde, los valores más significativos.

Se consigue identificar con un 95% de confianza, 5679 péptidos distintos que constituyen un total de 92 proteínas identificadas. Para ello se identificaron en la base de datos de proteoma un total de 9048 espectros que se corresponde con un 50% del total de espectros existentes (**tabla3**). Como se puede observar el número de espectros identificados, así como el número de péptidos y proteínas identificados es menor que cuando la comparación se hizo con respecto a la base de datos de transcriptoma. Esto se debe a que la base de datos de proteoma tiene menor número de información, pero en todos los casos se tratan de proteínas validadas para nuestra especie (*Cannis familiaris*). Sin embargo la base de datos de transcriptoma almacena información de secuencias peptídicas que constituyen proteínas sin validar, de ahí que la información sea mayor. De nuevo a partir de estos datos se investigó la modulación de la expresión proteica en las líneas con sobreexpresión de Hakai (HA4 y HA11) con respecto a las líneas control (MDCK1 y MDCK2) en concreto a MDCK2, ya que ambos controles presentan ratios de expresión similares. Los resultados obtenidos fueron los siguientes (**Figura 16**):

- Un total de 29 (31%) proteínas no presentaban modulación o no era significativa.
- 63 (69%) proteínas presentaban modulación estadísticamente significativa, de las cuales:
 - 42 (46%) proteínas reducían su expresión en HA4 y HA11 con respecto a las líneas control MDCK2.
 - 21 (23%) proteínas aumentaban su expresión en HA4 y HA11 con respecto a las líneas control MDCK2.

Uno de los ejemplos de modulación mas representativos, fue el que se correspondía con una proteína de estrés oxidativo muy relevante. Dicha proteína presentaba unos valores de expresión en las líneas MDCK-HA4 y MDCK-HA11, hasta 35 veces superiores a los presentados en la línea epitelial normal, MDCK, y con una significancia muy alta (**tabla 4**). Además estos valores fueron contrastados en la base de datos de transcriptoma, obteniendo resultados muy similares.

Proteína implicada en estrés oxidativo	Péptidos (95%)	HA4: MDCK	pValor HA4:MDCK	HA11: MDCK	pValor HA11: MDCK
Proteína 1	77	35,3	0,0006	36,9	0,0005

Tabla 4. Modulación de una proteína relacionada con el estrés oxidativo en las líneas epiteliales que expresan Hakai de forma estable (MDCK-HA4 y MDCK-HA11). La tabla muestra como esta proteína, para la cual se identificaron hasta 77 péptidos, presenta en las líneas HA4 y HA11 un incremento de la expresión de hasta 35 veces más y con un elevado grado de significancia (pValor significativo < 0,05).

Modulación de la expresión proteica

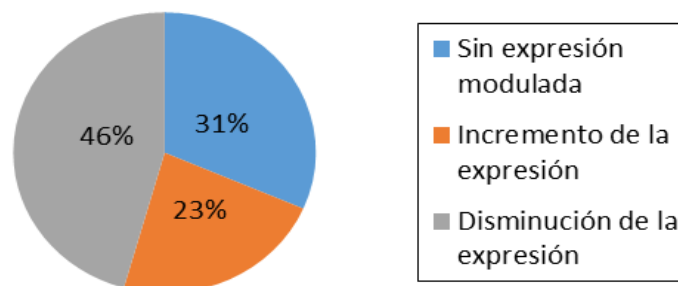


Figura 16. Modulación de la expresión proteica. La gráfica refleja los valores significativos de proteínas moduladas en las líneas MDCK-HA4 y MDCK-HA11, con respecto a la línea epitelial normal MDCK.

Por otro lado, se llevó a cabo una identificación de las partes celulares (**Figura 17**) y funciones celulares (**Figura 18**) de las que formaban parte las distintas proteínas, y se obtuvieron los siguientes resultados:

DISTRIBUCIÓN CELULAR DE LAS PROTEÍNAS

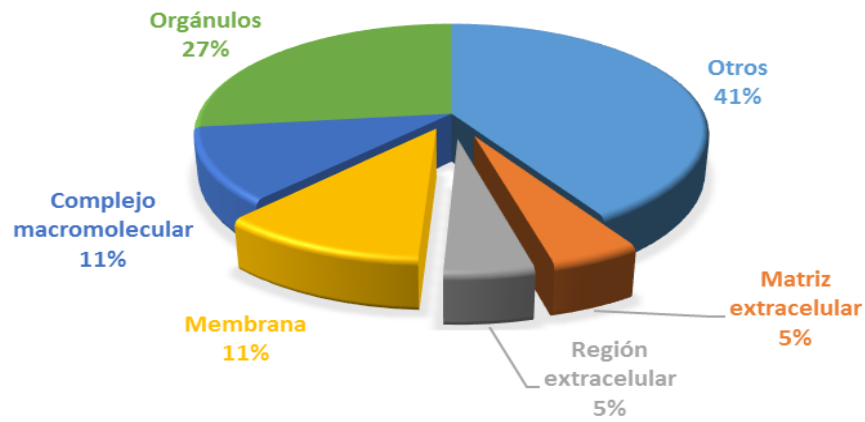


Figura 17. Distribución celular de las proteínas identificadas. Imagen adaptada a través de la utilización de la base de datos PANTHER (<http://www.pantherdb.org/>). para *Cannis familiaris*. Las principales funciones de interés para el estudio se encuentran agrupadas: **Membrana**, **Región extracelular** y **Matriz extracelular**.

FUNCIONES CELULARES DE LAS PROTEÍNAS

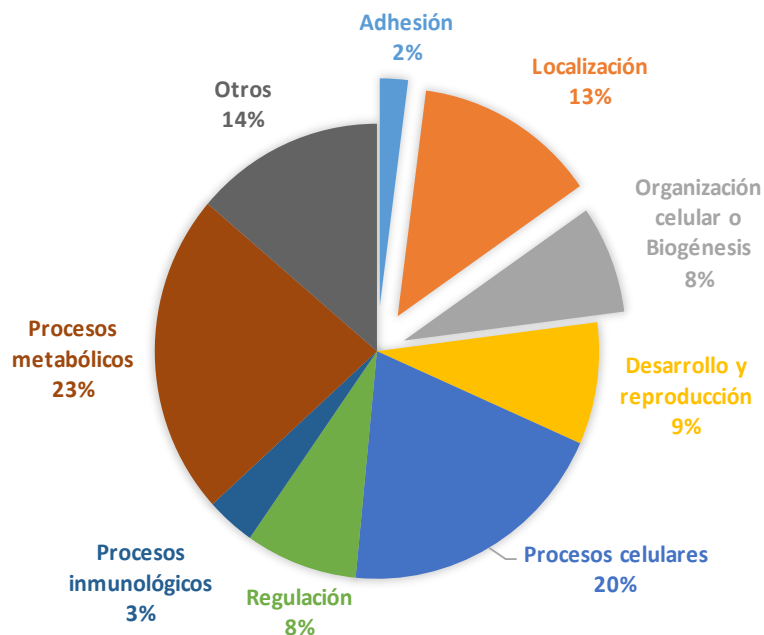


Figura 18. Distribución de las funciones de las proteínas identificadas. Imagen adaptada a través de la utilización de la base de datos PANTHER (<http://www.pantherdb.org/>). para *Cannis familiaris*. Las principales funciones de interés para el estudio se encuentran agrupadas: **Adhesión**, **Localización** y **Organización celular o Biogénesis**.

Por último, se estudiaron las conexiones entre las distintas proteínas, y se obtuvieron los siguientes resultados (**Figura 19**):

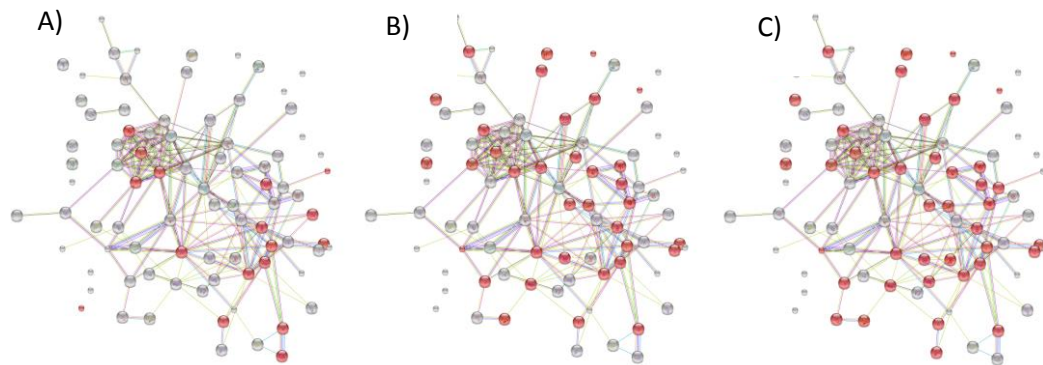


Figura 19. Red de interacción proteína-proteína. La base de datos STRING (http://string-db.org/newstring.cgi/show_network_section.pl) fue utilizada para analizar las interacciones entre las proteínas identificadas, se tomó como referencia la base de datos genómica para *Canis lupus*. Las interacciones se producen entre los nodos (proteínas) marcadas en rojo. **A)** Hace referencia a la conexión entre las proteínas relacionadas con las **uniones adherentes**. **B)** Hace referencia a la conexión entre las proteínas relacionadas con el la formación de **exosoma**. **C)** Hace referencia a la conexión entre proteínas relacionadas con la **región extracelular**.

7. Discusión

A lo largo de este estudio se ha tratado de incurrir, en cómo, Hakai fomenta la TEM, a través de la pérdida de la E-Cadherina constituyente de las uniones adherentes en las células epiteliales. Para ello, en primer lugar, se realizó un análisis de los posibles cambios fenotípicos, en las líneas de estudio (MDCK, MDCK-HA4 y MDCK-HA11), mediante microscopía de contraste de fases. Ahí se pudo determinar cómo en las líneas que sobreexpresan Hakai, las células se disgregan y modifican su morfología hacia un fenotipo fibroblástico (**Figura 5**), poniendo de relevancia, como se demostró previamente (*Figueroa et al.*, 2009 y *Rodríguez-Rigueiro et al.* 2011), el papel de esta E3 ubiquitina-ligasa en la transición epitelio-mesénquima (TEM). En la **figura 5**, en concreto en las imágenes correspondientes a las líneas HA4 y HA11, se puede observar la formación de unas prolongaciones que recuerdan a los pseudópodos, invadopodios o podosomas, que pueden estar asociados a la deslocalización de la cortactina a los márgenes celulares. Este tipo de prolongación promueve la invasión-degradación de la matriz extracelular, en procesos *in vivo*, de las células tumorales en crecimiento, fomentando así su movilidad para atacar tejidos nuevos, tal y como se explica en *Kirkbride et al.* (2011).

Como ya se ha comentado a lo largo del trabajo, la Cortactina, al igual que la E-Cadherina, han sido identificadas como sustratos de Hakai. En concreto, en los estudios de *Mukherjee et al* y *Fujita et al.* (2002), se pone de manifiesto como ambas proteínas son dianas de la acción de Hakai, que mediante su función como E3 ubiquitina-ligasa promueve su degradación vía lisosoma. Este hecho ha podido ser contrastado, a partir de los ensayos de western blot, (**Figura 6**), donde se muestra una reducción significativa en la expresión tanto de Cortactina, como de E-Cadherina en las líneas que sobreexpresan Hakai. Por otro lado, en esta figura también se confirma el incremento de la expresión de Hakai. También se han podido contrastar a partir de los ensayos de inmunofluorescencia (**Figura 7**). En concreto, se ha podido determinar mediante este ensayo, la reducción de los niveles de E-Cadherina en las líneas que sobreexpresan Hakai, lo que sustenta el hecho de que esta proteína constituyente de las uniones adherentes es un sustrato de Hakai.

La mayoría de las muertes por cáncer son el resultado de la metástasis que en general es reticente a cualquier forma de terapia disponible. En la actualidad todavía se está luchando para entender las causas subyacentes de la metástasis y de cómo la TEM puede derivar en un proceso metastásico en tejidos distantes. Dado que Hakai se ha propuesto como una diana terapéutica contra el cáncer, en este estudio quisimos identificar nuevas

dianas para esta E3 ubiquitin-ligasa mediante análisis proteómico. En los resultados obtenidos a través de la identificación de proteínas (tanto con la utilización de una base de datos del transcriptoma como para una base de datos de proteoma) y la utilización de los programas PANTHER y STRING, se pudieron encontrar las siguientes apreciaciones.

La utilización del software PANTHER (<http://www.pantherdb.org/>) nos permitió, por un lado, demostrar el gran número de proteínas identificadas que se encuentran reguladas por la sobreexpresión de Hakai. De esta forma se muestran proteínas de localizaciones celulares (**Figuras 13 y 17**), donde la TEM tiene mayor incidencia (uniones celulares, membrana celular), así como funciones celulares (**Figuras 14 y 18**), con mayor incidencia en este proceso (adhesión, organización y biogénesis, localización y procesos inmunes), lo que continúa apoyando la función de Hakai en la TEM.

Por otro lado este software nos aportó información acerca del gran número de proteínas implicadas en procesos extracelulares. En un primer momento, este dato parecía carecer de relevancia, pero la utilización del software STRING (http://string-db.org/newstring.cgi/show_network_section.pl) (**Figuras 15 y 19**), mostró que un gran porcentaje de las proteínas identificadas tenían relación directa con los exosomas, lo que dio pie a deducir que ambos datos podrían estar relacionados. La forma en la que los exosomas pueden estar implicados en los procesos cancerígenos, en la TEM y en la metástasis, es uno de los temas más candentes en la actualidad referente a este campo.

Los exosomas consisten en pequeñas microvesículas de membrana rodeadas por una bicapa lipídica, que carecen de orgánulos celulares y tienen un escaso citosol. Su composición es variable en función de las moléculas constituyentes de su célula de origen (casi todos los tipos celulares), incluyendo proteínas y ácidos nucleicos (todos los tipos de ARN y miARNs). Los exosomas se corresponden con las vesículas intraluminales de los cuerpos multivesiculares (CMVs), resultantes de la fusión y maduración de endosomas tempranos. Los CMVs se fusionan con la membrana plasmática, lo que resulta en la exocitosis de las vesículas contenidas, es decir los exosomas (*Campanella et al. 2014*). En cuanto a su función, actúan como elementos móviles que dan lugar a mecanismos de intercambio celular de proteínas y miRNAs (algunos de los cuales pueden ser promotores de vías metastásicas) de una célula a lugares distantes (*Camacho, Guerrero y Marchetti 2013*).

Diversos estudios han mostrado la relevancia de los exosomas en la TEM y en procesos metastásicos. Por ejemplo, *Roccaro et al. (2013)*, demostraron como los exosomas liberados de células mesenquimales derivadas de médula ósea marrón, eran

capaces de inducir el mieloma múltiple (MM) en un modelo animal (Roccaro et al. 2013). Se demostró que la promoción del MM se regía por la acción de los miARNs móviles de un exosoma concreto sobre células distantes, promoviendo la TEM. En cuanto a la metástasis, Grange et al. (2011) mostraron que los exosomas liberados de células renales pueden promover la angiogénesis en la ascitis de cáncer de pulmón (Grange et al. 2011). Por otro lado, Rana et al. (2013) investigaron cómo exosomas derivados de tumores inducen en determinados tejidos del huésped, la transformación hacia el fenotipo pro-metastásico (Rana, Malinowska y Zöller 2013). En este estudio, se demostró que los exosomas tumorales, se dirigían a las células no transformadas en órganos pre-metastásicos, y una vez allí, eran capaces de modular estas células a través de miRNAs transferidos. Además, se demostró que los miRNAs liberados tenían como diana, moléculas implicadas en la promoción de vías metastásicas, como por ejemplo: proteasas, moléculas de adhesión, ligandos de quimioquinas, genes que promueven el ciclo-celular y la angiogénesis, y los genes que participan en la respuesta al estrés oxidativo. Este último punto resulta muy interesante, dado que los resultados obtenidos en el presente trabajo muestran una expresión super-modulada en las líneas MDCK-HA4 y MDCK-HA11, con respecto a MDCK de una proteína implicada en el estrés oxidativo y relacionada con los exosomas (**Tabla 4**). Estos datos se contrastaron a partir la base de datos Uniprot/Swissprot, la cual utiliza secuencias de proteínas validadas de forma oficial.

Al parecer como explica Campenella et al. (2014), la liberación de proteínas relacionadas con el estrés oxidativo a través de exosomas, puede dar lugar al incremento del proceso carcinogénico, fomentando la movilidad de las células tumorales o la evasión de vías citotóxicas efectivas que puedan interrumpir la expansión tumoral (Campenella et al. 2014). De esta forma los resultados obtenidos en el presente trabajo apoyan esta idea, ya que se muestra un amplio incremento de la expresión, en las líneas con previsible actividad metastásica (MDCK-HA4 y MDCK-HA11), de una proteína implicada en estrés oxidativo más importante (**Tabla 4**); y al mismo tiempo se muestran un gran número de proteínas implicadas en la formación de exosomas, pudiendo por tanto relacionar ambos fenómenos.

Con este trabajo hemos contribuido a una mayor comprensión sobre el mecanismo de acción de Hakai durante la TEM y el descubrimiento de nuevas vías de señalización de esta E3-ubiquitín ligasa. Gracias a los resultados obtenidos, futuras investigaciones se podrán orientar en esta última dirección, teniendo en cuenta, sobre todo, el papel de los exosomas y las proteínas de estrés oxidativo en la regulación de Hakai.

8. Conclusiones

1. La E3 ubiquitina-ligasa, Hakai, tiene un papel fundamental en la transición epitelio mesenquimal (TEM), fomentando la degradación de la E-Cadherina constituyente de las uniones adherentes y promoviendo la degradación de la proteína citoesquelética Cortactina.
2. Los resultados proteómicos han determinado una posible asociación entre Hakai, la TEM, el estrés oxidativo y la formación de exomas. Esto abre futuras vías de investigación con respecto a este tema.

9. Agradecimientos

En primer lugar, me gustaría agradecer a mi tutora, Angélica, la oportunidad de incorporarme a su grupo de investigación y, sobre todo, su dedicación y atención a la hora de formarme como investigador, así como su disponibilidad para la solución de cualquier inconveniente surgido. Además, darle las gracias por permitirme abordar un campo tan interesante y enriquecedor como el tratado en el presente trabajo.

Por otro lado, agradecer a Raquel, su entera disposición para enseñarme como se debe de trabajar en un laboratorio, como llevar a cabo la mayoría de los procesos experimentales que se han realizado, a solucionarme muchas de las “chapuzas” que he hecho a lo largo de todo este tiempo y sobre todo, a tratarme tan bien desde el primer día. Además agradecer también a todo el grupo de Onco, a Isa y a Moi, por tratarme como uno más y por estar ahí cuando he necesitado su ayuda.

Agradecer a Valentina todo lo que me ha enseñado acerca de la proteómica, así como su disposición en todo momento a formarme en todo aquello que fuese necesario o sobre lo que me gustaría indagar. Además, resaltar su instinto docente y altruista, y sus ganas por tratar de darme en todo momento una visión más “pormenorizada” de la proteómica.

Agradecer al INIBIC en su conjunto la oportunidad de llevar a cabo mi formación en sus instalaciones y con sus trabajadores.

En último lugar, y no menos relevante, agradecer a toda mi familia su apoyo en todo momento y permitirme conseguir aquello que me propongo, y sobre todo, a mi novia, sin la cual no sería capaz de conseguir muchos de mis objetivos, por estar ahí siempre, y por ayudarme con sus conocimientos de photoshop a desarrollar varios de los aspectos de este trabajo.

10. Bibliografía

APARICIO, L.A., VALLADARES, M., BLANCO, M., ALONSO, G. y FIGUEROA, A. 2012. Biological influence of Hakai in cancer: a 10-year review. *Cancer and Metastasis Reviews*, vol. 31, no. 1-2, pp. 375-386. ISSN 0167-7659, 1573-7233. DOI 10.1007/s10555-012-9348-x.

BRASCH, J., HARRISON, O.J., HONIG, B. y SHAPIRO, L. 2012. Thinking outside the cell: how cadherins drive adhesion. *Trends in Cell Biology*, vol. 22, no. 6, pp. 299-310. ISSN 09628924. DOI 10.1016/j.tcb.2012.03.004.

CAMACHO, L., GUERRERO, P. y MARCHETTI, D. 2013. MicroRNA and Protein Profiling of Brain Metastasis Competent Cell-Derived Exosomes. En: P. RAMESHWAR (ed.), *PLoS ONE*, vol. 8, no. 9, pp. e73790. ISSN 1932-6203. DOI 10.1371/journal.pone.0073790.

CAMPANELLA, C., BAVISOTTO, C.C., GAMMAZZA, A.M., NIKOLIC, D., RAPPA, F., DAVID, S., CAPPELLO, F., BUCCHIERI, F. y FAIS, S. 2014. Exosomal Heat Shock Proteins as New Players in Tumour Cell-to-cell Communication. *Journal of Circulating Biomarkers*, pp. 1. ISSN 1849-4544. DOI 10.5772/58721.

FIGUEROA, A., FUJITA, Y. y GOROSPE, M. 2009. Hacking RNA: Hakai promotes tumorigenesis by switching on the RNA-binding function of PSF. En: PMID: 19855157PMCID: PMC2808762, *Cell cycle (Georgetown, Tex.)*, vol. 8, no. 22, pp. 3648-3651. ISSN 1538-4101.

FIGUEROA, A., KOTANI, H., TODA, Y., MAZAN-MAMCZARZ, K., MUELLER, E.-C., OTTO, A., DISCH, L., NORMAN, M., RAMDASI, R.M., KESHTGAR, M. y OTHERS 2009. Novel roles of hakai in cell proliferation and oncogenesis. *Molecular biology of the cell*, vol. 20, no. 15, pp. 3533-3542.

FUJITA, Y., KRAUSE, G., SCHEFFNER, M., ZECHNER, D., LEDDY, H.E.M., BEHRENS, J., SOMMER, T. y BIRCHMEIER, W. 2002. Hakai, a c-Cbl-like protein, ubiquitinates and induces endocytosis of the E-cadherin complex. En: PMID: 11836526, *Nature Cell Biology*, vol. 4, no. 3, pp. 222-231. ISSN 1465-7392. DOI 10.1038/ncb758.

GRANGE, C., TAPPARO, M., COLLINO, F., VITILLO, L., DAMASCO, C., DEREGIBUS, M.C., TETTA, C., BUSSOLATI, B. y CAMUSSI, G. 2011. Microvesicles Released from Human Renal Cancer Stem Cells Stimulate Angiogenesis and Formation of Lung Premetastatic Niche. *Cancer Research*, vol. 71, no. 15, pp. 5346-5356. ISSN 0008-5472, 1538-7445. DOI 10.1158/0008-5472.CAN-11-0241.

HEERBOTH, S., HOUSMAN, G., LEARY, M., LONGACRE, M., BYLER, S., LAPINSKA, K., WILLBANKS, A. y SARKAR, S. 2015. EMT and tumor metastasis. *Clinical and Translational Medicine* [en línea], vol. 4, no. 1. [Consulta: 8 mayo 2015]. ISSN 2001-1326. DOI 10.1186/s40169-015-0048-3. Disponible en: <http://www.clintransmed.com/content/4/1/6>.

HIRAKAWA 2009. Localization of cortactin is associated with colorectal cancer development. *International Journal of Oncology* [en línea], vol. 35, no. 06. [Consulta: 27

mayo 2015]. ISSN 10196439. DOI 10.3892/ijo_00000444. Disponible en: <http://www.spandidos-publications.com/ijo/35/6/1271>.

KIRKBRIDE, K.C., SUNG, B.H., SINHA, S. y WEAVER, A.M. 2011. Cortactin: A multifunctional regulator of cellular invasiveness. *Cell Adhesion & Migration*, vol. 5, no. 2, pp. 187-198. ISSN 1933-6918, 1933-6926. DOI 10.4161/cam.5.2.14773.

KOWALCZYK, A.P. y NANES, B.A. 2012. Adherens Junction Turnover: Regulating Adhesion Through Cadherin Endocytosis, Degradation, and Recycling. En: T. HARRIS (ed.), *Adherens Junctions: from Molecular Mechanisms to Tissue Development and Disease* [en línea]. Dordrecht: Springer Netherlands, pp. 197-222. [Consulta: 22 mayo 2015]. ISBN 978-94-007-4185-0, 978-94-007-4186-7. Disponible en: http://link.springer.com/10.1007/978-94-007-4186-7_9.

LILIENTAL, J. y CHANG, D.D. 1998. Rack1, a receptor for activated protein kinase C, interacts with integrin β subunit. *Journal of Biological Chemistry*, vol. 273, no. 4, pp. 2379-2383.

MUKHERJEE, M., CHOW, S.Y., YUSOFF, P., SEETHARAMAN, J., NG, C., SINNIAH, S., KOH, X.W., ASGAR, N.F.M., LI, D., YIM, D., JACKSON, R.A., YEW, J., QIAN, J., IYU, A., LIM, Y.P., ZHOU, X., SZE, S.K., GUY, G.R. y SIVARAMAN, J. 2012. Structure of a novel phosphotyrosine-binding domain in Hakai that targets E-cadherin. En: PMID: 22252131PMCID: PMC3298002, *The EMBO Journal*, vol. 31, no. 5, pp. 1308-1319. ISSN 0261-4189. DOI 10.1038/emboj.2011.496.

PALACIOS, F., TUSHIR, J.S., FUJITA, Y. y D'SOUZA-SCHOREY, C. 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*, vol. 25, no. 1, pp. 389-402. ISSN 0270-7306. DOI 10.1128/MCB.25.1.389-402.2005.

<http://www.pantherdb.org/>

RANA, S., MALINOWSKA, K. y ZÖLLER, M. 2013. Exosomal Tumor MicroRNA Modulates Premetastatic Organ Cells. *Neoplasia*, vol. 15, no. 3, pp. 281-293. ISSN 14765586. DOI 10.1593/neo.122010.

ROCCARO, A.M., SACCO, A., MAISO, P., AZAB, A.K., TAI, Y.-T., REAGAN, M., AZAB, F., FLORES, L.M., CAMPIGOTTO, F., WELLER, E., ANDERSON, K.C., SCADDEN, D.T. y GHOBRIAL, I.M. 2013. BM mesenchymal stromal cell-derived exosomes facilitate multiple myeloma progression. *Journal of Clinical Investigation*, vol. 123, no. 4, pp. 1542-1555. ISSN 0021-9738. DOI 10.1172/JCI66517.

RODRÍGUEZ-RIGUEIRO, T., VALLADARES-AYERBES, M., HAZ-CONDE, M., APARICIO, L.A. y FIGUEROA, A. 2011. Hakai reduces cell-substratum adhesion and increases epithelial cell invasion. *BMC cancer*, vol. 11, no. 1, pp. 474.

http://string-db.org/newstring.cgi/show_network_section.pl

SUN, C., SONG, C., MA, Z., XU, K., ZHANG, Y., JIN, H., TONG, S., DING, W., XIA, G. y DING, Q. 2011. Periostin identified as a potential biomarker of prostate cancer by iTRAQ-proteomics analysis of prostate biopsy. *Proteome Sci*, vol. 9, pp. 22.

TSAI, J.H. y YANG, J. 2013. Epithelial–mesenchymal plasticity in carcinoma metastasis. En: PMID: 24142872PMCID: PMC3814640, *Genes & Development*, vol. 27, no. 20, pp. 2192-2206. ISSN 0890-9369. DOI 10.1101/gad.225334.113.

XU, X.-Z., GARCIA, M.V., LI, T., KHOR, L.-Y., GAJAPATHY, R.S., SPITTLE, C., WEED, S., LESSIN, S.R. y WU, H. 2010. Cytoskeleton alterations in melanoma: aberrant expression of cortactin, an actin-binding adapter protein, correlates with melanocytic tumor progression. *Modern Pathology*, vol. 23, no. 2, pp. 187–196.

ZEISBERG, M. y NEILSON, E.G. 2009. Biomarkers for epithelial-mesenchymal transitions. *Journal of Clinical Investigation*, vol. 119, no. 6, pp. 1429-1437. ISSN 0021-9738. DOI 10.1172/JCI36183.

ZHOU, W.-J., GENG, Z.H., CHI, S., ZHANG, W., NIU, X.-F., LAN, S.-J., MA, L., YANG, X., WANG, L.-J., DING, Y.-Q. y OTHERS 2011. Slit-Robo signaling induces malignant transformation through Hakai-mediated E-cadherin degradation during colorectal epithelial cell carcinogenesis. *Cell research*, vol. 21, no. 4, pp. 609–626.

ZIESKE, L.R. 2006. A perspective on the use of iTRAQ™ reagent technology for protein complex and profiling studies. *Journal of Experimental Botany*, vol. 57, no. 7, pp. 1501-1508. ISSN 0022-0957, 1460-2431. DOI 10.1093/jxb/erj168.